

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 311**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/137** (2006.01)  
**A61K 31/155** (2006.01)  
**A61K 31/167** (2006.01)  
**A61K 31/185** (2006.01)  
**A61K 31/343** (2006.01)  
**A61K 31/423** (2006.01)  
**A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 31/195** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010 PCT/EP2010/066510**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11054759**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10773302 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2496226**

54 Título: **Nuevos enfoques terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**03.11.2009 EP 09306048**

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

**29.12.2020**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)  
11-13 Rue René Jacques  
92130 Issy-les-Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
CHUMAKOV, ILYA y  
NABIROCHKIN, SERGUEI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 800 311 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevos enfoques terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) y de trastornos relacionados. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas terapias combinatorias de la enfermedad de Alzheimer y de trastornos relacionados. En particular, la invención atañe a compuestos que, solos o en combinación(es), pueden modular eficazmente la función sináptica y/o la angiogénesis y/o la respuesta al estrés celular.

### Antecedentes de la invención

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

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

20 La tasa de incidencia de la EA aumenta espectacularmente con la edad. Las predicciones demográficas de las Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se acercará a los 370 millones para el año 2050. Actualmente, se estima que el 50% de las personas mayores de 85 años sufren de EA. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 50 años. La enorme cantidad de personas que requerirán cuidados constantes y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, monetarios y humanos (6).

30 El deterioro de la memoria es la primera característica de la enfermedad y afecta a la memoria episódica (memoria para acontecimientos cotidianos). La memoria semántica (memoria para significado verbal y visual) se ve afectada más tarde en la enfermedad. Por el contrario, la memoria de trabajo (memoria a corto plazo que implica estructuras y procesos utilizados para almacenar y manipular información temporalmente) y la memoria procedural (memoria inconsciente que es una memoria a largo plazo de habilidades y procedimientos) se conservan hasta tarde. A medida que avanza la enfermedad, surgen las características adicionales de deterioro del lenguaje, las deficiencias visuales perceptivas y espaciales, las agnosias y las apraxias.

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

40 La característica distintiva patológica de la EA incluye placas amiloides que contienen beta-amiloide (Abeta), ovillos neurofibrilares (ONFs) que contienen Tau y disfunción y pérdida neuronal y sináptica (9-11). En la última década se han propuesto dos hipótesis principales sobre la causa de la EA: la "hipótesis de la cascada amiloide", que expone que el proceso neurodegenerativo es una serie de acontecimientos desencadenados por el procesamiento anormal de la proteína precursora amiloidea (APP, por sus siglas en inglés) (12), y la "hipótesis de la degeneración citoesquelética neuronal" (13), que propone que los cambios citoesqueléticos son los acontecimientos desencadenantes. La teoría más ampliamente aceptada que explica la evolución de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada amiloide (14-16) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en determinar los mecanismos subyacentes a la toxicidad asociada con las proteínas Abeta. En cambio, la proteína Tau ha recibido mucha menos atención por parte de la industria farmacéutica que la amiloide, por intereses tanto fundamentales como prácticos. Además, el cambio en la densidad sináptica es la lesión patológica que mejor correlación tiene con el deterioro cognitivo en relación con las otras dos. Algunos estudios han revelado que la patología amiloide parece desarrollarse en una manera específica de los neurotransmisores, en la que los terminales colinérgicos parecen ser los más vulnerables, seguidos de los terminales glutamatérgicos y finalmente de los terminales GABAérgicos (11).

### Compendio de la invención

El propósito de la presente invención es proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para tratar la EA y los trastornos relacionados.

55 Los inventores han identificado diversos fármacos que, solos o en combinación(es), pueden afectar de forma eficaz a las rutas involucradas en la EA y representan terapias nuevas y efectivas para el tratamiento de la EA y los tras-

tornos relacionados.

Por lo tanto, la invención proporciona nuevas composiciones para tratar la enfermedad EA y trastornos relacionados, tal y como se definen en las reivindicaciones.

5 En esta memoria también se describe una composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos elegidos a partir del grupo que consiste en ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina, levosimendán y zonisamida, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado.

15 También se describe en esta memoria una composición que comprende una combinación de al menos dos compuestos elegidos a partir del grupo que consiste en ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina, levosimendán y zonisamida, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración simultánea, por separado o secuencial.

20 Las combinaciones de fármacos más preferidas comprenden 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, incluso más preferiblemente 2 o 3. Además, las combinaciones de fármacos anteriores también pueden usarse en combinación adicional con fármacos o tratamientos adicionales usados actualmente para la EA.

25 También se describe en esta memoria un método para producir fármaco(s) para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el método comprende una etapa de someter a ensayo el o los fármacos candidatos para estudiar la actividad sobre la función sináptica y la angiogénesis y la respuesta al estrés celular y seleccionar el o los fármacos candidatos que mejoran la función sináptica, atenúan la desregulación angiogénica y modulan la respuesta al estrés celular.

30 También se describe en esta memoria un método para producir una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el método comprende preparar una combinación de un fármaco que modula la función sináptica y/o un fármaco que atenúa la desregulación angiogénica y/o un fármaco que modula la respuesta al estrés celular, para una administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto que lo necesite.

### Breve descripción de las Figuras

35 Figura 1: Efecto de fármacos seleccionados sobre la extensión de neuritas en un cultivo de neuronas corticales primarias de rata, intoxicadas con beta-amiloide.  $\diamond\diamond$ :  $p < 0,01$ ;  $\diamond\diamond\diamond$ :  $p < 0,00001$ : significativamente diferente del vehículo. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ : significativamente diferente de A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Prueba t de Student bilateral. A $\beta$ <sub>25-35</sub> 20  $\mu$ M produce una intoxicación significativa, superior al 25%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con Acamprosato (Fig. 1A) o Zonisamida (Fig. 1B).

40 Figura 2: Efecto de Fenformina sobre la extensión de neuritas en un cultivo de neuronas corticales primarias de rata intoxicada con beta-amiloide.  $\diamond\diamond$ :  $p < 0,01$ : significativamente diferente del vehículo. \*\*:  $p < 0,001$ : significativamente diferente de A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Prueba t de Student bilateral. A $\beta$ <sub>25-35</sub> 20  $\mu$ M produce una intoxicación significativa, superior al 25%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con Fenformina.

45 Figura 3: Efecto protector de fármacos seleccionados contra la toxicidad del péptido beta-amiloide sobre la liberación de LDH desde células cerebrales endoteliales de rata.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ : significativamente diferente del vehículo. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,00001$ : significativamente diferente de A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Prueba t de Student bilateral. A $\beta$ <sub>25-35</sub> 30  $\mu$ M produce una intoxicación moderada pero significativa (Fig. 3A a D). Esta intoxicación se evita significativamente con Leflunomida (Fig. 3A), Terbinafina (Fig. 3B), Sulfisoxazol (Fig. 3C) o Baclofeno (-) (Fig. 3D). Además, Leflunomida y Terbinafina no solo evitan el efecto nocivo amiloide, sino que también disminuyen la muerte celular espontánea en el medio de cultivo.

55 Figura 4: Efecto de fármacos seleccionados sobre la viabilidad de PC12 diferenciadas con NGF después de una intoxicación con beta-amiloide.  $\diamond\diamond\diamond$ :  $p < 0,00001$ : significativamente diferente del vehículo. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ : significativamente diferente de A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Prueba t de Student bilateral. A $\beta$ <sub>25-35</sub> 10  $\mu$ M produce una intoxicación significativa, superior al 25%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo (Fig. 4A y 4B). Esta intoxicación se evita significativamente con Prilocaína (Fig. 4A) o Amlodipina (Fig. 4B).

Figura 5: Efecto de fármacos seleccionados sobre la liberación de LDH en un cultivo de neuronas corticales primarias de rata, intoxicadas con beta-amiloide.  $\diamond\diamond\diamond$ :  $p < 0,000001$ : significativamente diferente del vehículo. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ : significativamente diferente de  $A\beta_{25-35}$ . Prueba t de Student bilateral.  $A\beta_{25-35}$  20  $\mu$ M produce una intoxicación significativa, superior al 25%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo (Fig. 5A y B). Esta intoxicación se evita significativamente con Zonisamida (Fig. 5A) o Sulfisoxazol (Fig. 5B) o Leflunomida (Fig. 5C).

Figura 6: Efecto de un pretratamiento con fármacos seleccionados contra una lesión con  $A\beta_{1-42}$  humano en HBMEC. A) Validación del modelo experimental utilizado para la detección de fármacos: 1 hora de pretratamiento con VEGF 10 nM protegía significativamente la red capilar de esa lesión amiloide (+78% de la red capilar en comparación con una intoxicación con amiloide). \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente del control (sin intoxicación)  $\diamond$ :  $p < 0,05$ : significativamente diferente de una intoxicación con amiloide (ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc). La intoxicación se evita significativamente con Sulfisoxazol, Levosimendán, Terbinafina, Baclofeno, Ácido aminocaproico, Sulodexida o Fenoldopam, tal y como se muestra en los experimentos de dosis-respuesta, respectivamente en la Fig. 6B, Fig. 6C, Fig. 6D, Fig. 6E, Fig. 6F, Fig. 6G, Fig. 6H.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ : significativamente diferente de la siguiente dosis \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente de la intoxicación con amiloide (ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc).

Figura 7: Efecto de un pretratamiento con fármacos seleccionados sobre la liberación de LDH en la toxicidad de  $A\beta_{1-42}$  humano en células corticales primarias de rata. A) Validación del modelo experimental utilizado para la detección de fármacos: 1 hora de pretratamiento con BDNF (50 ng/ml) protegía significativamente las neuronas de esa lesión amiloide (-62%), lo que se considera un control positivo para la neuroprotección. \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente del control (sin intoxicación)  $\diamond$ :  $p < 0,05$ : significativamente diferente de la intoxicación con amiloide (ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc). Para todos los experimentos,  $A\beta_{1-42}$  produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. La intoxicación se evita significativamente con Baclofeno (-86%) (B), Sulfisoxazol (-42%) (C), Levosimendán (-133%) (D), Etomidato (-50%) (E), Carbenoxolona (-39%) (F), y con Cinarizina (-50%) (G). Para todos los experimentos,  $\diamond$ :  $p < 0,05$ : significativamente diferente de una intoxicación con  $A\beta_{1-42}$  (ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc).

Figura 8: Efecto de una terapia de combinación con Sulfisoxazol y Levosimendán sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Sulfisoxazol y Levosimendán (A), mientras que, con esas concentraciones, Levosimendán (B) y Sulfisoxazol (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

Figura 9: Efecto de una terapia de combinación con Sulfisoxazol y Terbinafina sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Sulfisoxazol y Levosimendán (A) mientras que, con esas concentraciones, Sulfisoxazol (B) y Terbinafina (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

Figura 10: Efecto de una terapia de combinación con Baclofeno y Levosimendán sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Baclofeno y Levosimendán (A) mientras que, con esas concentraciones, Levosimendán (B) y Baclofeno (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

Figura 11: Efecto de una terapia de combinación con Terbinafina y Ácido aminocaproico sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Terbinafina y Ácido aminocaproico (A) mientras que, con esas concentraciones, Ácido aminocaproico (B) y Terbinafina (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

Figura 12: Efecto de la combinación de Ácido aminocaproico y Levosimendán sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Dunett Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Levosimendán y Ácido aminocaproico (A) mientras que, con esas concentraciones, Ácido aminocaproico (B) y Levosimendán (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

Figura 13: Efecto de una terapia de combinación con Terbinafina y Levosimendán sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicados con beta-amiloide.  $\diamond$ :  $p < 0,05$ , significativamente diferente de  $A\beta_{1-42}$ . \*:  $p < 0,05$ , significativamente diferente del vehículo. ANOVA + prueba de Bonferroni Post-Hoc. El péptido amiloide humano agregado ( $A\beta_{1-42}$  2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de Terbinafina y Levosimendán (A) mientras que, con esas concentraciones, Terbinafina (B) y Levosimendán (C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

### Descripción detallada de la invención

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

La expresión "trastorno relacionado con EA" incluye demencia senil de tipo EA (DSTA), demencia con cuerpos de Lewis, demencia vascular, deterioro cognitivo leve (DCL), deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE) y problemas asociados con el envejecimiento, Parkinson post-encefálico, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y síndrome de Down.

Tal y como se usa en esta memoria, el "tratamiento" de un trastorno incluye la terapia, prevención, profilaxis, retraso o reducción de los síntomas provocados por el trastorno. El término tratamiento incluye en particular el control de la progresión de una enfermedad y los síntomas asociados.

El término "mejora", cuando se refiere a la función sináptica, incluye cualquier aumento en la función sináptica en comparación con la función existente en el sujeto. Una mejora de ese tipo puede incluir una restauración, es decir, a los niveles normales, o un aumento menor, que todavía son suficientes para mejorar el estado del paciente. Esa mejora puede evaluarse o verificarse utilizando pruebas biológicas conocidas, como las descritas en la sección experimental.

El término "aumento", cuando se refiere a la angiogénesis, incluye cualquier aumento de la angiogénesis en comparación con el nivel existente en el sujeto. Una mejora de ese tipo puede incluir una restauración, es decir, a niveles normales, o un aumento menor, que todavía son suficientes para mejorar el estado del paciente. Ese aumento puede evaluarse o verificarse usando pruebas biológicas conocidas, como las descritas en la sección experimental.

El término "inhibir", cuando se refiere a la respuesta frente al estrés celular ("REC"), incluye cualquier reducción en la REC en comparación con la actividad existente en el sujeto. Esa reducción puede incluir una disminución parcial, por ejemplo, del 5-20%, que es suficiente para mejorar el estado del paciente, así como reducciones más sustanciales, por ejemplo, del 20-50% o más de la inhibición completa, por ejemplo, superior al 50%. La inhibición se puede evaluar o verificar utilizando pruebas biológicas conocidas, como las descritas en la sección experimental.

Además, la designación de compuestos específicos dentro del contexto de esta invención se entiende que incluye no solo las moléculas mencionadas específicamente, sino también cualquier sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

La expresión "tratamiento/terapia combinada o combinatoria" designa un tratamiento en el que al menos dos o más fármacos se administran conjuntamente a un sujeto para causar un efecto biológico. En una terapia combinada de acuerdo con esta invención, los al menos dos fármacos pueden administrarse juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los al menos dos fármacos pueden administrarse a través de diferentes vías y protocolos. Como resultado, aunque se pueden formular juntos, los fármacos de una combinación también se pueden formular por separado.

Como se ha indicado anteriormente, en esta memoria se describen composiciones para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en un sujeto que lo necesita, usando fármacos particulares o combinaciones de fármacos que mejoran la función sináptica y/o aumentan la angiogénesis y/o inhiben la respuesta al estrés celular.

Mediante una integración integral de datos experimentales que incluyen los resultados de estudios de biología celular, experimentos del perfil de expresión y estudios de asociación genética, que describen diferentes aspectos de la enfermedad de Alzheimer y los vínculos existentes con la señalización celular y las rutas funcionales, los inventores han descubierto que la función sináptica, la angiogénesis y la respuesta al estrés celular representan mecanismos importantes que se alteran en sujetos que tienen EA. Mediante investigaciones experimentales adicionales, los inventores han seleccionado fármacos o combinaciones de fármacos que alteran eficazmente esas rutas y que mejoran eficazmente la EA, como se ilustra en los ejemplos. Esos fármacos y combinaciones, por lo tanto, representan enfoques novedosos para tratar la EA y trastornos relacionados.

Los genes ubicados en dichas redes funcionales e implicados en la enfermedad de Alzheimer se seleccionaron mediante los siguientes criterios:

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

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

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

5 A través de este procedimiento, los inventores han establecido que las redes responsables de la función sináptica, la angiogénesis y la respuesta al estrés celular son las principales redes funcionales afectadas en la enfermedad de Alzheimer.

Los inventores han establecido más específicamente que la pérdida sináptica es una característica distintiva, funcionalmente relevante de la enfermedad de Alzheimer, que finalmente conduce a un deterioro cognitivo progresivo, pérdida de memoria y demencia. Es importante destacar que la pérdida sináptica se correlaciona mejor con el déficit cognitivo caracterizado por la patología de Alzheimer, en comparación con otros marcadores de lesiones celulares específicos de la EA que se manifiestan con un desarrollo de ovillos neurofibrilares o el depósito de placas amiloides. En consecuencia, la organización de la sinapsis y la plasticidad sináptica representan un objetivo importante para las intervenciones terapéuticas en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

15 La proteína APP se transporta y procesa axonalmente en terminales presinápticas, lo que conduce a una acumulación elevada de Abeta en las sinapsis. Los oligómeros de Abeta42, así como las propias placas amiloides, son importantes para inhibir la potenciación a largo plazo y son los principales responsables del deterioro de la memoria en pacientes con EA.

Nuestro procedimiento de integración de datos reveló un grupo de genes, que están implicados en una distorsión 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 la transmisión correcta de la señal nerviosa a la membrana post-sináptica; proteínas que aseguran la liberación de neurotransmisores; y proteínas involucradas en el crecimiento del axón y la maduración del desarrollo de la maquinaria sináptica.

20 La presente solicitud describe, por lo tanto, que es importante, para un tratamiento eficaz de la EA, mejorar la actividad de las proteínas implicadas en la densidad postsináptica.

Entre los genes identificados a través de nuestro análisis, el gen DLG2, que codifica la proteína de la familia MAGUK y crea una interfaz entre los receptores agrupados unidos a la membrana, las moléculas de adhesión celular y el citoesqueleto basado en actina, tiene un interés particular (17-18). Los inventores han identificado un gran grupo de receptores del glutamato ionotróficos/metabotróficos y de factores de crecimiento, que interactúan directamente con la proteína DLG2 o el complejo de proteínas DLG2/PSD95 en las sinapsis excitadoras y que, por lo tanto, se pueden reconocer como dianas terapéuticas para tratar la enfermedad de Alzheimer.

25 La presente solicitud también describe que es importante, para un tratamiento eficaz de la EA, mejorar la actividad de las proteínas involucradas en la regulación de la liberación de neurotransmisores en la membrana presináptica.

