

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 834**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/13 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2019 PCT/EP2019/067645**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.01.2020 WO20002715**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2019 E 19734401 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023 EP 3813882**

(54) Título: **Combinación farmacéutica que comprende una biguanida y un inhibidor de la acetilcolinesterasa para usar en enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas**

(30) Prioridad:

29.06.2018 EP 18180906

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2024

(73) Titular/es:

**REJUVENATE BIOMED (100.0%)
Wetenschapspark 13
3590 Diepenbeek, BE**

(72) Inventor/es:

BELIËN, ANN

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 965 834 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

Combinación farmacéutica que comprende una biguanida y un inhibidor de la acetilcolinesterasa para usar en enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento, prevención y/o estabilización de enfermedades relacionadas con la edad y/o enfermedades degenerativas. En particular, dicha combinación farmacéutica comprende una biguanida y un inhibidor de la acetilcolinesterasa y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. La invención también se dirige al uso de dicha combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de las quejas relacionadas con la edad y/o dolencias degenerativas; y para mejorar una medida de la esperanza de vida y/o la duración de la salud como se detalla en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

El envejecimiento es la pérdida gradual de función y el deterioro a nivel celular, de tejido y órgano, lo que conduce a una pérdida progresiva de integridad fisiológica, una mayor susceptibilidad a la enfermedad y a los estresantes externos, y finalmente conduce a la muerte. A medida que aumenta el envejecimiento de la población mundial, la incidencia de las enfermedades relacionadas con la edad aumenta cada año. Y de ahí que se hayan hecho numerosos intentos para tratar las enfermedades relacionadas con la edad, así como para retrasar la aparición del complejo proceso del envejecimiento. Como resultado, se han identificado una serie de vías relacionadas con el envejecimiento a las que se podría dirigir la acción para prolongar la esperanza de vida y la duración de la salud. Por ejemplo, hay evidencias abrumadoras de que las mutaciones de un solo gen en las vías de detección de nutrientes, como la señalización de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) o las vías de señalización de la diana mecánica de la rapamicina (mTOR), prolongan la esperanza de vida y la salud en invertebrados. Estas vías también se han evaluado en modelos de mamíferos, en los que la duración de la salud y la esperanza de vida se han extendido mediante manipulación genética o fármacos. Aunque esto plantea saltos para nuevas intervenciones, que incluyen fármacos que ralentizan el proceso de envejecimiento y ralentizan la apariencia de la enfermedad relacionada con la edad mediante la modulación de las vías conservadas del envejecimiento, hasta ahora, excepto por algún tratamiento sintomático, desafortunadamente, no hay intervención conocida que se demostró que ralentiza eficientemente el proceso de envejecimiento humano. Después de todo, además de tratar las enfermedades y trastornos existentes por medio de la medicina, la necesidad y la demanda de medidas para permanecer sanas y retrasar el envejecimiento están aumentando.

Durante las últimas décadas, se han utilizado varios organismos modelo para obtener más información sobre la ciencia compleja del envejecimiento. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un organismo animal modelo utilizado comúnmente para estudiar el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, que tiene ventajas prominentes tales como, ciclo de vida corto, manipulación experimental simple y recursos genéticos ricos. Además, es el primer organismo multicelular cuya secuenciación del genoma completo se ha completado, cuyo genoma comprende 2/3 de los genes relacionados con la enfermedad humana, y los modelos de enfermedades transgénicas pueden obstruirse fácilmente por medio de marcaje de GFP y tecnología de ARNi del genoma completo, es posible realizar una investigación sistemática y completa de seguimiento de la vida en la patología degenerativa y fármacos potenciales a nivel individual, lo que es especialmente importante para el estudio del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad. Por lo tanto, el uso de *C. elegans* promueve en gran medida la explicación de los mecanismos patológicos relacionados con la edad y el desarrollo de compuestos activos. La metformina se ha utilizado ampliamente y está aprobada como un fármaco antidiabético para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Aumenta la sensibilidad a la insulina y, por lo tanto, mejora la acción de la insulina a nivel celular sin afectar la secreción de insulina. También se ha demostrado que la metformina ejerce efectos positivos sobre varios factores de riesgo cardiovascular. Además, se ha demostrado que la metformina se dirige también a varios mecanismos de envejecimiento. Específicamente para el envejecimiento, la metformina conduce a niveles de insulina disminuidos, la señalización disminuida de IGF-1, la inhibición de mTOR, la inhibición del complejo mitocondrial I en la cadena de transporte de electrones y la reducción de la producción endógena de especies reactivas de oxígeno, la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK) y la reducción en el daño del ADN. También se demostró que la metformina influye favorablemente en los procesos metabólicos y celulares estrechamente asociados con el desarrollo de afecciones relacionadas con la edad, tales como inflamación, autofagia y senescencia celular (Barzilai y col., Cell Metab. 2016). Mediante el uso de un sistema modelo de *C. elegans*, los efectos que promueven la salud y la vida útil de la metformina en la diabetes tipo 2 también se confirmaron.

Los estudios en seres humanos han demostrado además que la metformina reduce significativamente el riesgo de cáncer en pacientes diabéticos (Fuming y col. *Oncol Lett.* 2018) y reduce el riesgo de enfermedad coronaria (Hong y col., *Diabetes Care.* 2014). Sin embargo, todos estos efectos se han observado cuando se administra metformina a una dosis terapéutica considerablemente alta, que es de al menos 1500 mg/día o más. Además, hasta ahora, no se identificaron efectos sinérgicos de la metformina en combinación con otro compuesto sobre las enfermedades relacionadas con la edad.

La galactoamina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa que modula alostéricamente los receptores nicotínicos, es ampliamente conocido como fármaco administrado a pacientes con la enfermedad de Alzheimer. En *C. elegans*, se demostró que la galantamina facilita la neurotransmisión colinérgica de forma similar a como lo hace en humanos, y que rescata el fenotipo de parálisis en un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer en *C. elegans* (Xin y col., Plos One, 2013), pero no se han descrito efectos de la galantamina en *C. elegans* en la locomoción, la movilidad u otras formas de deterioro relacionadas con la edad. En seres humanos, se ha demostrado que la galantamina reduce significativamente la muerte por infarto de miocardio (Nordström y col., 2013). Además, la galantamina alivia la inflamación y la resistencia a la insulina en sujetos con síndrome metabólico (Consoim-Colombo y col.; JCI Insight. 2017). Sin embargo, todos estos efectos se han observado cuando se administra galantamina en una dosis terapéutica considerablemente alta, que es de al menos 24 mg/día o más. Además, también para la galantamina, no se identificaron efectos sinérgicos sobre las enfermedades relacionadas con la edad cuando la galantamina se combinó con otro compuesto.

En la presente invención, los inventores han identificado un efecto potenciador e incluso un efecto sinérgico sobre las enfermedades relacionadas con la edad mediante el uso de metformina de biguanida, en combinación con el inhibidor de la acetilcolinesterasa galantamina. En particular, este efecto se observó incluso al administrar al menos uno de los compuestos, o ambos compuestos, en su dosis subterapéutica.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende una biguanida, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Típico para la invención es que dicha combinación farmacéutica es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas. Además, también se describe el uso de dicha combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de las quejas relacionadas con la edad y/o dolencias degenerativas y el uso de dicha combinación farmacéutica para mejorar una medida de la esperanza de vida y/o la duración de la salud.

La combinación farmacéutica según todas las diferentes realizaciones de la presente invención comprende una biguanida y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y un inhibidor de la acetilcolinesterasa y/o un N-óxido, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización adicional, la biguanida es metformina, también denominada 1,1-dimetil-biguanida o N,N-dimetil-biguanida. En otra realización adicional de la presente invención, el inhibidor de acetilcolinesterasa se selecciona del grupo que comprende galantamina, donepezilo, rivastigmina y memantina. En otra realización adicional, la combinación farmacéutica según la invención comprende metformina en combinación con galantamina, donepezilo, rivastigmina y/o memantina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En aún una realización adicional, la combinación farmacéutica según la presente invención comprende metformina y galantamina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En aún otra realización, la combinación farmacéutica según la presente invención comprende metformina y donepezilo, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o metformina y memantina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o metformina y rivastigmina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, la invención comprende metformina en combinación con galantamina y donepezilo y/o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma; o metformina en combinación con galantamina y memantina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma; o metformina en combinación con galantamina y rivastigmina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma; o metformina en combinación con donepezilo, rivastigmina y memantina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En aún una realización adicional, la invención comprende metformina en combinación con galantamina, donepezilo y memantina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

En un primer objetivo de la presente invención, la combinación farmacéutica en todas sus diferentes realizaciones como se describió anteriormente en la presente memoria es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas en un sujeto.

En una realización adicional, dichas enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas se seleccionan del grupo que comprende enfermedades hepáticas inflamatorias, enfermedades del sistema neuromusculoesquelético, sarcopenia y fragilidad.

En un aspecto adicional y más preferido, las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas se seleccionan del grupo que comprende enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético, fragilidad y/o enfermedades inflamatorias hepáticas en aún otra realización, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el

- inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas seleccionadas de enfermedades del sistema neuromusculoesquelético y/o fragilidad. En el contexto de la presente invención, las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativa del sistema neuromusculoesquelético se seleccionan de trastornos extrapiramidales y de movimiento, enfermedades de la unión mioneural y músculo, atrofias sistémicas
- 5 afectan principalmente al sistema nervioso central, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y enfermedades relacionadas, enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica, movimientos involuntarios anormales, anomalías de la marcha y movilidad, ataxia, enfermedades neuromusculoesqueléticas asociadas mitocondriales y sarcopenia. Por lo tanto, en un aspecto específico, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de fragilidad.
- 10 En otro aspecto específico, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de la sarcopenia.
- 15 En aún otro aspecto específico, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en la aparición y/o reducción de trastornos extrapiramidales y de movimiento, enfermedades de la unión mioneural y músculo, atrofias sistémicas afectan principalmente al sistema nervioso central, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y enfermedades
- 20 relacionadas, enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica, movimientos involuntarios anormales, anomalías de la marcha y movilidad, o ataxia.
- Como ya se ha descrito anteriormente, y en una realización particular, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades neuromusculoesqueléticas asociadas mitocondriales. Dichas enfermedades
- 25 neuromusculoesqueléticas asociadas a mitocondrias se seleccionan de enfermedades del núcleo central y enfermedades asociadas a la atrofia óptica 1 (OPA1). Dichas OPA1 asociadas se seleccionan de atrofia óptica, hipertensión asociada a OPA1 y atrofia asociada a OPA1. En otro aspecto, la combinación farmacéutica según todas sus diferentes realizaciones es para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción
- 30 de los síntomas de enfermedades hepáticas inflamatorias relacionadas con la edad y/o degenerativa; en particular las enfermedades inflamatorias hepáticas asociadas a un aumento de los niveles de citoquinas.
- Como se ha descrito anteriormente, es típico que dicha combinación farmacéutica sea para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas según todas las diferentes realizaciones. En un aspecto particular de la invención, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en la prevención o retraso en el inicio de dichas enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas. En otro aspecto, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas. En aún otro aspecto adicional, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en la estabilización de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas según todas las diferentes realizaciones. En aún otro aspecto, la combinación farmacéutica según todas sus realizaciones es para usar en la reducción de síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas según todas sus realizaciones. En un aspecto adicional, dichas enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas se seleccionan de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético, sarcopenia y/o fragilidad.
- 40 45 En un segundo objetivo, la presente invención proporciona el uso de una combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de las quejas relacionadas con la edad, disfuncionamiento degenerativo y/o dolencias degenerativas. En particular, la presente invención proporciona además el uso de una combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de las dolencias relacionadas con la edad, disfuncionamiento degenerativo y/o dolencias degenerativas que se seleccionan del grupo que comprende debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular y movilidad reducida.
- 50 55 En un tercer objetivo, la presente invención proporciona el uso de una combinación farmacéutica para mejorar una medida de la esperanza de vida útil y/o la duración de la salud. En un aspecto adicional, la medida mejorada de la esperanza de vida y/o la extensión de salud se selecciona del grupo que comprende una mejora en función de una discapacidad relacionada con la edad, una estabilización de empeoramiento de una discapacidad relacionada con la edad, la mitigación o estabilización de las quejas relacionadas con la edad, la mitigación o estabilización de disfuncionamiento degenerativo y dolencias degenerativas, en relación con la afección del sujeto antes de la administración de la combinación farmacéutica o en relación con una población de control.
- 60 65 La combinación farmacéutica de los usos de las diferentes realizaciones de la invención comprende una biguanida y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y un inhibidor de la acetilcolinesterasa y/o un N-óxido, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización adicional, la biguanida es metformina, también denominada 1,1-dimetil-biguanida o N,N-dimetil-biguanida. En otra realización adicional de la presente invención, el inhibidor de acetilcolinesterasa se selecciona del grupo que comprende galantamina, donepezilo, rivastigmina y memantina. En otra realización adicional, la combinación farmacéutica según la invención comprende metformina en combinación con galantamina, donepezilo, rivastigmina

y/o memantina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En aún una realización adicional, la combinación farmacéutica según la presente invención comprende metformina y galantamina y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En otra realización más, la combinación farmacéutica según la presente invención comprende metformina y donepezilo, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o metformina y rivastigmina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, o metformina y memantina, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En vista de la presente invención, las dolencias relacionadas con la edad, el disfuncionamiento degenerativo y/o las dolencias degenerativas incluyen, pero no se limitan a, debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular, movilidad reducida, y fragilidad. En un aspecto particular, y en vista de la presente invención, las dolencias relacionadas con la edad, el disfuncionamiento degenerativo y/o las dolencias degenerativas se seleccionan de debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular, movilidad reducida.

10 En otra realización, la invención proporciona el uso de una combinación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la prevención, estabilización del empeoramiento, retraso en la aparición y/o reducción de la fragilidad, en donde la reducción de la fragilidad o la estabilización del empeoramiento de la fragilidad se selecciona del grupo de parámetros que comprenden el aumento de la fuerza, la estabilización de la pérdida de fuerza, el aumento de la masa corporal magra, la estabilización de la pérdida de peso, la mejora de la movilidad, la estabilización de la reducción de la movilidad, el aumento de la energía, la estabilización de la pérdida de energía, el aumento de los niveles de actividad, la estabilización de la pérdida de actividad, aumento de la resistencia, estabilización de la pérdida de resistencia, mejora de la respuesta conductual a una señal sensorial, estabilización de una respuesta conductual a una señal sensorial, disminución o estabilización de uno o más marcadores o biomarcadores inflamatorios, mejora de la homeostasis de la glucosa y del estado metabólico o catabólico, mejora de la neurotransmisión o de la transmisión neuromuscular, y disminución de uno o más biomarcadores de activación de la coagulación, en donde la reducción o estabilización es relativa al estado del sujeto antes de la administración de la combinación farmacéutica o relativa a una población de control.

15 En aún otra realización, la invención proporciona una combinación farmacéutica como la resumida anteriormente para usar en el tratamiento, prevención, estabilización del empeoramiento, retraso en la aparición, y/o reducción de la fragilidad, en donde la reducción de la fragilidad o la estabilización del empeoramiento de la fragilidad se selecciona del grupo de parámetros que comprenden el aumento de la fuerza, la estabilización de la pérdida de fuerza, el aumento de la masa corporal magra, la estabilización de la pérdida de peso, la mejora de la movilidad, la estabilización de la reducción de la movilidad, el aumento de la energía, la estabilización de la pérdida de energía, el aumento de los niveles de actividad, la estabilización de la pérdida de actividad, aumento de la resistencia, estabilización de la pérdida de resistencia, mejora de la respuesta conductual a una señal sensorial, estabilización de una respuesta conductual a una señal sensorial, disminución o estabilización de uno o más marcadores o biomarcadores inflamatorios, mejora de la homeostasis de la glucosa y del estado metabólico o catabólico, mejora de la neurotransmisión o de la transmisión neuromuscular, y disminución de uno o más biomarcadores de activación de la coagulación, en donde la reducción o estabilización es relativa al estado del sujeto antes de la administración de la combinación farmacéutica o relativa a una población de control.

20 En todas las diferentes realizaciones de la presente invención, la combinación farmacéutica según la invención puede administrarse en una dosis diaria terapéutica o subterapéutica a un sujeto, en particular a un sujeto humano. En aún otra realización, al menos uno de los componentes de la combinación farmacéutica de la presente invención se administra en una dosis subterapéutica a un sujeto. En otra realización, al menos uno de los componentes de la combinación farmacéutica según esta invención se administra en una dosis terapéutica. En aún otra realización, uno de los componentes de la combinación farmacéutica se administra en una dosis subterapéutica, mientras que el otro componente se administra en una dosis terapéutica. En otra realización, todos los componentes de la combinación farmacéutica de la presente invención se administran en una dosis subterapéutica al sujeto.

25 En una realización preferida, en la combinación farmacéutica, la biguanida o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se administra en una dosis subterapéutica, preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica máxima aproximadamente de 1500 mg/día por sujeto; más preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica que es aproximadamente 5 mg/día por sujeto o más y máxima aproximadamente de 1500 mg/día por sujeto; aún más preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica entre unos 5 mg/día y unos 1000 mg/día por sujeto, aún más preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica entre unos 5 mg/día y unos 850 mg/día por sujeto, o entre unos 5 mg/día y unos 800 mg/día por sujeto, o entre unos 5 mg/día y unos 750 mg/día por sujeto, o entre unos 5 mg/día y unos 700 mg/día por sujeto, o entre unos 5 mg/día y unos 500 mg/día por sujeto.

30 En otra realización, en la combinación farmacéutica, la biguanida o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma también se pueden administrar en una dosis terapéutica, preferiblemente en una dosis diaria terapéutica de más de 1500 mg/día por sujeto; incluso más preferiblemente en una dosis diaria terapéutica que es más de 1500 mg/día y menos de 3000 mg/día por sujeto.

