

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 480**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/42** (2006.01)  
**A61K 31/255** (2006.01)  
**A61K 31/155** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2009 PCT/EP2009/055176**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133128**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09738172 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2285374**

54 Título: **Composiciones de combinación para tratar la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados con zonisamida y acamprosato**

30 Prioridad:

**29.04.2008 US 48582 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.06.2020**

73 Titular/es:

**IMPACT COATINGS AB (100.0%)  
Westmansgatan 29  
582 16 Linköping, SE**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
CHUMAKOV, ILYA;  
NABIROCHKIN, SERGUEI;  
GUERASSIMENKO, OXANA y  
CHOLET, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 764 480 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

Composiciones de combinación para tratar la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados con zonisamida y acamprosato

La presente invención se refiere a composiciones y su uso para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA).

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

La incidencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta drásticamente con la edad. La EA es actualmente la causa más común de demencia. Se caracteriza clínicamente por una disminución global de la función cognitiva que progresa lentamente y deja a los pacientes en etapa terminal en cama, incontinentes y dependientes de la ayuda a la autonomía personal. La muerte ocurre, como media, 9 años después del diagnóstico (5).

15 La tasa de incidencia de la EA aumenta drásticamente con la edad. Las proyecciones de población de Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se acercará a 370 millones en el año 2050. Actualmente, se calcula que 50% de las personas mayores de 85 años padecen la EA. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 50 años. El vasto número de personas que requieren cuidado constante y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, monetarios y humanos (6).

20 El deterioro de la memoria es la característica temprana de la enfermedad e implica memoria episódica (memoria para los sucesos del día a día). Más tarde está implicada la memoria semántica (memoria para el significado verbal y visual) en la enfermedad. En cambio, la memoria de trabajo (la memoria a corto plazo que implica estructuras y procesos usados para el almacenamiento y manipulación de la información temporalmente) y memoria de procedimiento (memoria inconsciente que es memoria a largo plazo de habilidades y procedimiento) se conservan hasta tarde. A medida que la enfermedad progresa, surgen las características adicionales del deterioro del lenguaje, deficiencias de percepción visual y espacial, agnosias y apraxias.

25 La imagen clásica de la enfermedad de Alzheimer es suficientemente característica para permitir la identificación en aproximadamente 80% de los casos (7). No obstante, se produce heterogeneidad clínica y esto no solo es importante para la gestión clínica, sino que proporciona mayor implicación de tratamientos de medicación específicos para formas funcionalmente diferentes. (8).

30 La característica distintiva patológica de la EA incluye placas amiloides que contienen beta-amiloide (Abeta), ovillos neurofibrilares (NFT) que contienen Tau y disfunción y pérdida neuronal y sináptica (9-11). Durante la última década, se han propuesto dos hipótesis principales sobre la causa de la EA: la "hipótesis de la cascada de amiloide", que establece que el proceso neurodegenerativo es una serie de sucesos desencadenados por el procesamiento anormal de la proteína precursora de amiloide (APP) (12), y la "hipótesis de la degeneración citoesquelética neuronal" (13), que propone que los cambios citoesqueléticos son los sucesos desencadenantes. La teoría más ampliamente aceptada que explica el progreso de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada de amiloide (14-16) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en determinar los mecanismos que subyacen en la toxicidad asociada con proteínas Abeta. Al contrario, la proteína Tau ha recibido mucha menos atención de la industria farmacéutica que el amiloide, por problemas tanto fundamentales como prácticos. Además, el cambio de densidad sináptica es la lesión patológica que se correlaciona mejor que los otros dos con el deterioro cognitivo. Estudios han puesto de manifiesto que parece que la patología amiloide progresa de una forma específica de los neurotransmisores donde los terminales colinérgicos parecen los más vulnerables, seguido de los terminales glutaminérgicos y finalmente los terminales GABAérgicos (11). Lee et al., 2002 describen una función de la fenformina en la modulación de la respuesta neuronal al glutamato. El documento US2004/102525 se refiere a una composición farmacéutica que comprende acamprosato. El documento EP1040830 se refiere a un efecto inhibitorio de la zonisamida en la neurodegeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson y no en la enfermedad de Alzheimer.

### Resumen de la invención

El propósito de la presente invención es proporcionar nuevos planteamientos terapéuticos para tratar la EA.

50 Los autores de la invención han identificado una ruta molecular que está implicada en la génesis de la EA y que ofrece nuevos objetivos para el desarrollo de nuevos tratamientos para mejorar la EA en particular para el desarrollo de terapias de combinación usando moléculas nuevas o existentes usadas previamente en otras indicaciones. Más en particular, los autores de la invención han identificado varios fármacos que, solos o en combinación(es), pueden afectar de forma efectiva a dichas rutas y representan una terapia nueva y eficaz para el tratamiento de la EA.

55 Por lo tanto, la invención describe nuevas composiciones y métodos para tratar la EA.

Más en particular, la invención describe composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesite, en donde dichas composiciones comprenden un fármaco que mejora la función sináptica.

5 Esta invención también describe composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesita, en donde dichas composiciones comprenden una combinación de al menos dos fármacos que mejoran la función sináptica, para la administración combinada, separada o secuencial.

En particular, el fármaco o fármacos que mejoran la función sináptica se unen o modulan la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ABAT, ABI1, ABL1, ADORA2A, ADORA2B, AKT, AMPK, ANKRA, APBA1, ARHGAP26, ATG5, BASSOON, BDNF, BECLIN1, BIN1, canales BK (KCNMA1, KCNMB1), CACNA1C, CACNA2D3, CACNA2D4, CADPS2, CALCINEURINA, CALMODULINA, CASK, CASR, CAST, CBL, CDC2, CDC42, CDC42BPB, CDC42EP3, CDH13, CDH2, CDK5, CITRON, CNGB3, CORTACTINA, CRAM, CREB, CRMP, CTNNB1, DAB1, DCC, DEPDC2, DHFR, DLG2, DYN1, DYN3, EDNRA, ENDOFILINA, EPHA3, EPHBR, EFEXINA, EFRINA-A, EFRINA-B, ERBB4, ERK1, ERK2, FES, FYN, GABBR1, GABBR2, GABRA2, GABRG2, GAT1, GLRA1, GEFIRINA, GIPC1, GIPC2, GLUD1, GRANUFILINA, GRIA2, GRIA3, GRID1, GRID2, GRIK1, GRIK2, GRIN2B, GRIN3A, GRIP, GRM3, GRM5, GRM6, GRM7, GRM8, HOMER, HTR1B, HTR1D, KALIRINA, KCNA2, KCHIP1, KCHIP2.2, KCND2, KCNJ3, KCNJ12, KTN1, KYNU, LYN, MAML3, MINT1, MUC1, MUNC13, MUNC18A, MYO6, MYOL, NAV1, NBEA, NCAM1, NCK1, NCK2, NETRINA1, NFKB1, NGEF, NGF, NGFR, NIL16, NLGN1, NOC2, NOS1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NPC1, NPC2, NPST, NRG3, NRP1, NRP2, NRX3, NTF3, NTF5, NWASP, OPCML, OPRK1, PAK6, PAK7, PARI, PARK2, PDE11A, PDE3A/3B, PDE4A/4B/4D, PI3K, PIAS1, PICALM, PICK1, PIP5K, PKA, PKCA, PLD2, PLEXA1, PP1C, PPFIBP1, PRKG1, PSD95, PTN, PTPRF, PYK2, RAB3B, RABFILINA, RAC1, RAP1, RAS, RASGRF2, RBPJ, REELINA, RGFNEF, RHOA, RHOG, RIM2, RIMS1, RIMS2, ROBO2, ROCK2, RPH3AL, SACM1L, SAPAP, SCN1A, SCN1B, SEC24D, SEMA3A, SEMA3C, SEMA3E, SEMA4C, SIAH1A, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A5, SLC1A2, SLC6A1, SLC6A18, SLC9A1, SLIT1, SNAP25, SORBS2, SRC, SRGAP3, STX2, STXBP6, SUM1, SV2C, SINAPTOJANINA, SINTAXINA1A, SYT12, TACE, TBR1, TRIO, TRKB, TROMBINA, TSPO, UBE2A, ULK4, UNC13C, UNC5C, VAMP2, VAMP5, VELI, VINCULINA, WASPIP, WAVE, WWOX, YAP y YES1.

25 Ejemplos específicos y preferidos de dichos fármacos incluyen, sin limitación, compuestos seleccionados de acamprosato, alendronato, alfentanilo, amilorida, amlodipina, argatrobán, aztreonam, baclofeno, buclizina, bumetanida, buprenorfina, lidocaína, clorzoxazona, cilostazol, cinacalcet, dasatinib, desirudina, difilina, eletriptán, ergotamina, flunitrazepam, fosfenitoína, imatinib, ketotifeno, milrinona, nitroprusida, pegaptanib, pentazocina, fenobarbital, fenformina pregabalina, propiltiouracilo, sulfisoxazol, tadalafilo, temazepam, terbinafina, tiagabina, topiramato, triamtereno, vigabatrina y zonisamida, o una de sus combinaciones.

30 El objeto de esta invención se refiere a una composición como se define en las reivindicaciones. Más específicamente, la invención se refiere a una composición que comprende zonisamida, o una sal o formulación de liberación sostenida de la misma, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

35 En una realización particular, la composición de la invención comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo de difilina, tadalafilo, argatrobán, acamprosato, cinacalcet, terbinafina, cilostazol, baclofeno, fenformina, amlodipina y sulfisoxazol, sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la administración combinada, separada o secuencial con zonisamida.

40 Las composiciones más preferidas de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer comprenden al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos para la administración combinada, separada o secuencial.

- fenformina y zonisamida,
- zonisamida y sulfisoxazol,
- acamprosato y zonisamida,
- zonisamida y difilina,
- 45 - zonisamida y argatrobán, o
- zonisamida y cilostazol.

50 En otra realización particular, las composiciones de esta invención comprenden al menos un fármaco que modula la función sináptica, para uso combinado, separado o secuencial. En otra realización particular, las composiciones de esta invención comprenden al menos un fármaco que modula la angiogénesis, para uso combinado, separado o secuencial.

Alternativamente, o además, las composiciones de esta invención pueden comprender además al menos un fármaco que modula la respuesta al estrés celular, para uso combinado, separado o secuencial.

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

Esta invención también describe un método de producción de un fármaco para tratar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método una etapa ensayar en un fármaco candidato la actividad en la función sináptica y seleccionar fármacos candidatos que mejoran la función sináptica.

5 La invención también describe un método para producir una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método preparar una combinación de un fármaco que modula la función sináptica y un fármaco que modula la angiogénesis o respuesta al estrés celular, y formular dicha combinación de fármacos para su administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

10 La invención describe además un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite, de un fármaco o combinación de fármacos que mejora la función sináptica.

La invención describe además un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el método la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite, de un fármaco que modula la función sináptica y un fármaco que modula la angiogénesis y/o un fármaco que modula la respuesta al estrés celular.