La liberación de neurotransmisores en una zona activa restringida y altamente especializada de la membrana plasmática presináptica se desencadena a través del potencial de acción y se controla mediante acciones combinadas de canales Cav de calcio dependientes del voltaje, canales MaxiK/BK (canales de potasio activados por calcio de amplia conductancia) y proteínas cinasas PRKG dependientes de GMPc, todas las cuales están estrechamente asociadas, como lo demuestra nuestro análisis, con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Además de estos módulos funcionales implicados en la liberación de neurotransmisores, los inventores han definido otro grupo de proteínas, ligadas a la desregulación de la neurotransmisión sináptica en el curso de la enfermedad de Alzheimer, que son responsables de la maduración, el acoplamiento y la fusión de las vesículas sinápticas (por ejemplo, las proteínas de andamiaje STX2, STXBP6, BIN1, RAB3B, UNC13C y RIMS1/2). Por lo tanto, estas rutas funcionales se priorizaron como dianas terapéuticas apropiadas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

35 La presente solicitud describe además que es importante, para un tratamiento eficaz de la EA, mejorar la actividad de las proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y la orientación del axón.

Las proteínas que participan en la regulación del crecimiento y la orientación del axón permiten que las células precursoras neuronales y los axones migren hacia destinos adecuados para garantizar una ubicación y conectividad correctas; también están implicadas en la maduración del desarrollo de sinapsis establecidas recientemente, así como en la degradación de axones y sinapsis en la enfermedad EA. Estos procesos tienen un papel fundamental para la ejecución de funciones cognitivas y parecen ser extremadamente vulnerables al efecto tóxico de los depósitos de Abeta.

Las etapas consecutivas del crecimiento y orientación de los axones están estrechamente controladas por acciones combinadas de moléculas Netrin, Semaforinas, Efrinas, DLL y Slits extracelulares o ligadas a la membrana y sus respectivos receptores funcionales, la mayoría de los cuales han sido reveladas por nuestro enfoque de extracción de datos. Los resultados funcionales de la activación de la mayoría de los receptores del crecimiento axónico están

estrechamente relacionados con su capacidad para modular de forma diferencial la actividad de las pequeñas GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42, siendo RhoA la GTPasa la principal responsable de la retracción de las neuritas y el colapso del cono de crecimiento (19). Estas rutas de señalización se han reconocido como dianas terapéuticas pertinentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

- 5 Por lo tanto, la presente solicitud reconoce que es importante, para un tratamiento eficaz de la EA, mejorar la función sináptica alterada en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, mediante la modulación de los genes y proteínas diana descritos anteriormente.

A través del procedimiento de extracción de datos, los inventores también han establecido que la red responsable de la angiogénesis representa otra red funcional importante afectada por la enfermedad de Alzheimer.

- 10 La angiogénesis desempeña un papel fundamental para garantizar una homeostasis tisular y en respuestas adaptativas a desafíos ambientales y fisiológicos, tales como la hipoxia o la cicatrización de heridas; su disfunción contribuye a la patogénesis de numerosas y heterogéneas patologías que varían desde complicaciones cardiovasculares hasta el crecimiento de un tumor y la metástasis.

- 15 Aunque la enfermedad de Alzheimer se considera tradicionalmente como una afección neurodegenerativa acompañada de una patología vascular colateral, nuestro análisis permite reevaluar el impacto patógeno de la desregulación vascular y atribuye un papel importante y probablemente causal a las rutas angiogénicas en la etiología de esta enfermedad. Los inventores han descubierto que los genes que regulan la angiogénesis están extremadamente enriquecidos en las redes de señalización implicadas en la enfermedad de Alzheimer. Esta conclusión tiene profundas consecuencias para la prevención y la curación de la enfermedad de Alzheimer y proporciona nuevas pautas para el tratamiento combinatorio de este complejo trastorno neurodegenerativo.

- 20 Entre las rutas de señalización estrechamente implicadas en la remodelación vascular asociada con la enfermedad de Alzheimer, se han identificado varios módulos funcionales mediados por VEGFR1, ErbB4, Notch, DCC, CD44, receptores de efrina y cadherinas.

- 25 Como se revela a través de nuestro enfoque de extracción de datos, otras proteínas diana, potencialmente involucradas en el desarrollo de defectos vasculares manifestados en el curso de la enfermedad de Alzheimer, incluyen IL20R $\alpha$ , LEPTR, NRP1 y NRP2, y receptores de endotelina EDNRA, proteínas que participan en la organización y la remodelación de la matriz extracelular (THBS2, LAMA1, COL4A2, ADAMTS12 y ADAM10) o proteínas (por ejemplo, TLL2) que tienen un papel importante en el procesamiento funcional de moduladores angiogénicos bien conocidos, tales como la prolactina, la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario (20).

- 30 Además, también hemos descubierto que varios genes, asociados con la enfermedad de Alzheimer, representan moduladores aguas arriba y efectores aguas abajo de las cinasas activadas por AMP, reguladores importantes del sistema vascular (por ejemplo, receptores de leptina y CNTF, ruta de señalización de trombina, cinasas CAMKK2 $\beta$  y LKB1) (21-24). Este hallazgo nos ha permitido definir la red de señalización mediada por AMPK como una diana terapéutica razonable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

- 35 El ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina 1-fosfato (S1P) son fosfolípidos naturales que poseen potentes propiedades de señalización. En particular, estos factores de crecimiento fosfolipídico muestran efectos divergentes sobre el potencial angiogénico de las células endoteliales (25). Utilizando nuestro enfoque de extracción de datos, identificamos una gran cantidad de genes, involucrados en el metabolismo de LPA o modulados por la señalización de LPA y potencialmente vinculados a la progresión de la enfermedad de Alzheimer (MTR, MAT2B, CUBN, ATP10A, THEM2, PTPN13, ENPPG, SGPP2, AGPAT, DGKH, DGKB, MGST2, PLD2 y DRD2). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que esta red de señalización representa una diana terapéutica adecuada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

- 45 La presente solicitud también enfatiza en la importancia de aumentar la angiogénesis alterada en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, mediante una modulación de los genes y las proteínas diana descritos anteriormente.

Finalmente, hemos establecido que la red responsable de la respuesta frente al estrés celular es la tercera red funcional principal, afectada por la enfermedad de Alzheimer.

- 50 Hemos establecido más específicamente que la respuesta al estrés celular es una característica distintiva, funcionalmente relevante de la enfermedad de Alzheimer. Como se analiza a continuación, los inventores han identificado tres familias de proteínas, dentro de la red de respuesta al estrés celular, que son funcionalmente relevantes para la génesis y el control de la enfermedad de Alzheimer, y representan dianas valiosas para las terapias combinadas. Estos grupos de proteínas son, más específicamente, proteínas que participan en la homeostasis del calcio, en el plegamiento de proteínas y en la ejecución de la apoptosis.

- 55 La presente solicitud describe más específicamente composiciones que usan una combinación de fármacos que modula la actividad de una proteína implicada en la homeostasis del calcio.

El calcio, uno de los mensajeros intracelulares más importantes, media una pleiotropía de procesos celulares en las células neuronales y endoteliales, incluida la plasticidad sináptica, la angiogénesis y la apoptosis.

5 El nivel de calcio intracelular se regula con precisión mediante la acción cooperativa de una serie de canales permeables al calcio, bombas de calcio e intercambiadores de calcio en la membrana plasmática y el retículo endoplasmático (26-27). Hemos identificado una red de genes implicados en la ruta de la homeostasis del calcio, cuya función podría estar modificada por proteínas de presenilina mutantes o por  $\beta$ -amiloide tóxico en el curso de la enfermedad de Alzheimer. Entre ellos, los receptores IP3R (ITPR1) y RYR3, ATP2A3 (SERCA3 Ca<sup>2+</sup> + ATPasa) que regulan la homeostasis del calcio a nivel de RE, la ATPasa ATP2B1 de la membrana plasmática, que extruye los iones de calcio desde las células eucariotas frente a gradientes de concentración y los canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje, tienen un interés particular como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

También se describen en esta memoria composiciones que usan una combinación de fármacos que modula la actividad de una proteína implicada en el plegamiento o la agregación de proteínas.

15 La agregación de proteínas es un fenómeno citopatológico central en la EA. Dos características distintivas celulares principales de la enfermedad de Alzheimer se manifiestan en el desarrollo de ovillos neurofibrilares (ONFs) y el depósito de placas amiloides, compuestas de proteína tau hiperfosforilada agregada y fragmentos A $\beta$  de proteína APP, respectivamente. Sin embargo, otra proteína propensa a la agregación, la  $\alpha$ -sinucleína, reconocida como una característica distintiva bastante específica de la enfermedad de Parkinson, se puede detectar en las placas amiloides en la mayoría de los casos de formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Alzheimer.

20 Hemos determinado varios genes implicados en la modulación del plegamiento, la modificación postraduccional y el procesamiento de cada componente principal de las agregaciones de proteínas asociadas a la enfermedad de Alzheimer, como dianas terapéuticas pertinentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, las proteínas APBA1 y APBA2BP que interactúan con APP y regulan su estabilidad y funciones, o la ubiquitina-proteína ligasa PARK2 que está implicada en el aclaramiento de la  $\alpha$ -sinucleína (28). Además, la cinasa GSK-3 $\beta$  podría desempeñar un papel particularmente importante en la patogenia del plegamiento defectuoso de proteínas en el curso de la enfermedad de Alzheimer. Esta conclusión se ve reforzada por nuestro hallazgo de que unos pocos módulos de señalización que regulan la actividad de la cinasa GSK-3 $\beta$  y su interacción con la proteína tau - WWOX (29), el receptor de hialuronano CD44, los receptores de Wnt Fz2/ROR2 y el complejo de receptor de insulina/fosfatasa PTPRG (30) - están asociados con la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

30 La presente solicitud también describe composiciones que usan una combinación de fármacos que inhibe la apoptosis que se reconoce como un mecanismo celular principal responsable de la pérdida celular en la enfermedad de Alzheimer.

Tal y como se ha identificado con nuestro análisis, la apoptosis en el caso de la enfermedad de Alzheimer se ejecuta, muy probablemente, a través de rutas canónicas dependientes de p53.

35 La proteína p53 se puede regular mediante modificaciones postraduccionales y mediante interacciones con factores reguladores positivos y negativos. Hemos identificado varias de esas proteínas reguladoras (WWOX, MDM1, HIPK2 y PML), confirmando la propuesta sobre el papel fundamental de la proteína p53 en la ejecución de la muerte celular en la enfermedad de Alzheimer (31-33).

40 Entre los sistemas receptores que podrían estar directa y específicamente implicados en la inducción de la apoptosis en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, los receptores de netrína UNC5C (Homólogo C de Unc-5) y DCC (suprimido en el carcinoma colorrectal, del inglés "Deleted in Colorectal Carcinoma"), que participan en la guía axonal y la angiogénesis, tienen un interés particular. Estos receptores se denominan supresores tumorales condicionales putativos, ya que se comportan como receptores dependientes de netrína que inducen la apoptosis en ausencia de su ligando (34). La unión de netrína-1 a esos receptores inhibe la apoptosis dependiente de p53, mientras que p53 está implicado directamente en la regulación transcripcional de netrína-1 y sus receptores (33). Además, se sabe que el receptor de DCC está procesado por la presenilina, lo que indica su importante papel en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (35). Por lo tanto, nuestra extracción de datos sugiere que la muerte celular programada dependiente de los receptores de netrína y mediada por p53, podría ser una de las rutas específicas proapoptóticas implicadas en la pérdida celular patológica en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, además de programas proapoptóticos bastante inespecíficos, estimulados por la homeostasis de calcio interrumpida y la producción excesiva de ROS.

45 La presente solicitud también describe composiciones que emplean una combinación de fármacos que inhibe la actividad de al menos dos proteínas distintas, implicadas en la homeostasis del calcio, en el plegamiento de las proteínas y en la ejecución de la apoptosis.

55 La presente solicitud propone composiciones novedosas, que se pueden usar para inhibir la respuesta al estrés celular inducida en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, modulando genes y proteínas diana descritos anteriormente.

Como se ha indicado anteriormente, también se describen en esta memoria composiciones para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesita, usando una combinación de fármacos que mejoran la función sináptica y/o aumentan la angiogénesis y/o inhiben la respuesta al estrés celular.

5 Más específicamente, los inventores han seleccionado y sometido a ensayo una serie de fármacos o combinaciones de fármacos que alteran una o, preferiblemente, todas las rutas descritas anteriormente. Como se describe en los ejemplos, estas combinaciones de fármacos tienen un fuerte efecto sobre la enfermedad de Alzheimer y representan nuevos enfoques terapéuticos de la patología. Estas combinaciones de fármacos son particularmente ventajosas porque afectan a diferentes rutas y, por lo tanto, son más eficaces. Además, debido a su eficacia y modo de acción, las combinaciones de fármacos se pueden usar en dosificaciones bajas, lo cual es una ventaja adicional muy sustancial.

10

Los fármacos más preferidos se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO DE CAS
Acamprosato	77337-76-9
Ambrisentán	177036-94-1
Ácido aminocaproico	60-32-2
Amlodipina	88150-42-9
Amobarbital	57-43-2
Aprindina	37640-71-4
Argatrobán	74863-84-6
Baclofeno	1134-47-0
Benidipina	105979-17-7
Carbamazepina	298-46-4
Carbamazina	90-89-1
Carbenoxolona	5697-56-3
Cefmenoxima	65085-01-0
Cefotetán	69712-56-7
Ciclopirox	29342-05-0
Cilostazol	73963-72-1
Cinacalcet	226256-56-0
Cinarizina	298-57-7
Clopidogrel	113665-84-2
Difilina	479-18-5
Enprofilina	41078-02-8
Eplerenona	107724-20-9
Eprosartán	133040-01-4
Tetranitrato de eritrilo	7297-25-8
Etomidato	33125-97-2
Fenoldopam	67227-57-0
Leflunomida	75706-12-6
Lercanidipina	100427-26-7
Levosimendán	141505-33-1
Mepacrina	83-89-6
Metimazol	60-56-0

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO DE CAS
Metoclozida	135-07-9
Mitiglinida	145375-43-5
Moxifloxacina	354812-41-2
Oxtrifilina	4499-40-5
Parametadiona	115-67-3
Fenformina	114-86-3
Prilocaína	721-50-6
Rifabutina	72559-06-9
Risedronato	105462-24-6
Sulfisoxazol	127-69-5
Sulodexida	57821-29-1
Tadalafilo	171596-29-5
Terbinafina	91161-71-6
Zonisamida	68291-97-4

- 5 A este respecto, se describen en esta memoria composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos elegidos a partir del grupo que consiste en ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritrilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina, levosimendán y zonisamida, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración simultánea, por separado o secuencial.
- 10 También se describen en esta memoria composiciones que comprenden al menos un compuesto elegido a partir del grupo que consiste en ácido aminocaproico, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritrilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina y levosimendán, o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto elegido a partir del grupo que consiste en
- 15 acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina y zonisamida, o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida, para una administración simultánea, por separado o secuencial.
- Tal y como se describe en los ejemplos, las terapias combinadas que usan al menos 2 de los fármacos mencionados anteriormente, conducen a una corrección eficaz de la enfermedad de Alzheimer.
- 20 La terapia según la invención se puede llevar a cabo sola o como una combinación de fármacos.
- En una realización preferida, los fármacos de la invención se usan en combinación(es) para una administración combinada, por separado o secuencial, con el fin de proporcionar el efecto más efectivo. A este respecto, las composiciones para tratar la enfermedad de Alzheimer emplean fármaco(s) que mejora(n) la función sináptica y fármaco(s) que atenúa(n) la angiogénesis y/o fármaco(s) que inhibe(n) la respuesta al estrés celular.
- 25 También se describen en esta memoria las composiciones para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado que comprenden al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:
- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida),
- 30
- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un modulador de la actividad de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina),
  - un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),

## ES 2 800 311 T3

- un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador del receptor de rianodina RYR3 (preferiblemente, prilocaína),
- 5 - un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato),
- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),
- 10 - un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida),
- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de las sintasas de hialuronano HAS1-3 (preferiblemente, leflunomida),
- 15 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador de los receptores de adenosina ADORA1/2/3 (preferiblemente, difilina),
- un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),
- 20 - un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),
- un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y un inhibidor de las fosfolipasas PLA1A y PLA2 (preferiblemente, mepacrina),
- 25 - un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y un modulador de la actividad de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina),
- un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y una chaperona química (preferiblemente, rifabutina),
- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un inhibidor de las fosfodiesterasas PDE11A y PDE4A, PDE5A (seleccionado preferiblemente a partir de tadalafilo, enprofilina y oxtrifilina),
- 30 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador de la señalización del receptor de trombina F2R (preferiblemente, argatrobán y cefmenoxima),
- un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina) y un modulador de los receptores purinérgicos P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente, clopidogrel),
- 35 - un modulador de la actividad de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina) y un modulador de CASR (preferiblemente, cinacalcet),
- un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol) y un modulador de CASR (preferiblemente, cinacalcet),
- 40 - un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y un modulador de la señalización del receptor de trombina F2R (seleccionado preferiblemente a partir de argatrobán y cefmenoxima),
- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de los receptores purinérgicos P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente, clopidogrel),
- 45 - un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato) y un modulador de los receptores purinérgicos P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente, clopidogrel),
- un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un antagonista de los canales de calcio CACNA dependientes de voltaje (seleccionado preferiblemente a partir de cinarizina, benidipina, pa-

rametadiona y amlodipina),

- 5 - un modulador de la actividad de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina) y un antagonista de los canales de calcio CACNA dependientes de voltaje (seleccionado preferiblemente a partir de cinarizina, benidipina, parametadiona y amlodipina),
- un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador de la señalización de HIF1A (preferiblemente ciclopirox),
- 10 - un modulador de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina) y un modulador de la señalización de HIF1A (preferiblemente, ciclopirox),
- un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol) y un modulador de la fosforilación oxidativa (seleccionado preferiblemente a partir de amobarbital y metimazol),
- 15 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador de la fosforilación oxidativa (seleccionado preferiblemente a partir de amobarbital y metimazol),
- un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol) y un modulador del metabolismo de la vitamina K (preferiblemente, cefotetán),
- 20 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador del metabolismo de la vitamina K (preferiblemente, cefotetán),
- un modulador de la actividad de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, etomidato y aprindina) y un modulador de PRKG1 (preferiblemente, tetranitrato de eritrilo),
- 25 - un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida) y un modulador de PRKG1 (preferiblemente, tetranitrato de eritrilo),
- un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol) y un modulador de PRKG1 (preferiblemente, tetranitrato de eritrilo),
- 30 - un modulador de KCNJ11 (seleccionado preferiblemente a partir de mitiglinida y levosimendán) y un modulador de PRKG1 (preferiblemente, tetranitrato de eritrilo),
- un modulador de KCNJ11 (seleccionado preferiblemente a partir de mitiglinida y levosimendán) y un inhibidor del canal de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferiblemente, zonisamida) o un modulador de los canales de BK (preferiblemente, meticlotiazida),
- 35 - un modulador de KCNJ11 (seleccionado preferiblemente a partir de mitiglinida y levosimendán) y un modulador de RHOA (seleccionado preferiblemente a partir de terbinafina y risedronato).