- En otra realización preferida, en la combinación farmacéutica, el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo se administra en una dosis subterapéutica, preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica de menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto; aún más preferiblemente en una dosis subterapéutica que es más de aproximadamente 0,08 mg/día y menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto, preferiblemente menos de aproximadamente 12 mg/día por sujeto. En otra realización, el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en una dosis diaria subterapéutica que es más de aproximadamente 2 mg/día y menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto, preferiblemente menos de aproximadamente 12 mg/día por sujeto.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45
- En otra realización, en la combinación farmacéutica, el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo se administra en una dosis terapéutica, preferiblemente en una dosis diaria terapéutica de más de 16 mg/día por sujeto; aún más preferiblemente en una dosis diaria terapéutica que está entre 16 mg/día y 24 mg/día por sujeto.
- 10 15 20 25 30 35 40 45
- En otra realización preferida, la combinación farmacéutica según esta invención es una combinación farmacéutica que comprende una biguanida, preferiblemente metformina y un inhibidor de la acetilcolinesterasa, seleccionado de galantamina, donepezilo, rivastigmina o memantina, en donde tanto la biguanida como el inhibidor de la acetilcolinesterasa se administran ambos en una dosis subterapéutica. En dicho contexto, la biguanida se administra en una dosis diaria subterapéutica de un máximo de aproximadamente 1500 mg/día por sujeto, preferiblemente un máximo de aproximadamente 1000 mg/día por sujeto; Más preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica que es aproximadamente 5 mg/día o más y un máximo de aproximadamente 1500 mg/día por sujeto; aún más preferiblemente en una dosis diaria subterapéutica entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1000 mg/día por sujeto. También en dicho contexto, el inhibidor de la acetilcolinesterasa se administra en una dosis diaria subterapéutica de menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto; aún más preferiblemente en una dosis subterapéutica que es más de aproximadamente 0,08 mg/día y menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto, preferiblemente menos de aproximadamente 12 mg/día por sujeto. En una realización aún más preferida, en una dosis diaria subterapéutica que es más de aproximadamente 2 mg/día y menos de aproximadamente 16 mg/día por sujeto, preferiblemente menos de aproximadamente 12 mg/día por sujeto. En una realización aún más preferida, en una dosis diaria subterapéutica que está entre 3 mg/día y 12 mg/día por sujeto.
- 20 25 30 35 40 45
- En otro aspecto de la invención, la combinación farmacéutica en todas las diferentes realizaciones de la invención se prepara para administración oral o cualquier otra administración no invasiva. La combinación farmacéutica según las diferentes realizaciones de la invención se caracteriza además porque la biguanida y el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable se formulan por separado en composiciones farmacéuticas. En un aspecto adicional, la biguanida y el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable se administran simultáneamente al sujeto. Alternativamente, la biguanida y el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable se administran en diferentes momentos.
- 30 35 40 45
- En otro aspecto, la biguanida y el inhibidor de la acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable se formulan en una sola formulación farmacéutica en la presente combinación farmacéutica.

Breve descripción de los dibujos

- Con referencia específica ahora a las figuras, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las diferentes realizaciones de la presente invención solamente. Se presentan con el fin de proporcionar lo que se considera la descripción más útil y sencilla de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto no se hace ningún intento para mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo las varias formas de la invención pueden incorporarse en la práctica.
- 55 60 65 70 75 80 85 90
- Figura 1.** Ensayo de esperanza de vida mediante el uso de *C. elegans* para evaluar el efecto de prolongación de la vida de una dosis única de metformina, galantamina y la combinación de metformina y galantamina. Se muestran los datos agrupados de múltiples ensayos que miden la supervivencia de *C. elegans*. El tratamiento se inició el primer día de vida adulta y los animales recibieron una dosis. Los datos completos de la esperanza de vida se muestran en la Tabla 1.
- 55 60 65 70 75 80 85 90
- Figura 2.** Ensayo de la esperanza de vida mediante el uso de *C. elegans* para evaluar el efecto de prolongación de la vida de una dosis repetida de metformina, galantamina y la combinación de metformina y galantamina. El tratamiento se inició el primer día de vida adulta y los animales recibieron dosis repetidas. Los datos completos de la esperanza de vida se muestran en la Tabla 1.
- 65 70 75 80 85 90
- Figura 3.** La dosificación única de galantamina y/o metformina en *C. elegans* influye positivamente en múltiples parámetros de locomoción (es decir, actividad media (A) y actividad máxima (B)) durante el envejecimiento, así como

en el número medio de “días sanos” (C). Este último es un parámetro más saludable, definido como el número de días de los cuales la actividad de un animal es superior al 15 % de la actividad máxima media de la afección de controles no tratados (dentro del mismo ensayo). En los paneles A y B, la actividad de referencia (es decir, antes de un estímulo de luz azul) se muestra a la izquierda de la línea de puntos, mientras que la actividad estimulada (es decir, después de un estímulo de luz azul) se muestra a la derecha de la línea de puntos. Las barras de error indican el SEM. Los niveles de significación estadística (y los cambios porcentuales) se indican contra el control no tratado en la parte inferior de cada gráfico. La significación estadística contra “25 mM Met + 100 µM Gal” se indica mediante líneas adicionales. * $p_{ANOVA} < 0,05$, ** $p_{ANOVA} < 0,01$, *** $p_{ANOVA} < 0,001$, NS no significativo.

Figura 4. La dosificación repetida de *C. elegans* con galantamina y/o metformina afecta positivamente múltiples parámetros de locomoción y conductual en adultos posreproductivos (velocidad media (A), velocidad máxima (B), fracción corriendo (C), ocupación de celdas (D)). Las barras de error indican el SEM. Los niveles de significación estadística (y los cambios porcentuales) se indican contra el control no tratado en la parte inferior de cada gráfico. La significación estadística contra “25 mM Met + 100 µM Gal” se indica mediante líneas adicionales. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NS no significativo. Los datos de locomoción completa se muestran en la Tabla 2.

Figura 5. La combinación de 25 mM de Met con los inhibidores de la acetilcolinesterasa Don y Riv o el compuesto similar al inhibidor de la acetilcolinesterasa Mem induce un fenotipo de locomoción muy similar al de la combinación de 25 mM de Met con el inhibidor de la acetilcolinesterasa Gal (velocidad media (A), velocidad máxima (B), fracción de carrera (C), ocupación de celdas (D)). Los niveles de significación estadística (y los cambios porcentuales) se indican contra el control no tratado en la parte inferior de cada gráfico. * $p < 0,05$, NS no significativo. Los datos de locomoción completa se muestran en la Tabla 3.

Figura 6. La transcripción del gen citoprotector de la glutatión S-transferasa 4 (*gst-4*) es activada por Met y Gal de forma sinérgica. Se muestran los datos de un ensayo de transcripción génica *in vivo* en *C. elegans*. Cada círculo (réplica biológica) consiste en miles de animales. Las barras de error indican el SEM. Se muestran los datos agrupados de tres ensayos independientes. Los niveles de significación estadística (y los cambios porcentuales) se indican contra el control no tratado en la parte inferior.

La significación estadística contra la “25 mM Met + 100 µM Gal” se indica mediante líneas adicionales. *** $p_{ANOVA} < 0,001$, NS no significativo.

Figura 7. Los *C. elegans* adultos tratados con una combinación de Met y Gal muestran una morfología muscular mejorada en comparación con los animales de control no tratados. (A) La relación dimensional representa la medición de la longitud y el ancho del miofilamento, mientras que (B) la suavidad representa una medida para el contorno perfecto de miofilamento. Los niveles de significación estadística (y los cambios porcentuales) se indican contra la afección de controles no tratados. * $p_{ANOVA} < 0,05$, NS no significativo.

Figura 8. Los músculos específicos de ratones tratados con *Opa1^{-/-}* en combinación con metformina y galantamina mantuvieron la masa grasa, su metabolismo se restauró y previnieron la esteatosis hepática. (A) Peso corporal, (B) masa magra y (C) masa grasa medida en ratones hembra tratados con *Opa1^{+/+/-}* (controles) y con *Opa1^{-/-}* complementada con y sin metformina más galantamina después del tratamiento con tamoxifeno. (D) Contenido de tejido adiposo blanco (WAT) de ratones macho tratados con *Opa1^{+/+/-}* y con *Opa1^{-/-}* complementada con y sin metformina más galantamina. (E) Consumo de alimentos. (F-H) Respuesta metabólica *In vivo* al tratamiento combinado. (F) Producción de dióxido de oxígeno (VO₂) (G) (VCO₂) (H) Gasto de energía (I) Niveles inflamatorios de IL6 del músculo esquelético. Los datos son la media ± SEM, Hembras: n=2-4, Machos: n=3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$.

Figura 9. La combinación de metformina y galantamina mejoró el rendimiento físico en los músculos específicos de ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. (A) Tiempo transcurrido en la cinta de correr y (B) fuerza de agarre medida en ratones hembra tratados con *Opa1^{-/-}* con y sin metformina más tratamiento con galantamina 60 y 50 días después del tratamiento con tamoxifeno, respectivamente. (C-F) Curvas de fuerza-frecuencia realizadas *in vivo* en los músculos gastrocnemios. (C-D) Fuerza absoluta y (E-F) y la fuerza específica máxima generada durante la contracción tetánica en respectivamente ratones hembra y macho tratados con *Opa1^{-/-}* con y sin metformina más tratamiento con galantamina. Los datos representan la media ± SEM, Hembras: n = 2-4, Machos: n=3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 10. Combinación de metformina y galantamina parcialmente conservada en la masa muscular en ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. (A-F) Peso muscular de los controles de hembras y ratones macho controles, tratados con (*Opa1^{+/+/-}*) y con *Opa1^{-/-}* complementada con y sin metformina más tratamiento con galantamina, respectivamente. (A, D) Tibial anterior (B, E) Gastrocnemio (C, F) Sóleo (G) Cuantificación del número de miofibra y de (H) Fibras NCAM-positivas denervadas en ratones hembra controles tratados con (*Opa1^{+/+/-}*) y con *Opa1^{-/-}* con y sin metformina más tratamiento con galantamina. Los datos son la media ± SEM, Hembras: n=2-4, Machos: n=3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención está dirigida a una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas, en particular enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético, sarcopenia y/o fragilidad.
- A la luz de la presente invención, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a una acción que da lugar a un tratamiento curativo o a una disminución o reducción de la gravedad de un síntoma o de una enfermedad o afección o a una disminución de la frecuencia de los brotes de una enfermedad o trastorno. Los términos incluyen un tratamiento remitente de un trastorno (es decir, un tratamiento que hace que el trastorno entre en remisión). El término "tratar" o "tratamiento" incluye la administración de un agente donde la enfermedad o afección se mejora o mejora al menos parcialmente, y/o hay algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico, y/o hay un retraso en la progresión de la afección o enfermedad, y/o prevención o retraso del inicio de la afección o enfermedad. Por lo tanto, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto a regímenes de tratamiento profiláctico como terapéutico. El término "tratamiento" se utiliza indistintamente en la presente memoria con el término "método terapéutico" y se refiere tanto a medidas terapéuticas como profiláticas/preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento pueden ser tanto los que ya padecen un determinado trastorno médico como los que pueden acabar padeciéndolo (es decir, los que necesitan medidas preventivas).
- Como se utiliza en la presente memoria, "prevención" o "profilaxis" se refiere a métodos en los que se reduce el riesgo de desarrollar una enfermedad o una afección o síntoma. La prevención incluye la reducción en el riesgo de desarrollar una enfermedad o afección y/o una prevención del empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad o reducción en el riesgo de empeoramiento de los síntomas o la progresión de una enfermedad o afección.
- Como se utiliza en la presente memoria, "estabilización" de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad o degenerativas se refiere a la afección en donde no hay una disminución ni un aumento en el número y/o la extensión de la gravedad de los síntomas.
- Como se utiliza en la presente memoria, "una combinación" se refiere a cualquier asociación entre dos o entre más elementos. La asociación puede ser espacial o referirse al uso de los dos o más elementos para un propósito común. Como se utiliza en la presente memoria, una "composición" se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos (por ejemplo, agentes, moduladores, reguladores, etc.). Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo o una pasta, formulaciones acuosas o no acuosas o cualquier combinación de las mismas.
- La presente invención se dirige así a una combinación farmacéutica que comprende una biguanida, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de la misma; y un inhibidor de acetilcolinesterasa, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.
- Las formas de N-óxido están destinadas a comprender compuestos en donde uno o varios átomos de nitrógeno están oxidados al denominado N-óxido.
- Para uso farmacéutico, los compuestos de la invención pueden utilizarse como un ácido o base libre, y/o en forma de una sal de adición de ácido y/o adición de base farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, obtenida con ácido o base orgánico o inorgánico no tóxico), en forma de un hidrato, solvato y/o complejo, y/o en forma o un profármaco o prefármaco, tal como un éster. Como se utiliza en la presente memoria y a menos que se indique lo contrario, el término "solvato" incluye cualquier combinación que pueda estar formada por un compuesto de esta invención con un disolvente inorgánico adecuado (p. ej., hidratos) o disolvente orgánico, tal como, pero sin limitarse a, alcoholos, cetonas, ésteres y similares. Dichas sales, hidratos, solvatos, etc. y su preparación serán claras para el experto en la materia; se hace referencia, por ejemplo, a las sales, hidratos, solvatos, etc. descritos en las patentes US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733.
- Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos según la invención, es decir, en forma de productos solubles en agua, solubles en aceite, incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de tales sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftaleno-sulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales base incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc. Además, los grupos que contienen nitrógenos básicos pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquil sulfatos como dimetilo, dietilo, dibutilo; y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo,

haluros de aralquilo como bencilo y fenetil-bromuros y otros. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales etanolato de sal de sulfato y sulfato.

- Generalmente, para uso farmacéutico, los compuestos de las invenciones pueden formularse como una preparación farmacéutica o composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o adyuvante, y opcionalmente uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.
- Por medio de ejemplos no limitantes, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica (incluyendo ocular), para administración por inhalación, por un parche de piel, por un implante, por un suppositorio, etc. Dichas formas de administración adecuadas -que pueden ser semisólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración-, así como los métodos y portadores, diluyentes y excipientes para usar en la preparación de las mismas, serán evidentes para el experto en la técnica; se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a las patentes US-A-6.372.778, US-A-6.369.086, US-A-6.369.087 y US-A-6.372.733, así como a los manuales estándar, como la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences.
- A la luz de la presente invención, una "enfermedad relacionada con la edad" se refiere a una afección anormal caracterizada por un órgano, parte, estructura o sistema desordenado que funciona incorrectamente del cuerpo que se produce con más frecuencia en las personas mayores. Además, como se utiliza en la presente memoria, una "enfermedad degenerativa" se refiere a una enfermedad que es el resultado de un proceso continuo basado en cambios degenerativos de las células, afectando a los tejidos u órganos, que se deteriorarán cada vez más a lo largo del tiempo.
- A la luz de la presente invención, las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas incluyen, pero no se limitan a enfermedades hepáticas inmunitarias, enfermedades del sistema neuromusculoesquelético que incluyen sarcopenia y fragilidad. Las enfermedades del sistema neuromusculoesquelético se seleccionan del grupo que comprende trastornos extrapiramidales y de movimiento, enfermedades de la miconuclearina y músculo, atrofias sistémicas afectan principalmente al sistema nervioso central, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y enfermedades relacionadas, enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica, movimientos involuntarios anormales, anomalías de la marcha y movilidad, ataxia, enfermedades asociadas mitocondriales y sarcopenia.
- En la presente invención, las enfermedades asociadas mitocondriales relacionadas con la edad y/o degenerativas son enfermedades asociadas con el funcionamiento deficiente o deteriorado de las mitocondrias, a disfunciones neuromusculoesqueléticas. Dichas enfermedades se seleccionan de enfermedades del núcleo central y enfermedades asociadas a la atrofia óptica 1 (OPA1). La enfermedad del núcleo central es un trastorno neuromuscular hereditario asociado a un deterioro de la función mitocondrial. La enfermedad se caracteriza por zonas con actividad oxidativa reducida que discurren a lo largo del eje longitudinal de la fibra muscular ("núcleos centrales"), y rasgos clínicos de una miopatía congénita. El OPA 1 está ubicado en la membrana mitocondrial interna y ayuda a regular la estabilidad mitocondrial y la producción de energía. Las mutaciones del gen OPA1 se han asociado con la atrofia óptica tipo 1, que es una neuropatía óptica heredada dominante que resulta en una pérdida progresiva de la agudeza visual que conduce en muchos casos a la ceguera.
- Como se utiliza en la presente memoria, "sarcopenia" significa una pérdida de masa, calidad y resistencia del músculo esquelético. La sarcopenia puede conducir a la fragilidad, por ejemplo, en las personas mayores.
- El término "fragilidad" se refiere a un estado adverso, principalmente gerontológico, de salud, que puede incluir una reserva funcional baja, una osteoporosis acelerada, un buen color, una disminución de la fuerza muscular, una alta susceptibilidad a la enfermedad y una disminución de la libido (véase p. ej. Bandeen-Roch y col., The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences 61: 262-266, 2006). La fragilidad puede caracterizarse al cumplir tres de los cinco atributos siguientes: pérdida de peso involuntaria, debilidad muscular, lentitud al caminar, agotamiento y escasa actividad física. Además, la reducción de la fragilidad o la estabilización del empeoramiento de la fragilidad se caracteriza por uno o más de los siguientes parámetros aumento de la fuerza, estabilización de la pérdida de fuerza, aumento de la masa corporal magra, estabilización de la pérdida de peso, mejora de la movilidad, estabilización de la reducción de la movilidad, aumento de la energía, estabilización de la pérdida de energía, aumento de los niveles de actividad, estabilización de la pérdida de actividad, aumento de la resistencia, estabilización de la pérdida de resistencia, mejora de la respuesta conductual a una señal sensorial, estabilización de una respuesta conductual a una señal sensorial, una disminución o estabilización de uno o más marcadores o biomarcadores inflamatorios, una mejora de la homeostasis de la glucosa y del estado metabólico o catabólico, una mejora de la neurotransmisión o de la transmisión neuromuscular, y una disminución de uno o más biomarcadores de activación de la coagulación, en donde la reducción o estabilización es relativa al estado del sujeto antes de la administración de la combinación farmacéutica o relativa a una población de control.
- La presente invención se refiere además al uso de una combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de las dolencias relacionadas con la edad y/o dolencias degenerativas. Estos se seleccionan del grupo

que comprende debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular, movilidad reducida, respuesta inmunitaria deteriorada, desequilibrio metabólico, debilidad general, fragilidad.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “debilidad muscular” se refiere a una afección en la que se reduce la resistencia de uno o más músculos. El término “fuerza muscular” se refiere a la capacidad de un músculo o un grupo de músculos para producir tensión o ejercer fuerza por medio del sistema esquelético.