15 La invención describe además el uso de un fármaco que mejora la función sináptica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La invención se refiere además al uso de una combinación de al menos dos fármacos que mejora la función sináptica para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer, en donde dichos al menos dos fármacos se administran juntos, separados o secuencialmente.

20 Como se describe en la presente solicitud, las terapias y terapias de combinación anteriores proporcionan procedimientos nuevos y eficaces para tratar la EA en sujetos humanos.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de fármacos seleccionados en el crecimiento de neuritas en cultivo de neuronas corticales primarias de rata intoxicadas por beta-amiloide.  $\diamond\diamond$ :  $p<0.01$ ;  $\diamond\diamond\diamond\diamond$ :  $p<0.00001$ : significativamente diferente del vehículo. \*:  $p<0.05$ ; \*\*\*\*:  $p<0.0001$ : significativamente diferente de  $A\beta_{25-35}$ . Prueba t de Student bilateral

25 Figura 2: Efecto de fenformina en el crecimiento de neuritas en cultivo de neuronas corticales primarias de rata intoxicadas por beta-amiloide.  $\diamond\diamond$ :  $p<0.01$ : significativamente diferente del vehículo. \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.001$ : significativamente diferente de  $A\beta_{25-35}$ . Prueba t de Student bilateral

30  $A\beta_{25-35}$  20  $\mu$ M produce una intoxicación significativa, por encima de 25%, en comparación con neuronas tratadas con vehículo (Fig.1-A y B y Fig.2, en rojo). Esta intoxicación se previene eficazmente mediante BDNF 10 ng/ml, que se considera como un control positivo para la neuroprotección.

Esta intoxicación también se previene significativamente mediante los fármacos acamprosato (Fig.1A) o zonisamida (Fig.1B) y fenformina (Fig.2).

#### Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona nuevos procedimientos terapéuticos para tratar trastornos de la EA. La invención describe el uso nuevo de fármacos o combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de dichas enfermedades y se pueden usar para el tratamiento de pacientes.

Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" de un trastorno incluye la terapia, prevención, profilaxis, retardo o reducción de los síntomas provocados por el trastorno. El término tratamiento incluye en particular el control del progreso de la enfermedad y síntomas asociados.

40 El término "mejora", como tal se refiere a la función sináptica, incluye cualquier aumento en la función sináptica en comparación con la función existente en el sujeto. Dicha mejora puede incluir un restablecimiento, es decir, a niveles normales, o aumento menor, que son todavía suficientes para mejorar la afección del paciente. Dicha mejora se puede evaluar o verificar usando ensayos biológicos conocidos, tal como se describe en la sección experimental.

45 Además, la designación de compuestos específicos dentro del contexto de esta invención pretende incluir no solo las moléculas nombradas específicamente, sino también cualquier sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racematos o conjugados de los mismos farmacéuticamente aceptables.

50 El término "combinación" indica un tratamiento en donde al menos dos o más fármacos se coadministran a un sujeto para producir un efecto biológico. En una terapia combinada de acuerdo con esta invención, los al menos dos fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o de forma secuencial. Además, los al menos dos fármacos se pueden administrar por diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque se pueden formular juntos, los fármacos o una combinación también se pueden formular por separado.

Como se ha descrito antes, la invención describe composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesite, usando un fármaco o una combinación de fármacos que mejora la función sináptica.

5 Mediante la integración exhaustiva de datos experimentales que cubren resultados de estudios de biología celular, experimentos de perfiles de expresión y estudios de asociación genética, que describen diferentes aspectos de la enfermedad de Alzheimer y conexiones que existen en la señalización celular y rutas funcionales, los autores de la invención han descubierto que la función sináptica representa un mecanismo importante que está alterado en sujetos que tienen EA. Los genes localizados en dicha red funcional e implicados en la enfermedad de Alzheimer se seleccionaron por los siguientes criterios.

10 (1) - interacción directa con los genes causales responsables de casos familiares de la enfermedad de Alzheimer (APP, ApoE, presenilinas, proteína tau),

(2) - parejas funcionales de los genes seleccionados por el criterio (1),

(3) - las parejas funcionales más cercanas de los genes seleccionados por el criterio (2).

Mediante este procedimiento, los autores de la invención pudieron establecer que la red responsable de la disfunción sináptica es una red funcional principal afectada en la enfermedad de Alzheimer.

15 Los autores de la invención han establecido más específicamente que la pérdida sináptica es una característica distintiva de la enfermedad de Alzheimer funcionalmente relevante, que finalmente conduce al deterioro cognitivo progresivo, pérdida de memoria y demencia. Es importante que la pérdida sináptica se correlaciona mejor con la patología de Alzheimer caracterizada por la deficiencia cognitiva, en comparación con otros marcadores de lesión celular específicos de la EA que se ponen de manifiesto en el desarrollo de ovillos neurofibrilares o deposición de  
20 placas amiloides. Por consiguiente, la organización sináptica y la plasticidad sináptica representan un objetivo importante para las intervenciones terapéuticas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

La proteína APP es transportada de forma axonal y procesada en terminales presinápticos, conduciendo a alta acumulación de Abeta en la sinapsis. Los oligómeros de Abeta42 así como las propias placas amiloides son importantes para inhibir la potenciación a largo plazo y son responsables principalmente del deterioro de la memoria  
25 en pacientes de EA.

El procedimiento de integración de datos de los autores de la invención puso de manifiesto un grupo de genes, que están implicados en la alteración sináptica en la EA y que se pueden separar formalmente en tres grupos funcionales principales: proteínas que participan en la organización de la densidad postsináptica ("PSD") y correcta transmisión de señales nerviosas en la membrana postsináptica; proteínas que aseguran la liberación de neurotransmisores; y  
30 proteínas implicadas en el crecimiento de axones y maduración de desarrollo de la maquinaria sináptica.

Por lo tanto, la presente invención describe composiciones y métodos que usan fármacos que mejoran la actividad de proteínas implicadas en la densidad postsináptica.

La parte aferente de la sinapsis excitatoria, densidad postsináptica, está compuesta de una red estrechamente integrada de proteínas almacén y receptores de neurotransmisores que tienen una amplia variedad de funciones  
35 cognitivas, incluyendo formación de memoria y aprendizaje.

Entre los genes identificados por el análisis de los autores de la invención, el gen DLG2 que codifica la proteína de la familia MAGUK que crea una interfase entre receptores unidos a membrana agrupados, moléculas de adhesión celular y citoesqueleto basado en actina. También identificaron un grupo grande de receptores de glutamato y factor de crecimiento, que interaccionan directamente con la proteína DLG2 o complejo de proteínas DLG2/PSD95 en sinapsis  
40 excitatorias, en concreto receptores de ErbB4 y TrkB procesados y funcionalmente regulados por presenilina (17-18), receptores de glutamato ionotrópicos kainato (GRIK2) y tipos NMDA (GRIN3A, GRIN2B), receptores de glutamato tipo delta (GRID1, GRID2) y receptores de glutamato metabotrópicos acoplados a proteína G (GRM3, GRM7 y GRM8). También identificaron varias proteínas efectoras/moduladoras que están implicadas en la señalización corriente abajo de los receptores sinápticos, citron, una proteína efectora Rho/Rac, receptores de AMPA que se unen a RASGRF2 para la activación de las quinasas RAS/ERK, quinasa PARK2 y YES1.  
45

Otros genes funcionalmente relevantes para la EA puestos de manifiesto por los análisis incluyen las proteínas  $\gamma$ -neurexina (NXR3) presináptica y neuroligina 1 (NLGN1) postsináptica que forman el complejo funcional implicado en la correulación dinámica y membranas pre- y postsinápticas en sinapsis excitatorias.

50 En general, la población de proteínas PSD potencialmente implicadas en la enfermedad de Alzheimer, está enriquecida por receptores que participan en la organización de la sinapsis glutamatérgica excitatoria; el cribado por minería de datos de los autores de la invención solo detectó algunos receptores neuronales inhibidores GABA (A) y GABA (B).

La presente invención también describe composiciones y métodos que usan fármacos para mejorar la actividad de proteínas implicadas en la regulación de la liberación de neurotransmisores, preferiblemente en la membrana

presináptica.

La liberación de neurotransmisores en una zona activa restringida y altamente especializada de la membrana plasmática presináptica se produce por la acción potencial y es controlada por acciones combinadas y opuestas de canales de  $Ca_v$  selectivos de calcio, dependientes de voltaje (moduladores positivos de la liberación de neurotransmisores) y de canales  $MaxiK$ , canales de potasio sensibles al calcio y al voltaje, de alta conductancia (moduladores negativos de la liberación de neurotransmisores). Se seleccionaron ambos tipos de canales mediante los análisis de los autores de la invención como objetivos terapéuticos pertinentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, la liberación de neurotransmisores en la membrana presináptica podría ser modulada por la aplicación simultánea de fármacos que influyen en la actividad de la quinasa PRKG1 y/o receptores GABA(B) presinápticos.

Los análisis de los autores de la invención pusieron de manifiesto también un grupo de proteínas implicadas en la organización estructural de la maquinaria de liberación de neurotransmisores, responsable de la maduración, acoplamiento y fusión de la vesícula sináptica con las proteínas que componen una zona activa, proteínas STX2 y STXBP6 que participan en la fusión de vesículas sinápticas, proteína BIN1, RAB3B, UNC13C esencial para la maduración y cebado de vesículas sinápticas y proteínas de almacén RIMS1/2. Las proteínas identificadas por sus análisis representan tanto proteínas estructurales, directamente implicadas en la exocitosis/endocitosis y reciclado de vesículas sinápticas como sus moduladores dependientes de la actividad funcional.

La presente invención también describe composiciones y métodos que usan fármacos para mejorar la actividad de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y guía de axones.

Las proteínas que participan en la regulación del crecimiento y guía de axones permiten que las células precursoras neuronales y axones migren hacia destinos adecuados para asegurar la localización y conectividad correctas; también están implicadas en la maduración de desarrollo de sinapsis recién establecidas, así como en la degradación de axones y sinapsis en la enfermedad EA. Estos procesos tienen una función fundamental para la ejecución de funciones cognitivas y parece que son extremadamente vulnerables al efecto tóxico de las deposiciones de Abeta.

Las etapas consecutivas del crecimiento y guía de axones están estrechamente controladas por acciones combinadas de moléculas netrinas, semaforinas, efrinas, DLL y slits extracelulares o unidas a membrana y sus respectivos receptores funcionales, la mayoría de los cuales fueron puestos de manifiesto por el procedimiento de minería de datos de los autores de la invención. Los resultados funcionales de activación de la mayoría de los receptores de crecimiento axonal están estrechamente conectados con su capacidad para modular de forma diferencial la actividad de GTPasas pequeñas RhoA, Rac1 y Cdc42, siendo la GTPasa RhoA principalmente responsable de la retracción de neuritas y colapso de conos de crecimiento (19).