40 También se describe en esta memoria cualquier combinación de compuestos seleccionados a partir de ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritrilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina, levosimendán y zonisamida o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado.

45 También se describe en esta memoria un uso de una composición en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, que comprende al menos un compuesto elegido a partir del grupo que consiste en ácido aminocaproico, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritrilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina y levosimendán, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto elegido a partir del grupo que consiste  
50 en acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina y zonisamida, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos.

También se describe en esta memoria una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesita, que comprende al menos ácido aminocaproico, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos. Por ejemplo, el ácido aminocaproico se usa en combinación con al menos un compuesto adicional, seleccionado preferiblemente a partir de acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina, levosimendán y zonisamida o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial.

También se describen en esta memoria composiciones que comprenden ácido aminocaproico, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida del mismo, y al menos un compuesto adicional seleccionado a partir de baclofeno, sulfisoxazol, terbinafina y levosimendán, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial.

La presente invención se refiere a una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado en un sujeto que la necesita, que comprende al menos levosimendán, o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida del mismo. En una realización particular, levosimendán se usa en combinación con al menos un compuesto adicional seleccionado preferiblemente a partir de ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina y zonisamida o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial.

Una composición preferida de la invención comprende levosimendán, o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida del mismo, y al menos un compuesto adicional seleccionado a partir de ácido aminocaproico, baclofeno, sulfisoxazol y terbinafina, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial. Tal composición per se también representa un objeto particular de la invención.

También se describe en esta memoria una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesita, en donde la composición comprende al menos Eplerenona, Carbenoxolona, Sulodexida, Cinarizina o carbamazina, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida de las mismas.

Por ejemplo, Eplerenona, Carbenoxolona, Sulodexida, Cinarizina o carbamazina, se usan en combinación con al menos un compuesto adicional seleccionado preferiblemente a partir de levosimendán, ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, ciclopirox, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina y zonisamida, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial.

También se describe en esta memoria una composición que comprende Eplerenona, Carbenoxolona, Sulodexida, Cinarizina o carbamazina, o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) o formulación(es) de liberación sostenida de las mismas, y al menos un compuesto adicional seleccionado a partir de levosimendán, ácido aminocaproico, baclofeno, sulfisoxazol y terbinafina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial. Una composición de ese tipo per se también representa un objeto particular de la invención.

También se describe en esta memoria una composición para un tratamiento combinatorio de la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesita, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos para una administración combinada, por separado o secuencial:

- fenformina y zonisamida,
- fenformina y meticlotiazida,
- fenformina y acamprosato,
- fenformina y sulfisoxazol,
- baclofeno y ácido aminocaproico,
- baclofeno y levosimendán,

- baclofeno y terbinafina,
- baclofeno y risedronato,
- baclofeno y sulfisoxazol,
- baclofeno y zonisamida,
- 5 - baclofeno y meticlotiazida,
- baclofeno y sulfisoxazol,
- baclofeno y leflunomida,
- ácido aminocaproico y sulfisoxazol,
- ácido aminocaproico y terbinafina,
- 10 - ácido aminocaproico y levosimendán,
- levosimendán y sulfisoxazol,
- levosimendán y terbinafina,
- zonisamida y difilina,
- meticlotiazida y difilina,
- 15 - zonisamida y prilocaína,
- meticlotiazida y prilocaína,
- zonisamida y sulfisoxazol,
- fenformina y clopidogrel,
- acamprosato y cinacalcet,
- 20 - sulfisoxazol y cinacalcet,
- terbinafina y argatrobán,
- terbinafina y cefmenoxima,
- baclofeno y clopidogrel,
- terbinafina y clopidogrel,
- 25 - risedronato y clopidogrel,
- zonisamida y cinarizina,
- acamprosato y tetranitrato de eritritilo,
- sulfisoxazol y tetranitrato de eritritilo,
- mitiglinida o levosimendán y tetranitrato de eritritilo,
- 30 - mitiglinida o levosimendán y zonisamida,
- mitiglinida o levosimendán y terbinafina,
- mitiglinida o levosimendán y risedronato.
- mitiglinida o levosimendán y meticlotiazida,
- meticlotiazida o zonisamida y sulfisoxazol,
- 35 - terbinafina o risedronato y sulfisoxazol,

- terbinafina o risedronato y mepacrina,
- terbinafina o risedronato y acamprosato,
- terbinafina o risedronato y rifabutina,
- tadalafilo o enprofilina u oxtrifilina y fenformina,
- 5 - zonisamida o meticlotiazida y argatrobán o cefmenoxima,
- risedronato y argatrobán o cefmenoxima,
- zonisamida o meticlotiazida y cinarizina o benidipina o parametadiona o amlodipina,
- acamprosato y cinarizina o benidipina o parametadiona o amlodipina,
- zonisamida o meticlotiazida y ciclopirox,
- 10 - sulfisoxazol y amobarbital,
- zonisamida o meticlotiazida y amobarbital,
- sulfisoxazol y cefotetán,
- zonisamida o meticlotiazida y cefotetán,
- zonisamida o meticlotiazida y tetranitrato de eritrilito.
- 15 Los ejemplos específicos de tales composiciones comprenden una de las siguientes combinaciones de fármacos para una administración combinada, por separado o secuencial:
  - baclofeno y ácido aminocaproico,
  - baclofeno y levosimendán,
  - ácido aminocaproico y sulfisoxazol,
  - 20 - ácido aminocaproico y terbinafina,
  - ácido aminocaproico y levosimendán,
  - levosimendán y sulfisoxazol,
  - levosimendán y terbinafina,
  - eplerenona y levosimendán,
  - 25 - eplerenona y sulfisoxazol,
  - eplerenona y fenoldopam,
  - sulodexida and levosimendán,
  - sulodexida y sulfisoxazol,
  - sulodexida y fenoldopam o
  - 30 - eplerenona y sulodexida.
- Tal y como se ilustra en la sección experimental, las composiciones que comprenden al menos ácido aminocaproico o levosimendán, proporcionan un efecto terapéutico y biológico sustancial para mejorar la enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos. Esas composiciones evitan eficazmente los efectos tóxicos de la proteína o péptido amiloide b sobre las células humanas y representan métodos novedosos y potentes para tratar ese trastorno.
- 35 En otra realización preferida, las composiciones según la invención comprenden una combinación de al menos tres compuestos, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración simultánea, por separado o secuencial para un tratamiento combinatorio de la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite.



barrera hematoencefálica (seleccionado preferiblemente a partir de pancuronio, pipercuronio, rapacuronio, rocuronio, succinilcolina, vecuronio, atracurio, cisatracurio, doxacurio, mecamilamina, metocurina, mivacurio y neomicina), y/o un inhibidor de CNGB3 (preferiblemente, amilorida), y/o un modulador de los receptores eicosanoides CYSLTR1/2, PTGER1, PTGFR y TBXA2R (seleccionado preferiblemente a partir de travoprost, montelukast, cinalukast, amlexanox, carboprost trometamina, bimatoprost y ridogrel), y/o un inhibidor de DHFR (preferiblemente, pirimetamina y triamtereno), y/o un modulador del receptor de dopamina DRD2 (seleccionado preferiblemente a partir de dihidroergotamina y cabergolina), y/o un agonista del receptor de dopamina DRD5 (preferiblemente, fenoldopam), y/o un inhibidor de EDNRA (seleccionado preferiblemente a partir de sulfametoxazol y gentamicina), y/o un modulador de ENPP2 (autotaxina) (preferiblemente, L-histidina) y/o un inhibidor de ERBB2 (preferiblemente, lapatinib), y/o un modulador de la trombina F2 (seleccionado preferiblemente a partir de sulodexida, ximelagatrán, warfarina, fenprocumón, enoxaparina, ardeparina, fondaparinux, latamoxef, bacitracina, ticlopidina y erdoesteina), y/o un inhibidor de FDPS (preferiblemente, alendronato), y/o un modulador de GABRA2 (seleccionado preferiblemente a partir de fenobarbital, metohexital, cefotiam, clometiazol, tiopental, lubiprostona y aztreonam), y/o un antagonista de GRIK1 (preferiblemente, topiramato), y/o un modulador de la actividad de GSK3B (seleccionado preferiblemente a partir de albuterol y metaraminol), y/o un modulador de la señalización de HIF1A (seleccionado preferiblemente a partir de meloxicam, topotecán, deferoxamina, ácido úsnico, hidralazina, deferiprona, dibenzoilmetano, avobenzona, dinoprostona, epoprostenol, 2-oxoglutarato y mimosina), y/o un inhibidor de HK2 (hexocinasa II) (seleccionado preferiblemente a partir de quinina, gabexato, bifonazol y clotrimazol), y/o un modulador de HMOX1 (seleccionado preferiblemente a partir de auranofina, hematina/hemina y hemo arginato), y/o un modulador de los receptores HTR1B/1D (seleccionado preferiblemente a partir de ergotamina y eletriptán), y/o un inhibidor de IMPDH1 e IMPDH2 (preferiblemente, tioguanina), y/o un modulador de las integrinas ITGA/B (preferiblemente, rabepazol), y/o un inhibidor del canal de potasio KCND2 (preferiblemente, lidocaína), y/o un inhibidor del canal de potasio KCNH2 (preferiblemente, ibutilida), y/o un modulador de KCNMA1 (seleccionado preferiblemente a partir de cromoglicato, etinamato, ketoconazol, cloroxazona, unoprostona, hesperitina, bendroflumetiazida, benzotiazida, clorotiazida, ciclotiazida, diazoxida, hidroflumetiazida, quinetazona y triclormetiazida), y/o un modulador de MGST2 (preferiblemente, balsalazida), y/o un modulador de MMP2 y MMP9 (preferiblemente, candoxatril), y/o un modulador de la formación de poros de transición para la permeabilidad mitocondrial (seleccionado preferiblemente a partir de carbenoxolona y ciprofloxacina), y/o un inhibidor de MTOR (preferiblemente, rapamicina), y/o un modulador de NOS1/2A/3 (seleccionado preferiblemente a partir de propiltiouracilo, tietilperazina y ketotifeno), y/o un modulador de la señalización del receptor NR3C1 (seleccionado preferiblemente a partir de metirapona y mometasona), y/o un modulador del receptor NR3C2 (seleccionado preferiblemente a partir de eplerenona y fludrocortisona), y/o un inhibidor de NRP2 (preferiblemente, pegaptanib), y/o un modulador de OPCML (preferiblemente, alfentanilo), y/o un modulador de OPRK1 y OPRS1 (seleccionado preferiblemente a partir de buprenorfina y pentazocina), y/o OPRM (preferiblemente, levalorfanol), y/o un modulador de la fosforilación oxidativa (seleccionado preferiblemente a partir de almitrina, eritromicina, kanamicina y cerulenina), y/o un inhibidor de los receptores P2RY1 y/o P2RY12 (preferiblemente, tirofibán), y/o un inhibidor de las fosfodiesterasas PDE11A, PDE4A y PDE5A (seleccionado preferiblemente a partir de mesembrina, milrinona y anagrelida), y/o un inhibidor de las fosfodiesterasas PDE3A/3B y PDE4A/4B y un activador de los canales de BK (preferiblemente, cilostazol), y/o un modulador de los receptores PDGFRA/B (seleccionado preferiblemente a partir de becaplermina, estreptomina, delfinidina, cianidina y fumagilina), y/o un modulador de PLA2 (seleccionado preferiblemente a partir de ácido niflúmico, hidrocortamato y netilmicina), y/o un modulador de PLAT (preferiblemente, fenilbutirato de sodio), y/o un modulador de PLD2 (preferiblemente, ambrisentán), y/o un inhibidor de PLG (preferiblemente, ácido aminocaproico), y/o un modulador de PPARD (preferiblemente, icosapent), y/o un modulador de PPARG (preferiblemente, fenilbutirato), y/o un modulador de PRKG1 (seleccionado preferiblemente a partir de nitroprusiato, nitroglicerina y paricalcitol), y/o un inhibidor de PTP1B (preferiblemente, tiludronato), y/o un modulador de RHOA/RAC (seleccionado preferiblemente a partir de clortalidona, hidroclorotiazida, clomociclina, limeciclina, natamicina, anfotericina B, cefalexina, cefaloridina, cefuroxima, dicloxacilina), y/o un modulador de RXR/RAR (preferiblemente, tazaroteno), y/o un antagonista de los canales de sodio SCN1A/B (preferiblemente, fosfenitoína), y/o un inhibidor de SLC12A1 (preferiblemente, bumetanida), y/o un inhibidor de SLC6A1 (preferiblemente, tiagabina), y/o un modulador de SLC9A1 (preferiblemente, buclizina), y/o un inhibidor de SRD5A1 (preferiblemente, dutasterida), y/o un antagonista de TACR1 (seleccionado preferiblemente a partir de aprepitant y vapreotida), y/o un modulador de la señalización de TGFB (preferiblemente, aliskireno), y/o un modulador de THRA/B (seleccionado preferiblemente a partir de liotioronina), y/o un inhibidor de TOP2A (preferiblemente, lucantona), y/o un modulador de TSPO (seleccionado preferiblemente a partir de flunitrazepam y temazepam), y/o un modulador de VDAC1 (preferiblemente, dihidroxialuminio), y/o un inhibidor de VEGFR1 (preferiblemente, sunitinib), y/o un modulador del metabolismo de la vitamina K (seleccionado preferiblemente a partir de cefmetazol, cefamandol y cefoperazona), y/o un inhibidor de VMAT (seleccionado preferiblemente a partir de tetrabenazina, deserpidina y nitisinona), y/o un inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje (CACNA) (seleccionado preferiblemente a partir de lercanidipina, pregabalina, mibefradilo, aranidipina, bamidipina, benciclano, bepridilo, clentiazem, efonidipina, elgodipina, etafenona, fendilina, flunarizina, galopamilo, isadipina, lacidipina, lidoflazina, lomerizina, manidipina, nicardipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, perhexilina, prenilamina, semotiadilo y terodilina), y/o un inhibidor de YES1, SRC y EPHA3 (preferiblemente, dasatinib).

Otras terapias utilizadas junto con el o los fármacos o combinaciones de fármacos descritos en esta memoria, pueden comprender uno o varios fármacos que mejoran los síntomas de la enfermedad de Alzheimer o fármacos que se podrían usar para un tratamiento paliativo de la enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, dicho uno o varios fármacos se seleccionan a partir de 3APS, AAB-001, ABT-089, ABT-126, AC-3933, ACC-001, Acetaminofeno, AFFI-

TOPE AD01, AFFITOPE AD02, ácido alfa lipoico, alfa-tocoferol, AN1792, anti-Abeta, AQW051, Aripiprazol, Atomoxetina, Atorvastatina, AVE1625, AVP-923, AZD0328, AZD3480, Bapineuzumab, BAY94-9172 (ZK 6013443), Bifeprunox, Bioperina, BMS-708163, BRL-049653, Briostatina, CAD106, Celecoxib, CERE-110, Cerebrolisina, CHF 5074, Colina, Circadina, Citalopram, Coenzima Q, Cobre, CTS21166, Curcumina, CX516 (Ampalex), CX717, Ciclofosfamato, DCB-AD1, Dextroamfetamina, DHA (Ácido Docosahexaenoico), Digoxina, Dimebon (Latrepidina), Di-valproex, DMXB-A, Donepezilo, Doxiciclina, Egb 761, EHT 0202 tazolato, ELND005 (escilo-inositol), EPAX 1050TG, mesilato de Ergoloid, Epigallocatequina-Galato, Escitalopram, Estradiol, Estrógeno, Etanercept, EVP-6124, EVT101, Exelon, aceite de pescado, FK962, florpipramina F 18, Folato + Vitamina B6 + Vitamina B21, Gabapentina, Galantamina, Gemfibrozilo, extractos de *Ginkgo biloba* (por ejemplo, EGb 761 o CP401), extractos mejorados de *Ginkgo biloba* (por ejemplo, enriquecidos en ingredientes activos o con menos contaminantes) o fármaco que contiene extractos de *Ginkgo biloba* (por ejemplo, Tanakan o Gingkor fort), Glucosa, Ácido L-glutámico, GSI 136, GSI-953, GSK239512, GSK933776A, Haloperidol, HF0220, Huperzina A, Hidrocodona/APAP, Ibuprofeno, IFN-alfa2A, Indometacina, Insulina, Inmunoglobulina intravenosa, Ketasina, Lecozotán, Leuprolida, Levodopa, Ácido lipoico, Litio, Lorazepam, Lovostatina, Luteína, LY2062430 (solanezumab), LY2811376, LY450139, LY451395, MABT5102A, Malato, Masitinib (AB1010), Medroxiprogesterona, Melatonina, MEM 1003, MEM 3454, Memantina, Azul de metileno, Metilfenidato, Mifepristona, MK0249, MK0677, MK0952, MK0952, MK3328, Modafinilo, MPC-7869, NADH, Naproxeno, Nefiracetam, Aceite de krill Neptuno, Neramexano, NIC5-15, parche de Nicoderm, Nicotinamida (vitamina B3), Novasoy, NP031112, NS 2330, NSA-789, AINEs, Olanzapina, Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (EPA+DHA), ONO-2506PO, Oxibato, Panax Ginseng, PAZ-417, PBT2, Perfenazina, PF-04360365, PF-04447943, PF-04494700, Fenserina, Fosfatidilserina, Pitavastatina, Posifeno, PPI-1019 (APAN), Pravastatina, Prazosina, Prednisona, Progesterona, PRX-03140, PYM50028, Quetiapina, R1450, Raloxifeno, Ramiprilo, Rasagilina, Razadina, resveratrol, rifampicina, risperidona, Rivastigmina, RN1219, RO5313534, Rofecoxib, Rosiglitazona, Salvia officinalis (salvia), SAM-315, SAM-531, SAM-760, SB-742457, Selenio, Sertralina, SGS-742, Simvastatina SK-PC-B70M, Solanezumab, SR57667B, SRA-333, SRA-444, SSR180711C, ST101, T-817MA, Tacrina, Tarenflurbilo, Testosterona, Tramiprosato (3APS), Trazodona, TRx0014 (cloruro de metiltioninio), Triptófano, V950, Valproato, Vareniclina, Vitamina C, Vitamina E, VP4896, Xaliprodeno, Zeaxantina, Zolpidem y ZT-1 (DEBIO-9902 SR).