10 El término “músculo esquelético” incluye tejido del músculo esquelético, así como componentes del mismo, tales como las fibras del músculo esquelético (es decir, fibras del músculo esquelético rápido o lento), las miofibrillas que comprenden las fibras del músculo esquelético, el sarcómero esquelético que comprende las miofibrillas y los diversos componentes del sarcómero esquelético descritos anteriormente.

15 El término “degeneración neuromuscular” se refiere a cualquier degeneración que afecte a cualquier parte de los nervios y/o músculos.

20 El término “movilidad reducida” se refiere a la movilidad física reducida y se refiere a cualquier limitación en el movimiento físico independiente e intencionado del cuerpo o de una o más extremidades del cuerpo.

25 A la luz de la presente invención, “respuesta inmunitaria reducida” se refiere a una reacción inmunológica reducida, ya sea celular y/o humoral, del organismo a patógenos, incluyendo bacterias y virus o cáncer.

30 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “dolencias degenerativas” se utiliza para cualquier malestar o quejas que eventualmente dará como resultado una enfermedad degenerativa.

35 Como se utiliza en la presente memoria, el término “inhibir el desarrollo” o el término “retraso en la aparición” de una señal de envejecimiento significa retrasar el inicio, ralentizar la progresión o reducir la manifestación, de un signo de envejecimiento.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término “mejorar el rendimiento” se refiere a cualquier aspecto del rendimiento, que incluye el rendimiento cognitivo o el rendimiento físico, tal como, pero sin limitarse a, la capacidad de ser autosuficiente, para cuidar (algunas, pero no necesariamente todas) necesidades personales, de ser ambulatorio o de cualquier otra manera móvil, o interacción con otros.

45 Además, la presente invención está dirigida al uso de una combinación farmacéutica según la invención para mejorar una medida de la esperanza de vida y/o la duración de la salud. El término “esperanza de vida”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la esperanza de vida máxima observada en un grupo de individuos. Alternativamente, la esperanza de vida también se refiere a la esperanza de vida promedio esperada en un grupo de individuos.

50 El término “duración de la salud” se refiere al período de tiempo durante el cual un individuo cumple una o más medidas seleccionadas de la extensión de salud. Un aumento en la “extensión de salud” se refiere a una extensión en el período de salud, según tales medidas, en comparación con el período de salud en una población de control. Puede medirse un aumento en la extensión de salud, por ejemplo, determinando el período de tiempo que un individuo continúa con la(s) medida(s) seleccionada(s) de la extensión de salud. Alternativamente, puede determinarse un período de salud de aumento midiendo un grado de mejora en una o más medidas seleccionadas de la extensión de salud que se correlaciona con un aumento en el período de tiempo que un individuo continúa cumpliendo las medidas seleccionadas de la extensión de salud. Alternativamente, el lapso de salud es el período de vida durante el cual un individuo es completamente funcional y está libre de enfermedades crónicas.

55 Como se utiliza en la presente memoria, una “población de control” se refiere a una población que no se ha tratado con la combinación según la presente invención, en donde los miembros de esa población tienen una o más características y/o afecciones de un sujeto que se trata con la combinación de la presente invención. Por lo tanto, por ejemplo, si un sujeto está siendo tratado por fragilidad, la población de control relevante tendría fragilidad; y si un sujeto está siendo tratado para cualquier enfermedad relacionada con la edad, la población de control relevante tendría la misma enfermedad relacionada con la edad.

60 El término “marcador inflamatorio” se refiere a una afección endógena, a menudo la presencia, nivel y/o forma de una molécula, que indica la presencia de inflamación. Por ejemplo, la proteína C reactiva (CRP) es un marcador inflamatorio que se ha demostrado que predice futuros episodios cardiovasculares en individuos con y sin enfermedad cardiovascular establecida. Los marcadores inflamatorios implicados en el proceso inflamatorio que conduce a la aterotrombosis incluyen, por ejemplo, la PCR, la adiponectina, la proteína quimoatrayente de monocitos 1 (MCP-1), el ligando CD40 y la fosfolipasa A(2) asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂).

65 El término “homeostasis de la glucosa” se refiere al estado de, o tendencia hacia, niveles normales (no patológicos) de glucosa, que varían apropiadamente en respuesta a diversos estímulos. Una medida ilustrativa de la homeostasis de la glucosa incluye los niveles de insulina, glucosa y péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) estimulados por las comidas.

- El término “biomarcador” de activación de la coagulación “se refiere a una afección endógena, a menudo la presencia, nivel y/o forma de una molécula, que indica la activación de la vía que conduce a la formación de un coágulo sanguíneo. Los biomarcadores ilustrativos de activación de la coagulación incluyen, por ejemplo, los fragmentos de protrombina 5 y 2, el complejo de trombina-antitrombina y los productos de degradación de la fibrina.
- El término “inmunosenescencia” se refiere al deterioro gradual del sistema inmunitario provocado por el envejecimiento natural. Implica tanto la capacidad del sujeto para responder a las infecciones como el desarrollo de la memoria inmunitaria a largo plazo, especialmente mediante la vacunación. Por ejemplo, la inmunosenescencia incluye 10 la reducción de la respuesta a la vacunación en las personas que envejecen.
- El término “sujeto”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo 15 un ser humano, que ha sido o será el objeto de tratamiento, observación o experimento. Los métodos descritos en la presente memoria pueden ser útiles tanto en terapia humana como en aplicaciones veterinarias. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, y en algunas realizaciones adicionales, el sujeto es un ser humano. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto humano. En una realización aún más preferida, el sujeto es un sujeto humano con una enfermedad relacionada con la edad, por ejemplo un sujeto humano con una enfermedad relacionada 20 con la edad por encima de 50 años. En otra realización, el sujeto es un sujeto humano con una enfermedad degenerativa. En aún otra realización, el sujeto es un sujeto humano con una enfermedad relacionada con la edad y una enfermedad degenerativa.
- En todas las diferentes realizaciones de la presente invención, la combinación farmacéutica según la invención puede administrarse en una dosis diaria terapéutica o subterapéutica a un sujeto, en particular a un sujeto humano.
- 25 El término “dosis subterapéutica” cuando se utiliza para describir la cantidad del inhibidor de biguanida y/o acetilcolinesterasa se refiere a una dosis de dichos compuestos que no proporciona el efecto terapéutico deseado para la enfermedad que se está tratando cuando se administra solo a un paciente. Esto también puede denominarse “cantidad sinéricamente eficaz”, con referencia a la sinergia observada cuando se administran los compuestos juntos.
- 30 En una realización, la cantidad de biguanida o el inhibidor de la acetilcolinesterasa administrado es aproximadamente el 20 % menos que la cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización, la cantidad de inhibidor de biguanida o acetilcolinesterasa administrado es aproximadamente 50 % menos que la cantidad terapéuticamente efectiva. Alternativamente, la cantidad de inhibidor de biguanida o acetilcolinesterasa administrado es aproximadamente 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % o 90 % menos que la cantidad terapéuticamente 35 efectiva.
- Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de metformina, dependiendo del paciente y/o afección, tal como el peso corporal, puede ser de aproximadamente 2000 mg/día o de aproximadamente 2500 mg/día. En consecuencia, 40 la dosis diaria subterapéutica agregada de metformina para un paciente humano es de aproximadamente 400 mg/día o aproximadamente 500 mg/día. En otra realización, la dosis diaria subterapéutica agregada para un paciente humano es de aproximadamente 1000 mg/día o aproximadamente 1250 mg/día.
- También, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de galantamina, dependiendo del paciente y/o afección, 45 tal como el peso corporal, puede ser de aproximadamente 16 mg/día o aproximadamente 24 mg/día. En consecuencia, la dosis diaria subterapéutica agregada de galantamina para un paciente humano es de aproximadamente 3,20 mg/día o aproximadamente 4,80 mg/día. En otra realización, la dosis diaria subterapéutica agregada para un paciente humano es de aproximadamente 8 mg/día o aproximadamente 12 mg/día.
- 50 La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende dos compuestos diferentes. En este contexto, diferentes formas de análisis de los efectos farmacológicos de dos (o más) compuestos están disponibles y son ampliamente aceptadas en este campo. Por ejemplo, el término “efectos sinérgicos” se refiere al fenómeno donde el tamaño del efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos individuales. Como esta definición es muy estricta, particularmente dada la variabilidad biológica, se aplicará el modelo de agente único superior (HSA) (Boris, PNAS, 2013). Según este modelo, las combinaciones de fármacos se consideran sinérgicas si el efecto 55 combinatorio es significativamente mayor que el efecto más grande de cualquiera de los fármacos individuales a la misma concentración que en la mezcla. En el contexto de la presente invención, se considera que los efectos sinérgicos de la combinación farmacéutica de la presente invención son relevantes y dan como resultado efectos fisiológicos.
- 60 En la parte experimental de esta invención, los inventores utilizaron el *C. elegans*, un organismo modelo para estudiar el envejecimiento (Carretero y col., Curr Top Med Chem 2017; Kenyon, Nature 2010). *Caenorhabditis elegans* es un nematodo pequeño que se ha convertido en uno de los modelos más intensamente estudiados en la investigación biológica. Desde la segunda mitad del siglo XX, se han realizado en este nematodo muchos descubrimientos fundamentales en las ciencias de la vida, incluido el descubrimiento de vías genéticas que promueven la longevidad. 65 Estas vías han permanecido relativamente sin cambios durante la evolución, lo que permite su disección en un invertebrado simple, tal como *C. elegans*. Varios cambios que tienen lugar durante el envejecimiento en *C. elegans* se

comparten con el envejecimiento en seres humanos, incluyendo una mayor elasticidad de la piel, una reducción en la masa muscular, pérdida de integridad muscular, pérdida de motilidad y aumento de la susceptibilidad a las infecciones. Además, múltiples formas de aprendizaje y memoria disminuyen con la edad, tanto en *C. elegans* como en mamíferos. Además, las principales redes genéticas y bioquímicas que subyacen al envejecimiento y la enfermedad relacionada con la edad parecen evolutivamente bien conservadas. Por lo tanto, organismos modelo susceptibles tales como *C. elegans* permiten un enfoque relativamente ágil y de alto rendimiento para estudiar y comprender estos fenómenos. En la actualidad, investigadores de todo el mundo utilizan *C. elegans* para descifrar vías de señalización evolutivamente conservadas que intervienen en la longevidad y para evaluar el potencial terapéutico de intervenciones destinadas a paliar el envejecimiento humano. En esencia, *C. elegans* combina las ventajas experimentales de los microorganismos (es decir, facilidad de manipulación y manipulación experimental) con los beneficios de un contexto multicelular (es decir, modelado de procesos complejos tales como envejecimiento orgánico, patogénesis y comportamiento).

El método más común para medir el envejecimiento de *C. elegans* se basa en la inspección manual de la supervivencia de los gusanos en placas de agar recubiertas de bacterias.

Además, en los ejemplos se utilizó un modelo de ratón con atrofia óptica 1 (OPA1) en músculos específicos, como se muestra a continuación. Este modelo de ratón transgénico recapitula eficazmente aspectos fisiopatológicos clave de la pérdida y resistencia muscular relacionada con la sarcopenia, y muestra un envejecimiento precomucoso (p. ej., cabello blanco, cifosis). La delección de OPA1 específicamente en los músculos esqueléticos da como resultado la disfunción mitocondrial, el aumento del estrés oxidativo y la inflamación. Además, el modelo de ratón OPA1 es un modelo para ratones reconocido para enfermedades asociadas mitocondriales relacionadas con OPA1, tal como atrofia óptica y como causa de la hipertensión por atrofia óptica (Archer, 2013, New Engl J Med 369: 23).

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Modelo de *Caenorhabditis elegans*

Materiales y métodos

Sustancias químicas de interés

Hidrobromuro de galantamina (Gal; CAS 1953-04-4, referencia PHR1623), clorhidrato de donepezilo (Don; CAS 120011-70-3, referencia PHR1584), clorhidrato de memantina (Mem; CAS 41100-52-1, referencia PHR1886) y clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida (Met; CAS 1115-70-4, referencia D150959) se compraron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.). Tartrato de rivastigmina (Riv; CAS 129101-54-8, referencia A18484M) fue suministrado por Interquim S. A. (Barcelona, España). Se prepararon soluciones madre en agua Milli-Q ultrapura a 3,8 mg/ml (Gal), 416 mg/ml (Don), 216 mg/ml (Mem) y 100 mg/ml (Riv).

40 Ensayos de esperanza de vida mediante el uso de *caenorhabditis elegans*

La cepa N2 de *C. elegans* de tipo salvaje se obtuvo del *Caenorhabditis* Genetic Center (Universidad de Minnesota, EE. UU.) y se cultivó a 20 °C en medio de crecimiento de nemátodos estándar (NGM) sembrado con una fina capa de *Escherichia coli* OP50, a menos que se indique lo contrario. La esperanza de vida de *C. elegans* se midió de forma análoga a los métodos descritos anteriormente^{1,2}. El primer día de la edad adulta siempre se registró como día 0. Se utilizó FUDR (5-fluoro-2'-desoxiuridina, Sigma-Aldrich) en todos los ensayos de esperanza de vida para evitar la producción de progenie. Se realizaron múltiples ensayos independientes. Se utilizó un mínimo de 100 animales por afección por ensayo, para asegurar una potencia estadística suficiente.

50 Durante el “ensayo de dosificación individual”, utilizamos la plataforma WorMotel para imágenes recurrentes a largo plazo de *C. elegans*³. Esta plataforma semiautomatizada permite una monitorización longitudinal no sesgada de los fenotipos de envejecimiento de *C. elegans*, incluyendo mediciones diarias de la supervivencia, así como la cuantificación de la locomoción. Desde el inicio de la edad adulta, los animales se confinaron en pocillos individuales de placas de microtitulación (es decir, chips WorMotel microfabricados preparados como se describe en³) que se sembraron con *E. coli* HT115(DE3) como fuente de alimento y se supplementaron con los compuestos correspondientes a diferentes dosis (Tabla 1). Se analizaron cuatro placas de microtitulación replicadas, con las cuatro afecciones probadas presentes en cada placa de microtitulación (en ubicaciones aleatorias). Los animales se mantuvieron en las mismas placas de microtitulación durante la duración del experimento (es decir, 30 días). El tiempo de la muerte se determina como el tiempo final de movimiento distinto de cero. Nótese que esta plataforma de formación de imágenes es incompatible con la dosificación repetida. Se utilizó el software estadístico R para construir curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, calcular la media y la mediana de la esperanza de vida y llevar a cabo todos los análisis estadísticos relacionados. Para comparar la supervivencia entre dos afecciones, se utilizaron pruebas de orden logarítmico (es decir, la función *survdiff* del paquete *survival*, ajustada para comparaciones múltiples mediante el método Benjamini-Hochberg). Los valores de p correspondientes se denominan *porden logarítmico*.

Durante el “ensayo de dosificación repetida”, seguimos el método estándar en el campo (es decir, la inspección manual de la supervivencia de las poblaciones sincronizadas por edad en placas de agar recubiertas de bacterias²), que es robusto y técnicamente relativamente sencillo. En resumen, al inicio de la edad adulta, los animales se transfirieron a placas de ensayo NGM estándar (controles no tratados) o placas de ensayo NGM complementadas con los compuestos correspondientes a diferentes dosis (Tabla 1). Los animales se transfirieron a placas de ensayo NGM estándar recientes o placas de ensayo NGM recientes complementadas con los compuestos correspondientes a diferentes dosis tres veces en la primera semana y semanalmente después (durante una duración total de 33 días). Este programa de dosificación se realiza en conformidad con los protocolos estandarizados del *Caenorhabditis* Intervention Testing Program (CITP)⁴. La Met se añadió al NGM antes del autoclave, mientras que la Gal se pipeteó en las placas de ensayo sembradas (al menos dos horas antes de transferir los animales a las placas de ensayo). Se añadió un mismo volumen de líquido a todas las placas, también a las placas de la afección de controles y Met no tratados (es decir, tratamiento simulado). Se censuraron los animales que se arrastraron fuera de las placas de ensayo o murieron por eclosión interna. El número de gusanos vivos y muertos se calificó cada uno a dos días.

15 Ensayo de locomoción

La locomoción de *C. elegans* se caracteriza por movimientos sinusoidales (es decir, flexiones del cuerpo), y disminuye progresivamente durante la vida adulta. Como en otros animales, el mantenimiento del movimiento coordinado se considera un parámetro primordial de la duración de la salud⁵. Más específicamente, la actividad locomotora máxima es un buen indicador de la forma física y la salud general de *C. elegans*⁶, mientras que se ha demostrado que la tasa de disminución de la actividad locomotora en la mediana edad predice la esperanza de vida⁷.