Entre los genes seleccionados, el receptor de netrina guía axonal DCC está implicado tanto en la atracción como repulsión de neuronas, aunque el receptor de netrina UNC5C posee más bien actividad de repulsión de neuronas (20); las semaforinas y efrinas median el colapso de conos de crecimiento y repulsión en el sistema nervioso durante el desarrollo y tienen una función importante en la plasticidad sináptica en el SNC de adultos (21-25). Las proteínas slits están implicadas simultáneamente en la repulsión y ramificación de axones, dos procedimientos estrechamente relacionados, y modulan la actividad de receptores de netrina (26). Finalmente, parece que el receptor Notch afecta a la guía axonal a través de la ruta de ABL1/DAB1/TRIO tanto dependiente de RBPJ como independiente de RBPJ que controla la organización del citoesqueleto de actina (27).

En la presente invención, los autores de la invención proponen nuevas composiciones, que se pueden usar para mejorar la función sináptica alterada en la enfermedad de Alzheimer. En particular, las composiciones y métodos descritos en esta invención, usan fármacos que mejoran la función sináptica a través de su interacción con o modulación de un gen o proteína como se han citado antes.

Más específicamente, las composiciones descritas en esta invención comprenden un fármaco o fármacos que mejoran la función sináptica por la unión a o modulación de la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ABAT, ABI1, ABL1, ADORA2A, ADORA2B, AKT, AMPK, ANKRA, APBA1, ARHGAP26, ATG5, BASSON, BDNF, BECLIN1, BIN1, canales BK (KCNA1, KCNB1), CACNA1C, CACNA2D3, CACNA2D4, CADPS2, CALCINEURINA, CALMODULINA, CASK, CASR, CAST, CBL, CDC2, CDC42, CDC42BPB, CDC42EP3, CDH13, CDH2, CDK5, CITRON, CNGB3, CORTACTINA, CRAM, CREB, CRMP, CTNNA1, DAB1, DCC, DEPDC2, DHFR, DLG2, DYN1, DYN3, EDNRA, ENDOFILINA, EPHA3, EPHBR, EFEXINA, EFRINA-A, EFRINA-B, ERBB4, ERK1, ERK2, FES, FYN, GABBR1, GABBR2, GABRA2, GABRG2, GAT1, GLRA1, GEFIRINA, GIPC1, GIPC2, GLUD1, GRANUFILINA, GRIA2, GRIA3, GRID1, GRID2, GRIK1, GRIK2, GRIN2B, GRIN3A, GRIP, GRM3, GRM5, GRM6, GRM7, GRM8, HOMER, HTR1B, HTR1D, KALIRINA, KCNA2, KCHIP1, KCHIP2.2, KCND2, KCNJ3, KCNJ12, KTN1, KYNU, LYN, MAML3, MINT1, MUC1, MUNC13, MUNC18A, MYO6, MYOL, NAV1, NBEA, NCAM1, NCK1, NCK2, NETRINA1, NFKB1, NGF, NGF, NGFR, NIL16, NLGN1, NOC2, NOS1, NOTCH 1, NOTCH2, NOTCH3, NPC1, NPC2, NPIST, NRG3, NRP1, NRP2, NRX3, NTF3, NTF5, NWASP, OPCML, OPRK1, PAK6, PAK7, PARI, PARK2, PDE11A, PDE3A/3B, PDE4A/4B/4D, PI3K, PIAS1, PICALM, PICK1, PIP5K, PKA, PKCA, PLD2, PLEXA1, PP1C, PPFIBP1, PRKG1, PSD95, PTN, PTPRF, PYK2, RAB3B, RABFILINA, RAC1, RAP1, RAS, RASGRF2, RBPJ, REELINA, RGNEF, RHOA, RHOG, RIM2, RIMS1, RIMS2, ROBO2, ROCK2, RPH3AL, SACM1L, SAPAP, SCN1A, SCN1B, SEC24D, SEMA3A, SEMA3C,

SEMA3E, SEMA4C, SIAH1A, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A5, SLC1A2, SLC6A1, SLC6A18, SLC9A1, SLIT1, SNAP25, SORBS2, SRC, SRGAP3, STX2, STXBP6, SUM1, SV2C, SINAPTOJANINA, SINTAXINA1A, SYT12, TACE, TBR1, TRIO, TRKB, TROMBINA, TSPO, UBE2A, ULK4, UNC13C, UNC5C, VAMP2, VAMP5, VELI, VINCULINA, WASPIP, WAVE, WWOX, YAP y YES1.

- 5 Las secuencias de todos los genes y proteínas citados antes, están disponibles en genotecas y se pueden aislar por técnicas conocidas en la materia. Además, la actividad de estos genes y proteínas se puede evaluar por técnicas conocidas de por sí en la materia, como se describe en la sección experimental.

La invención describe además fármacos que se pueden usar para modular estos genes objetivo y proteínas. La invención también describe la identificación y actividad de fármacos particulares que, sea solos pero preferiblemente en combinación(es), modulan la ruta anterior y se pueden usar para tratar dichas enfermedades. En particular, identificaron moléculas pequeñas que ya existen en la bibliografía pero que se usan para tratar diferentes enfermedades en sujetos humanos.

15 En relación con esto, las composiciones comprenden un inhibidor de ABAT (preferiblemente, vigabatrina); y/o un inhibidor de ABL1 (preferiblemente imatinib); y/o un modulador de ADORA2B (preferiblemente difilina); y/o un modulador de AMPK (preferiblemente fenformina) y/o un inhibidor de CACNA1C (preferiblemente amlodipina); y/o un inhibidor de CACNA2D3 (preferiblemente pregabalina); y/o un modulador de CASR (preferiblemente cinacalcet); y/o un modulador de CNGB3 (preferiblemente amilorida), y/o un inhibidor de DHFR (preferiblemente triamtereno), y/o un inhibidor de EPHA3 (preferiblemente dasatinib), y/o antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente sulfisoxazol), y/o un modulador de GABBR2 y receptores glutamatérgicos (preferiblemente seleccionado de baclofeno y acamprosato), y/o un modulador de GABRA2 (preferiblemente seleccionado de fenobarbital y aztreonam), y/o un antagonista de GRIK1 (preferiblemente, topiramato), y/o un modulador de GRIN2B y GRIN3A (preferiblemente, acamprosato), y/o un modulador de HTR1B y HTR1D (preferiblemente seleccionado de ergotamina y eletriptán), y/o un antagonista de KCND2 (preferiblemente, lidocaína), y/o un modulador de KCNMA1 (preferiblemente, clorzoxazona), y/o un modulador de NOS1 (preferiblemente seleccionado de ketotifeno y propiltiouracilo), y/o un inhibidor de NRP2 (preferiblemente, pegaptanib), y/o un modulador de OPCML (preferiblemente, alfentanilo), y/o un modulador de OPRK1 (preferiblemente seleccionado de buprenorfina y pentazocina), y/o un inhibidor del receptor de trombina PARI (preferiblemente, argatrobán), y/o un inhibidor de fosfodiesterasas PDE11A y PDE4A, PDE5A (preferiblemente, tadalafilo), y/o un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales de BK (preferiblemente, cilostazol), y/o un inhibidor de PDE4D (preferiblemente, milrinona), y/o un activador de PRKG1 (preferiblemente seleccionado de nitroprusida, tadalafilo y cilostazol), y/o un modulador de RHOA (preferiblemente seleccionado de alendronato y terbinafina), y/o un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida), y/o un inhibidor de SCN1A/B (preferiblemente, fosfenitoína), y/o un inhibidor de SLC6A1 (preferiblemente, tiagabina), y/o un modulador de SLC9A1 (preferiblemente, buclizina), y/o un inhibidor de SLC12A1 (preferiblemente, bumetanida), y/o un inhibidor de TROMBINA (preferiblemente, desirudina), y/o un modulador de TSPO (preferiblemente seleccionado de flunitrazepam y temazepam), y/o un inhibidor de YES 1 (preferiblemente, dasatinib).

Como se ha descrito antes, la invención propone en particular diseñar terapias de combinación para dirigirse a los mecanismos de la EA y trastornos relacionados. En relación con esto, se describen a continuación ejemplos de las combinación de objetivos y fármacos más preferidas.

- 40 También se describe en la presente memoria la composición para usar en el tratamiento de la EA que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos para la administración combinada, separada o secuencial:

- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida),

- 45 - un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un modulador de receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (preferiblemente, acamprosato),

- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),

- un modulador de receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (preferiblemente, acamprosato) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),

- 50 - un inhibidor de canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol).

- un modulador de receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (preferiblemente, acamprosato) y un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales BK (preferiblemente, cilostazol),

- 55 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida) y un modulador del receptor de adenosina ADORA2B (preferiblemente, difilina),

- un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida) y un inhibidor del receptor de trombina PARI (preferiblemente, argatrobán),

- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un modulador del receptor de adenosina ADORA2B (preferiblemente, difilina),

5 - un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales BK (preferiblemente, cilostazol),

- un inhibidor de fosfodiesterasas PDE11A y PDE4A, PDE5A (preferiblemente, tadalafilo) y un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales BK (preferiblemente, cilostazol), o

10 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida) y un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales BK (preferiblemente, cilostazol).

Los ejemplos más preferidos de terapias de combinación para usar en el tratamiento de la EA comprenden el uso combinado de al menos los siguientes compuestos:

- fenformina y zonisamida,

- zonisamida y sulfisoxazol,

15 - acamprosato y zonisamida,

- zonisamida y difilina,

- zonisamida y argatrobán o

- zonisamida y cilostazol,

20 Las composiciones de la invención para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer comprenden al menos un compuesto seleccionado del grupo de difilina, tadalafilo, argatrobán, acamprosato, cinacalcet, terbinafina, cilostazol, baclofeno, fenformina, amlodipina y sulfisoxazol, sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la administración combinada, separada o secuencial con zonisamida.

25 También se describe en la presente memoria la composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en zonisamida, difilina, tadalafilo, argatrobán, acamprosato, cinacalcet, terbinafina, cilostazol, baclofeno, fenformina, amlodipina y sulfisoxazol, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en donde dicha composición mejora la función sináptica alterada en el trastorno neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer (EA).

30 La invención también describe la composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en zonisamida, difilina, tadalafilo, argatrobán, acamprosato, cinacalcet, terbinafina, cilostazol, baclofeno, fenformina, amlodipina y sulfisoxazol, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA).

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

- fenformina y zonisamida,

35 - fenformina y acamprosato,

- fenformina y sulfisoxazol,

- acamprosato y sulfisoxazol,

- zonisamida y sulfisoxazol,

- acamprosato y cilostazol,

40 - acamprosato y zonisamida,

- acamprosato y cilostazol,

- zonisamida y difilina,

- zonisamida y argatrobán,

- fenformina y difilina,

- fenformina y cilostazol,
- tadalafilo y cilostazol o
- zonisamida y cilostazol,

5 La composición de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos: zonisamida y acamprosato, o zonisamida y fenformina, o zonisamida y sulfisoxazol, o zonisamida y difilina, o zonisamida y argatrobán, o zonisamida y cilostazol, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración simultánea, separada o secuencial.