También se describe en esta memoria un método para seleccionar un fármaco para el tratamiento combinatorio de la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el método comprende una etapa de someter a ensayo un fármaco candidato para estudiar una actividad en la función sináptica y/o la angiogénesis y/o la respuesta al estrés celular y seleccionar un fármaco candidato que mejora la función sináptica, atenúa la desregulación angiogénica y modula la respuesta al estrés celular.

También se describe en esta memoria un método para seleccionar una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el método comprende preparar una combinación de un fármaco que modula la función sináptica y/o un fármaco que atenúa la desregulación angiogénica y/o un fármaco que modula la respuesta al estrés celular, para una administración simultánea, por separado o secuencial a un sujeto que lo necesita.

La composición de la invención se puede administrar repetidamente al sujeto.

Las composiciones de la invención comprenden típicamente uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La duración de la terapia depende del estadio de la enfermedad que se está tratando, la combinación utilizada, la edad y el estado del paciente, y cómo responde el paciente al tratamiento. La dosificación, la frecuencia y el modo de administración de cada componente de la combinación se pueden controlar de forma independiente. Por ejemplo, un fármaco se puede administrar por vía oral mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La terapia combinada se puede administrar en ciclos a intervalos que incluyen períodos de descanso de modo que el cuerpo del paciente tiene la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario aún no previsto. Los fármacos también se pueden formular juntos de manera que una administración suministre todos los fármacos.

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

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

Más comúnmente, esas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "paquetes de paciente" que contienen una cantidad de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para uso durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, generalmente un blíster. En relación con las prescripciones tradicionales, en las que un farmacéutico divide el suministro para un paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, los paquetes de paciente tienen la ventaja de que el paciente tiene siempre acceso al prospecto contenido en el paquete de paciente, normalmente ausente en las prescripciones tradiciona-

les. Se ha comprobado que la inclusión de un prospecto mejora la adaptabilidad del paciente a las instrucciones del médico. Así pues, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con un material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En un paquete de paciente de ese tipo, el uso previsto de una formulación para el tratamiento combinado puede inferirse mediante instrucciones, recursos, previsiones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a utilizar la formulación del modo más adecuado para el tratamiento. Tales medidas hacen que un paquete de paciente sea específicamente adecuado y esté específicamente adaptado para el uso en un tratamiento con la combinación de la presente invención.

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

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

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar el fármaco activo sustancialmente de manera inmediata a la administración, o después de la administración en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado.

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

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en los casos en los que el fármaco, bien solo, o en combinación, tiene (i) un índice terapéutico reducido (es decir la diferencia entre la concentración plasmática que produce efectos secundarios nocivos o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que produce un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación entre la dosis letal media (DL50) y la dosis eficaz media (DE50); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta, de manera que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

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

#### Formas de dosificación sólidas para uso oral

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

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

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

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

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

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

La liberación controlada por disolución o difusión puede lograrse mediante un revestimiento apropiado de una formulación en forma de comprimido, cápsula, gránulo o granulado de fármacos, o incorporando el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o varias de las sustancias de revestimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abeja, glycowax, cera de ricino, cera de carnauba, 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, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz puede incluir también, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo), polietileno y/o fluorocarburo halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o varios de los fármacos de las combinaciones reivindicadas puede presentarse también en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o una cápsula que, después de la administración oral, flota encima del contenido gástrico durante un cierto periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del o de los fármacos puede prepararse granulando una mezcla del o de los fármacos con excipientes y un 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir a continuación para obtener comprimidos. Al ponerse 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 participa a la hora de mantener una densidad de menos de uno, permitiendo de este modo que el comprimido permanezca flotando en el jugo gástrico.

#### Líquidos para administración por vía oral

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

#### Composiciones parenterales

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

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

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

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

#### Composiciones rectales

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

#### Composiciones percutáneas y tópicas

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

30 Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (por ejemplo, goma de acacia o goma de tragacanto)

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

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

#### Dosificaciones y duración del tratamiento

40 Se apreciará que los fármacos de la combinación pueden administrarse de manera concomitante, en la misma formulación farmacéutica o en una formulación farmacéutica diferente o secuencialmente. Si se realiza una administración secuencial, la demora en administrar el segundo ingrediente activo (o el ingrediente activo adicional) no debería ser tal que se pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo

para una combinación según esta descripción es que la combinación debería estar destinada a un uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso previsto de una combinación puede inferirse mediante recursos, previsiones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a utilizar la combinación según la invención.

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

10 La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material o materiales activos, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico necesario.

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

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

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

25 Una ventaja notable de la invención es que cada compuesto puede utilizarse con dosis bajas en una terapia combinada, produciendo al mismo tiempo, en combinación, un beneficio clínico considerable para el paciente. La terapia combinada puede, de hecho, ser eficaz en dosis en las que los compuestos no tienen individualmente ningún efecto importante. Por consiguiente, una ventaja concreta de la invención reside en la capacidad de utilizar dosis subóptimas de cada compuesto, es decir, dosis que son menores que las dosis terapéuticas normalmente prescritas, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5 o incluso más preferiblemente 1/10 a 1/100 de las dosis terapéuticas. En tales dosificaciones subóptimas, los compuestos solos serían sustancialmente inactivos, mientras que la o las combinaciones según la invención son totalmente eficaces.

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

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

35 A continuación se ofrecen ejemplos específicos de dosificaciones de fármacos para uso en la invención:

- Ácido aminocaproico desde aproximadamente 0,05 a 15 g por día
- Levosimendán de 0,05 a 4 mg por día
- amlodipina por vía oral desde aproximadamente 0,05 a 1 mg por día
- clopidogrel por vía oral desde aproximadamente 0,75 a 7,5 mg por día,
- 40 - tadalafilo por vía oral desde aproximadamente 0,05 a 0,5 mg por día,
- cilostazol por vía oral desde aproximadamente 1 a 10 mg por día,
- terbinafina por vía oral desde aproximadamente 2,5 a 25 mg una o dos veces al día,
- leflunomida por vía oral desde aproximadamente 0,25 a 2,5 mg por día,
- cinacalcet por vía oral desde aproximadamente 0,3 a 3 mg por día,
- 45 - acamprosato por vía oral desde aproximadamente 7 a 70 mg tres veces al día,
- metimazol por vía oral desde aproximadamente 0,05 a 1,5 mg por día
- mepacrina por vía oral desde aproximadamente 3 a 30 mg por día,

- fenformina por vía oral desde aproximadamente 0,5 a 5 mg por día,
- baclofeno por vía oral desde aproximadamente 0,4 a 8 mg por día administrados en dos o tres dosis divididas,
- rifabutina por vía oral desde aproximadamente 6 a 60 mg por día,
- 5 - amobarbital por vía oral desde aproximadamente 0,06 a 15 mg por día,
- cefotetán por vía oral desde aproximadamente 0,01 a 0,4 mg por día,
- difilina por vía oral desde aproximadamente 6 a 60 mg por día en dos o tres dosis divididas,
- meticlotiazida por vía oral desde aproximadamente 0,025 a 1 mg por día,
- risedronato por vía oral desde aproximadamente 0,05 a 3 mg por día,
- 10 - etomidato por vía oral desde aproximadamente 0,6 a 6 mg por día,
- zonisamida por vía oral desde aproximadamente 1 a 40 mg por día.

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

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no a modo de limitación.

### Ejemplos

#### 20 *I. Los compuestos y las combinaciones de los mismos evitan la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>*

En esta primera serie de experimentos se han sometido a ensayo los compuestos candidatos en cuanto a su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Los fármacos se someten a ensayo en primer lugar individualmente, a lo que siguen ensayos de su acción combinada. El efecto se determina sobre diversos tipos de células, para documentar ulteriormente la actividad de los compuestos.

25 En la EA, la proteína APP forma agregados de láminas  $\beta$  insolubles plegadas de proteína Abeta fibrilar (amiloide). El cambio conformacional desde las formas solubles a fibrilares parece ser un evento espontáneo que se incrementa con concentraciones más altas de Abeta, por lo que cualquier producción de cantidades más altas de lo normal de Abeta (o la producción de formas más grandes y menos solubles de Abeta) tenderá a aumentar la formación de placa. Una vez que la placa Abeta ha comenzado a formarse, otras moléculas pueden interaccionar con la placa naciente para producir eventualmente la placa madura con sus áreas asociadas de muerte celular neuronal. Considerando esto, hemos dado prioridad a someter a ensayo los efectos de los fármacos sobre la viabilidad de las células expuestas a la proteína  $\beta$  amiloide.

#### 30 *I.1 Protección frente a la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> en neuronas corticales*

##### Cultivo celular

35 Se cultivaron neuronas corticales de rata como describen Singer et al. 1999. Brevemente, se dio muerte a ratas hembra preñadas en el día 15 de gestación mediante luxación cervical (Ratas Wistar; Janvier) y se extrajeron los fetos del útero. Se extrajo el córtex y se colocó en medio helado de Leibovitz (L15; Invitrogen) que contenía un 1% de penicilina-estreptomina (PS; Invitrogen) y un 1% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma). Los córtex se disociaron mediante tripsina durante 20 min a 37°C (Tripsina EDTA 1X; Invitrogen) diluida en PBS sin calcio ni magnesio. La reacción se detiene mediante la adición de medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contiene ADNasa I de grado II (0,1 mg/ml; Roche Diagnostic) y 10% de suero de ternera fetal (FCS; Invitrogen). Las células se disocian mecánicamente mediante 3 pases a través de una pipeta de 10 ml. Las células se centrifugan después a 180 x g durante 10 minutos a 10°C. El material sobrenadante se desecha y las células del sedimento se resuspenden 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 PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Pan Biotech). Las células viables se cuentan en un citómetro de Neubauer utilizando la prueba de exclusión con azul de tripano. Las células se siembran con una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos están recubiertos previamente con poli-L-lisina (10  $\mu$ g/ml; Sigma)) y se cultivan a 37°C en una atmósfera con aire humidificado (95%)/CO<sub>2</sub> (5%).

Después de 6 días de cultivo, las células se incuban con los fármacos (5 concentraciones). Después de 1 hora, las células se intoxican con 20  $\mu\text{M}$  de beta-amiloide (25-35; Sigma) en medio definido sin BDNF pero junto con los fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 2 días. Se realizan dos cultivos independientes por condición, 6 pocillos por condición.

## 5 Cuantificación de la longitud de las neuritas

Las células se fijan con una solución fría de etanol (95%) y ácido acético (5%) durante 10 minutos. Después de la permeabilización con 0,1% de saponina, las células se bloquean durante 2 h con PBS que contiene 10% de suero de cabra. A continuación, las células se incuban con anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína 2 asociada a los microtúbulos (MAP-2; Sigma). Este anticuerpo indica específicamente los cuerpos celulares y las neuritas. El anticuerpo secundario utilizado es una IgG (sonda Molecular) de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488. Los núcleos de las neuronas se indican por un tinte fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA). Se toman veinte imágenes por pocillo, usando InCell Analyzer<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare) con un aumento de 20x. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones. La longitud de las neuritas se cuantifica utilizando el programa informático Developer (GE Healthcare).

## 15 Resultados

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

20 Los fármacos se incubaron con neuronas corticales primarias de rata una hora antes de la intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> 20  $\mu\text{M}$  que dura 2 días (36).

Los resultados muestran que los fármacos sometidos a ensayo ejercen claramente un efecto neuroprotector frente a una intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> (Fig. 1 y Fig. 2).

## 25 1.2 Protección frente a la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> en células cerebrales endoteliales

### Cultivo celular

El primer cultivo de células cerebrales endoteliales de rata (Vect-Horus SAS, Marsella) se cultiva en el pase 0. Al llegar a confluencia, las células endoteliales se disocian con tripsina EDTA (Pan Biotech Ref: P10-023100). Las células se siembran con una densidad de 25.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos están recubiertos con 30  $\mu\text{l}$  de colágeno de rata de tipo I, a 1,5 mg/ml, Vect-Horus SAS, Marsella) y se cultivan en medio MCBBD 131 (M-131-500, Invitrogen) complementado con 1% de complemento de crecimiento microvascular (MVGCS, S-005-25, Invitrogen). Las células se cultivan a 37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%)/CO<sub>2</sub> (5%). La mitad del medio se cambia cada dos días por medio fresco.

Después de 4 días, se añaden los fármacos al medio de cultivo celular, con diferentes concentraciones, se disuelven en DMSO al 0,1% o agua. Se realiza una incubación previa de 1 hora, en un medio de cultivo que contiene medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM, Pan Biotech Ref: P04-03600), complementado con 2% de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen ref: 16000-036), 1% de L-glutamina (Pan Biotech ref: P04-80100), 1% de penicilina-estreptomocina (PS; Pan Biotech ref: P06-07100), 0,1 mg/ml de heparina (Sigma), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Invitrogen) y 10 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, PHG0146, Invitrogen).

40 A continuación, las células se intoxican con 30  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -amiloide (25-35; Sigma) junto con los fármacos en el mismo medio de cultivo. Las células se intoxican durante 3 días.

### Ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Para cada cultivo, después de 3 días de intoxicación, se recoge el material sobrenadante y se analiza con un kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche Applied Sciences). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la muerte celular se basa en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde el citosol de las células dañadas en el material sobrenadante. La densidad óptica (DO) se determina mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm mediante un aparato de barrido múltiple (Thermo, Ref Ascent).

### Resultados

Los resultados presentados en la Figura 3 se extraen a partir de dos cultivos independientes, 6 pocillos por condición. Todos los valores se expresan como media  $\pm$  e.e.m. Se realiza una prueba *t* de Student bilateral con datos sin procesar. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular, en comparación con el control (vehículo).

Las fármacos se incuban con células endoteliales cerebrales primarias de rata una hora antes de la intoxicación con A $\beta$ <sub>25-35</sub> 30  $\mu\text{M}$  que dura 3 días.

Tres días después de esta incubación, se cuantifica la liberación de LDH en el medio de cultivo, lo que refleja el nivel de muerte celular.

Los resultados presentados muestran claramente que los compuestos sometidos a ensayo ejercen un potente efecto protector contra esa intoxicación con A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Fig. 3).

### 5 I.3 Protección contra la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> en células de feocromocitoma

#### Cultivo celular de PC12

10 Las células PC12 (Feocromocitoma de rata, ATCC ref: CRL-1721) procedentes de ATCC (ATCC CRL-1721) se descongelaron rápidamente en agua a 37°C. El material sobrenadante se puso inmediatamente en 9 ml de *medio de proliferación de PC12* que contenía medio Eagle modificado con Dulbecco DMEM-F12 (Pan Biotech ref: P04-41450) con 15% de suero de caballo inactivado por calor (Invitrogen ref: 16050-130), 2,5% de suero fetal bovino (FBS; Invitrogen ref: 16000-036), 1% de penicilina 10.000 U/ml y estreptomycinina 10 mg/ml (PS; Pan Biotech ref: P06-07100) y 1% de L-glutamina 200 mM (Pan Biotech ref: P04-80100).

15 Las células se centrifugaron (800 ciclos/min, 4°C durante 5 min) y se añadieron a 5 ml de *medio de proliferación de PC12*, las células viables se contaron con una cámara Malassez utilizando la prueba de exclusión de rojo neutro (Sigma).

A continuación, las células se sembraron a 3.10<sup>4</sup> células por cm<sup>2</sup> en *medio de proliferación de PC12* en matraces de plástico de 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Ref: 658175) recubiertos previamente con poli-L-lisina (10 µg/ml, Sigma Ref: P2636).

20 El medio se cambió cada dos días. Después de 3 días de cultivo, cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se lavaron en HBSS sin calcio ni magnesio (Pan Biotech Ref: P06-33500) y se incubaron en tripsina EDTA, (0,05%, Pan Biotech Ref: P10-023100). La reacción enzimática se detuvo con *medio de proliferación de PC12* al que se añadió 0,5 mg/ml de ADNasa 1 de grado 2 (Pan Biotech Ref: T60-37780100). A continuación, las PC12 se centrifugaron (800 ciclos/min a 4°C durante 10 min) y las células se sembraron con una densidad de 2,9 10<sup>4</sup> por cm<sup>2</sup> en un matraz de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (Greiner Ref: 661195) recubierto previamente con poli-L-lisina.

#### Intoxicación y ensayo de viabilidad de MTT

25 Las células PC12 (pase n° 2) se siembran con una base de 3300 células por cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos (Greiner Ref: 655 180) recubiertas previamente con medio neurobasal de poli-L-lisina (Sigma) (Invitrogen, Ref: 21103049) que contenía B27 (2%, Invitrogen, Ref: 21103049), penicilina (50 U/ml)-estreptomycinina (50 µg/ml) y glutamina (1%) y 50 ng/ml de NGF (Sigma Ref: N1408). NGF permite que las PC12 se diferencien en células similares a las neuronas simpáticas.

30 Después de 5 días de cultivo, el medio se cambia por neurobasal al que se añade NGF (50 ng/ml), B27 sin antioxidante, glutamina y antibióticos. Después de 24 h, las células se incuban durante 1 hora con fármacos con 5 concentraciones, 6 pocillos por condición. Después de 1 hora de preincubación, las células se intoxican con 10 µM de beta-amiloide (25-35; Sigma) junto con fármacos en el medio de cultivo celular. Después de 24 h, las células se lavan una vez con PBS (Pan Biotech, Ref: P04-36100) y se evalúa la supervivencia de las células PC12 mediante la prueba de viabilidad con MTT (bromuro de 3,[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio).

#### 35 Cultivo celular de neuronas corticales

Se cultivaron neuronas corticales primarias de rata como describen Singer et al. 1999. Brevemente, se dio muerte a ratas hembras preñadas en el día 15 de gestación mediante luxación cervical (Ratas Wistar; Janvier) y se extrajeron los fetos del útero. Se extrajo el córtex y se colocó en medio helado de Leibovitz (L15; Invitrogen) que contenía un 1% de penicilina-estreptomycinina (PS; Invitrogen) y 1% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma). Los córtex se disociaron mediante tripsina durante 20 min a 37°C (Tripsina EDTA 1X; Invitrogen) diluida en PBS sin calcio ni magnesio. La reacción se detiene mediante la adición de medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contiene ADNasa I de grado II (0,1 mg/ml; Roche Diagnostic) y 10% de suero de ternera fetal (FCS; Invitrogen). Las células se disocian mecánicamente mediante 3 pases a través de una pipeta de 10 ml. Las células se centrifugan después a 180 x g durante 10 minutos a 10°C. El material sobrenadante se desecha y las células del sedimento se resuspenden 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 PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico obtenido del cerebro (BDNF, Pan Biotech). Las células viables se cuentan en un citómetro de Neubauer utilizando la prueba de exclusión con azul de tripano. Las células se siembran con una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos están recubiertos previamente con poli-L-lisina (10 µg/ml; Sigma) y se cultivan a 37°C en una atmósfera con aire humidificado (95%)/CO<sub>2</sub> (5%).