A. Seguimiento de locomoción basado en WorMotel (dosificación única)

25 Cada período de formación de imágenes, la actividad de locomoción media y máxima antes y después de un estímulo de luz azul se cuantifican (como se describe en³). Los valores de actividad resultantes se denominan “locomoción de línea base” y “locomoción estimulada”, respectivamente. Los animales que se mueven mucho presentan valores de actividad elevados, mientras que los que se mueven lentamente o los más viejos presentan valores de actividad bajos. La “actividad media” de un animal representa el promedio de los valores de actividad locomotora que se detectaron para ese animal durante toda la duración del experimento. La “actividad máxima” representa el valor máximo de actividad locomotora detectado para un animal, independientemente del día de detección. Los “días sanos” se definen como el número total de días en los que se observó que la actividad de un animal vivo era superior al 15 % de la actividad máxima media de la afección de controles no tratados presente en la misma réplica de la técnica (es decir, chip). Un aumento de los “días sanos” indica un aumento de la esperanza de vida basada en la locomoción. Los resultados se analizaron mediante ANOVA unidireccionales y bidireccionales, con la corrección Holm-Sidak para comparaciones múltiples en el software GraphPad Prism. Todos los valores de p correspondientes se denominan como *p*ANOVA.

B. Seguimiento de locomoción basado en cámara (dosificación repetida)

40 Para cuantificar los efectos de la locomoción con más detalle, utilizamos un sistema de seguimiento automatizado para *C. elegans* que es compatible con placas de petri estándar. El sistema de rastreo de múltiples cámaras permite la cuantificación objetiva de la velocidad media de locomoción, la velocidad máxima de locomoción y los múltiples parámetros de comportamiento mediante análisis de imágenes basados en las rutas. Se utilizó un sistema similar al de Peymen y col.⁸. Se realizaron dos ensayos distintos. En un primer ensayo (Tabla 2), se analizaron los efectos de locomoción de Gal, Met y una combinación de ambos compuestos. Esto permitió probar los efectos sinérgicos entre Gal y Met en múltiples parámetros de locomoción. En un segundo ensayo (Tabla 3), se caracterizaron los efectos de locomoción de la combinación de Met con diferentes inhibidores de acetilcolinesterasa (es decir, Gal, Don y Riv), así como la combinación de Met con el compuesto similar al inhibidor de la acetilcolinesterasa Mem. De este modo, pudimos comprobar si existe un efecto de clase de los inhibidores de la acetilcolinesterasa en su conjunto (en combinación con Met). Los animales de tipo salvaje sincronizados se cultivaron en presencia de los compuestos correspondientes a diferentes dosis del paso L4 (es decir, el día 0) y el FUdR, hasta el inicio de la medición. Se volvió a dosificar a los animales tres veces (en los días 2, 4 y 7) mediante la transferencia a placas de NGM tratadas con compuesto nuevo. Antes de la obtención de imágenes, para cada réplica se transfirieron manualmente 20 animales vivos bien alimentados de su placa de cultivo a una placa NGM sin sembrar y, tras 5 minutos, se transfirieron a otra placa NGM sin sembrar utilizada para la obtención de imágenes. La adquisición de imágenes se realizó con el software multicámara StreamPix 6 (cámara GigE PRO GP11004M con objetivo KOWA LM16JC10M) durante 11 min a 2 fps y una exposición constante, tras lo cual se realizó el seguimiento de los gusanos mediante un código MATLAB personalizado de seguimiento de partículas. Para cada animal móvil (es decir, un animal que se movió durante al menos 2 minutos durante el período de obtención de imágenes), se extrajeron las velocidades de locomoción media y máxima, así como las métricas de comportamiento “ocupación de celdas” y “fracción corriendo”. Este último representa la fracción de tiempo en que se detectó un animal que estaba corriendo (en lugar de parar o dar la vuelta). La ocupación de celda es una métrica que cuantifica la eficiencia de búsqueda espacial de un gusano. Los valores de ocupación de celdas representan el número de celdas únicas (cuadrados de 1 mm²) que el gusano visitó durante el período de obtención de imágenes. Ambos parámetros conductuales disminuyen durante el envejecimiento. Los experimentos se realizaron por triplicado (o cuadruplicado), con 20 gusanos por afección por réplica. Los resultados

se analizaron mediante múltiples pruebas t, con la corrección Holm-Sidak para comparaciones múltiples en el software GraphPad Prism. Los valores de p correspondientes se denominan p.

Ensayos de actividad génica *in vivo*

El cuerpo transparente de *C. elegans* permite realizar mediciones directas y no invasivas de la transcripción génica *in vivo* mediante reporteros fluorescentes transgénicos⁹. Medimos la transcripción del reportero GFP *gst-4p::GFP* *C. elegans* para comprender mejor las redes de señalización intracelular que se ven afectadas por Met y/o Gal. Además, hemos comprobado si Met y Gal tienen un efecto sinérgico o potenciador en la activación de la transcripción del gen *gst-4*.

El gen *GST-4* codifica la enzima citoprotectora y metabolizante de fármacos glutatión S-transferasa 4 (GST-4). *Gst-4* es una diana directa de SKN-1, un ortólogo de la familia de proteínas relacionadas con el factor nuclear E2 (Nrf2) de los mamíferos que es un factor de transcripción clave implicado en la protección contra el estrés oxidativo y xenobiótico. En respuesta a las agresiones oxidativas, SKN-1/Nrf2 es fosforilada por PMK-1/p38 MAPK (entre otras) en el citoplasma, tras lo cual migra al núcleo para inducir la expresión de una amplia gama de enzimas antioxidantes y desintoxicantes como *gst-4*. En la investigación sobre el envejecimiento en *C. elegans*, la activación transcripcional de *gst-4* se utiliza a menudo como indicador de la actividad de SKN-1. No obstante, se ha demostrado que *gst-4* también puede activarse transcripcionalmente por la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a través de EOR-1, un factor de transcripción BTB/dedo de zinc similar a la proteína dedo de zinc de la leucemia promielocítica de mamíferos (PLZF). La regulación positiva de las enzimas GST desintoxicantes es una característica común de *C. elegans* longevos y está conectado a la longevidad no solo en gusanos, sino en todas las especies, incluidos los seres humanos¹⁰. La fluorescencia de la GFP se cuantificó mediante un método automatizado, como se ha descrito anteriormente¹¹. En resumen: Animales JMET69 con genotipo *ls[gst-4(1491 bp)::gfp;unc-119(+)];ls[unc-54p::mCherry;unc-119(+)]* se cultivaron en presencia y ausencia de fármacos (es decir, Met y/o Gal) en placas de NGM sembradas con *E. coli* OP50, desde L1 hasta el paso tardío L4, antes de transferir a una placa de 96 pocillos para la cuantificación de fluorescencia. Se muestran los valores con corrección de fondo. No se utilizó la normalización de BCA. Las medias se compararon estadísticamente mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak en el programa GraphPad Prism. Los valores de p correspondientes se denominan PANova.

Cuantificación de la morfología muscular y el deterioro en *C. elegans*

La pérdida progresiva de masa muscular y función con envejecimiento en *C. elegans* muestra una progresión muy similar a la sarcopenia en seres humanos¹². Los sarcómeros son unidades musculares fundamentales, responsables de la contracción muscular. Los sarcómeros de *C. elegans* consisten en filamentos alternados que contienen miosina y actina, similares a los sarcómeros de los vertebrados. Si bien los miofilamentos sarcóticos en la pared corporal de los animales jóvenes están organizados en filas simétricas paralelas, los miofilamentos sarcómero en animales mayores se desorganizan progresivamente con una forma y orientación más irregulares.

Mediante el uso de una cepa indicadora transgénica que tiene una fusión de la cadena pesada de miosina con GFP fluorescente (cepa RW1596; *myo-3p::MYO-3::GFP*), la estructura muscular de *C. elegans* se puede visualizar *in vivo*. Combinado con microscopía confocal y análisis bioinformático, esto ofrece no solo lecturas cualitativas, sino también cuantitativas para la evaluación del nivel organizativo de las fibras musculares. Se ha optimizado un método analítico para cuantificar el deterioro muscular en el laboratorio del profesor Bart Bareckman (UGent; unpublished data). Se utilizó esta técnica para verificar si los animales tratados con Gal y/o Met, muestran un fenotipo muscular que se asemeja al de los individuos más jóvenes no tratados.

Los animales RW1596 sincrónicos se cultivaron en presencia de los compuestos correspondientes a diferentes dosis (véase la Figura 7) y FUdR, del paso L4 (es decir, día 0) en adelante. Se volvió a dosificar a los animales una vez, en el día 7, mediante transferencia a placas NGM recién tratadas. Las mediciones se realizaron a finales de la edad adulta (es decir, el día 14), utilizando al menos 30 animales por afección.

Para cada animal, se extrajeron las dos métricas morfológicas “relación de aspecto” y “suavizado”. La relación de aspecto es una medida de la dimensión general (es decir, la forma alargada) de un sarcómero. Cuanto mayor es este valor, más alargado es el sarcómero. La relación de aspecto se calcula como la relación de la longitud del eje mayor (= longitud) y la longitud del eje menor (= ancho) para los miofilamentos individuales dentro de un sarcómero. A medida que los animales envejecen, la relación de aspecto disminuye. La suavidad es una medida de la suavidad de los contornos de los miofilamentos. Cuanto más bajo sea este valor, más “dentado” y “deformado” estará el borde de un miofilamento. La suavidad se indica en unidades arbitrarias. Un valor de 1 corresponde a la suavidad máxima observada en los filamentos musculares (es decir, al principio de la edad adulta), mientras que un valor de 0 corresponde a la suavidad observada en gusanos de control muy viejos (día 18). Se compararon estadísticamente dos afecciones mediante un ensayo t de Student de dos colas mediante el software GraphPad Prism.

Resultados

Efecto sinérgico de la combinación de metformina y galantamina en la extensión de la vida útil La dosis única de los compuestos individuales aumentó significativamente la supervivencia de *C. elegans* en comparación con los controles no tratados (Met: $p_{orden \ log.} = 0,00215$; Gal: $p_{orden \ log.} = 0,000176$) (Figura 1, Tabla 1). Para probar la sinergia del fármaco, utilizamos el modelo más alto de actividad única (HSA)¹³. Según este modelo, las combinaciones de fármacos se consideran sinérgicas si el efecto combinatorio es significativamente mayor que el efecto más grande de cualquiera de los fármacos individuales. Mediante este modelo, se descubrió la sinergia del fármaco ya que el tratamiento con Met 25 mM y Gal 100 μ M dio como resultado un aumento adicional en la supervivencia en comparación con los compuestos individuales (Met: $p_{orden \ log.} = 0,049$; Gal: $p_{orden \ log.} = 0,0244$) (Figura 1). Se observó un efecto potenciador más fuerte de la combinación Met y Gal para animales que recibieron dosis repetidas de Met y Gal (Figura 2, Tabla 1). De nuevo, la combinación de ambos fármacos (Met y Gal) indujo la extensión de la esperanza de vida más fuerte: la media de la esperanza de vida aumentó con el 22,1 % en comparación con el control no tratado ($p_{orden \ log.} < 1E-6$), con el 12,5 % en comparación con el grupo tratado con Gal ($p_{orden \ log.} = 0,000006$) y con el 8,3 % en comparación con el grupo tratado con Met 25 mM ($p_{orden \ log.} = 0,037$). La esperanza de vida máxima de los animales tratados con la combinación Gal y Met aumentó con el 29 % en comparación con el control no tratado, con un 23 % en comparación con el grupo tratado con Gal y con un 17 % en comparación con el grupo tratado con Met. En general, la combinación de fármacos Met y Gal indujo efectos significativamente mayores sobre la supervivencia que el efecto más grande producido por cualquiera de sus componentes individuales (Tabla 1), indicativo de un efecto sinérgico entre Met y Gal.

Tabla 1. Datos de supervivencia detallados obtenidos a partir de los ensayos de esperanza de vida mediante el uso de *C. elegans*. El tratamiento con Met, Gal, así como con una combinación de Met y Gal, mejora significativamente la supervivencia de los adultos de *C. elegans*. Se muestran los datos agrupados de múltiples ensayos. N el número total de muertes observadas para cada afección, SEM el error estándar de la media, LS la esperanza de vida, MLS la media de la esperanza de vida, * $p_{orden \ log.} < 0,05$ ** $p_{orden \ log.} < 0,01$, *** $p_{orden \ log.} < 0,001$, **** $p_{orden \ log.} < 0,0001$. La mediana de la mediana de la esperanza de vida útil (Mediana de LS) se define como el día en el que el 50 % de los animales todavía están vivos (es decir, el cuantil 50º de la curva de supervivencia). La esperanza de vida máxima (LS máxima) se define como el día en el que el 10 % de los animales todavía están vivos (es decir, el cuantil 90º de la curva de supervivencia).

Afección	[Gal] (μ M)	[Met] (mM)	MLS ± SEM (días)	Median a de LS (días)	LS máxima (días)	Aumentar MLS contra control no tratado	Disminución MLS contra combinación Met25 + Gal100	N
Dosificación única								
No tratados	0	0	17,41 ± 0,44	18	25		-14,8 % ****	170
Gal 100	100	0	19,63 ± 0,44	20	27	+12,8 % ***	-3,9 % *	183
Met 25	0	25	19,08 ± 0,58	20	28	+9,6 % **	-6,7 % *	127
Met 25 + Gal 100	100	25	20,44 ± 0,52	21	29	+17,5 % ****		153
Dosificación repetida								
No tratados	0	0	15,80 ± 0,31	16	21		-18,1 % ****	148
Gal 100	100	0	16,87 ± 0,32	17	22	+6,8 % *	-12,5 % ****	149
Met 25	0	25	17,68 ± 0,50	18	23	+11,9 % ****	-8,3 %	116
Met 25 + Gal 100	100	25	19,29 ± 0,57	20	27	+22,1 % ***		87

Una dosificación única de *C. elegans* con la combinación de galantamina y metformina afecta positivamente la locomoción y la duración de la salud basada en la locomoción

Un solo tratamiento de *C. elegans* con los compuestos individuales (Gal y Met) aumentó significativamente múltiples parámetros de actividad de locomoción durante la edad adulta (Figura 3). Por ejemplo, Gal aumentó significativamente la actividad inicial máxima en un 15 % ($p_{ANOVA} = 0,0054$) mientras que Met aumentó la actividad inicial máxima en un 35 % ($p_{ANOVA} < 0,0001$) en comparación con los grupos de control no tratados. La combinación de Gal y Met indujo el mayor aumento porcentual en el porcentaje de actividad inicial máxima: 41 % en comparación con los controles no tratados ($p_{Anova} < 0,0001$). Además, para la mayoría de los parámetros de locomoción, se observó un efecto mejorado significativo para los animales tratados con la combinación de Met y Gal, en comparación con al menos uno de los tratamientos de un solo compuesto (Figura 3). Ninguno de los compuestos individuales indujo un efecto mejor

significativo que la combinación de Gal y Met, sugiriendo una eficacia mejorada cuando se combinan tanto Gal como Met.

En comparación con los controles no tratados, la combinación de Gal y Met aumentó el número total de días sanos (es decir, extensión de salud basada en la locomoción) en un 30 %, que fue significativamente mejor que el efecto observado para Met (+14 %, $p_{ANOVA} = 0,037$) pero no significativamente diferente del efecto observado para Gal (+ 20 %, $p_{ANOVA} = 0,095$) (Figura 3C). En resumen, la actividad de locomoción durante el envejecimiento así como la extensión de salud basada en la locomoción (es decir, el período de vida que un animal que muestra niveles sanos de función muscular) se mejora significativamente en animales tratados con la combinación de Met y Gal.

La dosificación repetida de *C. elegans* con la combinación de galantamina y metformina afecta positivamente los parámetros de locomoción y conductual de manera sinérgica

Para obtener más información sobre los efectos sobre la extensión de la salud basada en la locomoción, se cuantificaron cuatro parámetros de locomoción y conductual en adultos de *C. elegans* después de la dosificación repetida con Gal, Met y la combinación. Los niveles más altos para los cuatro parámetros (es decir, parecidos a los fenotipos de locomoción de los individuos más jóvenes) se observaron en los animales tratados con la combinación de 25 mM Met y 100 μ M Gal (Tabla 2, Figura 4). En los animales tratados con esta combinación de Met y Gal, la velocidad media de locomoción aumentó en un 141 % ($p < 0,000001$), la velocidad máxima en un 24 % ($p < 0,001$), la fracción de tiempo dedicada a correr en un 46 % ($p < 0,000001$) y la ocupación de celdas en un 239 % ($p < 0,000001$) en comparación con los controles no tratados. En esencia, la disminución relacionada con la edad de estos cuatro parámetros basados en locomoción se mitiga significativamente por la combinación de Met y Gal. Además, se observó un efecto sinérgico significativo entre Met y Gal para los parámetros “velocidad de locomoción media” y “ocupación de celdas” en comparación con los tratamientos de un solo compuesto (Tabla 2, Figura 4). Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que la combinación de Met y Gal es capaz de mejorar la extensión de la salud basada en la locomoción más que Met o Gal solos.

A continuación, para evaluar la amplitud de nuestra estrategia de mezcla de compuestos, ensayamos la locomoción de animales de *C. elegans* tratados con otros miembros del grupo de inhibidores de la acetilcolinesterasa (siempre en combinación con Met). La combinación de 25 mM de Met con otros inhibidores de acetilcolinesterasa (es decir, Don y Riv) o compuestos similares a inhibidores de acetilcolinesterasa (es decir Mem) indujo un fenotipo de locomoción similar a la combinación de Met 25 mM con el inhibidor Gal de acetilcolinesterasa (Figura 5, Tabla 3). Cuando se consideran las cuatro afecciones probadas (Tabla 3), esencialmente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos del compuesto ($p_{ANOVA} = 0,25$). De las 16 comparaciones estadísticas realizadas (es decir, pruebas t múltiples), solo una fue significativa: cuando se combinó Mem con Met, la velocidad máxima de locomoción disminuyó (-14,5 %; $p = 0,0036$), en comparación con la afección en donde Met se combinó con Gal (Tabla 3). No obstante, se encontró que las 15 otras comparaciones estadísticas de locomoción y parámetros conductuales no eran significativamente diferentes (Figura 5). Por lo tanto, cuando se combinan con Met, todos los inhibidores de acetilcolinesterasa probados parecen actuar de manera similar.