En otra realización, la composición comprende además al menos un fármaco que modula la función sináptica, para uso combinado, separado o secuencial.

10 Preferiblemente, el fármaco adicional que modula la función sináptica se selecciona de un inhibidor de ABAT (preferiblemente, vigabatrina); y/o un inhibidor de ABL1 (preferiblemente imatinib); y/o un modulador de ADORA2B (preferiblemente difilina); y/o un modulador de AMPK (preferiblemente fenformina) y/o un inhibidor de CACNA1C (preferiblemente amlodipina); y/o un inhibidor de CACNA2D3 (preferiblemente pregabalina); y/o un modulador de CASR (preferiblemente cinacalcet); y/o un modulador de CNGB3 (preferiblemente amilorida), y/o un inhibidor de DHFR (preferiblemente triamtereno), y/o un inhibidor de EPHA3 (preferiblemente dasatinib), y/o antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente sulfisoxazol), y/o un modulador de GABBR2 y receptores glutamatérgicos (preferiblemente seleccionado de baclofeno y acamprosato), y/o un modulador de GABRA2 (preferiblemente seleccionado de fenobarbital y aztreonam), y/o un antagonista de GRIK1 (preferiblemente, topiramato), y/o un modulador de GRIN2B y GRIN3A (preferiblemente, acamprosato), y/o un modulador de HTR1B y HTR1D (preferiblemente seleccionado de ergotamina y eletriptán), y/o un antagonista de KCND2 (preferiblemente, lidocaína), y/o un modulador de KCNMA1 (preferiblemente, clorzoxazona), y/o un modulador de NOS1 (preferiblemente seleccionado de ketotifeno y propiltiouracilo), y/o un inhibidor de NRP2 (preferiblemente, pegaptanib), y/o un modulador de OPCML (preferiblemente, alfentanil), y/o un modulador de OPRK1 (preferiblemente seleccionado de buprenorfina y pentazocina), y/o un inhibidor del receptor de trombina PAR1 (preferiblemente, argatrobán), y/o un inhibidor de fosfodiesterasas PDE11A y PDE4A, PDE5A (preferiblemente, tadalafilo), y/o un inhibidor de fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de canales de BK (preferiblemente, cilostazol), y/o un inhibidor de PDE4D (preferiblemente, milrinona), y/o un activador de PRKG1 (preferiblemente seleccionado de nitroprusida, tadalafilo y cilostazol), y/o un modulador de RHOA (preferiblemente seleccionado de alendronato y terbinafina), y/o un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de canales BK (preferiblemente, zonisamida), y/o un inhibidor de SCN1A/B (preferiblemente, fosfenitoína), y/o un inhibidor de SLC6A1 (preferiblemente, tiagabina), y/o un modulador de SLC9A1 (preferiblemente, buclizina), y/o un inhibidor de SLC12A1 (preferiblemente, bumetanida), y/o un inhibidor de TROMBINA (preferiblemente, desirudina), y/o un modulador de TSPO (preferiblemente seleccionado de flunitrazepam y temazepam), y/o un inhibidor de YES 1 (preferiblemente, dasatinib).

35 En otras realizaciones, dicho fármaco adicional que modula la función sináptica se selecciona del fármaco o fármacos que se unen o modulan la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de:

40 ABAT, ABI1, ABL1, ADORA2A, ADORA2B, AKT, AMPK, ANKRA, APBA1, ARHGAP26, ATG5, BASSOON, BDNF, BECLIN1, BIN1, canales BK (KCNMA1, KCNMB1), CACNA1C, CACNA2D3, CACNA2D4, CADPS2, CALCINEURINA, CALMODULINA, CASK, CASR, CAST, CBL, CDC2, CDC42, CDC42BPB, CDC42EP3, CDH13, CDH2, CDK5, CITRON, CNGB3, CORTACTINA, CRAM, CREB, CRMP, CTNNA1, DAB1, DCC, DEPDC2, DHFR, DLG2, DYN1, DYN3, EDNRA, ENDOFILINA, EPHA3, EPHBR, EFEXINA, EFRINA-A, EFRINA-B, ERBB4, ERK1, ERK2, FES, FYN, GABBR1, GABBR2, GABRA2, GABRG2, GAT1, GLRA1, GEFIRINA, GIPC1, GIPC2, GLUD1, GRANUFILINA, GRIA2, GRIA3, GRID1, GRID2, GRIK1, GRIK2, GRIN2B, GRIN3A, GRIP, GRM3, GRM5, GRM6, GRM7, GRM8, HOMER, HTR1B, HTR1D, KALIRINA, KCNA2, KCHIP1, KCHIP2.2, KCND2, KCNJ3, KCNJ12, KTN1, KYNU, LYN, MAML3, MINT1, MUC1, MUNC13, MUNC18A, MYO6, MYO7A, NAV1, NBEA, NCAM1, NCK1, NCK2, NETRINA1, NFKB1, NGEF, NGF, NGFR, NIL16, NLGN1, NOC2, NOS1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NPC1, NPC2, NPIST, NRG3, NRP1, NRP2, NRX3, NTF3, NTF5, NWASP, OPCML, OPRK1, PAK6, PAK7, PARI, PARK2, PDE11A, PDE3A/3B, PDE4A/4B/4D, PI3K, PIAS1, PICALM, PICK1, PIP5K, PKA, PKCA, PLD2, PLEXA1, PP1C, PPFIBP1, PRKG1, PSD95, PTN, PTPRF, PYK2, RAB3B, RABFILINA, RAC1, RAP1, RAS, RASGRF2, RBPJ, REELINA, RGF, RGF2, RHOA, RHOG, RIM2, RIMS1, RIMS2, ROBO2, ROCK2, RPH3AL, SACM1L, SAPAP, SCN1A, SCN1B, SEC24D, SEMA3A, SEMA3C, SEMA3E, SEMA4C, SIAH1A, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A5, SLC1A2, SLC6A1, SLC6A18, SLC9A1, SLIT1, SNAP25, SORBS2, SRC, SRGAP3, STX2, STXBP6, SUM1, SV2C, SINAPTOJANINA, SINTAXINA1A, SYT12, TACE, TBR1, TRIO, TRKB, TROMBINA, TSPO, UBE2A, ULK4, UNC13C, UNC5C, VAMP2, VAMP5, VELI, VINCULINA, WASPIP, WAVE, WWOX, YAP y YES1.

55 Los autores de la invención han establecido que los fármacos anteriores y combinaciones de fármacos proporcionan efecto biológico mejorado y sinérgico que conduce a una corrección efectiva o normalización o desregulación funcional que conducen a la EA.

Los compuestos mencionados antes se citan en la siguiente tabla 1, junto con su número CAS. Como se ha descrito antes, debe entenderse que la invención abarca el uso de los compuestos anteriores, así como cualquier sal, hidrato,

éster, éter, isómeros, racemato o conjugados de los mismos farmacéuticamente estables. Los profármacos se pueden preparar (p. ej., por acoplamiento del fármaco a un vehículo adecuado) para ofrecer un mejor control sobre los parámetros farmacocinéticos del tratamiento.

Tabla 1

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Acamprosato	77337-76-9
Alendronato	66376-36-1
Alfentanilo	71195-58-9
Amilorida	2016-88-8
Amlodipina	88150-42-9
Argatrobán	74863-84-6
Aztreonam	78110-38-0
Baclofeno	1134-47-0
Balsalazida	80573-04-2
Buclizina	82-95-1
Bumetanida	28395-03-1
Buprenorfina	52485-79-7
Lidocaína	137-58-6
Clorzoaxona	95-25-0
Cilostazol	73963-72-1
Cinacalcet	226256-56-0
Dasatinib	302962-49-8
Desirudina	120993-53-5
Difilina	479-18-5
Eletriptán	143322-58-1
Ergotamina	113-15-5
Flunitrazepam	1622-62-4
Fosfenitoína	93390-81-9
Imatinib	152459-95-5
Ketotifeno	34580-14-8
Milrinona	78415-72-2
Nitroprusida	15078-28-1
Pegaptanib	222716-86-1
Pentazocina	359-83-1
Fenobarbital	50-06-6
Fenformina	114-86-3
Pregabalina	148553-50-8
Propiltiouracilo	51-52-5
Sulfisoxazol	127-69-5
Tadalafilo	171596-29-5
Temazepam	846-50-4
Terbinafina	91161-71-6
Tiagabina	115103-54-3
Topiramato	97240-79-4
Triamtereno	396-01-0
Vigabatrina	60643-86-9
Zonisamida	68291-97-4

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables, sales de metales farmacéuticamente aceptables y sales de amonio y amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilen-salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, acetatos, benzoatos, hidroxinaftoatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos y similares. Se dan ejemplos adicionales de sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, p. ej., en *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 2. Los ejemplos de sales de metales incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolamina, colina y similares.

La terapia de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo sola o como combinación de fármacos, y/o junto con cualquier otra terapia, que se dirija a la misma ruta o que tenga modos de acción distintos. Se puede proporcionar en casa, despacho médico, una clínica, un departamento ambulatorio del hospital o un hospital, de modo que el médico pueda observar los efectos de la terapia de cerca y hacer cualquier ajuste que sea necesario.

En una realización particular, las composiciones de la invención comprenden además al menos un fármaco que modula la angiogénesis, preferiblemente que aumenta la angiogénesis, para el uso combinado, separado o secuencial. Más preferiblemente, dicho al menos un fármaco que modula la angiogénesis se selecciona de albuterol, alendronato, ambrisentán, ácido aminocaproico, balsalazida, becaplermina, cabergolina, clopidogrel, dihidroergotamina, eplerenona, fenoldopam, acetato de fludrocortisona, gemfibrozil, hesperetina, leflunomida, L-histidina, liotironina, marimastat, meloxicam, mepacrina, metazolamida, metimazol, montelukast, netilmicina, nitroglicerina, fenilbutirato, pirimetamina, sunitinib, tietilperazina, tirofibán, topotecán, vidarabina y warfarina (véase la tabla 2 a continuación)

Tabla 2

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Albuterol	18559-94-9
Alendronato	66376-36-1
Ambrisentán	177036-94-1
Ácido aminocaproico	60-32-2
Balsalazida	80573-04-2
Becaplermina	165101-51-9
Cabergolina	81409-90-7
Clopidogrel	113665-84-2
Dihidroergotamina	6190-39-2
Eplerenona	107724-20-9
Fenoldopam	67227-57-0
Fludrocortisona	127-31-1
Gemfibrozilo	25812-30-0
Hesperetina	520-33-2
Leflunomida	75706-12-6
L-histidina	71-00-1
Liotironina	6893-02-3
Marimastat	154039-60-8
Meloxicam	71125-38-7
Mepacrina	83-89-6
Metazolamida	554-57-4
Metimazol	60-56-0
Montelukast	158966-92-8

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Netilmicina	56391-56-1
Nitroglicerina	55-63-0
Pirimetamina	58-14-0
Fenilbutirato de sodio	1716-12-7
Sunitinib	557795-19-4
Tietilperazina	1420-55-9
Tirofibán	144494-65-5
Topotecán	1194 13-54-6
Vidarabina	24356-66-9
Warfarina	81-81-2

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

Tabla 3

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Arabitól	488-82-4, 7643-75-6, 6018-27-5
Manitol	69-65-8
Metaraminol	54-49-9
Omeprazol	73590-58-6
Prilocaína	721-50-6
Rapamicina	53123-88-9
Rifabutina	72559-06-9
Tioguanina	154-42-7
Trehalosa	99-20-7

- 10 La invención también describe una composición que comprende un fármaco que mejora la función sináptica, un fármaco que aumenta la angiogénesis, y un fármaco que inhibe la respuesta al estrés celular, para administración simultánea, separada o secuencial.