Después de 6 días de cultivo, las células se incuban con los fármacos (5 concentraciones). Después de 1 hora, las células se intoxican con 20 µM de  $\beta$ -amiloide (25-35; Sigma) en medio definido sin BDNF pero junto con los fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 2 días.

Ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

5 Después de 2 días de cultivo, se recoge el material sobrenadante y se analiza con el kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche Applied Sciences). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la muerte celular se basa en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde el citosol de las células dañadas en el material sobrenadante. La densidad óptica (DO) se determina mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm mediante un aparato de barrido múltiple (Thermo, Ref Ascent). Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular, en comparación con el control negativo (vehículo).

Resultados

10 Los resultados presentados en las Figuras 4 y 5 se extraen a partir de dos cultivos independientes, 6 pocillos por condición. Todos los valores se expresan como media ± e.e. de la media. Se realiza una prueba *t* de Student bilateral con datos sin procesar. Los resultados se expresan en porcentaje de longitud de neuritas, en comparación con el control (vehículo).

Las células PC12 diferenciadas con NGF se incuban con los fármacos una hora antes de la intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> 10 μM que dura 24 horas.

15 Un día después de esa incubación, se cuantifica la viabilidad de las PC12 diferenciadas con NGF, usando el ensayo de MTT. Los resultados muestran claramente que la prilocaína y la amlodipina ejercen un fuerte efecto neuroprotector contra esa intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> (Fig. 4).

20 Las neuronas corticales primarias de rata también se incubaron con compuestos de la invención una hora antes de la intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> 20 μM que dura 2 días. Dos días después de esa incubación, se cuantifica la liberación de LDH en el medio de cultivo, lo que refleja el nivel de muerte celular. Los resultados presentados demuestran que los compuestos para uso en la presente invención ejercen un efecto protector sustancial contra esa intoxicación con Abeta<sub>25-35</sub> (Fig. 5).

1.4 Actividad de las combinaciones de fármacos

25 Los ensayos *in vitro* también se llevan a cabo con varias combinaciones de fármacos que modulan la función sináptica y/o la angiogénesis y/o la respuesta al estrés celular.

Los fármacos se incuban con las mismas condiciones experimentales que las descritas anteriormente (véanse las secciones I.1-I.3). Las combinaciones de fármacos más eficaces que actúan sobre las dianas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector contra una intoxicación con Aβ <sub>25-35</sub>
fenformina y zonisamida	+
fenformina y meticlotiazida	+
fenformina y acamprosato	+
fenformina y sulfisoxazol	+
baclofeno y terbinafina	+
baclofeno y risedronato	+
baclofeno y sulfisoxazol	+
baclofeno y zonisamida	+
baclofeno y meticlotiazida	+
baclofeno y leflunomida	+
zonisamida y difilina	+
meticlotiazida y difilina	+
zonisamida y prilocaína	+
meticlotiazida y prilocaína	+
zonisamida y sulfisoxazol	+
terbinafina y sulfisoxazol	+

ES 2 800 311 T3

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector contra una intoxicación con A $\beta$ <sub>25-35</sub>
terbinafina y mepacrina	+
acamprosato y terbinafina	+
terbinafina y rifabutina	+
fenformina y tadalafilo	+
zonisamida y argatrobán	+
fenformina y clopidogrel	+
acamprosato y cinacalcet	+
sulfisoxazol y cinacalcet	+
terbinafina y argatrobán	+
terbinafina y cefmenoxima,	+
baclofeno y clopidogrel	+
terbinafina y clopidogrel	+
risedronato y clopidogrel	+
zonisamida y cinarizina	+
acamprosato y cinarizina	+
zonisamida y ciclopirox	+
acamprosato y ciclopirox	+
sulfisoxazol y amobarbital	+
zonisamida y amobarbital	+
sulfisoxazol y cefotetán	+
zonisamida y cefotetán	+
acamprosato y tetranitrato de eritrilo	+
zonisamida y tetranitrato de eritrilo	+
sulfisoxazol y tetranitrato de eritrilo	+
mitiglinida y tetranitrato de eritrilo	+
levosimendán y tetranitrato de eritrilo	+
mitiglinida y zonisamida	+
levosimendán y zonisamida	+
mitiglinida y terbinafina	+
levosimendán y terbinafina	+
mitiglinida y risedronato	+
levosimendán y risedronato	+
mitiglinida y meticlotiazida	+
levosimendán y meticlotiazida	+
meticlotiazida y sulfisoxazol	+
zonisamida y sulfisoxazol	+
risedronato y sulfisoxazol	+
risedronato y mepacrina	+
risedronato y acamprosato	+
risedronato y rifabutina	+

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector contra una intoxicación con A $\beta$ <sub>25-35</sub>
enprofilina y fenformina	+
oxtrifilina y fenformina	+
zonisamida y cefmenoxima	+
meticlotiazida y argatrobán	+
meticlotiazida y cefmenoxima	+
risedronato y argatrobán	+
risedronato y cefmenoxima	+
zonisamida y cinarizina	+
zonisamida y benidipina	+
zonisamida y parametadiona	+
zonisamida y amlodipina	+
meticlotiazida y cinarizina	+
meticlotiazida y benidipina	+
meticlotiazida y parametadiona	+
meticlotiazida y amlodipina	+
acamprosato y benidipina	+
acamprosato y parametadiona	+
acamprosato y amlodipina	+
meticlotiazida y ciclopirox	+
meticlotiazida y amobarbital	+
meticlotiazida y cefotetán	+
meticlotiazida y tetranitrato de eritritilo	+
<i>+ indica un efecto neuroprotector positivo contra la intoxicación con A<math>\beta</math><sub>25-35</sub></i>	

*II. Los compuestos evitan la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

En esta serie adicional de experimentos, los compuestos candidatos se han sometido a ensayo para estudiar su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano. A $\beta$ <sub>1-42</sub> es el péptido de longitud completa que constituye los agregados que se encuentran en las biopsias de pacientes humanos afectados por EA. Los fármacos primero se someten a ensayo individualmente, seguido por ensayos de su acción combinatoria. El efecto se determina sobre varios tipos de células, para documentar adicionalmente la actividad de los compuestos.

*II.1. Protección frente a la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> en un modelo de células endoteliales microvasculares de cerebro humano*

Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano para estudiar la protección que ofrecen los compuestos candidatos sobre la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

Células cerebrales endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC, ScienCell Ref: 1000, congeladas en el pase 10) se descongelaron rápidamente en un baño de agua a +37°C. El material sobrenadante se puso inmediatamente en 9 ml de medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM; Pan Biotech ref: P04-03600) que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS; GIBCO ref. 10270-106). La suspensión celular se centrifugó a 180 x g durante 10 minutos a +4°C y el sedimento se suspendió en medio sin suero CSC (CSC sin suero, Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Lote 51407-4) con 1,6% de RocketFuel exento de suero (Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Lote 54102), 2% de 10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina (PS; Pan Biotech ref: P06-07100 lote 133080808) y se sembró con una densidad de 20.000 células por pocillo, en placas de 96 pocillos (sistema de angiogénesis de biocapa de capa matrigel, BD, Ref 354150, Lote A8662) con un volumen final de 100  $\mu$ l. Sobre el soporte matrigel, las células cerebrales endoteliales iniciaron espontáneamente el proceso de morfogénesis de la red capilar (47).

Se realizaron tres cultivos por separado para cada condición, 6 pocillos por condición.

Compuestos candidatos y tratamiento de amiloide- $\beta_{1-42}$  humano

Brevemente, el péptido  $A\beta_{1-42}$  (Bachem, ref: H1368 lote 1010533) se reconstituyó en medio de cultivo definido 20  $\mu\text{M}$  (solución madre) y se agitó lentamente a  $+37^\circ\text{C}$  durante 3 días en la oscuridad para la agregación. El medio de control se preparó en las mismas condiciones.

- 5 Después de 3 días, este péptido amiloide humano agregado se usó sobre HBMEC 2,5  $\mu\text{M}$ , diluido en medio de control (tiempo de incubación óptimo). El péptido  $A\beta_{1-42}$  se añadió 2 horas después de la siembra de HBMEC sobre matrigel durante 18 horas de incubación.

- 10 Una hora después de la siembra de las HBMEC sobre matrigel, los compuestos del ensayo y VEGF-165 se disolvieron en medio de cultivo (+0,1% de DMSO) y luego se incubaron previamente con HBMEC durante 1 hora antes de la aplicación de  $A\beta_{1-42}$  (con un volumen final por pocillo de cultivo de 100  $\mu\text{l}$ ). Una hora después, los compuestos del ensayo o de la incubación con VEGF (dos horas después de la siembra de las células sobre matrigel), se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de péptido  $A\beta_{1-42}$  hasta una concentración final de 2,5  $\mu\text{M}$ , diluida en medio de control en presencia de los compuestos del ensayo o VEGF (en un volumen total/pocillo de 200  $\mu\text{l}$ ), para evitar diluciones adicionales del fármaco.

- 15 Organización de las placas de cultivos

VEGF-165, conocido por ser una isoforma proangiogénica de VEGF-A, se usó para todos los experimentos en este estudio como compuesto de referencia. VEGF-165 es una de las isoformas de VEGF más abundantes implicadas en la angiogénesis. Se usó VEGF como compuesto de referencia del ensayo, 10 nM.

Se establecieron las siguientes condiciones:

- 20 - *Control negativo*: medio solo + 0,1% de DMSO
- *Intoxicación*: amiloide- $\beta_{1-42}$  (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante 18 h
- *Control positivo*: VEGF-165 (10 nM) (1 compuesto de referencia/cultivo) 1 hora antes de la adición de  $A\beta_{1-42}$  (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante un tiempo de incubación de 18 h.
- 25 - *Compuestos del ensayo*: Compuesto del ensayo 1 hora antes de la adición de  $A\beta_{1-42}$  (2,5  $\mu\text{M}$ ) durante un tiempo de incubación de 18 h.

Cuantificación de la red capilar

Por pocillo, se tomaron 2 fotos con lente de 4x usando InCell Analyzer<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare) en transmisión de luz. Todas las imágenes se tomaron con las mismas condiciones. El análisis de las redes de angiogénesis se realizó utilizando el programa informático Developer (GE Healthcare). Se evaluó la longitud total de la red capilar.

- 30 Procesamiento de datos

- 35 Todos los valores se expresan como media  $\pm$  e.e. de la media de los 3 cultivos ( $n = 6$  por cada condición). Los análisis estadísticos se realizaron sobre las diferentes condiciones realizando una ANOVA seguida de la prueba de Dunnett cuando se permitía (programa informático Statview versión 5.0). Los valores (como %) insertados en los gráficos muestran la evolución de la toxicidad amiloide. De hecho, la toxicidad amiloide se tomó como el 100% y el efecto del compuesto del ensayo se calculó como un % de esa toxicidad amiloide.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 6 y la tabla 3. Demuestran que los fármacos, por sí mismos, inducen un efecto protector sustancial contra la toxicidad causada por el péptido  $A\beta_{1-42}$ :

- 40 - El ácido aminocaproico solo, con una dosificación baja de, por ejemplo, 160 nM, induce un fuerte efecto protector;
- Levosimendán, con una dosis tan baja como 8 nM, induce un fuerte efecto protector.

II.2 Protección frente a la toxicidad de  $A\beta_{1-42}$  en células de neuronas corticales primarias

Compuesto del ensayo y tratamiento con amiloide  $\beta_{1-42}$  humano

Las neuronas corticales primarias de rata se cultivan como se ha descrito previamente.

- 45 Brevemente, el péptido  $A\beta_{1-42}$  se reconstituyó en medio de cultivo definido 40  $\mu\text{M}$  (solución madre) y se agitó lentamente a  $+37^\circ\text{C}$  durante 3 días en la oscuridad para la agregación. El medio de control se preparó en las mismas condiciones.

Después de 3 días, la solución se usó sobre neuronas corticales primarias de la siguiente manera:

Después de 10 días de cultivo de neuronas, el fármaco se disolvió en el medio de cultivo (+0,1% de DMSO) y luego se incubó previamente con las neuronas durante 1 hora antes de la aplicación de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (con un volumen final por pocillo de cultivo de 100  $\mu$ l). Una hora después de la incubación del fármaco, se añadieron 100  $\mu$ l de péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> hasta una concentración final de 10  $\mu$ M diluida en presencia de fármaco, para evitar más diluciones del fármaco. Las neuronas corticales se intoxicaron durante 24 horas. Se realizaron tres cultivos por separado con cada condición, 6 pocillos por cada condición.

BDNF (50 ng/ml) y Estradiol- $\beta$  (100 y 150 nM) se usaron como control positivo y compuestos de referencia, respectivamente. Se realizarán tres cultivos por separado con cada condición, 12 pocillos por cada condición.

10 Organización de las placas de cultivo

Se usó estradiol- $\beta$  100 y 150 nM como compuesto de ensayo de referencia y BDNF a 50 ng/ml se usó como control positivo.

El estradiol- $\beta$  y el BDNF se disolvieron en medio de cultivo y se incubaron previamente durante 1 h antes de aplicar el amiloide- $\beta$ <sub>1-42</sub> agregado.

15 Se evaluaron las siguientes condiciones:

- 1 PLACA DE CONTROL: 12 pocillos/condición

- *Control negativo*: medio solo + 0,1% de DMSO
- *Intoxicación*: amiloide- $\beta$ <sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h
- *Control positivo*: BDNF (50 ng/ml) 1 hora seguido por amiloide- $\beta$ <sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h
- *Compuesto de referencia*: Estradiol (150 nM) 1 h seguido de amiloide- $\beta$ <sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h.

20

- PLACA CON FÁRMACO: 6 pocillos/condición

- *Control negativo*: medio solo + 0,1% de DMSO
- *Intoxicación*: amiloide- $\beta$ <sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h
- *Fármaco 1*: Fármaco 1 - 1 h seguido de  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h
- *Fármaco 2*: Fármaco 2 - 1 h seguido de  $\beta$ -amiloide<sub>1-42</sub> (10  $\mu$ M) durante 24 h

25

Ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Veinticuatro horas después de la intoxicación, se retiró el material sobrenadante y se analizó con el kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche Applied Science, ref: 11644793001, lote: 11800300). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la toxicidad celular se basa en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde el citosol de las células moribundas en el material sobrenadante.

30

Procesamiento de datos

Todos los valores se expresan como media  $\pm$  e.e. de la media de los 3 cultivos (n = 6 por cada condición). Los análisis estadísticos se realizaron con las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando estaba permitido, programa informático Statview versión 5.0).

35

Resultados

Los resultados obtenidos para los fármacos seleccionados individuales en los ensayos de toxicidad sobre células neuronales corticales primarias, se presentan en la tabla 3 y en la figura 7.

Tabla 3

Nombre del fármaco	Efecto protector en células neuronales intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Efecto protector en HBMC intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>
Ácido aminocaproico		+
Baclofeno (+/-)	+	+

Nombre del fármaco	Efecto protector en células neuronales intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Efecto protector en HBMC intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>
Carbamazina	+	
Carbenoxolona	+	
Cinacalcet	+	
Cinarizina	+	
Eplerenona		+
Etomidato	+	
Fenoldopam		+
Leflunomida	+	
Levosimendán	+	+
Moxifloxacina	+	
Fenformina	+	
Sulfisoxazol	+	+
Sulodexida		+
Tadalafilo	+	
Terbinafina		+
Zonisamida	+	

*II.3 Efecto de las terapias combinadas sobre la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano en células HBMEC humanas.*

La eficacia de las combinaciones de fármacos de la invención se evalúa en células humanas. El protocolo que se utiliza en esos ensayos es el mismo que el que se describe en las secciones II.1 anteriores.

5 Resultados

Se someten a ensayo las siguientes combinaciones de fármacos sobre células endoteliales microvasculares de cerebro humano:

- baclofeno y ácido aminocaproico,
- baclofeno y levosimendán,
- 10 - ácido aminocaproico y sulfisoxazol,
- ácido aminocaproico y terbinafina,
- ácido aminocaproico y levosimendán,
- levosimendán y sulfisoxazol,
- levosimendán y terbinafina,
- 15 - eplerenona y levosimendán,
- eplerenona y sulfisoxazol,
- eplerenona y fenoldopam,
- sulodexida y levosimendán,
- sulodexida y sulfisoxazol,
- 20 - sulodexida y fenoldopam o
- eplerenona y sulodexida.

Todas las combinaciones de fármacos sometidas a ensayo proporcionan un efecto protector contra la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano en el modelo de HBMEC, tal y como se muestra en la Tabla 4 a continuación y se ejemplifica en las Figuras 8 a 13.

25

Tabla 4

Nombre del fármaco	Efecto protector en células de HBMEC intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>
baclofeno y ácido aminocaproico	+
baclofeno y levosimendán	+

Nombre del fármaco	Efecto protector en células de HBMEC intoxicadas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>
ácido aminocaproico y sulfisoxazol	+
ácido aminocaproico y terbinafina	+
ácido aminocaproico y levosimendán	+
levosimendán y sulfisoxazol	+
levosimendán y terbinafina	+
eplerenona y levosimendán	+
eplerenona y sulfisoxazol	+
eplerenona y fenoldopam	+
sulodexida y levosimendán	+
sulodexida y sulfisoxazol	+
sulodexida y fenoldopam	+
eplerenona y sulodexida	+

*III. La terapia de combinación de levosimendán y sulfisoxazol protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

5 En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación que emplea levosimendán y sulfisoxazol por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

10 Los resultados se presentan en la Figura 8. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de sulfisoxazol y levosimendán (Fig. 8A) mientras que, a esas concentraciones, levosimendán (Fig. 8B) y sulfisoxazol (Fig. 8C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

15 *IV. La terapia de combinación de terbinafina y sulfisoxazol protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación con terbinafina y sulfisoxazol por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

20 La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

25 Los resultados se presentan en la Figura 9. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de terbinafina y sulfisoxazol (Fig. 9A) mientras que, a esas concentraciones, el sulfisoxazol (Fig. 9B) y la terbinafina (Fig. 9C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

*V. La terapia de combinación de levosimendán y baclofeno protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación que emplea levosimendán y baclofeno por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

30 La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

35 Los resultados se presentan en la Figura 10. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de levosimendán y baclofeno (Fig.