Tabla 2. La locomoción los *C. elegans* adultos de edad mediana (es decir, los adultos posrreproductivos del día 7) aumenta significativamente después de la dosificación repetida con Gal y Met, así como con una combinación de ambos. Se muestran los datos agrupados de múltiples réplicas. Los efectos sinérgicos significativos entre Gal y Met (según la definición del modelo de HSA) se indican en negrita. La significación (contra la afección de control no tratada) se indica mediante: NS no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N la cantidad total de animales probados, SEM el error estándar de la media, # el número de ensayos repetidos realizados. La fracción corriendo representa la fracción de tiempo que un animal dedicó a correr (en lugar de parar o dar la vuelta). La ocupación de celdas indica el número de celdas únicas (cuadrados de 1 mm²) que un gusano visitó durante el período de obtención de imágenes. Los datos corresponden a la Figura 4.

Ensayos	Afección	[Gal] (μ M)	[Met] (mM)	Velocidad media (μ m/s) \pm SEM	Velocidad máxima (μ m/s) \pm SEM	Fracción corriendo (%) \pm SEM	Ocupación celular (únicas áreas visitadas) \pm SEM	N	N. ^o
Met + Gal	No tratados	0	0	50 \pm 3	242 \pm 13	48 \pm 2	11 \pm 1	60	3
	Gal 100	100	0	48 \pm 4 NS	270 \pm 17 NS	48 \pm 2 NS	11 \pm 1 NS	80	4
	Met 25	0	25	102 \pm 5 ***	262 \pm 8 NS	67 \pm 2 ***	28 \pm 3 ***	60	3
	Met 25 + Gal 100	100	25	120 \pm 6 ***	299 \pm 8 ***	70 \pm 2 ***	37 \pm 3 ***	60	3
¿Sinergia significativa entre Gal y Met?				Sí	No	No	Sí		

<i>p</i> Met 25 + Gal 100 contra Gal 100	<i>p</i> < 1 E-6	<i>p</i> = 0,14	<i>p</i> < 1E-6	<i>p</i> < 1E-6
<i>p</i> Met 25 + Gal 100 contra Met 25	<i>p</i> = 0,046	<i>p</i> = 0,0092	<i>p</i> = 0,17	<i>p</i> = 0,037

Tabla 3. La combinación de Met con diferentes inhibidores de acetilcolinesterasa (es decir, Don, Riv y Gal) o compuestos similares a inhibidores de acetilcolinesterasa (es decir Mem), da como resultado fenotipos de locomoción similares. Significación (contra Met 25 + afección Gal 100) se indica mediante: ^{NS} no significativo, * *p* < 0,05. El movimiento de locomoción se cuantificó el día 7 de la edad adulta, similar a los datos presentados en la Tabla 2. Se muestran los datos agrupados de múltiples réplicas. N la cantidad total de animales probados, SEM el error estándar de la media, # el número de ensayos repetidos realizados. Las concentraciones finales de Gal (100 µM), Don (80,92 µM), Riv (57,12 µM) y Mem (132,2 µM) se basan en sus dosis clínicas diarias máximas. Los datos corresponden a la Figura 5.

10

Ensayos	Afección	Velocidad media (µm/s) ± SEM	Velocidad máxima (µm/s) ± SEM	Fracción corriendo (%) ± SEM	Ocupación celular (únicas áreas visitadas) ± SEM	N	N.º
<i>Met (mM) + otro AChEI (µM)</i>							
	Met 25 + Gal 100	126 ± 5	375 ± 10	69 ± 1	29 ± 2	80	4
	Met 25 + Don 80,9	127 ± 6 ^{NS}	374 ± 11 ^{NS}	65 ± 1 ^{NS}	31 ± 3 ^{NS}	60	3
	Met 25 + Riv 57,1	126 ± 2 ^{NS}	342 ± 9 ^{NS}	69 ± 2 ^{NS}	25 ± 2 ^{NS}	60	3
	Met 25 + Mem 132,2	116 ± 9 ^{NS}	321 ± 13*	64 ± 2 ^{NS}	30 ± 3 ^{NS}	60	3

La transcripción de la glutatión S-transferasa 4 aumenta por Gal y Met de forma sinérgica

15 Se ensayaron los niveles de transcripción de *la glutatión S-transferasa 4 (gst-4)* en poblaciones de *C. elegans* sincronizadas por edad, tras el tratamiento farmacológico. Como se esperaba de la bibliografía¹⁴, los animales tratados con Met mostraron una mayor cantidad significativa de los niveles de transcripción de *gst-4* (+26 %, *p*_{ANOVA} < 0,0001, Figura 6) en comparación con los controles no tratados. El tratamiento con únicamente 100 µM de Gal no indujo un aumento significativo en la transcripción de *gst-4* (+9 %, *p*_{ANOVA} = 0,37). Sin embargo, la combinación de Met 25 mM y Gal 100 µM indujo la activación más fuerte de la transcripción de *gst-4*. La señal fluorescente aumentó un 62 % en comparación con 100 µM de Gal (*p*_{ANOVA} < 0,0001) y un 28 % en comparación con el tratamiento con solo 25 mM de Met (*p*_{ANOVA} < 0,0001). Por lo tanto, encontramos que Gal y Met actúan de forma sinérgica para activar la transcripción de *gst-4*. Este efecto fue altamente consistente y se observó de manera robusta en ensayos independientes adicionales, tanto en presencia como en ausencia de estrés oxidativo (datos no mostrados). La activación de *gst-4* es indicativa de una protección mejorada contra el estrés oxidativo y xenobióticos (desintoxicación), así como la activación de los factores de transcripción de la longevidad Nrf2/SKN-1 y/o PLZF/EOR-1. Como se ha indicado anteriormente, la regulación positiva de enzimas GST está vinculada a la longevidad en múltiples especies (incluyendo seres humanos) y es una característica común de los *C. elegans* longevos. Por lo tanto, la activación sinérgica de *gst-4* está en línea con nuestras observaciones anteriores de un efecto sinérgico entre Gal y Met sobre la longevidad. Por lo tanto, como la activación *gst-4* protege contra el estrés oxidativo, investigando el efecto de la combinación de Gal y Met sobre la resistencia al calor y el estrés oxidativo utilizando el método de puntuación automatizada de supervivencia libre de etiquetas (FLASS), un método para automatizar los ensayos de supervivencia que utilizan la fluorescencia asociada a la muerte para determinar la mediana del tiempo de muerte, como se ha descrito anteriormente¹⁵.

20 30 35 La morfología muscular de *C. elegans* se mejora mediante una combinación de Gal y Met

Los *C. elegans* tratados con una combinación de Gal y Met muestran mejoras cuantitativas y cualitativas en la morfología muscular en la edad adulta tardía, en comparación con los animales de la afección de controles no tratados (Figura 7A-B). En comparación con el control no tratado, *C. elegans* tratado con la combinación de Met 25 mM y Gal 100 µM tienen una relación de aspecto sarcómero significativamente mayor (+7,7 %, *p* = 0,045, Figura 7A). Esencialmente, la dimensión general de su sarcómero (es decir, la relación de aspecto) se asemeja a la de personas más jóvenes. El tratamiento con únicamente 25 mM de Met o con únicamente 100 µM de Gal no indujo aumentos significativos en la relación de aspecto (Figura 7A).

40 45 La otra métrica muscular morfológica que se cuantificó fue la suavidad del contorno de los miofilamentos. En comparación con la afección de controles no tratados, observamos un aumento del 55 % en la suavidad del contorno

de miofilamentos para animales tratados con una combinación de Met 25 mM y Gal 100 μ M (Figura 7B). Sin embargo, solo se observó una tendencia ($p = 0,076$), probablemente debido a una mayor variación biológica de este parámetro. No obstante, en imágenes microscópicas representativas, se observó que los miofilamentos dentro de los sarcómeros de animales tratados con la combinación de Gal y Met tienen una forma y orientación más regulares que las de los animales no tratados. Más específicamente, los miofilamentos de animales tratados con la combinación de Gal y Met tienden a organizarse en paralelo simétrico, en contraste con los animales no tratados cuyos miofilamentos tienden a tener una forma y orientación algo más irregulares. Esto sugiere una función muscular mejorada en animales tratados con una combinación de Gal y Met, que concuerda con nuestra observación previa de la tasa de locomoción mejorada en estos animales (véase más arriba).

10 Ejemplo 2: Modelo de ratón

Introducción

15 Basándonos en la evidencia de que los componentes metformina y galantamina se dirigen a vías conocidas implicadas en el envejecimiento y la fragilidad, investigamos los efectos de esta combinación sobre la sarcopenia y la fuerza muscular en el modelo de ratón con atrofia óptica 1 (OPA1) en músculos específicos, así como sobre el cambio general en los parámetros de envejecimiento. Este modelo de ratón transgénico recapitula eficazmente aspectos fisiopatológicos clave de la pérdida y resistencia muscular relacionada con la sarcopenia y muestra un envejecimiento precoz (p. ej., cabello blanco, cifosis)¹⁶. La delección de OPA1 específicamente en los músculos esqueléticos da como resultado la disfunción mitocondrial, el aumento del estrés oxidativo y la inflamación.

Material y métodos

25 Modelo de ratón OPA1

La generación y caracterización de los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* se describe en detalle en otra parte^{16,17}. La delección específica de OPA1 para músculos específicos se obtuvo cruzando la línea del *OPA1^{fl/fl}* con ratones que portan Cre-ER accionado por el promotor de la actina esquelética humana (HSA). La recombinación de CreLoxP inducida por tamoxifeno se activó mediante administración oral de comida que contiene tamoxifeno (Tam400/Cre ER Harlan) que se proporcionó a voluntad durante 5 semanas. Los animales con ingesta de alimentos recibieron, a título indicativo, 1 mg de tamoxifeno al día. Los experimentos se realizaron en ratones hembra y macho.

35 Dietas

30 Los ratones inactivos tratados con OPA1 en músculos específicos se mantuvieron con pienso casero (Certificado de Dieta Estándar de Mucedola S.R.L.) o un pienso casero complementado con metformina y galantamina. La combinación se formuló para proporcionar dosis diarias de 2,5 mg de galantamina y 410 mg de metformina por kg⁻¹ de peso corporal. Las dietas del estudio se compraron a Mucedola S.R.L.

40 Pruebas preclínicas de la composición del cuerpo y la energía

45 Los cambios en la composición corporal ocurren a lo largo de la duración de la vida humana. En general, la vejez temprana se asocia a un aumento progresivo de la masa grasa y a una disminución de la masa corporal magra y de la densidad mineral ósea, mientras que en pasos posteriores de la vida, los seres humanos empiezan a perder peso, en particular las reservas de grasa.

Peso corporal y composición corporal

50 El peso corporal se controló semanal o quincenalmente. Las mediciones de masa magra y grasa en ratones vivos se evaluaron mediante EchoMRI-100 (EchoMRI, Houston TX, EE. UU.).

Evaluación metabólica

55 La tasa metabólica de ratón se evaluó mediante calorimetría indirecta mediante el uso del sistema de jaulas metabólicas FenoMaster (TSE, Berlín, Alemania), que proporcionó mediciones directas de consumo de oxígeno (VO₂) y producción de dióxido de carbono (VCO₂). Basándose en estos parámetros, se calculó el gasto de energía¹⁸. Además, se monitorizó el consumo de alimentos.

60 Pruebas preclínicas de la función y el rendimiento neuromusculares

La función y el rendimiento neuromusculares son resultados clínicos clave en la evaluación de la salud general de las personas mayores, ya que están muy relacionados con acontecimientos adversos para la salud como caídas, depresión, discapacidad y muerte.

65

Rendimiento físico

El deterioro funcional de las personas mayores, a menudo asociado a un declive de las capacidades motoras y cognitivas y a una morbilidad sustancial, se considera un factor determinante de la salud en la tercera edad. En ratones, se ha desarrollado una batería de pruebas para evaluar los resultados conductuales en ratones que envejecen. Cinta de correr. El protocolo de entrenamiento concéntrico consistió en correr en una cinta ergométrica (Biological Instruments, LE 8710 Panlab Technology 2B) hasta el agotamiento, con un descenso constante de 5° a 13 cm/s. Se registró el tiempo dedicado a correr total de cada ratón.

5 Fuerza de agarre. La fuerza de agarre se realizó permitiendo que los ratones agarren una rejilla y posteriormente tirando de los ratones de la cola y registrarán el tiempo hasta la liberación.

10 Las mediciones de fuerza in vivo se realizaron en animales vivos utilizando un sistema de palanca muscular 305B (Aurora Scientific, ON, Canadá) como se ha descrito previamente¹⁹. Brevemente, el protocolo de fuerza/frecuencia consistió en una serie de estimulaciones a frecuencias crecientes (pulso único, 20 Hz, 40 Hz, 55 Hz, 75 Hz, 100 Hz y 150 Hz). Cada estimulación se realiza >30 segundos después del último, el voltaje aplicado varía de 4 a 6 V, la duración de cada tren se establece en 200 ms mientras que la duración de cada pulso individual se establece en 200.

Cosecha de tejido muscular, hígado y tejido adiposo blanco

20 67 días después de la inducción, se sacrificaron ratones y se recogieron los músculos (gastrocnemio, tibial anterior, sóleo) utilizando métodos de disección estandarizados. Los tejidos musculares se limpian del exceso de grasa y tejido conjuntivo, se pesaron en una balanza analítica y se recogieron para su posterior análisis. Se conservó el tejido muscular para histología y ARN. Se recogió tejido de hígado y se conservó para histología. Se recogió tejido adiposo blanco y se pesó en una balanza analítica.

25 Expresión génica

El ARN total se aisló de los músculos mediante el uso de TRIzol (Invitrogen). Se generó ADN complementario mediante el uso de la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen). La expresión génica se determinó mediante qPCR como se describe¹⁶. La PCR cuantitativa se realizó con los siguientes cebadores: IL6Fw: TAGTCCTCCTACCCCAATTCC; IL6Rv: TTGGTCCTAGCCACTCCTTC GAPDHf: CACCATCTTCCAGGAGCGAG; GAPDHRv: CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC.

Histología e inmunofluorescencia

35 Las criosecciones de los músculos gastrocnemios y del hígado se tiñeron con succinato deshidrogenasa (SDH) y con tinte de aceite rojo O, respectivamente. El número total de miofibras del músculo gastrocnemio se calculó a partir de la sección transversal completa del miembro posterior basándose en la imagen de mosaico ensamblada (aumento de 20X). Para la inmunotinción se utilizó el anticuerpo para NCAM (dilución 1:200 en tampón de bloqueo, Millipore, St. Louis, MO). La WGA conjugada con Cy3 se utilizó para identificar el sarcolema. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital de dispositivos de carga acoplada Leica DFC300-FX y el software Leica DC Viewer.

Métodos estadísticos y definición de sinergia

45 Todos los datos se presentan como media ± SEM. Las comparaciones entre 2 grupos se realizaron mediante pruebas t de Student de 2 colas. Para los análisis estadísticos de las diferencias entre grupos, se realizó un ANOVA unidireccional con la corrección adecuada para comparaciones múltiples (pruebas de comparación múltiple de Tukey, software GraphPad Prism). Se utilizó un ANOVA de medidas repetidas para evaluar los cambios temporales significativos entre dos (o más) grupos. Los valores de P por debajo de 0,05 se consideraron significativos.

50 Resultados

Los músculos específicos de ratones tratados con *Opa1*^{-/-} en combinación con metformina y galantamina mantuvieron la masa grasa, su metabolismo se restauró y previnieron la esteatosis hepática

55 El tratamiento con combinación de metformina y galantamina no tuvo efecto sobre el peso corporal (Figura 8A) y la masa magra (Figura 8B) en ratones hembra tratados con *Opa1*^{-/-}. Sin embargo, la masa grasa se mantuvo en los ratones hembra tratados con *Opa1*^{-/-} de edad avanzada (Figura 8C), que se ha asociado con una mayor supervivencia en los estudios sobre roedores y humanos^{20,21,22}. En paralelo, los ratones macho tratados con *Opa1*^{-/-} evitaron parcialmente la pérdida de tejido adiposo blanco (Figura 8D). Aunque los ratones hembra tratados con *Opa1*^{-/-} tuvieron una masa grasa aumentada en comparación con los tratados con *Opa1*^{+/+}, este grupo consumió la misma cantidad de calorías (Figura 8E). A continuación, se exploró la relación entre la masa corporal y la tasa metabólica mediante la evaluación del metabolismo *in vivo* mediante el sistema de jaulas metabólicas Phenomaster. La calorimetría indirecta reveló que la combinación de galantamina y metformina normalizada tanto al consumo de oxígeno como a la producción de dióxido de carbono, especialmente durante la fase ligera, en los ratones hembra tratados con *Opa1*^{-/-} para controlar ratones (Figura 8F-G). En paralelo, los ratones hembra tratados con *Opa1*^{-/-} tuvieron un mayor gasto

de energía en comparación con los ratones no tratados con *Opa1^{-/-}*, a pesar de la mayor masa grasa (Figura 8H). Por lo tanto, la masa grasa aumentada observada en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* no puede explicarse por la ingesta de alimentos o el gasto de energía. Estos datos sugieren que el tratamiento combinado con galantamina y metformina corrige el fenotipo de ayuno extremo observado en ratones no tratados con *Opa1^{-/-}*. A continuación, para evaluar la esteatosis hepática en estos ratones, realizamos una tinción con aceite rojo O. Los ratones hembra tratados con *Opa1^{-/-}* mostraron esteatosis hepática, que se previno por completo en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. Los niveles de expresión muscular de IL6 en ratones hembras tratados con *Opa1^{-/-}* se normalizaron a los niveles de control, indicativo de una disminución de la inflamación (Figura 8I).