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

- 15 La dosis, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación se pueden controlar independientemente. Por ejemplo, un fármaco se puede administrar por vía oral mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La terapia de combinación se puede dar a intervalos que incluyen periodos de reposo de modo que el cuerpo del paciente tiene la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario aún no previsto. Los fármacos se pueden formular también juntos de modo que una administración suministre todos los fármacos.

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

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

Más habitualmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "paquetes para el paciente" que contienen una serie de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para

5 usar durante un periodo de tiempo diferente en un envase individual, normalmente un envase blíster. Los paquetes para los pacientes tienen una ventaja frente a las prescripciones tradicionales donde un farmacéutico divide un suministro del paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en cuanto que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete para el paciente, que normalmente está ausente en las prescripciones tradicionales. Se ha mostrado que la inclusión del prospecto mejora la observancia del paciente con las instrucciones del médico. Por lo tanto, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito en lo que antecede, en combinación con material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En dicho paquete para el paciente el uso previsto de una formulación para el tratamiento de combinación se puede deducir de las instrucciones, dispositivos, suministros, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación más adecuada para el tratamiento. Dichas medidas hacen que el paquete para el paciente sea específicamente adecuado para y esté adaptado para usar para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

10 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad adecuada en cualquier sustancia vehículo adecuada, y puede estar presente en una cantidad de 1-99% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración oral, parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalación, piel (parche) u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de, p. ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, escayolas, pociones, dispositivos de suministro osmótico, supositorios, enemas, productos inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles.

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

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

25 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco en el cuerpo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retardo predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo a lo largo de un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel del fármaco eficaz, relativamente constante en el cuerpo con minimización simultánea de efectos secundarios indeseables asociados con fluctuaciones en el nivel de plasma del fármaco activo; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, p. ej., por colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en el tejido enfermo; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco usando vehículos o derivados químicos para suministrar el fármaco en un tipo de célula objetivo particular.

30 La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada se prefiere en especial en casos en los que el fármaco, solo o en combinación, tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración plasmática que conduce a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que conduce a un efecto terapéutico, es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación de la dosis letal mediana (DL50) a la dosis efectiva mediana (DE50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta de modo que se requiere la administración frecuente durante un día con el fin de mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

35 Se puede seguir cualquiera de una serie de estrategias con el fin de obtener la liberación controlada en la que la velocidad de liberación prevalece frente a la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener por la selección adecuada de diferentes parámetros e ingredientes de formulación, que incluyen, p. ej., varios tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Por lo tanto, el fármaco se formula con excipientes adecuados en una composición farmacéutica que, tras administración, libera el fármaco de una forma controlada (composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias individuales o múltiples, soluciones en aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

#### Formas farmacéuticas sólidas para uso oral

40 Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el(los) principio(s) activo(s) en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (p. ej., sacarosa, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregación (p. ej., derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (p. ej., goma arábiga, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (p. ej., ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes de sabor, plastificantes, humectantes, agentes de tamponamiento y similares.

Los comprimidos pueden no estar recubiertos o se pueden recubrir por técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida a lo largo de un periodo más largo. El recubrimiento se puede adaptar para liberar el fármaco activo en un patrón predeterminado (p. ej., con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para no liberar el fármaco activo hasta después del paso del estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (p. ej., basado en copolímero de ácido metacrílico, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato ftalato de vinilo), goma de laca y/o etilcelulosa). Se puede usar un material de retardo de tiempo tal como, p. ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimido sólidas pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (p. ej., degradación química antes de la liberación del fármaco activo). El recubrimiento se puede aplicar sobre una forma farmacéutica sólida de una forma similar a la descrita en la Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Se pueden mezclar varios fármacos entre sí en el comprimido, o se pueden dividir. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y el segundo fármaco está en el exterior, de modo que una parte sustancial del segundo fármaco es liberado antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral se pueden presentar en forma de comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o en forma de cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados antes en los comprimidos y cápsulas de una forma convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral se pueden construir, p. ej., para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o difusión del fármaco activo.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede lograr mediante el recubrimiento adecuado de una formulación de comprimido, cápsula, pelet o granulado de fármacos, o incorporando el fármaco a una matriz adecuada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más sustancias de recubrimiento mencionadas antes y/o, p. ej., goma laca, cera de abeja, Glycowax, cera de ricino, cera de carnaúba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, poli(ácido dl-láctico), acetato butirato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material matriz puede incluir también, p. ej., metilcelulosa hidratada, cera de carnaúba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo), polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

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

#### Líquidos para administración oral

Los polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua son formas farmacéuticas convenientes para la administración oral. La formulación como una suspensión proporciona el principio activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, alginato de sodio y similares.

#### Composiciones parenterales

La composición farmacéutica también se puede administrar por vía parenteral por inyección, infusión o implante (intravenoso, intramuscular, subcutáneo o similar) en formas farmacéuticas, formulaciones o por dispositivos de suministro adecuados o implantes que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, convencionales. La formulación y preparación de dichas composiciones son bien conocidas para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

5 Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitaria (p. ej., en ampollas de una dosis individual), o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase más abajo). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de suministro para implante o se puede presentar en forma de un polvo seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Aparte del(de los) principio(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables. El(los) fármaco(s) activo(s) se puede(n) incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes de ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

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

20 Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones en aceite, suspensiones en aceite o emulsiones. Alternativamente, el(los) fármaco(s) activo(s) se pueden incorporar en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión biocompatibles. Los materiales para usar en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, p. ej., polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que se pueden usar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (p. ej., dextranos), proteínas (p. ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para usar en implantes pueden ser no biodegradables (p. ej., polidimetilsiloxano) o biodegradables (p. ej., poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

#### Composiciones rectales

30 Para aplicación rectal, las formas farmacéuticas adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el(los) fármaco(s) activo(s) se combinan con una base de supositorio adecuada farmacéuticamente aceptable tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada y diferentes bases solubles o dispersables en agua como polietilenglicoles. Se pueden incorporar diferentes aditivos, potenciadores o tensioactivos.

#### Composiciones percutáneas y tópicas

35 Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por vía tópica sobre la piel para la absorción percutánea en formas farmacéuticas o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticos aceptables convencionalmente no tóxicos que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, barras, pulverizadores, pastas, escayolas y otras clases de sistemas de suministro transdérmico de fármacos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes de tamponamiento, conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración, agentes quelantes, agentes de formación de geles, bases de pomadas, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (p. ej., goma arábiga o goma de tragacanto).

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

45 Las composiciones farmacéuticas descritas antes para la administración tópica sobre la piel también se pueden usar en relación con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones se pueden adaptar para la aplicación directa o para aplicación mediante dispositivos de suministro de fármacos especiales tales como apósitos o alternativamente escayolas, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

#### 50 Dosis y duración del tratamiento

55 Se apreciará que los fármacos de la combinación se pueden administrar simultáneamente, sea en la misma o diferente formulación farmacéutica o de forma secuencial. Si hay una administración secuencial, el retardo en la administración del segundo principio activo (o adicional) no debería ser tal que se perdiera el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los principios activos. Un requisito mínimo para una combinación de acuerdo con esta descripción es que la combinación debe estar prevista para el uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los principios activos. El uso previsto de una combinación se puede deducir por los dispositivos, suministros, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la combinación de acuerdo con la invención.

Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en dosis divididas, por ejemplo, dos o tres veces al día, se prefiere una sola dosis diaria de cada fármaco en la combinación, siendo lo más preferido una sola dosis diaria de todos los fármacos en una sola composición farmacéutica (forma farmacéutica unitaria).

5 La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del material o materiales activos calculados para producir el efecto terapéutico deseado, asociado con el vehículo farmacéutico requerido.

10 La administración puede ser de una a varias veces al día durante varios días a varios años, y pueden ser incluso durante la vida del paciente. En la mayoría de los casos estará indicada la administración a largo plazo crónica o al menos periódicamente repetida.

Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo en la farmacocinética, farmacodinámica o perfil de eficacia de un producto terapéutico) sobre un paciente particular puede afectar a la dosis usada.

15 Excepto cuando se responde a casos de enfermedad EA especialmente deteriorados cuando se pueden requerir dosis más altas, la dosis preferida de cada fármaco en la combinación normalmente estará dentro del intervalo de dosis no por encima de la prescrita habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que se ha demostrado que es segura en estudios clínicos de fase 3 grandes.

La dosis más preferida corresponderá a cantidades desde 1% hasta 10% de la prescrita habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo. Por ejemplo:

20 - dasatinib por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día y acamprosato por vía oral de aproximadamente 7 a 70 mg tres veces al día,

- aztreonam por vía oral de aproximadamente 20 a 1400 mg al día en 4 dosis divididas y tiagabina por vía oral de aproximadamente 0.3 a 3 mg al día,

- cloroxazona por vía oral de aproximadamente 5 a 50 mg 3 o 4 veces al día y tadalafilo por vía oral de aproximadamente 0.05 a 0.5 mg al día,

25 - cloroxazona por vía oral de aproximadamente 5 a 50 mg 3 o 4 veces al día y cilostazol por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día,

- cloroxazona por vía oral de aproximadamente 5 a 50 mg 3 o 4 veces al día y terbinafina por vía oral de aproximadamente aproximadamente 2.5 a 25 mg una o dos veces al día,

30 - cloroxazona por vía oral de aproximadamente 5 a 50 mg 3 o 4 veces al día y dasatinib por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día,

- dasatinib por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día y terbinafina por vía oral de aproximadamente 2.5 a 25 mg una o dos veces al día,

- cinacalcet por vía oral de aproximadamente 0.3 a 3 mg al día y acamprosato por vía oral de aproximadamente 7 a 70 mg tres veces al día,

35 - aztreonam por vía oral de aproximadamente 20 a 1400 mg al día en 4 dosis divididas y vigabatrina por vía oral de aproximadamente 20 a 200 mg una o dos veces al día,

- topiramato por vía oral de aproximadamente 2 a 60 mg al día y difilina por vía oral de aproximadamente 6 a 60 mg al día en dos o tres dosis divididas.