10A) mientras que, a esas concentraciones, levosimendán (Fig. 10B) y baclofeno (Fig. 10C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

*VI. La terapia de combinación de ácido aminocaproico y terbinafina protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

- 5 En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación que emplea ácido aminocaproico y terbinafina por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

- 10 Los resultados se presentan en la Figura 11. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de ácido aminocaproico y terbinafina (Fig. 11A) mientras que, a esas concentraciones, el ácido aminocaproico (Fig. 11B) y la terbinafina (Fig. 11C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

- 15 *VII. La terapia de combinación de ácido aminocaproico y levosimendán protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación que emplea ácido aminocaproico y levosimendán por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

- 20 La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

- 25 Los resultados se presentan en la Figura 12. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación ácido aminocaproico y levosimendán (Fig. 12A) mientras que, a esas concentraciones, el ácido aminocaproico (Fig. 12B) y el levosimendán (Fig. 12C) por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

*VIII. La terapia de combinación de terbinafina y levosimendán protege eficazmente las neuronas contra la toxicidad de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano*

- 30 En este ejemplo, se evaluó la terapia de combinación que emplea levosimendán y terbinafina por su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> humano.

La terapia de combinación se sometió a ensayo en las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo II.1. Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano, tal y como se describe en II.1., y se incubaron simultánea o secuencialmente con la combinación de fármacos.

- 35 Los resultados se presentan en la Figura 13. Muestran claramente que el péptido amiloide humano agregado (A $\beta$ <sub>1-42</sub> 2,5  $\mu$ M) produce una intoxicación significativa, superior al 40%, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esa intoxicación se evita significativamente mediante la combinación de terbinafina y levosimendán (Fig. 13A) mientras que, a esas concentraciones, la terbinafina (Fig. 13B) y el levosimendán (Fig. 13C), por sí solos, no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación.

*IX. Actividad in vivo*

- 40 Se someten a ensayo compuestos y sus combinaciones de forma activa en pruebas *in vitro* en un modelo *in vivo* de enfermedad de Alzheimer. La sobreexpresión de transgenes de precursores de la proteína beta amiloide humana (APP) mutante, ligada a la enfermedad de Alzheimer, ha sido el medio más fiable para promover el depósito de Abeta en los cerebros de ratones transgénicos que servían como modelos de la enfermedad EA en numerosos estudios. A medida que envejecen, esos ratones con APP mutante desarrollan una patología amiloide fuerte y otras
- 45 características similares a la EA, que incluyen una disminución de la densidad sináptica, gliosis reactiva y algunos déficits cognitivos. Muchos modelos de ratones con APP mutante muestran poca evidencia de pérdida neuronal manifiesta y patología de ovillo neurofibrilar (ONF). Los ratones hemicigotos para este transgén BRI-Abeta42 son viables y fértiles con una esperanza de vida normal. El ARNm transgénico de BRI-Abeta42 se expresa con un patrón
- 50 característico del promotor de la proteína priónica de ratón; los niveles más altos de expresión transgénica se detectan en las células granulares cerebelosas y el hipocampo, seguidos de la corteza, el puente de Varolio, el tálamo y el mesencéfalo. En la proteína de fusión transgénica, Abeta1-42 se fusiona con el extremo C de la proteína BRI en el sitio de escisión similar a la furina, de modo que la escisión da como resultado una secreción eficaz de Abeta1-42 en el lumen o el espacio extracelular. Por lo tanto, esos ratones expresan específicamente la isoforma Abeta1-42. Los ratones hemicigotos BRI-Abeta42 acumulan con la edad beta amiloide insoluble con detergente y desarrollan placas

con núcleo en el cerebelo a los 3 meses de edad. El desarrollo de la patología del prosencéfalo tiene lugar más tarde, las placas de Abeta extracelulares no están presentes de manera consistente en el hipocampo y las cortezas entorrinal/piriforme hasta los 12 meses de edad. Los depósitos beta amiloides (placas con núcleo) pueden observarse ya a los 3 meses en la capa molecular del cerebelo de ratones transgénicos y volverse más pronunciados con la edad; ocasionalmente se observan placas extracelulares en las cortezas entorrinal/piriforme y el hipocampo a los 6 meses de edad, pero no se encuentran de manera constante hasta >12 meses de edad. Los ratones de más edad muestran una patología generalizada con placas con núcleo y difusas en el cerebelo, la corteza, el hipocampo y el bulbo olfatorio. Las placas amiloides extracelulares muestran núcleos amiloides densos con fibrillas radiantes; se observan muchos haces de neuritas distróficas en la periferia de esas placas. Una gliosis reactiva se asocia con las placas.

#### Tratamientos farmacológicos

Los ratones transgénicos Tg A12E mc (Prnp-ITM2B/APP695\*42) (37) se han obtenido en Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/007002.html>). Los ratones originadores con los niveles plasmáticos más altos de Abeta42, la línea BRI-Abeta42A (12e), se han mantenido en un fondo mixto de B6C3. Los ratones transgénicos machos adultos tienen libre acceso a alimentos y agua. De acuerdo con un protocolo aprobado del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, los ratones se pesan y se les inyecta i.p. o son alimentados a la fuerza, una vez al día durante 10 a 20 semanas consecutivas con una solución de control (placebo) o los fármacos de la presente invención o con combinaciones de fármacos de la Tabla 2, preparadas con dosis diferentes.

#### Análisis de la supervivencia

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

#### Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales fueron diseñadas y realizadas de acuerdo con los métodos publicados por varios autores (38-41).

#### Aprendizaje y memoria espacial en el laberinto de agua de Morris (MWM, por sus siglas en inglés)

Este experimento se realiza en una piscina circular de 90 cm de diámetro, hecha a base de plástico blanco y rellena de agua de color lechoso. Una plataforma de escape de 8 cm de diámetro, de plástico transparente, se sumergió 0,5 cm por debajo del nivel del agua. Las pistas visuales son proporcionadas por diferentes formas geométricas impresas en letras de tamaño A4 y colocadas en las cuatro paredes circundantes (la distancia desde la piscina era de 50 a 70 cm). Con cada ratón se han realizado cuatro ensayos diarios (intervalo de 5 a 7 minutos entre ensayos, un total de 16 ensayos) durante 4 días. Cada ensayo se ha realizado a partir de uno de cuatro puntos de partida diferentes. El movimiento de los ratones se controla mediante el programa informático Videotrack (View Point). Se ha determinado el tiempo necesario para localizar la plataforma de escape (latencia de escape, hasta 60 segundos). Después de localizar la plataforma, al ratón se le ha permitido sentarse sobre ella durante 15 segundos. Los ratones que no pudieron encontrar la plataforma en 60 segundos, fueron guiados hacia ella y se les permitió permanecer en ella durante 15 segundos. Se ingresa una latencia de 60 segundos en el registro para ese caso. Los cuatro ensayos al día se han promediado para un análisis estadístico, excepto el primer ensayo el día 1. El día 9 (5 días después del último entrenamiento) los ratones han sido sometidos a una prueba de ensayo de 60 segundos en la que se elimina la plataforma y se permite que los ratones la busquen. Se registra el tiempo que pasa cada animal en cada cuadrante (tiempo de búsqueda en cuadrante). Se han utilizado varios grupos de ratones macho con 3, 7, 10 y 12 meses.

Pocos ratones han mostrado un comportamiento de congelación (por ejemplo, quedándose inmóviles en el agua y negándose a nadar) que interfiere fuertemente con la prueba; esos animales han sido excluidos del análisis de los datos. Todas las pruebas de comportamiento se llevan a cabo en un ambiente tranquilo y con poca luz.

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

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

rectos) y la latencia de escape (tiempo para alcanzar la plataforma, máximo 60 s) se registran para cada ensayo.

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

5 Esta prueba de una tarea con base cognitiva se realiza con la ayuda del aparato que consiste en una plataforma circular de 69 cm de diámetro que tiene 16 orificios de "escape" distribuidos de forma equidistante alrededor de la circunferencia. Un refugio de escape está instalado debajo de uno de los orificios, y una cortina negra, sobre la que se colocan varias señales visuales, rodea la plataforma. El animal se coloca en el centro de la plataforma al inicio de una sola prueba de 5 minutos y se presentan estímulos adversos (luces brillantes, aire de un ventilador). Se registra el número total de errores (toques con la cabeza en los orificios sin escape) y la latencia de escape (tiempo hasta alcanzar el orificio de escape).

10 Capacidad de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de la plataforma

15 Esta tarea de búsqueda con base cognitiva evalúa la identificación de un objeto y la capacidad de reconocimiento. El objeto diana consiste en una plataforma circular de 9 cm de diámetro provista de un distintivo negro de 10 cm x 40 cm, que se coloca 0,8 cm por encima de la superficie del agua en una piscina circular de 100 cm de diámetro. Las pruebas consisten en cuatro ensayos de 60 s por día, cada uno de cuatro días consecutivos. Cada día, el objeto diana se coloca en un cuadrante diferente de la piscina para cada prueba, y el animal es liberado en la misma ubicación a lo largo de la circunferencia de la piscina en los cuatro ensayos. Se registra la latencia total (máximo 60 s) para cada ensayo.

Examen de Irwin modificado

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

25 Cuantificación del depósito amiloide vascular

30 Para la cuantificación de la angiopatía amiloide cerebral (CAA), se inmunotifieron secciones de 5 µm incluidas en parafina a intervalos de 30 µm a través de las leptomeninges de la corteza parietal o cerebelar, con anticuerpo Ab9 biotinilado (anti-Aβ1-16, 1:500) durante la noche a 4°C (n = 5-7 ratones por genotipo en cada grupo de edad, n = 6 secciones por ratón). Los vasos sanguíneos teñidos positivamente se evalúan visualmente utilizando el sistema de puntuación de Vonsattel modificado (42). La puntuación de la gravedad de la CAA se calcula multiplicando el número de vasos de CAA por el grado de gravedad de CAA.

Histología: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

35 Los ratones Tg y WT de 3 a 12 meses se anestesian y se perfunden transcardialmente de forma secuencial con NaCl al 0,9% y paraformaldehído al 4% en 0,1 mol/L de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) o formol al 10% y paraformaldehído al 4% en 0,1 mol/L de PBS (pH 7,4). Los cerebros y las médulas espinales se extirpan y se almacenan en paraformaldehído al 4%. Algunas muestras se incluyen en parafina y se cortan en un microtomo deslizando con un espesor de 10 µm. Las criosecciones (14 µm) se cortan en un criostato y se montan sobre portaobjetos recubiertos con alumbre de cromo. La peroxidasa endógena se inactiva tratando la sección con metanol que contiene un 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Las secciones se bloquean en suero de caballo al 10%.

40 Los anticuerpos primarios se usan 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 de Texas y AMCA, los fluorocromos, el 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 de los anticuerpos se realizan usando solución salina tamponada con fosfato (0,1 mol/L de PBS, pH 7,4) o solución salina tamponada con Tris (0,01 mol/L de Tris, 0,15 mol/L de NaCl, pH 7,4).

45 La incubación con el complejo ABC y la detección con 3,3'-diaminobencidina se lleva a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. La contratinción con hematoxilina se realiza de acuerdo con procedimientos convencionales. Para cada determinación se utiliza un mínimo de tres ratones por genotipo, edad y sexo (43).

Preparación de extractos cerebrales

50 Los cerebros se recogen rápidamente sobre hielo, 90 a 120 minutos después de la inyección mortal y se congelan a -80°C. El hemisferio cerebral derecho de cada ratón se pesa después de la congelación. El análisis de la masa del hemisferio a través de la desviación absoluta media, nos permite excluir las muestras que sobrepasan 4 desviaciones absolutas medias del resto del conjunto. Los hemisferios cerebrales se homogeneizan y los lisados celulares que contienen proteínas enteras se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante para los kits de ensayo enzimático (R&D Systems, Inc.). En resumen, las cortezas cerebrales se homogeneizan en 800 µl de tampón de extracción 1x con bajo contenido en sales (kit de R&D) y se incuban sobre hielo durante 10 minutos. Los homoge-

55

neizados se centrifugan luego a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteína 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 mediante técnicas de inmunotransferencia Western y ELISA tipo sándwich. Además, las actividades de las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se pueden medir a partir de los mismos extractos.

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

Se carga una cantidad igual de proteínas de extractos cerebrales en cada gel, 30  $\mu$ g por pista para cada muestra. Cada gel contenía ocho tratamientos: control; fármaco 1 dosis de 7,5 mg/kg; y fármaco 2 en varias dosis. Para minimizar la variación dentro del gel, cada gel contenía tres conjuntos de todos los grupos de tratamiento. Cada transferencia se analiza con el anticuerpo 22C11. Cada transferencia también se analiza con el anticuerpo de  $\beta$ -actina para una normalización para transferir la eficiencia. La intensidad de la señal de la banda de APP se normaliza con la de  $\beta$ -actina. Se cargan dos muestras de "control" en cada gel/transferencia para estudiar la variación de transferencia a transferencia. El análisis de las transferencias se realiza de dos maneras: en cuanto a la transferencia ( $n = 3$ ), para evaluar la variación de gel a gel; y de transferencias combinadas ( $n = 9$  o 10) tal y como se describe (38-39). El análisis en cuanto a la transferencia 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 ELISA de A $\beta$  del cerebro, los niveles de A $\beta$  del cerebro anterior y posterior se determinan de forma independiente, y el bulbo olfatorio se excluye del análisis. Para el análisis de A $\beta$  en plasma, se extrae sangre en tubos recubiertos con EDTA después de una punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y el plasma se divide en partes alícuotas y se almacena a -80°C hasta su uso. Los niveles de A $\beta$  se determinan mediante ELISAs de tipo sándwich, específicos del final utilizando Ab9 (Ab anti-A $\beta$ 1-16) como Ab (anticuerpo) 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 frente a los resultados anteriores, utilizando los mismos conjuntos de ratones como controles internos para minimizar una variabilidad potencial de ELISA, como se describe (46).

#### Transferencia Western

Las muestras de cerebro anterior congeladas a presión se homogeneizan en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Boston BioProducts, Worcester, MA) con una mezcla de inhibidor de proteasa al 1% (Roche). El homogeneizado se centrifuga a 100.000 x g durante 1 h a 4°C. La concentración de proteínas en el material sobrenadante se determina utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce). Las muestras de proteína (20  $\mu$ g) se procesan en geles Bis-Tris al 12% XT o geles Bis-Tris al 4-12% XT (Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfieren a membranas de nitrocelosa de 0,2  $\mu$ m. Las transferencias se someten a microondas durante 2 minutos en PBS 0,1 M dos veces y se analizan con Ab 82E1 (anti-A $\beta$ 1-16, 1:1000; IBL, Gunma, Japón) y 20 aminoácidos C-terminales anti-APP (1:1000) como se describe (46). Las transferencias se estabilizan y se repite el análisis con anti- $\beta$ -actina (1:1000; Sigma) como control de carga. La intensidad relativa de las bandas se mide con el programa informático ImageJ.

#### Cuantificación del depósito de amiloide parenquimatoso

Los medios cerebros se fijan mediante inmersión en formalina al 10% y se procesan para la inclusión en parafina. Secciones de tejido cerebral (5  $\mu$ m) se inmunotiñeron con anticuerpo (Ab) anti-A $\beta$  total. Las secciones se contratiñen con hematoxilina. Se utilizan seis secciones por cerebro a través del hipocampo, la corteza piriforme (bregma, -1,70 a -2,80 mm) o el cerebelo (parafloclulo, crus ansiforme y lobulillos simples; bregma, -5,40 a -6,36 mm) para la cuantificación ( $n = 5-7$  ratones por genotipo en cada grupo de edad). La carga de la placa de A $\beta$  se determina utilizando el programa informático MetaMorph (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Para la cuantificación de las placas con núcleo, se tiñen secciones en serie de las analizadas para la carga de A $\beta$  con tioflavina S (ThioS) y se cuenta el número de placas positivas para ThioS en el hipocampo, la corteza entorrinal/piriforme o el cerebelo. Todos los análisis anteriores se realizan de forma ciega.

#### Análisis estadístico de datos *in vivo*

Los resultados de todos los experimentos se analizan con STATISTICA 8.0 (Statsoft). Los niveles de A $\beta$ , la carga de placa amiloide y la gravedad de la CAA, se analizan utilizando ANOVA con la prueba de comparación múltiple Holm-Sidak post hoc o la prueba t de Student de dos colas. Si el conjunto de datos no cumple con los supuestos de la prueba paramétrica, se realiza la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la comparación múltiple de Dunn post hoc o la prueba de suma de rango de Mann-Whitney. Para analizar si los niveles de A $\beta$  en los ratones bitransgénicos eran compatibles con una suma aditiva de los niveles de A $\beta$  en los miembros individuales transgénicos de una camada, se utiliza una regresión lineal múltiple sin prueba de intercepción. Todas las comparaciones se hacen entre miembros de una camada. La modelización de la respuesta al fármaco se realiza excluyendo las muestras de control (0 mg/kg). La DE50 corresponde a la dosis (mg/kg) requerida para inducir un 50% de respuesta máxima inducida por el fármaco en los experimentos. Se calcula utilizando el modelo de la ecuación de Hill para el logaritmo de DE50.

Se realizan experimentos *in vivo* para combinaciones de fármacos candidatos. Los resultados positivos en la memoria de aprendizaje y espacial se enumeran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Fármaco	Resultados en el experimento del laberinto de agua de Morris
Terbinafina y Levosimendán	+
Terbinafina y Sulfisoxazol	+
Baclofeno y Levosimendán	+
Sulfisoxazol y Levosimendán	+
Ácido aminocaproico y Levosimendán	+
Ácido aminocaproico y Terbinafina	+

**Bibliografía**

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.
- 5 2. Houlden H., Baker M., et al. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., et al. (1997). Two novel (M233T and R278T) presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
- 10 4. 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. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525.
- 15 7. Blacker D., Albert M.S., et al. (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., et al. (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5(4): 393-7.
- 20 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. and Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
- 25 12. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
13. Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.
- 30 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. and Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
- 35 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.
- 40 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. Ge G., Fernández C.A., et al. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(24):10010-5.
21. Hardie D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10): 774-85.
- 45 22. Reihill J.A., Ewart M.A., et al. (2007). AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun.* 354(4):1084-8.
23. Ouchi N., Kobayashi H., et al. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between

AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 279(2):1304-9.

24. Hug C., Wang J., et al. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(28):10308-13.

5 25. English D., Kovala A.T., et al. (1999). Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res.* 8(6):627-34.

26. Grolach A., Klappa P., et al. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10): 1391-418.

27. Verkhatsky A. (2004). Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. *Biol Res.* 37(4): 693-9.

10 28. Cookson M.R. (2003). Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease? *Curr Biol.* 13(13): R522-4.