La combinación de metformina y galantamina mejoró el rendimiento físico en músculos específicos de ratones tratados con *Opa1^{-/-}*.

A continuación, se determinó si el rendimiento físico, un marcador importante de la duración de la salud, se conservó en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. Para determinar la salud física de estos animales, se incluyó una cinta de correr y mediciones de la fuerza de agarre y de fuerza. Los ratones hembra tratados con *Opa1^{-/-}* corrieron tres veces más que los ratones no tratados con *Opa1^{-/-}* (Figura 9A). Además, se observó un efecto significativo con el tratamiento combinado en la fuerza de agarre (Figura 9B). El tratamiento mostró un aumento en la fuerza absoluta (Figura 9C) y en la fuerza específica máxima (Figura 9E), generada durante la contracción tetánica, en ratones hembra tratados con *Opa1^{-/-}*, pero este efecto no fue significativo. La falta de significancia en las hembras es probablemente un resultado de un número insuficiente y de la mayor variabilidad biológica. Sin embargo, en ratones macho tratados con *Opa1^{-/-}*, se observó un aumento significativo de la fuerza absoluta y la fuerza específica máxima en comparación con los ratones no tratados con *Opa1^{-/-}* (Figura 9D-F), que indican una debilidad muscular reducida en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. En general, estas pruebas indican que la combinación de galantamina y metformina mejoró la idoneidad general de los ratones tratados con *Opa1^{-/-}*, que se asocian a menores tasas de mortalidad por todas las causas cardiovasculares²³.

Combinación de metformina y galantamina parcialmente conservada en la masa muscular en ratones *Opa1^{-/-}*

Los músculos de tanto los ratones no tratados como tratados con *Opa1^{-/-}* son más pequeños en comparación con los ratones control, tanto en hembras (Figura 10A-C) como en machos (Figura 10D-F). En hembras, el músculo tibial anterior, una fibra glucolítica tipo II (contracción rápida), se conservó parcialmente en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* (Figura 10A), mientras que en los machos el gastrocnemio y el músculo sóleo se rescataron parcialmente en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* (Figura 10E). Este es un hallazgo importante ya que la atrofia muscular asociada a la edad es mayor en los músculos glucolíticos (tibial anterior, gastrocnemio) en comparación con los músculos oxidativos (por ejemplo, músculo soldado). La tinción de succinato deshidrogenasa (SDH) aumentó en los ratones hembra no tratados con *Opa1^{-/-}* en comparación con los animales de control no tratados con *Opa1^{-/-}*, lo que indica un aumento del metabolismo oxidativo. Sin embargo, las regiones del citoplasma de miofibra tipo IIA están desprovistas de mitocondrias en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* (datos histopatológicos archivados), un patrón de localización que se asemeja a la enfermedad del núcleo central, y esto se mantuvo en los ratones tratados con *Opa1^{-/-}*. En línea con la tinción SDH, se observaron fibras de tipo IIA aumentadas en los animales tratados con *Opa1^{-/-}* en comparación con los controles y los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* (Figura 10G). A continuación, examinamos la expresión de la molécula de adhesión celular neural (NCAM), una molécula Enriquecida en la membrana postsináptica de la unión mioneuronal (NMJ) pero en gran parte ausente en miofibras adultas. Sin embargo, después de la pérdida de inervación, NCAM se vuelve a expresar a lo largo de toda la fibra muscular. Es importante destacar que la pérdida de inervación de miofibras, que se produce durante el envejecimiento normal y que coincide con una aceleración de atrofia muscular, se previno parcialmente en los ratones hembra tratados con *Opa1^{-/-}*, como se muestra por las fibras positivas NCAM reducidas (Figura 10H). Además, la salud ósea también se evaluará en estos ratones. Varios parámetros (por ejemplo, el volumen óseo trabecular, la conectividad trabecular y la densidad mineral ósea trabecular y el grosor cortical) se evaluarán con micro-TC. Los ratones tratados con *Opa1^{-/-}* se tratarán adicionalmente con los componentes individuales galantamina y metformina individualmente y se realizará el mismo análisis que se describió anteriormente.

Combinación de metformina y galantamina en trayectorias de salud fisiológicas, metabólicas y funcionales longitudinalmente

El efecto del fármaco combinado (metformina más galantamina) en trayectorias de salud fisiológicas, metabólicas y funcionales se medirá en dos cepas de ratones y ambos sexos durante toda la duración de su vida, denominado estudio de envejecimiento longitudinal en ratones-2 (SLAM-2). El conjunto de este estudio se basa en el estudio SLAM-1 en el National Institute on Envejecimiento (NIH, EE. UU.), que probó el mismo envejecimiento y fenotipos relacionados con la edad pero sin una intervención. SLAM-2 será un estudio muy extenso, comenzando las mediciones en ratones a una edad de 12 meses. A lo largo de la vida se realizarán diversas pruebas en distintos momentos finales, centrándose principalmente en cuatro fenotipos clave del envejecimiento: metabólico (p. ej., diabetes, NAFLD, síndrome metabólico), neuromuscular (por ejemplo, sarcopenia, osteoporosis, estabilidad NMJ), cardiovascular (p. ej., insuficiencia cardíaca) y cognitivo (p. ej., Alzheimer), que tienen gran relevancia para la salud humana, ya que estos ámbitos son la principal causa de discapacidad, mortalidad y morbilidad. Los resultados de SLAM-2 revelarán cómo cambian las trayectorias de parámetros biológicos y fisiológicos con la intervención de un compuesto que se sabe que tiene efectos positivos en el envejecimiento sano, en comparación con los resultados iniciales de SLAM-1.

Además, en un estudio separado, se examinará la eficacia sobre la extensión de la salud y la esperanza de vida de ambos compuestos individuales, así como el fármaco de combinación. Una batería de pruebas similares a las descritas en SLAM-2 se realizará longitudinalmente a intervalos regulares, semanalmente y mensualmente, a lo largo de la duración de la vida de los animales.

5 Combinación de metformina y galantamina para promover la resistencia mejorada

10 En paralelo con los estudios sin estrés, los efectos de la combinación de metformina y galantamina se examinarán en el contexto de los modelos estresados (resiliencia). Tres de las dolencias clínicas más comunes asociadas con el envejecimiento humano son la diabetes tipo II relacionada con la obesidad (inducida por la sobrenutrición), la sarcopenia (descanso en cama a largo plazo) y la inestabilidad de la unión mioneural (traumatismo, cirugía). Tres modelos de ratón bien establecidos y eficientes en el tiempo que pueden utilizarse para examinar estas complicaciones + /-combinación de tanto metformina como galantamina son (I) ratones alimentados con dieta rica en grasas (HFD), (II) suspensión de patas traseras, y (III) aplastamiento o corte del nervio ciático, respectivamente. En el contexto de estos modelos, se realizará un panel de pruebas estandarizadas a corto plazo en ratones jóvenes y de mediana edad para determinar la eficacia de la combinación de metformina y galantamina en la promoción de la mejora de la resistencia.

15 20 Ejemplo 3: Estudio en humanos

A. Estudio de prueba de concepto en pacientes con obesidad sarcopénica

25 Este estudio de prueba de concepto exploratorio se realizará para evaluar en qué medida la combinación de metformina y galantamina tiene un impacto favorable en los parámetros sarcopénicos de la masa muscular y la fuerza muscular en pacientes con obesidad sarcopénica. También pretende evaluar el efecto de diferentes dosis de metformina y galantamina en los parámetros a evaluar, incluyendo biomarcadores del envejecimiento. Este estudio es un estudio de prueba de concepto de concepto aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de 24 semanas, que consiste en 3 períodos consecutivos de tratamiento de 8 semanas con 3 niveles de dosis crecientes.

30 35 La metformina se proporcionará como formulación de liberación inmediata, liberación sostenida, liberación retardada o liberación controlada, lo que permite proporcionar dosis diarias de 250 mg (nivel de dosis 1), 500 mg (nivel de dosis 2) y 1000 mg (nivel de dosis 3). La galantamina se proporcionará como formulación de liberación inmediata o de liberación sostenida, lo que permite proporcionar dosis diarias de 3 mg (nivel de dosis 1), 6 mg (nivel de dosis 2) y 12 mg (nivel de dosis 3). La combinación de metformina y galantamina se proporcionará como una combinación fija, por ejemplo de 250 mg de metformina y 3 mg de galantamina (nivel de dosis 1), 500 mg de metformina y 6 mg de galantamina (nivel de dosis 2) y 1000 mg de metformina y 12 mg de galantamina (nivel de dosis 3). Se proporcionarán formulaciones coincidentes de placebo.

40 B. Estudio de prueba de concepto en pacientes sarcopénicos que sufren artroplastia total de cadera

Este estudio de prueba de concepto exploratorio está diseñado para evaluar en qué medida la combinación de metformina y galantamina tiene un impacto favorable en los parámetros sarcopénicos de la masa muscular y la fuerza muscular en pacientes con sarcopenia que tienen programada una artroplastia total de (THA) de la cadera. También se ha diseñado para evaluar si, y en qué medida, los pacientes tratados con la combinación de metformina y galantamina experimentan un mejor resultado funcional tras la THA. Este estudio es un estudio exploratorio de prueba de concepto, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de 24 semanas de duración, que consta de una fase de tratamiento de 12 semanas antes de la cirugía y una fase de tratamiento de 12 semanas después de la cirugía.

50 La combinación de metformina y galantamina se proporcionará como una combinación fija de, por ejemplo, 250 mg de metformina y 3 mg de galantamina (nivel de dosis 1), 500 mg de metformina y 6 mg de galantamina (nivel de dosis 2) y 1000 mg de metformina y 12 mg de galantamina (nivel de dosis 3). Se proporcionarán formulaciones coincidentes de placebo. El tratamiento es parcialmente antes de la cirugía y parcialmente postoperatorio.

55 Referencias

1. De Haes, W. y col. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E2501-E2509 (2014).
- 60 2. Wilkinson, D. S., Taylor, R. C. y Dillin, A. Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol.* 107, 353-381 (2012).
3. Churkin, M. A. y col. Longitudinal imaging of *Caenorhabditis elegans* in a microfabricated device reveals variation in behavioral decline during aging. *Elife* 6, (2017).

4. Lucanic, M. y col. Standardized Protocols from the Caenorhabditis Intervention Testing Program 2013-2016: Conditions and Assays used for Quantifying the Development, Fertility and Lifespan of Hermaphroditic Caenorhabditis Strains. *Protoc. Exch.* (2017).
- 5 5. Keith, S. A., Amrit, F. R. G., Ratnappan, R. y Ghazi, A. The *C. elegans* healthspan and stress-resistance assay toolkit. *Methods* 68, 476-486 (2014).
- 10 6. Hahm, J.-H. y col. *C. elegans* maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation. *Nat. Commun.* 6, 8919 (2015).
- 10 7. Hsu, A.-L., Feng, Z., Hsieh, M.-Y. & Xu, X. Z. S. Identification by machine vision of the rate of motor activity decline as a lifespan predictor in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging* 30, 1498-1503 (2009).
- 15 8. Peymen, K. y col. Myoinhibitory peptide signaling modulates aversive gustatory learning in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* 15, e1007945 (2019).
9. Don, D. J. y col. Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging (Albany, NY)* 8, 777-795 (2016).
- 20 10. McElwee, J. J. y col. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol.* 8, R132 (2007).
- 25 11. Detienne, G., Van de Walle, P., De Haes, W., Schoofs, L. y Temmerman, L. SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm* 5, e1230585 (2016).
12. Herndon, L. A. y col. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. Elegans*. *Nature* (2002).
- 30 13. Borisy, A. A. y col. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 7977-7982 (2003).
14. Cabreiro, F. y col. Metformin Retards Aging in *C. elegans* by Altering Microbial Folate and Methionine Metabolism. *Cell* 153, 228-239 (2013).
- 35 15. Benedetto, A. y col. LFASS: Label-free automated survival scoring for high-throughput nematode assays. *Aging Cell* in press (2019).
16. Tezze, C. y col. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab.* 25, 1374-1389.e6 (2017).
- 40 17. Cogliati, S. y col. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160-171 (2013).
18. Weir, J. B. de V. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* 109, 1-9 (1949).
- 45 19. Blaauw, B. y col. Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3686-3696 (2008).
20. Mitchell, S. J. y col. Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab.* 23, 1093-1112 (2016).
- 50 21. Liao, C. Y. y col. Fat maintenance is a predictor of the murine lifespan response to dietary restriction. *Aging Cell* 10, 629-639 (2011).
- 55 22. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, G. B. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories. *J. Am. Med. Assoc.* 97, 3855-63 (2013).
23. Kokkinos, P. Physical Activity, Health Benefits, and Mortality Risk. *SRN Cardiol.* 2012, 1-14 (2012).

60

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas en un sujeto, comprendiendo dicha combinación farmacéutica:
- una biguanida, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y
 - un inhibidor de acetilcolinesterasa, y/o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 10 y en donde las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas son enfermedades del sistema neuromusculoesquelético, fragilidad y/o enfermedades inflamatorias hepáticas.
- 15 2. La combinación farmacéutica según la reivindicación 1, para usar en el tratamiento, prevención, estabilización, retraso en el inicio y/o reducción de los síntomas de enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético y/o fragilidad.
- 20 3. La combinación farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético se seleccionan del grupo que comprende trastornos extrapiramidales y de movimiento, enfermedades de la unión mioneural y músculo, atrofias sistémicas que afectan principalmente al sistema nervioso central, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y enfermedades relacionadas, enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica, movimientos involuntarios anormales, anomalías de la marcha y movilidad, ataxia, enfermedades neuromusculoesqueléticas asociadas mitocondriales y sarcopenia.
- 25 4. La combinación farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético son trastornos extrapiramidales y de movimiento, enfermedades de la unión mioneural y músculo, atrofias sistémicas afectan principalmente al sistema nervioso central, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y enfermedades relacionadas, enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica, movimientos involuntarios anormales, anomalías de la marcha y movilidad, o ataxia.
- 30 5. La combinación farmacéutica para usar según la reivindicación 1 a 4, en donde la enfermedad relacionada con la edad y/o degenerativa del sistema neuromusculoesquelético es sarcopenia.
- 35 6. La combinación farmacéutica para usar según la reivindicación 1 a 4, en donde las enfermedades relacionadas con la edad y/o degenerativas del sistema neuromusculoesquelético son enfermedades neuromusculoesqueléticas asociadas mitocondriales; en particular, enfermedades neuromusculoesqueléticas asociadas mitocondriales seleccionadas de enfermedades del núcleo central y enfermedades asociadas a la atrofia óptica 1 (OPA1).
- 40 7. Uso no terapéutico de una combinación farmacéutica para la prevención, estabilización y/o reducción de dolencias relacionadas con la edad y/o dolencias degenerativas, comprendiendo dicha combinación farmacéutica:
- una biguanida, o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y
 - un inhibidor de acetilcolinesterasa, o un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo,
- 45 en donde las dolencias relacionadas con la edad y/o las dolencias degenerativas se seleccionan del grupo que comprende debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular o movilidad reducida.
- 50 8. Uso no terapéutico de una combinación farmacéutica para mejorar una medida de la esperanza de vida y/o de la duración de la salud, comprendiendo dicha combinación farmacéutica:
- una biguanida, o un N-óxido, un hidrato, una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y
 - un inhibidor de acetilcolinesterasa, un N-óxido, un hidrato, una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo,
- 55
- 60
- 65

- en donde la medida mejorada de la esperanza de vida y/o de la duración de la salud se selecciona del grupo que comprende la mitigación o estabilización de las dolencias relacionadas con la edad, la mitigación o estabilización de las dolencias degenerativas disfuncionales y degenerativas, en relación con la afección del sujeto antes de la administración de la combinación farmacéutica o en relación con una población de control, y en donde las dolencias relacionadas con la edad y/o las dolencias degenerativas se seleccionan del grupo que comprende debilidad muscular, menor fuerza muscular, degeneración neuromuscular o movilidad reducida.
5. 9. La combinación farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el uso no terapéutico de una combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde la biguanida es metformina.
10. 10. La combinación farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el uso no terapéutico de una combinación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el inhibidor de acetilcolinesterasa se selecciona del grupo que comprende galantamina, donepezilo, rivastigmina y memantina; preferiblemente en donde el inhibidor de acetilcolinesterasa es galantamina.
15. 11. La combinación farmacéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el uso no terapéutico de una combinación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la biguanida y el inhibidor de acetilcolinesterasa se administran en una dosis subterapéutica al sujeto.
20. 12. La combinación farmacéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el uso no terapéutico de una combinación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el sujeto es un sujeto humano.
25. 13. La combinación farmacéutica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el uso no terapéutico de una combinación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde la biguanida y el inhibidor de acetilcolinesterasa o su N-óxido, hidrato, sal o solvato farmacéuticamente aceptable se formulan por separado en composiciones farmacéuticas o se formulan en una sola composición farmacéutica.
- 30.