40 Se entenderá que la cantidad de fármaco realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección o afecciones que se van a tratar, la composición exacta que se va a administrar, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosis anteriores están previstos para proporcionar guía y soporte general para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos se dan para fines de ilustración y no a modo de limitación.

#### 45 Ejemplos

##### 1. Validación del fármaco usando ensayos in vitro

50 Los ensayos in vitro son una herramienta poderosa para mejorar los fármacos y sus combinaciones que actúan en las rutas implicadas en la EA. Los fármacos de la presente invención, y sus combinaciones, se optimizan por acción en ensayos in vitro específicos adaptados de acuerdo con la red de la EA identificada en esta invención. Posteriormente estas moléculas o sus combinaciones se ensayan en el modelo in vivo de EA.

Estos ensayos in vitro empiezan con el estudio del nivel de expresión del gen APP seguido de ensayos de potencial neuroprotección de los fármacos en las células expuestas al efecto tóxico de la proteína Abeta. Los fármacos en rutas implicadas se ensayan individualmente, seguido de ensayos de su acción combinatoria. En la etapa siguiente, las combinaciones más eficaces que actúan sobre los objetivos en rutas individuales se combinan y se ensayan en ensayos de neuroprotección.

En la EA, la proteína forma agregados de láminas  $\beta$  plegadas de proteína Abeta fibrilar (amiloide). El cambio conformacional de formas solubles a fibrilares parece que es un suceso espontáneo que aumenta con concentraciones mayores de Abeta, de modo que cualquier producción de cantidades mayores de Abeta de lo normal (o producción de las formas más grandes, menos solubles de Abeta) tenderá a aumentar la formación de placa. Una vez que la placa Abeta ha empezado a formarse, otras moléculas pueden interactuar con la placa que surge para producir finalmente la placa madura con sus áreas asociadas de muerte de células neuronales. Considerando esto, se le ha dado prioridad al ensayo de los efectos de los fármacos en la viabilidad de las células expuestas a la proteína  $\beta$  amiloide.

#### Cultivo celular

Se cultivan neuronas corticales primarias de rata como describen Singer et al., 1999. Brevemente, se sacrifican ratas hembra preñadas de 15 días de gestación por dislocación cervical (Ratas Wistar; Janvier) y se extraen los fetos de los úteros. Se retiran las cortezas y se ponen en medio de Leibovitz enfriado con hielo (L15; Invitrogen) que contiene 1% de penicilina-estreptomina (PS; Invitrogen) y 1% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma). Las cortezas se disocian por tripsinización durante 20 min a 37°C (tripsina EDTA 1X; Invitrogen) diluidas en PBS sin calcio y magnesio. La reacción se detiene por la adición de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contiene DNAsa I grado II (0.1 mg/ml; Roche Diagnostic) y 10% de suero ternero fetal (FCS; Invitrogen). Después las células se disocian mecánicamente por 3 pases a través de una pipeta de 10 ml. Después las células se centrifugan a 180 x g durante 10 min a 10°C. El líquido sobrenadante se descarta y las células del sedimento se vuelven a suspender en un medio de cultivo definido que consiste en Neurobasal (Invitrogen) complementado con B27 (2%; Invitrogen), L-glutamina (0.2 mM; Invitrogen), 1% de solución de PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Pan Biotech). Las células viables se cuentan en un citómetro Neubauer usando la prueba de exclusión con tinta azul de trypan. Las células se siembran en una densidad de 30 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se recubren previamente con poli-L-lisina (10  $\mu$ g/ml; Sigma) y se cultivan a 37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%/CO<sub>2</sub> (5%).

Después de 6 días de cultivo, las células se incuban con fármacos (5 concentraciones). Después de 1 hora, las células se intoxican con 20  $\mu$ M de beta-amiloide (25-35; Sigma) en medio definido sin BDNF pero junto con fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 2 días. El BDNF (10 ng/ml) se usa como control positivo (neuroprotector). Se llevan a cabo dos cultivos independientes por condición, 6 pocillos por condición.

#### Cuantificación de la longitud de las neuritas

Las células se fijan en una solución fría de etanol (95%) y ácido acético (5%) durante 10 min. Después de permeabilización con 0.1% de saponina, las células se bloquean durante 2 h con PBS que contiene suero de cabra al 10%. Después las células se incuban con anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2; Sigma). Este anticuerpo pone de manifiesto específicamente cuerpos celulares y neuritas. El anticuerpo secundario usado es uno de cabra anti-IgG de ratón con Alexa Fluor 488 (Molecular probe). Los núcleos de las neuronas se revelan mediante un colorante fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA). Se toman veinte imágenes por pocillo usando un InCell Analyzer<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare) con 20x aumentos. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones. La longitud de las neuritas se cuantifica usando el software Developer (GE Healthcare).

#### Resultados

Los resultados presentados en la fig. 1 se extraen de dos cultivos independientes, 6 pocillos por condición. Todos los valores se expresan como media  $\pm$  e.e.media. Se lleva a cabo un análisis de prueba t de Student bilateral en los datos sin procesar. Los resultados se expresan en porcentaje de la longitud de las neuritas, en comparación con el control (vehículo).

Los fármacos se incubaron con neuronas corticales primarias de rata una hora antes de la intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> 20  $\mu$ M que dura 2 días (40).

Dos días después de esta incubación, se cuantificó la longitud de la red de neuritas, que reflejaba el crecimiento celular axonal. Los autores de la invención han observado que 3 fármacos ejercen claramente un efecto neuroprotector contra esta intoxicación por Abeta<sub>25-35</sub> (Fig. 1 y Fig. 2).

#### Ensayos in vivo

Los compuestos y sus combinaciones activas en ensayos in vitro se han ensayado en el modelo in vivo de enfermedad de Alzheimer. La sobreexpresión de los transgenes del precursor de proteína beta amiloide (APP) humana mutante asociada a la enfermedad de Alzheimer, ha sido el medio más fiable de promover la deposición de Abeta en los cerebros de ratones transgénicos que sirven como modelos de la enfermedad EA en numerosos estudios. A medida

que envejecen, estos ratones con APP mutante desarrollan patología amiloide robusta y otras características similares a la EA, incluyendo menor densidad sináptica, gliosis reactiva y algunas deficiencias cognitivas. Muchos modelos de ratones con APP mutante muestran poca evidencia de pérdida neuronal y patología de ovillos neurofibrilares (NFT) manifiesta. Los ratones homocigotos para este transgén BRI-Abeta42 son viables y fértiles con una duración de vida normal. El ARNm de BRI-Abeta42 transgénico se expresa en un patrón característico del promotor de la proteína priónica de ratón; se detectan niveles de expresión transgénica más altos en células granulosas del cerebelo y el hipocampo, seguido de la corteza, protuberancia, tálamo y mesencéfalo. En la proteína de fusión transgénica, Abeta1-42 está fusionado al extremo C de la proteína BRI en el sitio de escisión similar a la furina de modo que esta escisión da como resultado la secreción eficaz de Abeta1-42 en el lumen o espacio extracelular. Por lo tanto, estos ratones expresan específicamente la isoforma Abeta1-42. Los ratones homocigotos para BRI-Abeta42 acumulan amiloide-beta insoluble en detergente con la edad y desarrollan placas nucleadas en el cerebelo tan pronto como a los 3 meses de edad. El desarrollo de la patología del prosencéfalo ocurre más tarde, las placas de Abeta extracelular no están presentes sistemáticamente en el hipocampo y las cortezas entorrinal/piriforme hasta los 12 meses de edad. Los depósitos de beta amiloide (placas nucleadas) se pueden observar tan pronto como a los 3 meses en la capa molecular del cerebelo de ratones transgénicos y se vuelven más pronunciadas con la edad; se ven placas extracelulares ocasionales en las cortezas entorrinal/piriforme e hipocampo a los 6 meses de edad, pero no se encuentran sistemáticamente hasta >12 meses de edad. Los ratones más mayores muestran una patología más extendida con placas nucleadas y difusas en el cerebelo, corteza, hipocampo y bulbo olfativo. Las placas amiloides extracelulares muestran núcleos amiloides densos con fibrillas que irradian; se observan muchos haces de neuritas distróficas en la periferia de estas placas. La gliosis reactiva está asociada con placas.

#### Tratamientos farmacológicos

Los ratones A12E mc transgénicos Tg (Prnp-ITM2B /APP695\*42) (31) se han obtenido de Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/007002.html>). Ratones fundadores con los niveles plasmáticos más altos de Abeta42, línea BRI-Abeta42A (12e), se han mantenido en un contexto B6C3 mixto. Los ratones transgénicos machos adultos tienen acceso libre a alimento y agua. De acuerdo con un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee, los ratones se pesaron y se les inyectó por vía i.p. o se les administró por alimentación forzada una vez al día durante de 10 a 20 semanas consecutivas, una solución de control (placebo) o fármacos PXT, preparados en dosis diferentes.

#### Análisis de la supervivencia

Las tasas de supervivencia se han analizado usando métodos de Kaplan-Meier. Se han usado métodos de Holm-Sidak (a posteriori) para todos los ensayos de comparaciones múltiples de datos emparejados. Las muertes extrañas se censuran. Todas las comparaciones se han realizado entre crías de la misma camada para limitar cualquier efecto potencialmente de confusión de diferencias en las cepas de origen.

#### Ensayos conductuales

Los ensayos conductuales se diseñaron y realizaron de acuerdo con los métodos publicados por varios autores (32-35).

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

Este experimento se lleva a cabo en una piscina circular, de 90 cm de diámetro, hecha de plástico blanco y llena con agua de color lechoso. Una plataforma de escape, de 8 cm de diámetro, hecha de plástico transparente, se sumergió 0,5 cm debajo del nivel de agua. Se proporcionan pistas visuales mediante diferentes formas geométricas impresas en letras de tamaño A4 y se colocan en las 4 paredes de alrededor (la distancia desde la piscina era de 50 a 70 cm). En cada ratón se realizaron cuatro ensayos diarios (intervalo de 5 a 7 minutos entre ensayos, un total de 16 ensayos) durante 4 días. Cada ensayo se llevó a cabo desde uno de cuatro puntos de partida diferentes. El movimiento de los ratones se vigila usando el software Videotrack (View Point). Se ha determinado el tiempo necesario para localizar la plataforma de escape (latencia de escape; hasta 60 segundos). Después de localizar la plataforma, se permitió al ratón sentarse en ella durante 15 segundos. Los ratones que no consiguieron encontrar la plataforma en 60 segundos se han guiado a la misma y se les ha dejado permanecer en ella durante 15 segundos. En el registro se introduce una latencia de 60 segundos para dicho caso. Se hizo la media de los cuatro ensayos diarios para el análisis estadístico, excepto por el primer ensayo el día 1. El día 9 (5 días después del último entrenamiento), los ratones se han sometido a un ensayo de detección de 60 segundos en el que se retira la plataforma y se deja que los ratones la busquen. Se registra el tiempo que cada animal está en cada cuadrante (tiempo de búsqueda por cuadrante). Se han usado varios grupos de ratones macho a los 3, 7, 10 y 12 meses.