29. Sze C.I., Su M., et al. (2004). Down-regulation of WW domain-containing oxidoreductase induces Tau phosphorylation in vitro. A potential role in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279(29): 30498-506.

15 30. Wälchli S., Curchod M.L., et al. (2000). Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *J Biol Chem.* 275(13):9792-6.

31. Chang N.S., Doherty J., et al. (2003). JNK1 physically interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 278(11):9195-202.

32. D'Orazi G., Cecchinelli B., et al. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4(1):11-9.

20 33. Zhu H., Wu L., et al. (2003). MDM2 and promyelocytic leukemia antagonize each other through their direct interaction with p53. *J Biol Chem.* 278(49):49286-92.

34. Rodrigues S., De Wever O., et al. (2007). Opposing roles of netrin-1 and the dependence receptor DCC in cancer cell invasion, tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 26(38):5615-25.

25 35. Taniguchi Y., Kim S.H., et al. (2003). Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J Biol Chem.* 278(33):30425-8.

36. Singer C., Figueroa-Masot X., Batchelor R., and Dorsa D. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999, 19(7):2455-2463.

30 37. McGowan E., et al. (2005) Aβ42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron* 47: 191-199.

38. 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

39. Ashe KH (2001) Learning and memory in transgenic mice modelling Alzheimer's disease. *Learning and Memory* 8: 301-308.

35 40. 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.

41. Hsiao K, et al. (1996) Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.

40 42. Greenberg S.M. and Vonsattel J.P. (1997) Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* 28(7):1418-22

43. 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.

45 44. 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.

45 45. 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.

46. 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.

47. Paris D, et al. (2005) Anti-angiogenic activity of the mutant Dutch A(beta) peptide on human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 136: 212-30.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno relacionado, que comprende al menos levosimendán, o una sal o una formulación de liberación sostenida del mismo.
- 5 2. Una composición para uso según la reivindicación 1, que comprende levosimendán, o una sal o una formulación de liberación sostenida del mismo y al menos un compuesto adicional seleccionado a partir de ácido aminocaproico, acamprosato, amlodipina, argatrobán, baclofeno, cilostazol, cinacalcet, clopidogrel, difilina, fenoldopam, leflunomida, mepacrina, metimazol, fenformina, prilocaína, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, cinarizina, eplerenona, carbenoxolona, sulodexida, carbamazina, ciclopirox, amobarbital, cefotetán, tetranitrato de eritritilo, meticlotiazida, risedronato, enprofilina, oxtrifilina, parametadiona, cefmenoxima, aprindina, etomidato, mitiglinida, benidipina y zonisamida, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, por separado o secuencial.
- 10 3. Una composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende levosimendán, o una sal o una formulación de liberación sostenida del mismo, y al menos un compuesto adicional seleccionado a partir de ácido aminocaproico, baclofeno, sulfisoxazol y terbinafina, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, formulados para una administración combinada, por separado o secuencial.
- 15 4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, formulándose los fármacos en cada combinación para una administración combinada, por separado o secuencial:
- baclofeno y levosimendán,
  - 20 - ácido aminocaproico y levosimendán,
  - levosimendán y sulfisoxazol,
  - levosimendán y terbinafina,
  - levosimendán y tetranitrato de eritritilo, o
  - levosimendán y zonisamida,
  - 25 o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos.
5. La composición para uso según la reivindicación 4, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, formulándose los fármacos en cada combinación para una administración combinada, por separado o secuencial:
- baclofeno y levosimendán,
  - 30 - ácido aminocaproico y levosimendán,
  - levosimendán y sulfisoxazol, o
  - levosimendán y terbinafina,
  - o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos.
- 35 6. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición se administra repetidamente al sujeto.
8. Una composición que comprende levosimendán, o una sal o una formulación de liberación sostenida del mismo, para uso para proteger neuronas o células cerebrales endoteliales contra la toxicidad de A $\beta$  en un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer.
- 40 9. Una composición que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, para una administración combinada, por separado o secuencial:
- baclofeno y levosimendán,
  - ácido aminocaproico y levosimendán,
  - 45 - levosimendán y sulfisoxazol,

- levosimendán y terbinafina,
  - levosimendán y tetranitrato de eritritilo, o
  - levosimendán y zonisamida,
- o sal(es) o formulación(es) de liberación sostenida de los mismos.