Figura 1

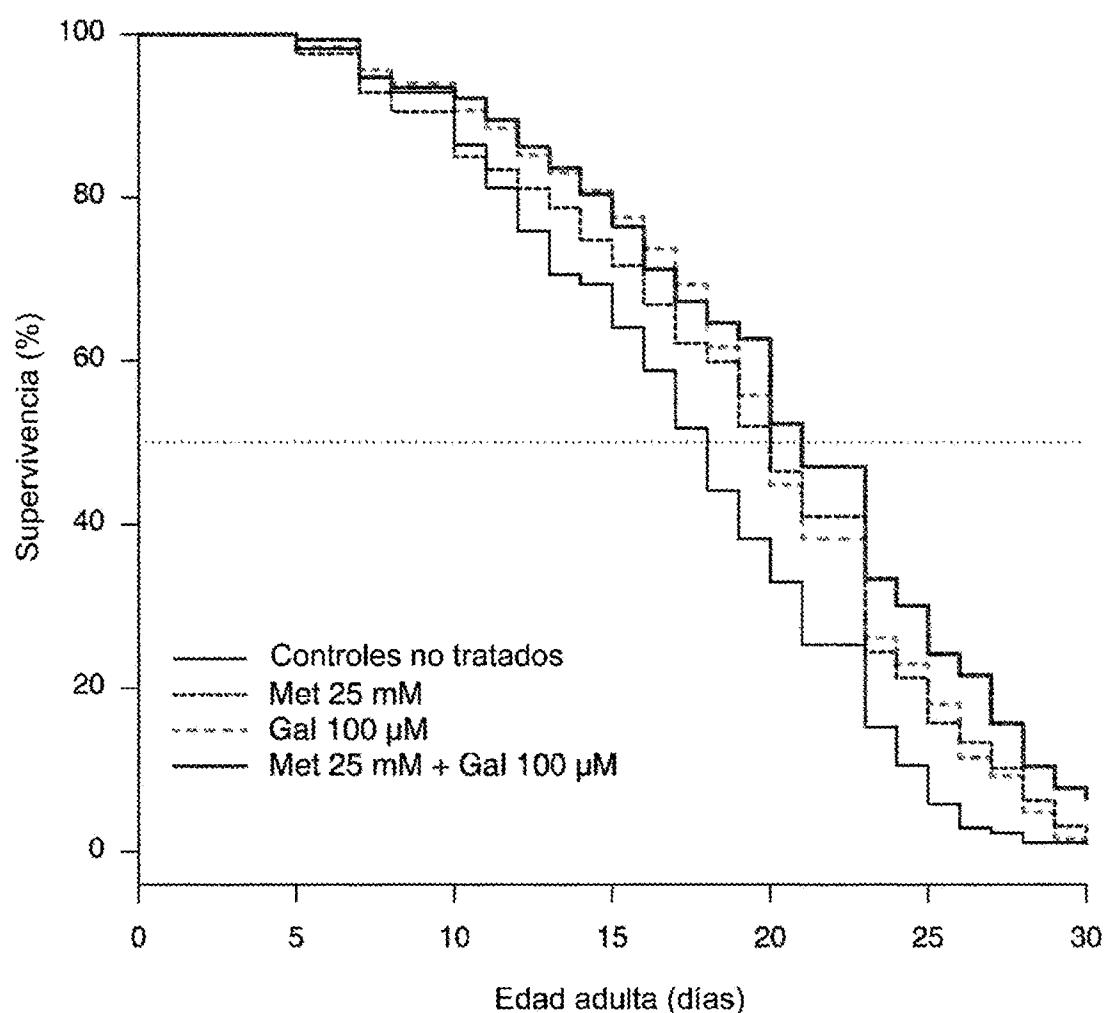


Figura 2

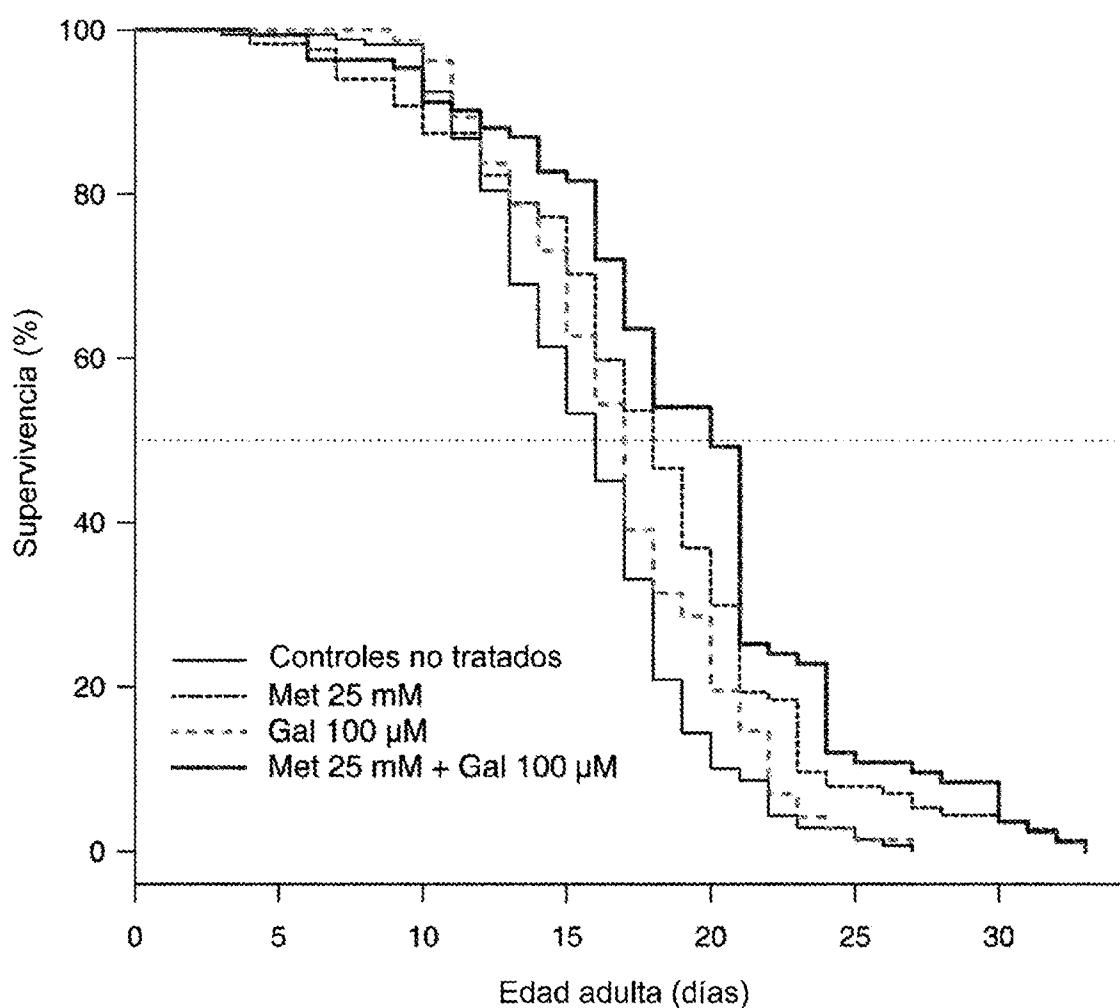


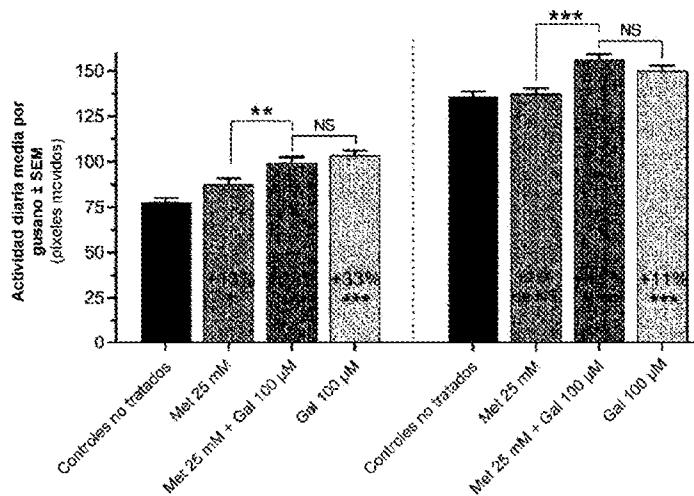
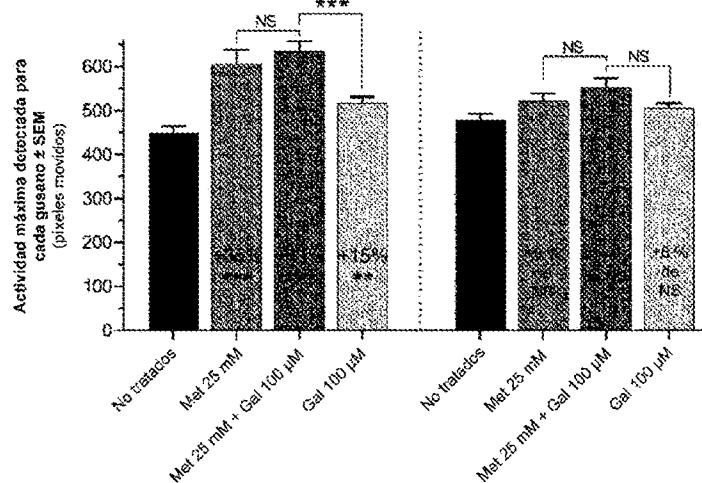
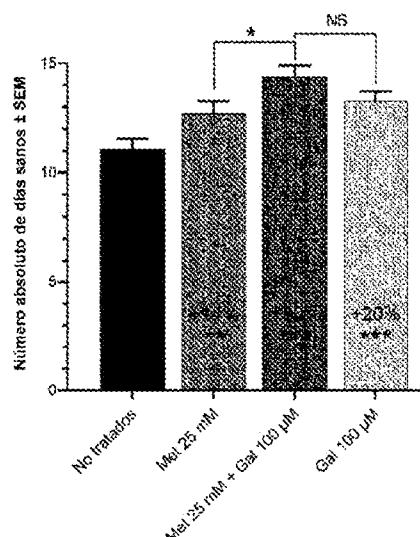
Figura 3**A.****B.****C.**