Unos pocos ratones han mostrado un comportamiento de inmovilidad (p. ej., quedando inmóviles en el agua y rechazando nadar) que interfirió considerablemente en el ensayo, estos animales se excluyeron del análisis de datos.

Todos los ensayos conductuales se llevan a cabo en un ambiente tranquilo y con reducción de luz.

Ensayo de la memoria de trabajo en el laberinto de agua con brazos radiales

Esta medida sensible basada en la cognición de la memoria de trabajo se ha obtenido con ayuda del aparato que

5 consiste en una piscina llena de agua de 100 cm de diámetro (también usada para el laberinto de agua de Morris y las tareas de reconocimiento de plataforma) equipada con un inserto de aluminio para crear seis brazos de nado distribuidos radialmente. Las pruebas consisten en cinco ensayos de 1 min por sesión diaria, durante 9-12 días consecutivos. Al principio de cada sesión, se coloca una plataforma transparente sumergida en el extremo de uno de los seis brazos (seleccionado al azar, cambiado a diario). Para cada uno de los primeros cuatro ensayos de adquisición, el animal se coloca en uno de los brazos que no contiene la plataforma (secuencia aleatorizada) y se deja que busque la plataforma. Durante el ensayo de 60 s, cada vez que el animal entra en otro brazo que no contiene la plataforma, se le devuelve suavemente a su lugar de partida y se registra un error. Después del cuarto ensayo, se deja descansar al animal durante 30 min, seguido por un quinto ensayo (retención), que se inicia en el brazo de nado final que no contiene la plataforma. Se registran para cada ensayo el número de errores (elecciones incorrectas del brazo) y la latencia de escape (tiempo para llegar hasta la plataforma, máximo 60 s).

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

15 Esta prueba de tareas basada en la cognición se lleva a cabo con la ayuda del aparato que consiste en una plataforma circular de 69 cm que tiene 16 orificios de "escape" espaciados de forma equidistante alrededor de la circunferencia. Se instala un refugio de escape debajo de uno de los agujeros y rodeando a la plataforma una cortina negra, sobre la cual se colocan varias pistas visuales. El animal se coloca en el centro de la plataforma al principio de un único ensayo de 5 minutos y se presentan estímulos de aversión (luces brillantes, aire con ventilador). Se registra el número total de errores (golpes con la cabeza en los agujeros sin escape) y la latencia del escape (tiempo hasta alcanzar el agujero de escape).

20 Capacidad de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de la plataforma

25 Esta tarea de búsqueda basada en la cognición evalúa la capacidad de reconocimiento y de identificación de objetos. El objeto diana consiste en una plataforma circular de 9 cm de diámetro equipada con una enseña negra de 10 cm x 40 cm, que se coloca a 0,8 cm por encima de la superficie del agua en una piscina circular de 100 cm de diámetro. El ensayo consiste en cuatro ensayos de 60 s al día en cada uno de cuatro días consecutivos. Cada día, el objeto diana se coloca en un cuadrante diferente de la piscina para cada ensayo y el animal se libera en el mismo lugar a lo largo de la circunferencia de la piscina para los cuatro ensayos. Se registra para cada ensayo la latencia total (máximo 60 s).

Examen de Irwin modificado

30 Se usa un cribado exhaustivo, modificado de Irwin, para determinar si alguno de los ratones presentaba deterioros fisiológicos, conductuales o sensoriomotores relacionados con su genotipo. Para explorar las capacidades motoras, coordinación y fuerza muscular, los ratones se colocan en un alambre que se tensó entre dos columnas de 30 cm de altura y se evalúa su capacidad para mantener el equilibrio sobre el alambre. Además, se determina su capacidad para agarrarse y colgarse del alambre con las cuatro patas durante al menos 5 segundos y de volver a escalar al alambre.

Cuantificación del depósito de amiloide vascular

35 Para cuantificar la angiopatía amiloide cerebral (AAC), secciones de 5 µm insertadas en parafina a intervalos de 30 µm a lo largo de las leptomeninges de la corteza cerebelosa o parietal se someten a inmunotinción con anticuerpo Ab9 biotinilado (anti-Aβ1-16, 1:500) durante la noche a 4°C (n= 5-7 ratones por genotipo en cada grupo de edad, n= 6 secciones por ratón). Los vasos sanguíneos teñidos positivamente se evalúan visualmente usando el sistema de puntuación modificada de Vonsattel (36). La puntuación de la gravedad de AAC se calcula multiplicando el número de vasos con AAC por el grado de gravedad de la AAC.

Histología: Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

45 Ratones Tg y WT de 3 a 12 meses se anestesian y se perfunde por vía transcardiaca de modo secuencial NaCl al 0.9% y paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato 0,1 mol/l (PBS) (pH 7.4) o formalina al 10% y paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 mol/l (pH 7.4). Se extraen los cerebros y las médulas espinales y se almacenan en paraformaldehído al 4%. Algunas muestras se insertan en parafina y se cortan en un microtomo de deslizamiento a un espesor de 10 µm. Se cortan criosecciones (14 µm) en un criostato y se montan en portaobjetos recubiertos con alumbre de cromo. La peroxidasa endógena se inactiva tratando la sección con metanol que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% durante 30 minutos. Las secciones se bloquean en suero de caballo al 10%. Se usan anticuerpos primarios y se incuban durante la noche a 4°C en presencia de suero de caballo al 1%. Todos los anticuerpos secundarios biotinilados o acoplados a fluoresceína, rojo Texas y AMCA, fluorocromos, kit ABC y 3,3'-diaminobencidina como cromógeno para la actividad peroxidasa proceden de Vector Laboratories. La incubación con el anticuerpo secundario se mantiene a temperatura ambiente durante 1 hora. Todas las etapas de lavado (3-10 minutos) y la dilución del anticuerpo se llevan a cabo usando solución salina tamponada con fosfato (PBS 0.1 mol/l, pH 7.4) o solución salina tamponada con Tris (Tris 0.01 mol/l, NaCl 0.15 mol/l, pH 7.4). La incubación con el complejo ABC y la detección con 3,3'-diaminobencidina se llevan a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. Se realiza contratinción con hematoxilina de acuerdo con procedimientos convencionales. Para cada determinación se usa un mínimo de tres ratones por genotipo, edad y sexo (37).

## Preparación de extractos cerebrales

Los cerebros se recogen rápidamente en hielo entre 90 y 120 min después de la última inyección y se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El hemisferio cerebral derecho de cada ratón se pesa después de congelar. El análisis de la masa del hemisferio por la desviación absoluta mediana permite a los autores de la invención excluir las muestras con más de 4 desviaciones absolutas medianas con respecto al resto del grupo. Los hemisferios cerebrales se homogeneizan y los lisados celulares que contienen la proteína total se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante para los kit de ensayo enzimático (R&D Systems, Inc.). En resumen, las cortezas cerebrales se homogeneizan en  $800\ \mu\text{l}$  de tampón de extracción 1x con bajo contenido en sales (kit de R&D) y se incuban en hielo durante 10 min. Después los homogeneizados se centrifugan a  $13\ 000\ \text{g}$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteínas en cada muestra se estima de acuerdo con un ensayo derivado de biuret (Pierce). Los niveles de APP, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se miden por inmunotransferencia Western y técnicas de ELISA de tipo sándwich, respectivamente, como se ha descrito (28). Además, se pueden medir las actividades de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas en los mismos extractos.

## Ensayo de los niveles de APP total en extractos de corteza cerebral de ratón

Se carga una cantidad de extractos cerebrales equivalente en proteínas en cada gel,  $30\ \mu\text{g}$  por banda por muestra. Cada gel contenía ocho tratamientos: control; fármaco 1 dosis de  $7.5\ \text{mg/kg}$ ; y fármaco 2 en varias dosis. Para minimizar la variación intra-gel, cada gel contenía tres grupos de todos los grupos de tratamiento. Cada transferencia se detecta con anticuerpo 22C11. Asimismo, cada transferencia se detecta con el anticuerpo de  $\beta$ -actina para la normalización de la eficiencia de la transferencia. La intensidad de la señal de la banda de APP se normaliza con la de la  $\beta$ -actina. Se cargan dos "controles" de muestra en cada gel/transferencia para analizar la variación de una transferencia a otra. El análisis de transferencias se lleva a cabo de dos formas: por transferencias ( $n=3$ ) para analizar la variación de un gel a otro; y transferencias combinadas ( $n=9$  o  $10$ ) como se ha descrito (38-39). El análisis por transferencias con  $n=3$  muestra la misma tendencia que el análisis final con  $n=9$  o  $10$ . Se presentan los resultados del análisis combinado.

ELISA de tipo sándwich de A $\beta$ 

Para los ELISAS de A $\beta$  en el cerebro, se determinan los niveles de A $\beta$  en el prosencéfalo y el rombencéfalo de forma independiente, y el bulbo olfativo se excluye del análisis. Para el análisis de A $\beta$  en plasma, se recoge sangre en tubos recubiertos con EDTA tras punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugan a  $3000\ \text{rpm}$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y el plasma se distribuye en partes alícuotas y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se usa. Los niveles de A $\beta$  se determinan por ELISA de tipo sándwich específico de extremo usando Ab9 (Ab anti-A $\beta$ 1-16) como el Ab de captura para A $\beta$ 40, 13.1.1-HRP (Ab anti-A $\beta$ 35-40) como Ab de detección para A $\beta$ 40, 2.1.3 (Ab anti-A $\beta$ 35-42) como Ab de captura para A $\beta$ 42 y Ab9-HRP como Ab de detección para A $\beta$ 42 ( $n=5-7$  ratones por genotipo en cada grupo de edad). Los niveles de A $\beta$  se normalizan a los resultados previos usando los mismos grupos de ratones como controles internos para minimizar la potencial variabilidad del ELISA, como se ha descrito (28).

## Transferencia Western

Se homogeneizan muestras de prosencéfalo ultracongelado en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Boston BioProducts, Worcester, MA) con mezcla de inhibidor de proteasa al 1% (Roche). El homogeneizado se centrifuga a  $100\ 000\ \times\ \text{g}$  durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteínas en los líquidos sobrenadantes se determina usando el ensayo de proteínas de BCA (Pierce). Las muestras de proteína ( $20\ \mu\text{g}$ ) se analizan en geles XT de Bis-Tris al 12% o geles XT de Bis-Tris al 4-12% (Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfieren a membranas de nitrocelulosa de  $0.2\ \mu\text{m}$ . Las transferencias se someten a microondas durante 2 min en PBS 0.1 M dos veces y se detectan con Ab 82E1 (anti-A $\beta$ 1-16, 1:1000; IBL, Gunma, Japón) y anti-20 aminoácidos C-terminales de APP (1:1000) como se ha descrito (28). Las transferencias se extraen y se vuelven a detectar con anti- $\beta$ -actina (1:1000; Sigma) como control de carga. La intensidad relativa de la banda se mide usando el software ImageJ.