5

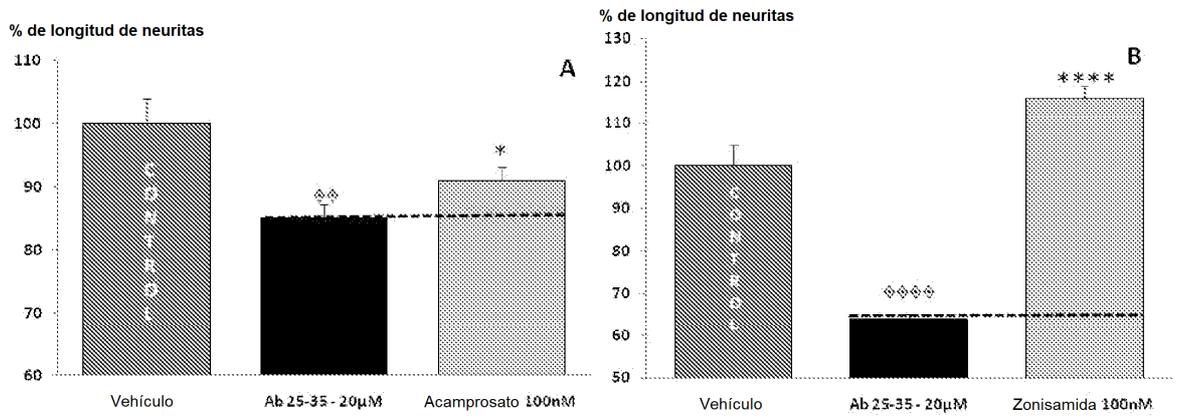


FIGURA 1

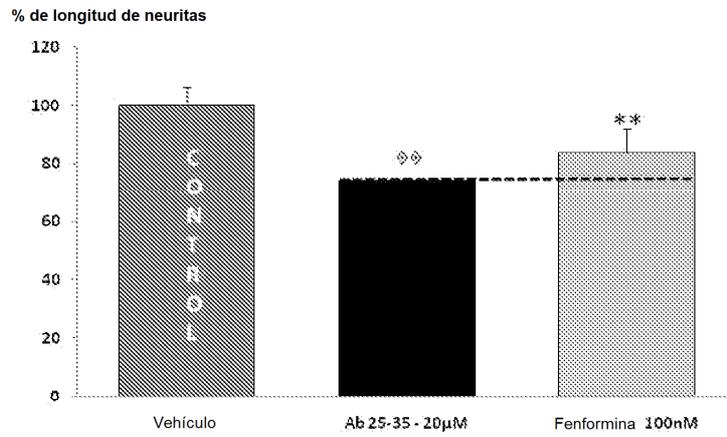


FIGURA 2

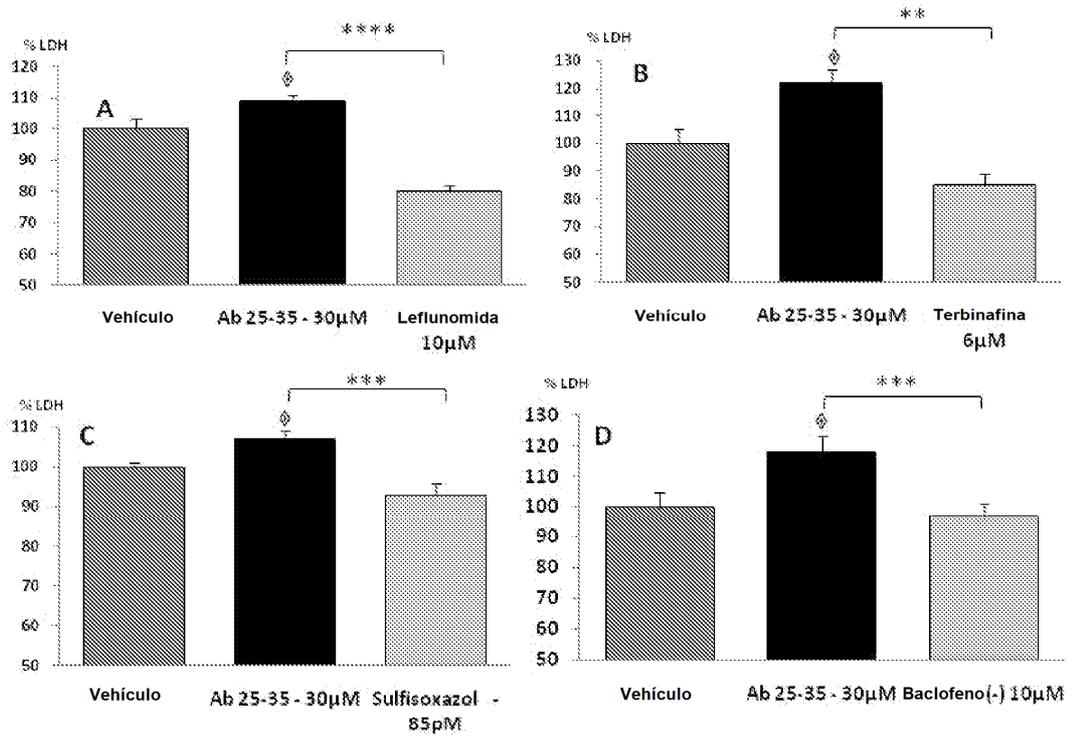


FIGURA 3

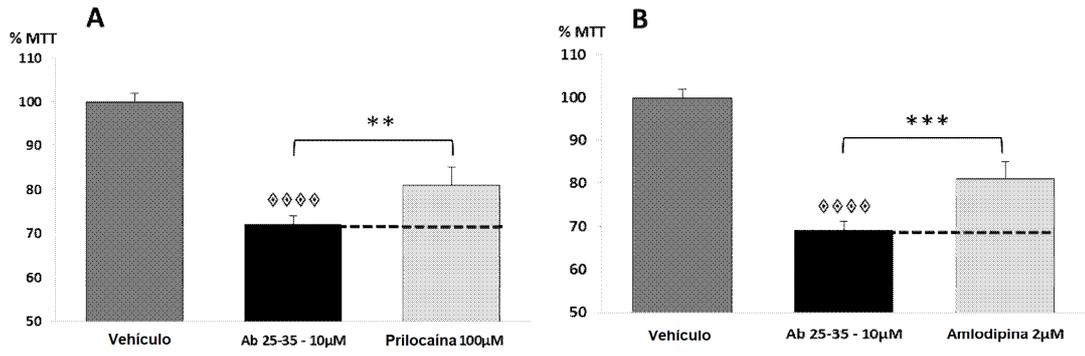


FIGURA 4

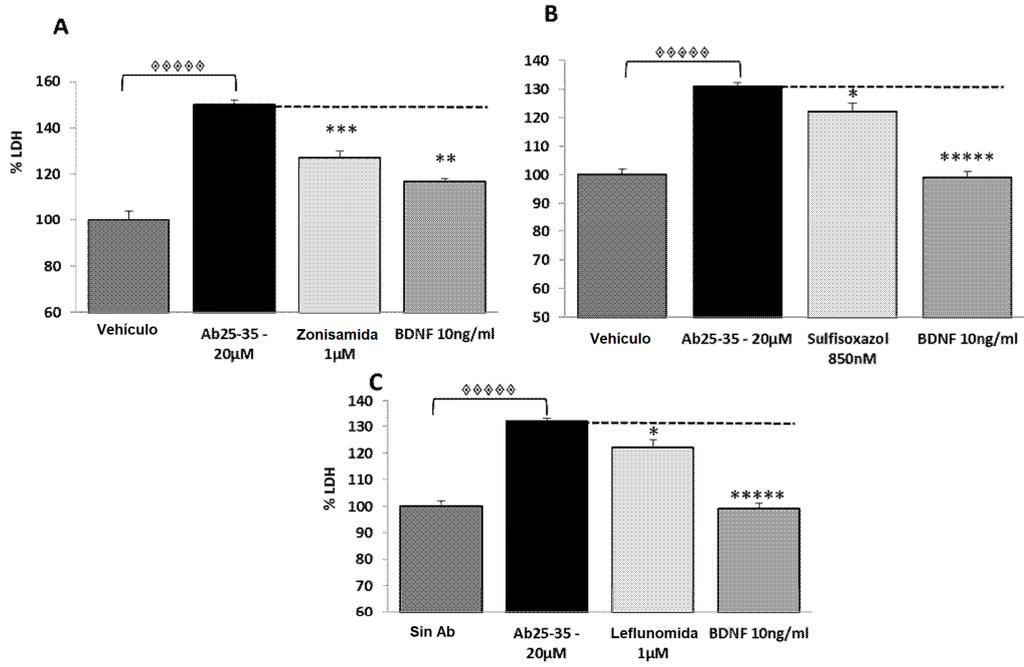


FIGURA 5

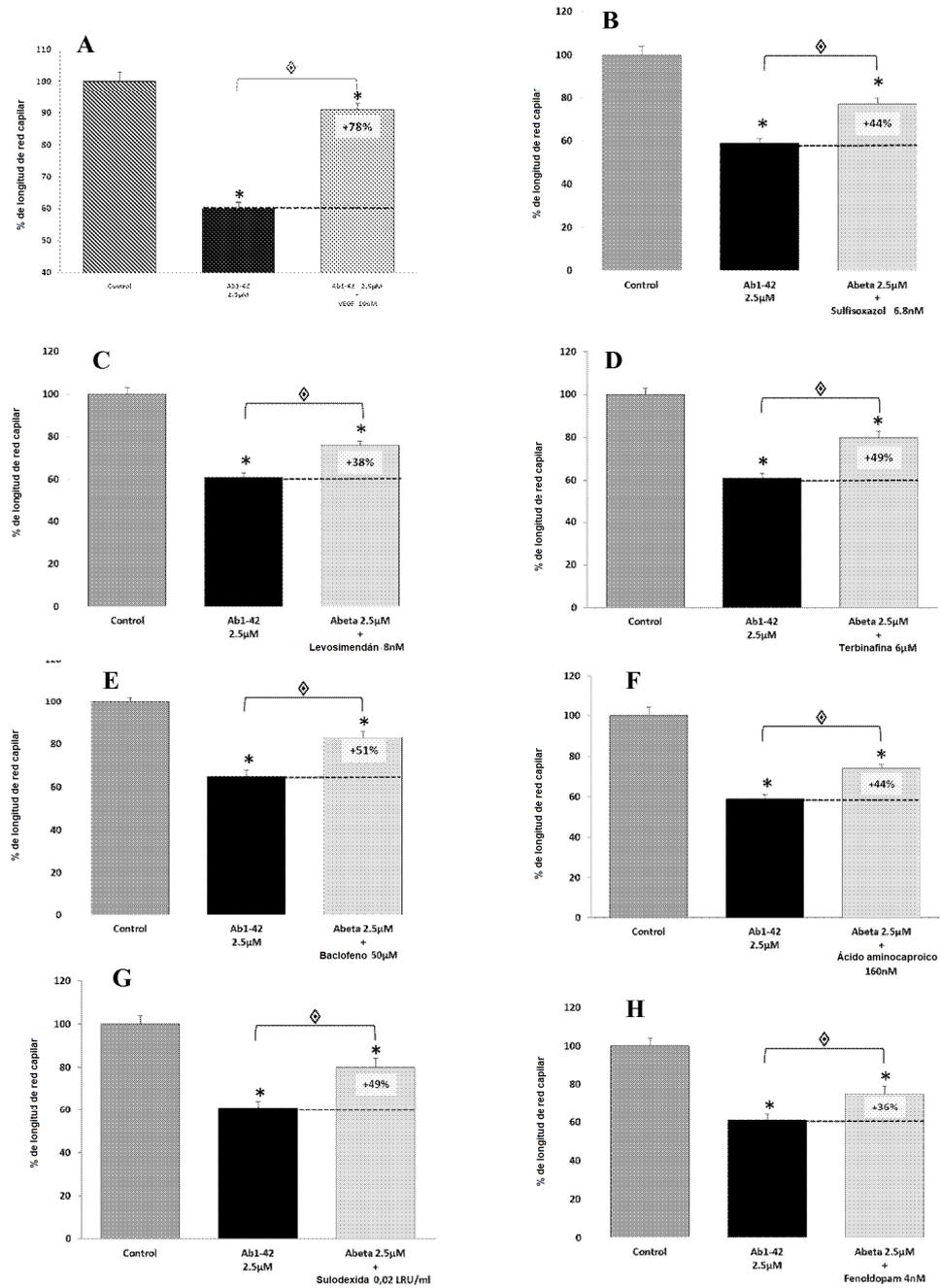


FIGURA 6

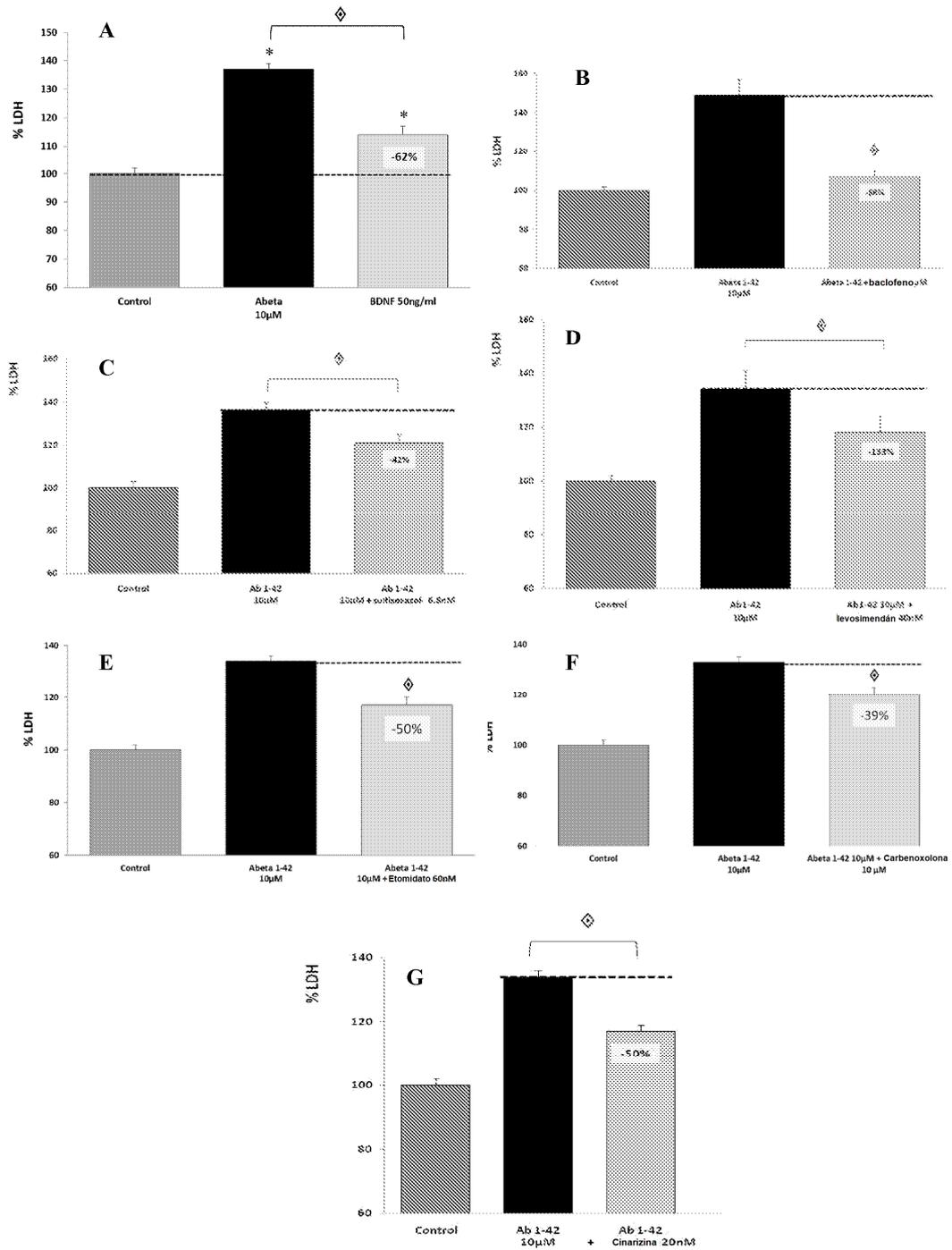


FIGURA 7

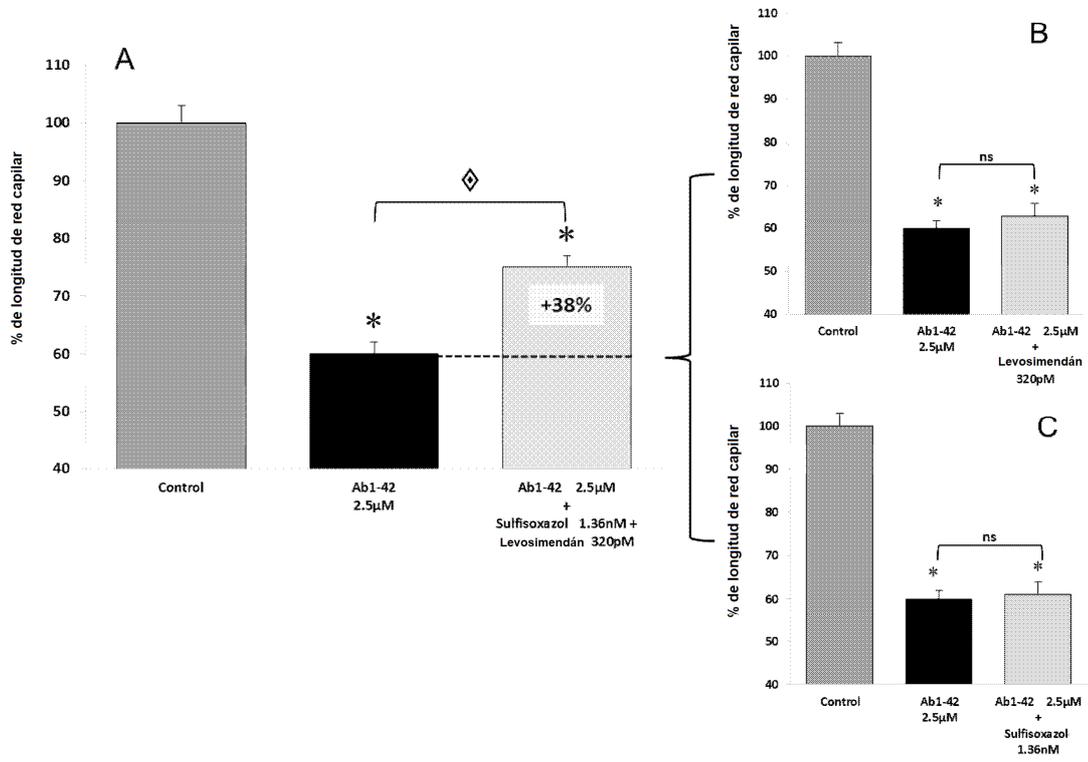


FIGURA 8

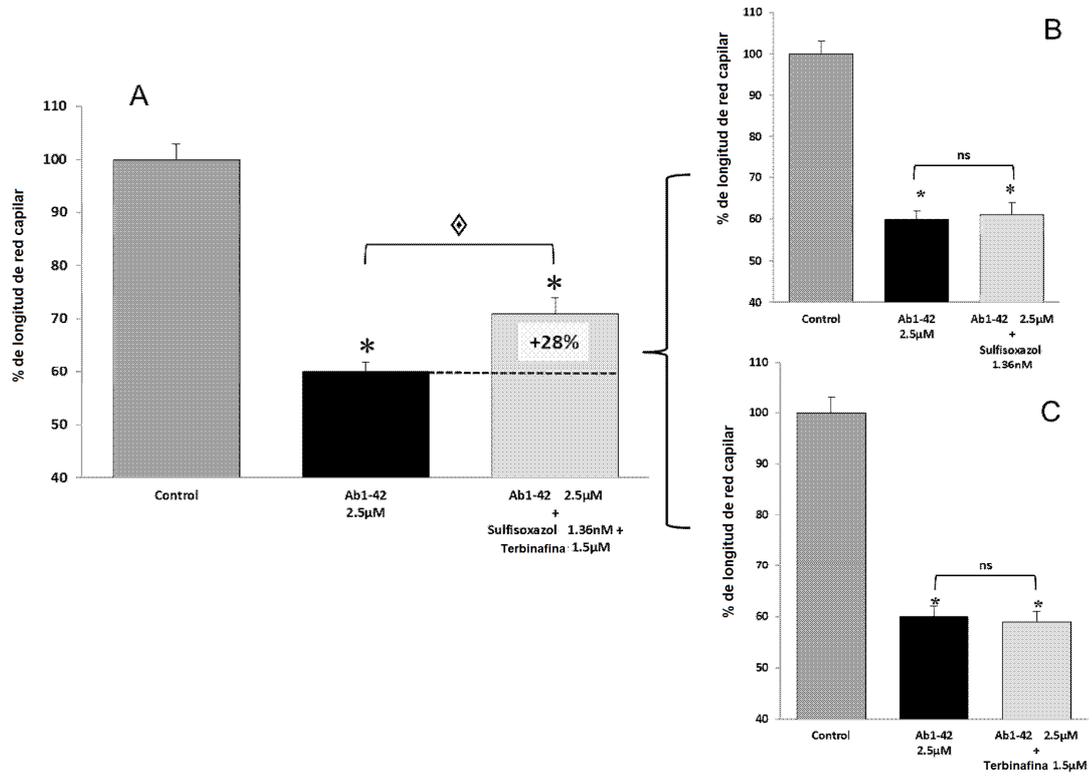


FIGURA 9

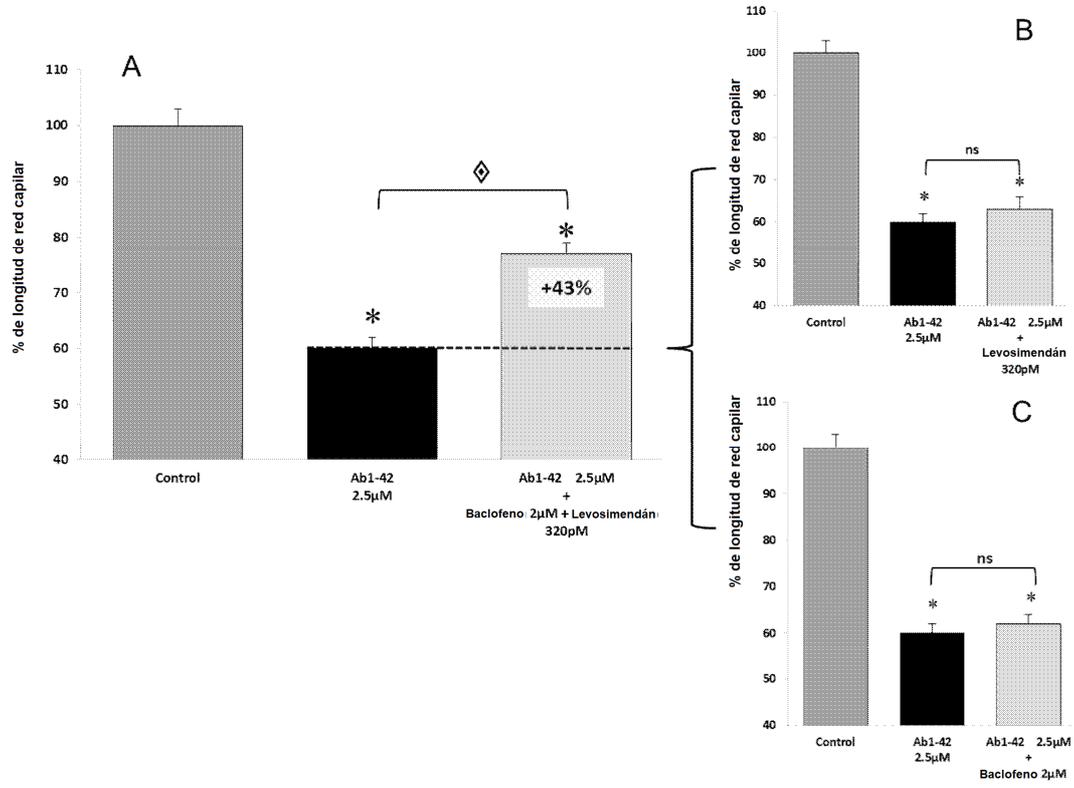


FIGURA 10

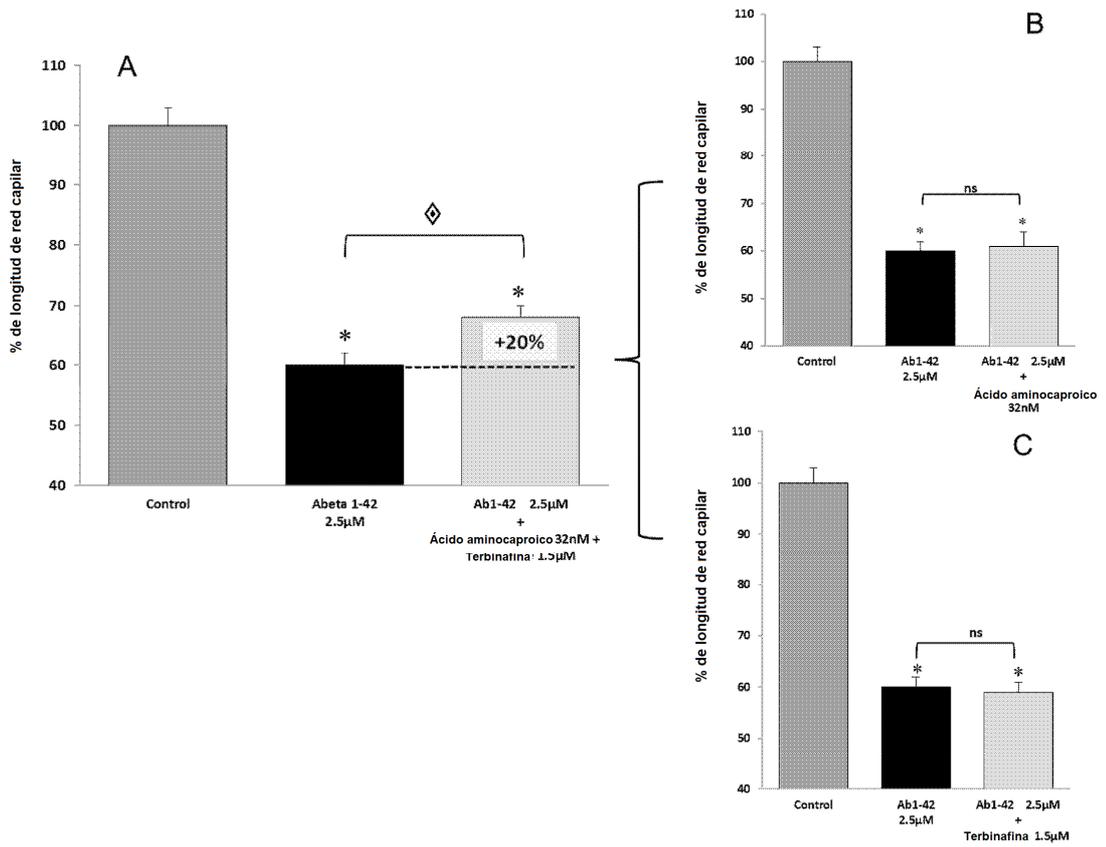


FIGURA 11

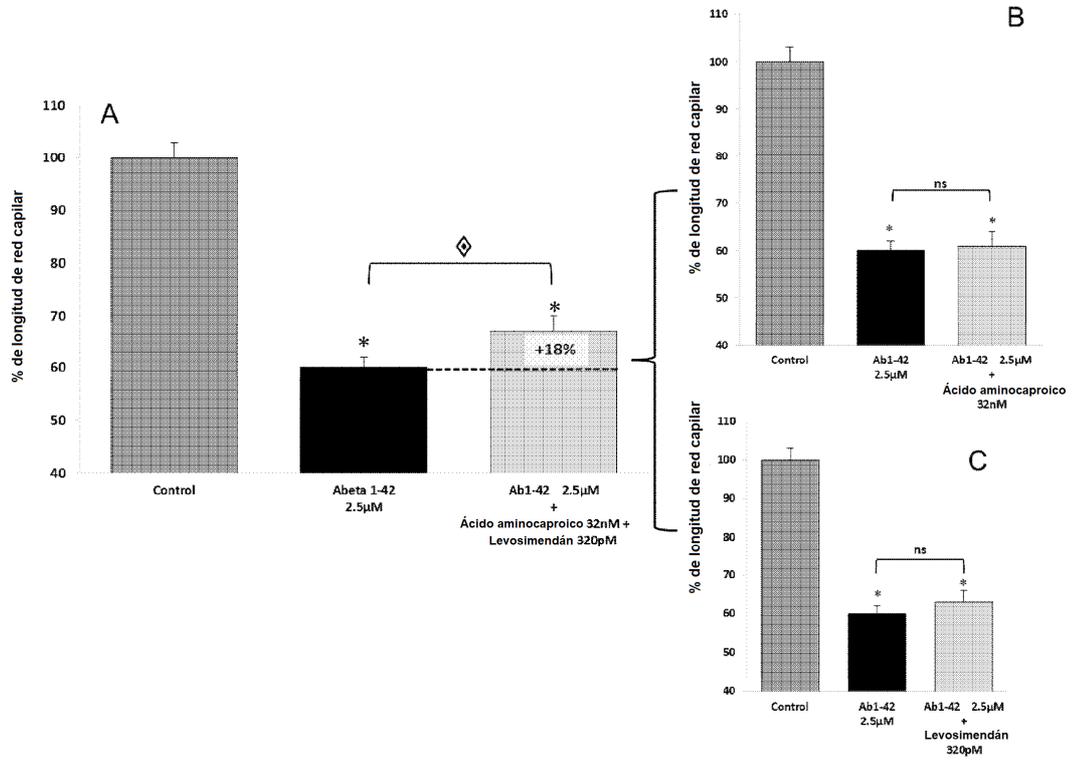


FIGURA 12

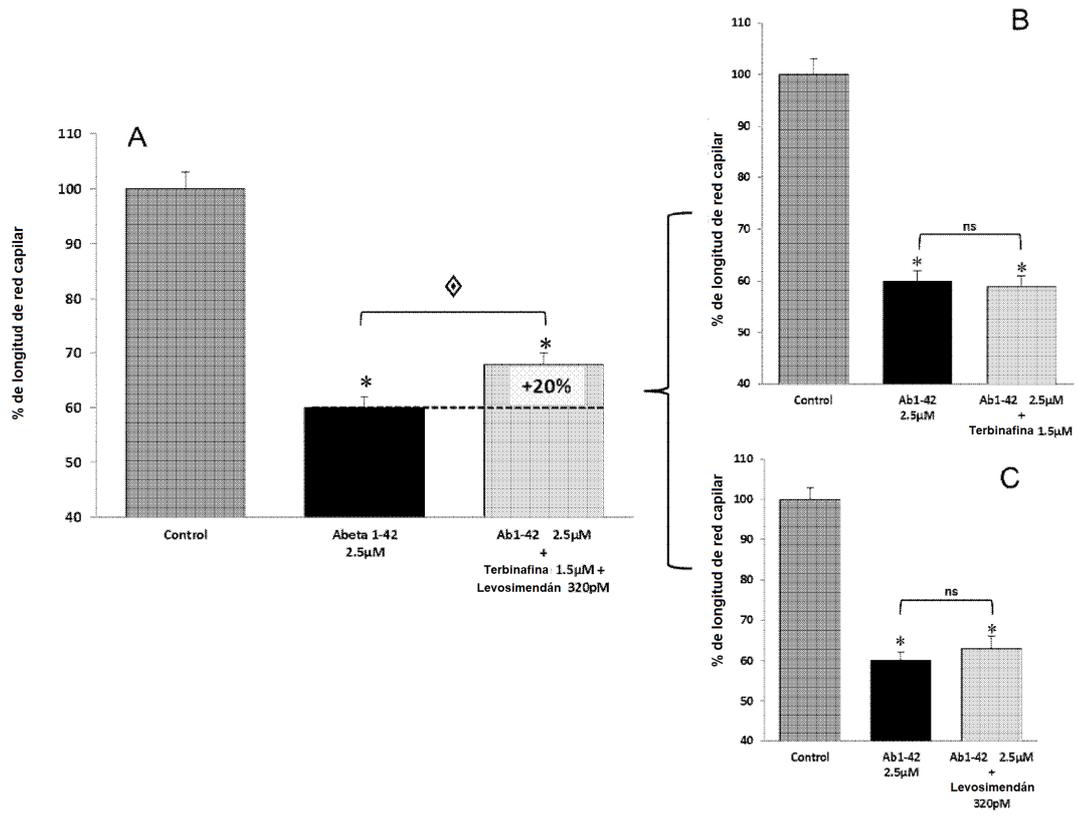


FIGURA 13