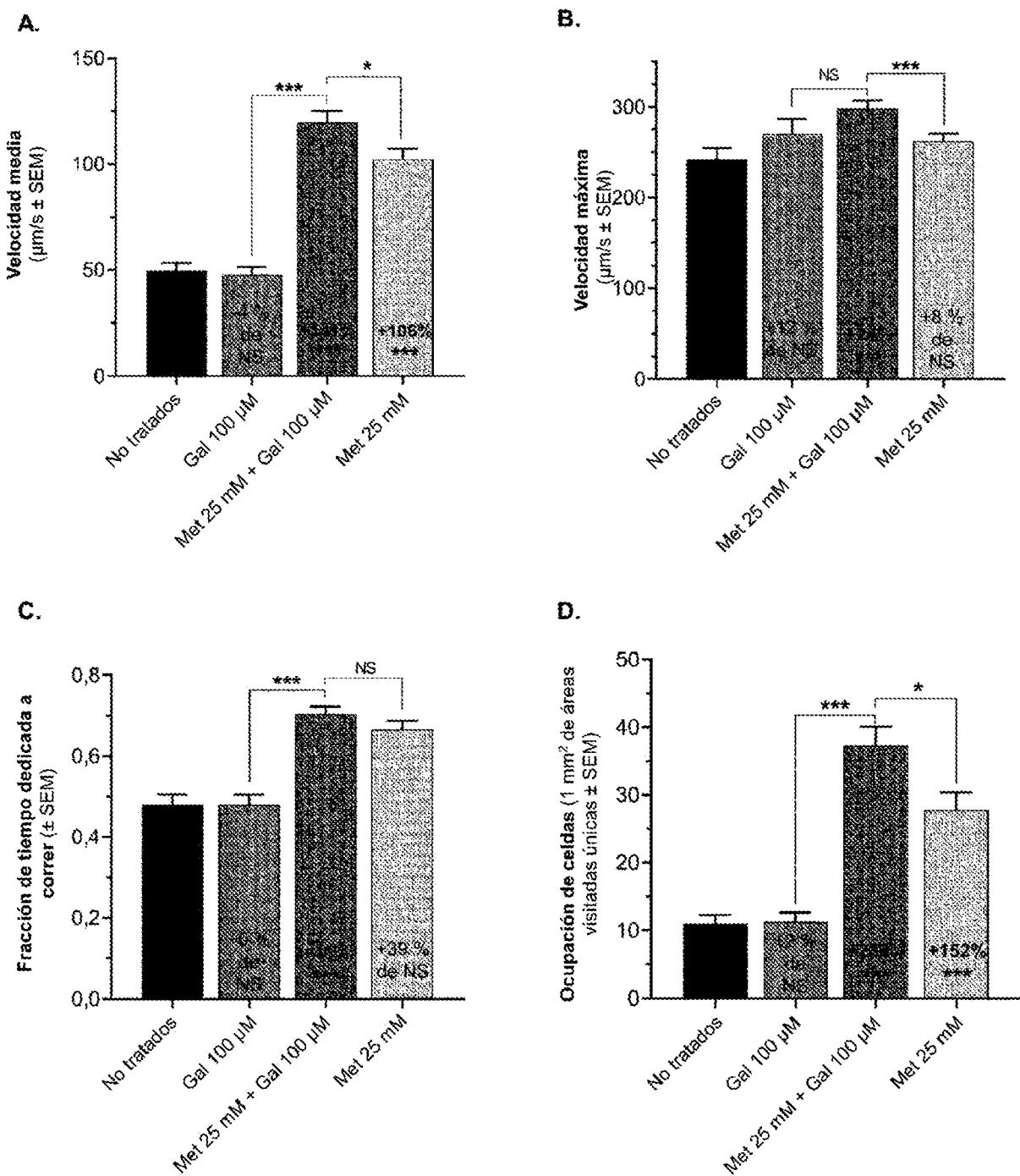
Figura 4

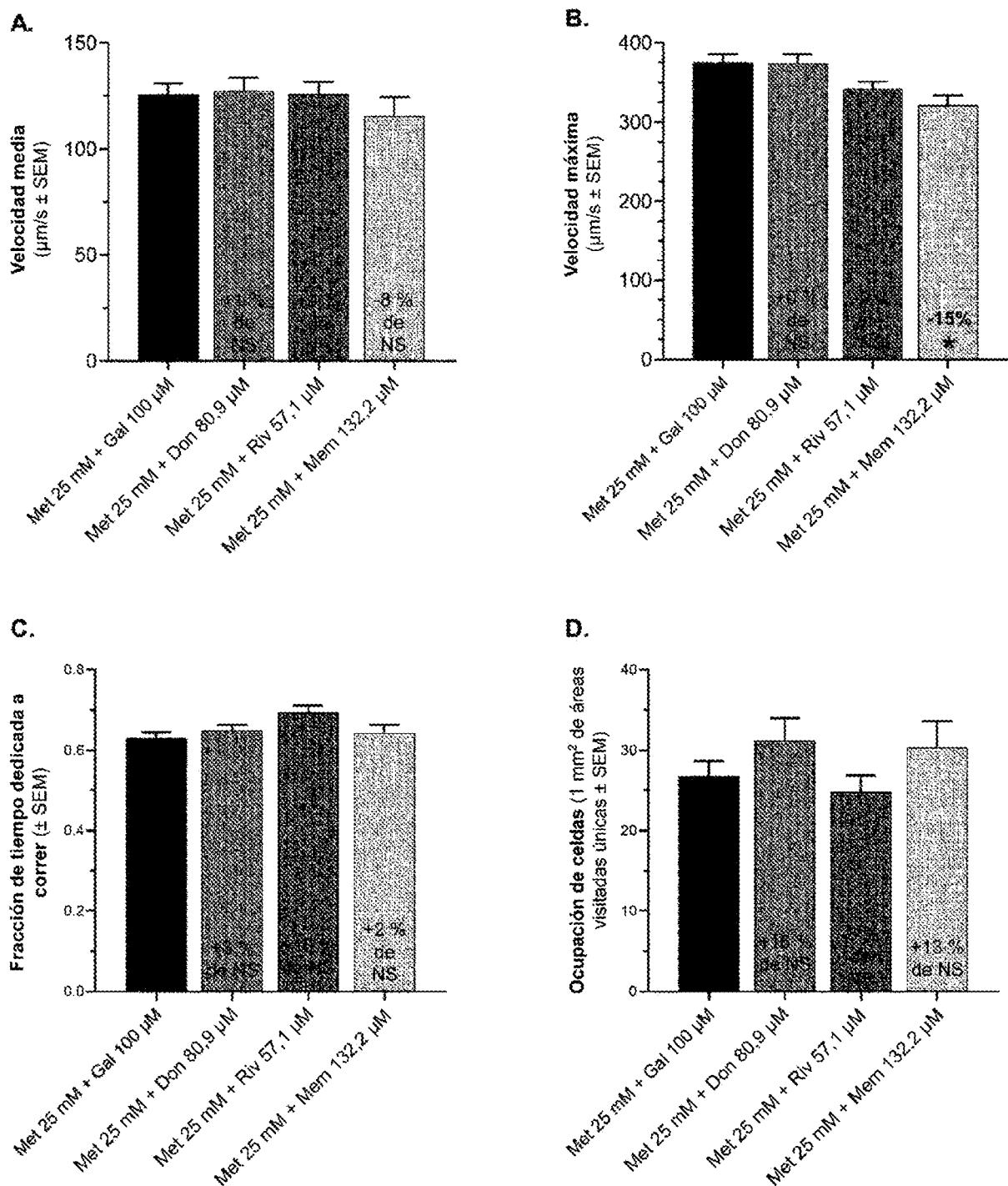
Figura 5

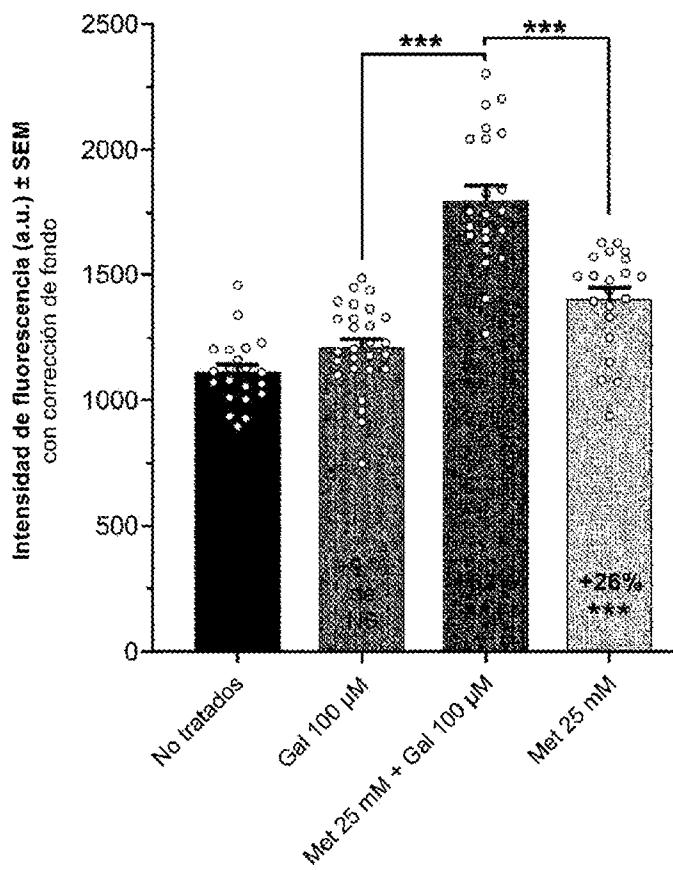
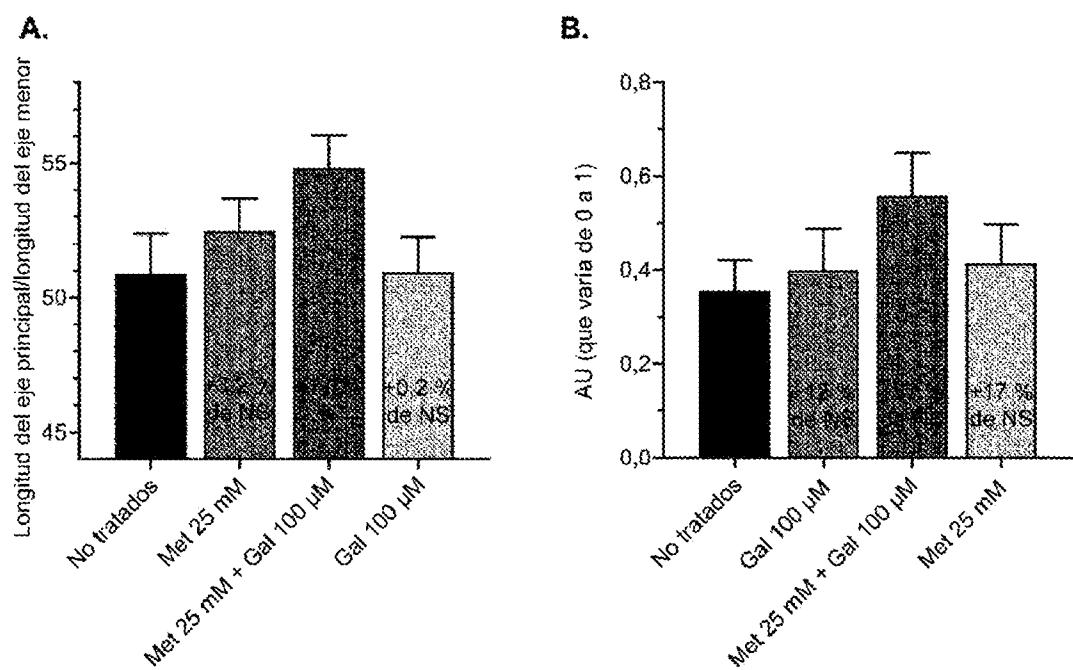
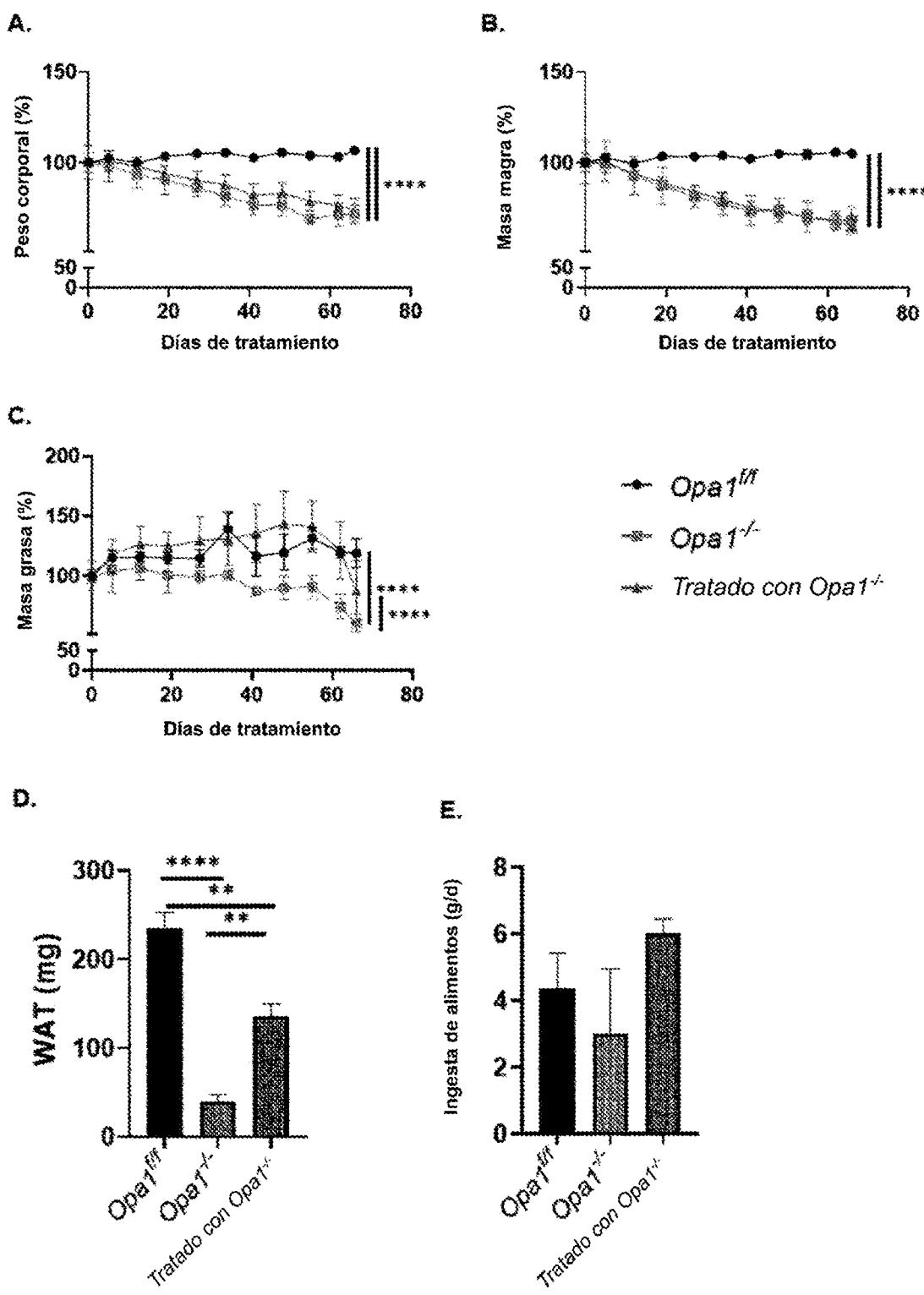
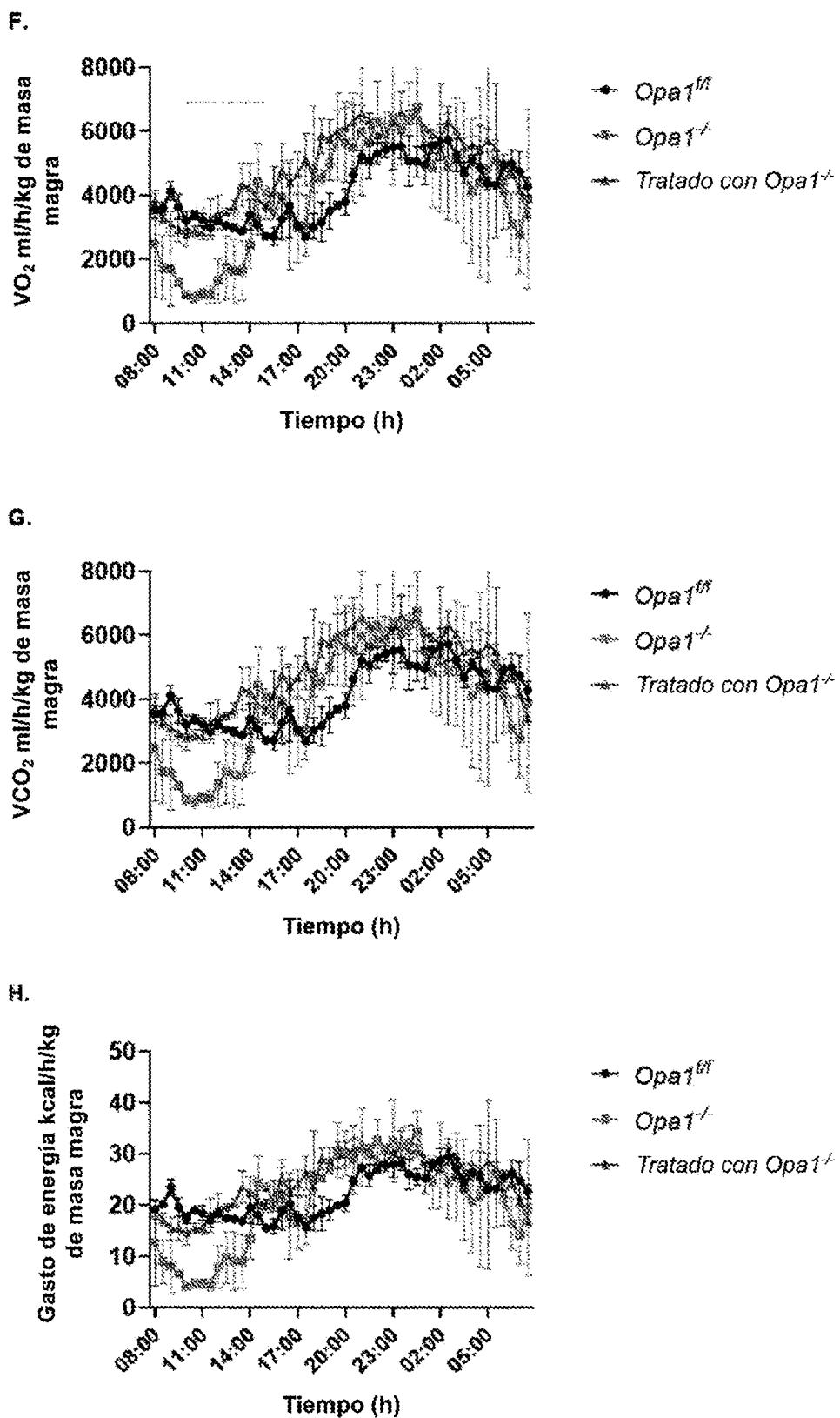
Figura 6**Figura 7**

Figura 8



I.

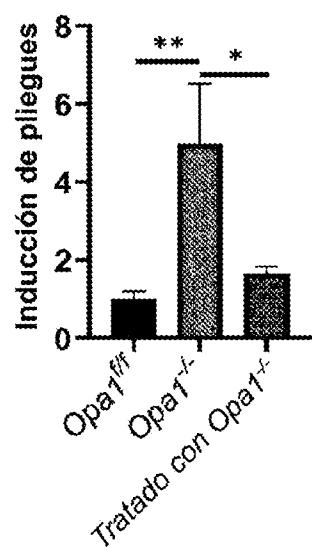
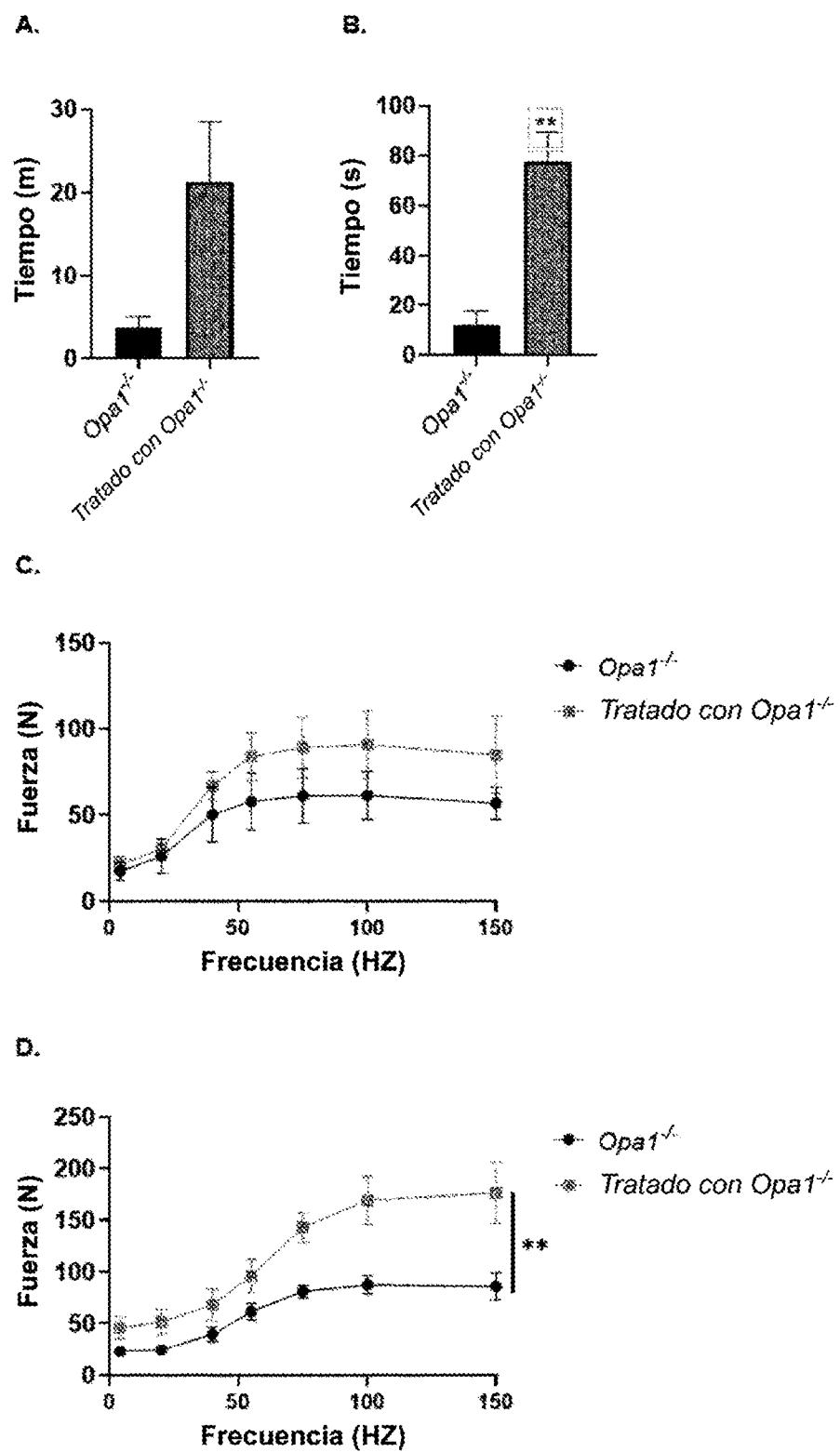


Figura 9



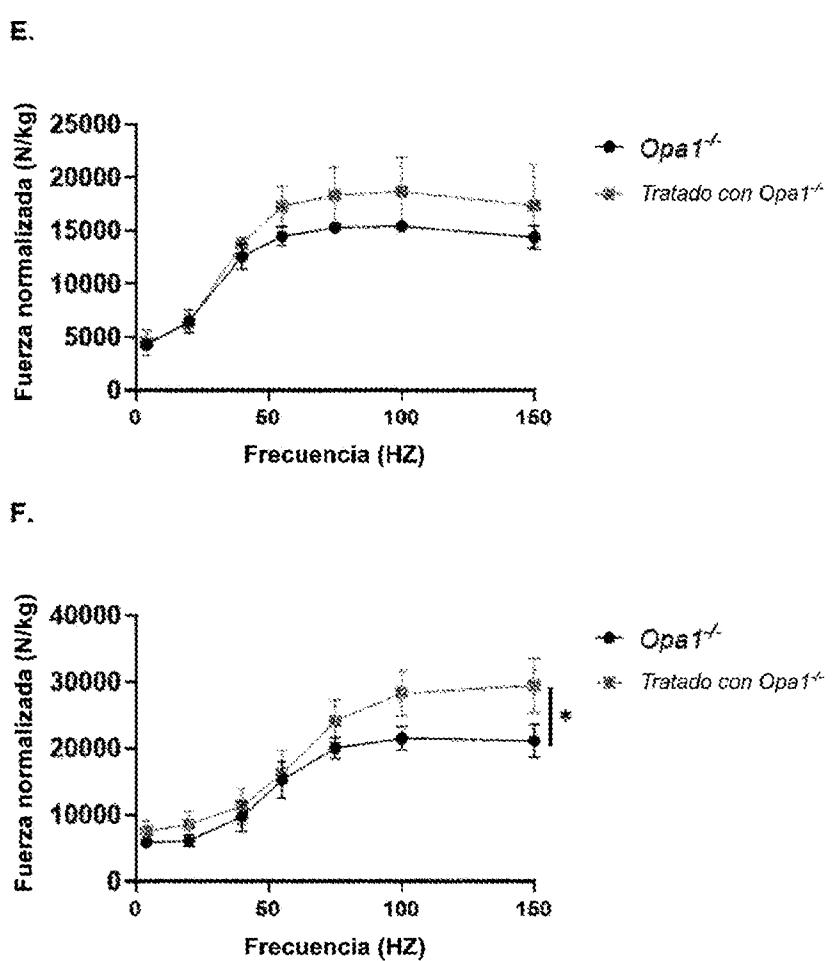


Figura 10