## Cuantificación del depósito de amiloide parenquimatoso

Se fijan hemisferios por inmersión en formalina al 10% y se procesan para insertar en parafina. Las secciones de tejido cerebral ( $5\ \mu\text{m}$ ) se inmunotiñeron con anticuerpo (Ab) anti-A $\beta$  total. Las secciones se contratiñen con hematoxilina. Se usan seis secciones por cerebro a lo largo del hipocampo, corteza piriforme (bregma,  $-1,70$  a  $-2,80\ \text{mm}$ ), o cerebelo (paraflóculo, cruz ansiforme y lóbulos simples; bregma  $-5,40$  a  $-6,36\ \text{mm}$ ) para cuantificación ( $n=5-7$  ratones por genotipo en cada grupo de edad). La carga de placa A $\beta$  se determina usando el software MetaMorph (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Para la cuantificación de las placas nucleadas se tiñen secciones seriadas de las analizadas para la carga de A $\beta$  con tioflavina S (TioS) y se cuenta el número de placas positivas para TioS en el hipocampo, corteza entorrina/piriforme o el cerebelo. Todos los análisis anteriores se llevan a cabo de forma enmascarada.

## Análisis estadístico de los datos in vivo.

Los resultados de todos los experimentos se analizan con STATISTICA 8.0 (Statsoft).

Los niveles de A $\beta$ , carga de placa amiloide y la gravedad de AAC se analizaron usando ANOVA con la prueba a

5 posteriori de comparaciones múltiples de Holm-Sidak o pruebas t de Student de dos colas. Si el conjunto de datos no cumple las suposiciones del ensayo paramétrico, se lleva a cabo bien la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de comparación múltiple a posteriori de Dunn o la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Para analizar si los niveles de A $\beta$  en los ratones bitransgénicos eran consistentes con una suma aditiva de los niveles de A $\beta$  en las crías de la misma camadas transgénicas simples, se usa un ensayo de regresión lineal múltiple sin intersección. Todas las comparaciones se hacen entre crías de la misma camada. La modelización de la respuesta al fármaco se hace excluyendo las muestras control (0 mg/kg). La DE50 corresponde a la dosis (mg/kg) requerida para inducir un 50% de la respuesta máxima inducida por el fármaco en los experimentos. Se calcula usando el modelo de ecuación de Hill para el log de DE50.

10

## Bibliografia

1. Crook R., Verkkoniemi A., *et al.* (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5.
2. Houlden H., Baker M., *et al.* (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., *et al.* (1997). Two novel (M233T and R278T) presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
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. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
6. Suh Y.H. y 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.
7. Blacker D., Albert M.S., *et al.* (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., *et al.* (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5(4): 393-7.
9. Glenner G.G., Wong C.W., *et al.* (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2(6): 357-69.

10. Ballatore C., Lee V.M., *et al.* (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.
11. Bell K.F. y Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
12. Hardy J.A. y Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
13. Braak H. y Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.
14. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15(1): 84-7.
15. Hardy J. y Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18(4): 903-22.
17. Huang Y.Z., Won S., *et al.* (2000). Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron.* 26(2): 443-55.
18. Naruse S., Thinakaran G., *et al.* (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron.* 21(5):1213-21.
19. Leeuwen F.N., Kain H.E., *et al.* (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol.* 139(3):797-807.
20. Guan K.L. y Rao Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci.* 4(12): 941-56.

21. Comeau M.R., Johnson R., *et al.* (1998). A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity*. 8(4): 473-82.
22. Hall K.T., Boumsell L., *et al.* (1996). Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(21): 11780-5.
23. Kolodkin A.L., Matthes D.J., *et al.* (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*. 75(7): 1389-99.
24. Luo Y., Shepherd I., *et al.* (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron*. 14(6): 1131-40.
25. Messersmith E.K., Leonardo E.D., *et al.* (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron*. 14(5): 949-59.
26. Brose K. y Tessier-Lavigne M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol*. 10(1): 95-102.
27. Le Gall M., De Mattei C., *et al.* (2008). Molecular separation of two signaling pathways for the receptor Notch. *Dev Biol*. 313(2): 556-67.
28. Lahiri D.K. et al. (2007) Experimental Alzheimer's Disease Drug Posiphen[(Phenserine) Lowers Amyloid-betaPeptide Levels in Cell Culture and Mice. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* **320**: 386-396.
29. P.J. Mitchell et al. (2007) A quantitative method for analysis of in vitro neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Methods* 164 350–362
30. Sang Tae KIM, et al. (2006) Neuroprotective Effect of Some Plant Extracts in Cultured CT105-Induced PC12 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **29**(10) 2021—2024
31. McGowan E.,et al. (2005) A $\beta$ 42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron* 47: 191–199.

32. Leighty R.E. et al. (2008) Use of artificial neural networks to determine cognitive impairment and therapeutic effectiveness in Alzheimer's transgenic mice. *Journal of Neuroscience Methods* **167**: 358–366
33. Ashe KH (2001) Learning and memory in transgenic mice modelling Alzheimer's disease. *Learning and Memory* **8**: 301-308.
34. Carlson GA, et al. (1997) Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Human Molecular Genetics* **6**:1951-1959.
35. Hsiao K, et al. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**: 99-102.
36. Greenberg S.M. y Vonsattel J.P. (1997) Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* **28**(7):1418-22
37. Schindowski K. et al. (2006) Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. *Am J Pathol.* **169**: 599–616.
38. Lahiri DK, et al. (2004) Dietary supplementation with melatonin reduces levels of amyloid beta-peptides in the murine cerebral cortex. *Journal of Pineal Research* **36**:224–231.
39. Basha MR, et al. (2005) The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. *Journal of Neuroscience* **25**: 823–829.
40. Singer C., Figueroa-Masot X., Batchelor R., y Dorsa D. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999, **19**(7):2455–2463.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende zonisamida, o una sal o formulación de liberación sostenida de la misma, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. La composición para usar de la reivindicación 1, que comprende además al menos un compuesto seleccionado del grupo de difilina, tadalafilo, argatrobán, acamprosato, cinacalcet, terbinafina, cilostazol, baclofeno, fenformina, amlodipina y sulfisoxazol, sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la administración combinada, separada o secuencial con zonisamida.
- 10 3. La composición para usar de la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, siendo dichos fármacos en dichas combinaciones para la administración combinada, separada o secuencial:
  - fenformina y zonisamida,
  - zonisamida y sulfisoxazol,
  - acamprosato y zonisamida,
  - zonisamida y difilina,
  - 15 - zonisamida y argatrobán o
  - zonisamida y cilostazol.
4. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición comprende además al menos un fármaco que modula la función sináptica, para el uso combinado, separado o secuencial.
- 20 5. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición comprende además al menos un fármaco que modula la angiogénesis, para el uso combinado, separado o secuencial.
6. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición comprende además al menos un fármaco que modula la respuesta al estrés celular, para el uso combinado, separado o secuencial.
- 25 7. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. La composición para usar de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición se administra repetidamente al sujeto.

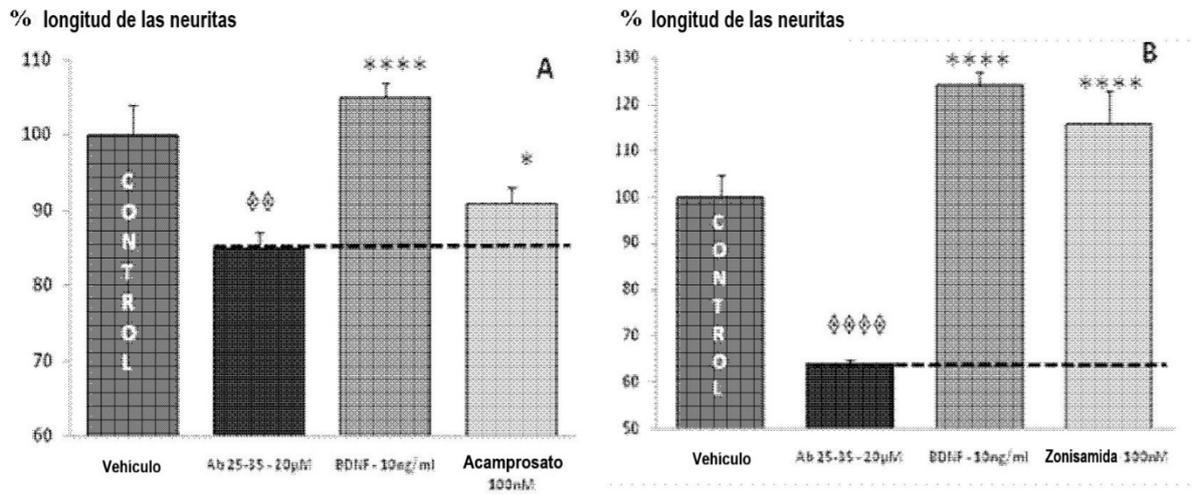


FIGURA 1

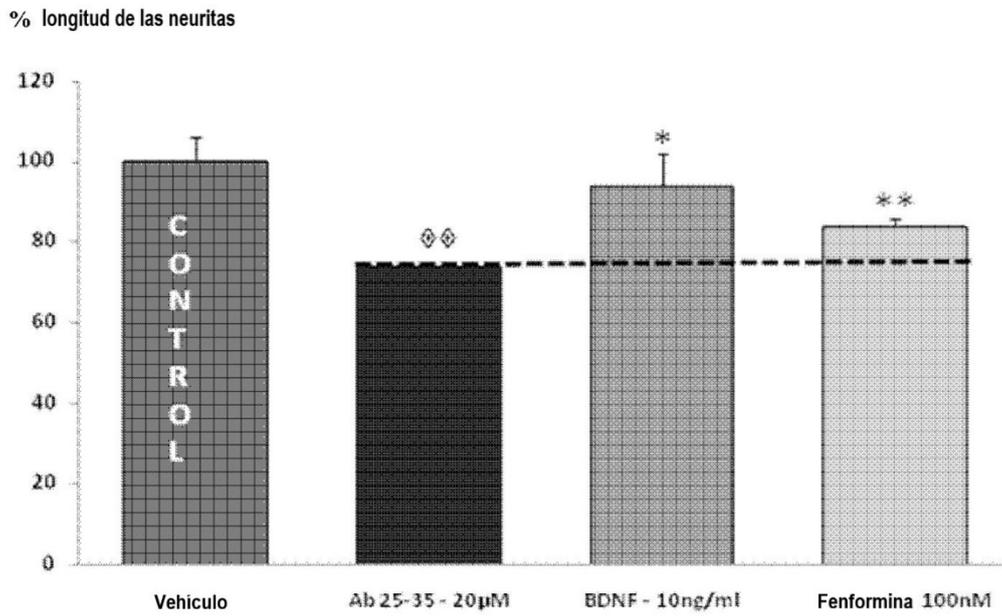


FIGURA 2