

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 927**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137	(2006.01) A61K 31/145	(2006.01)
A61K 31/138	(2006.01) A61K 31/164	(2006.01)
A61K 31/185	(2006.01) A61K 31/44	(2006.01)
A61K 31/195	(2006.01) A61K 31/428	(2006.01)
A61K 31/42	(2006.01) A61K 9/20	(2006.01)
A61K 31/64	(2006.01)	
A61P 25/28	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 31/197	(2006.01)	
A61K 31/445	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012** **E 13196461 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 2727588**

54 Título: **Terapia para trastornos neurológicos basada en baclofeno y acamprosato**

30 Prioridad:

01.03.2011 EP 11305217
29.03.2011 US 201161468658 P
06.06.2011 EP 11305687
06.06.2011 US 201161493606 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 698 927 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

Terapia para trastornos neurológicos basada en baclofeno y acamprosato

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a combinaciones para tratar la Esclerosis Múltiple. Más específicamente, la presente invención se refiere a una nueva politerapia para Esclerosis Múltiple, basada en una combinación de baclofeno y acamprosato.

Antecedentes de la invención

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

15 La incidencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta drásticamente con la edad. La EA es en la actualidad la causa más frecuente de demencia. Desde el punto de vista clínico se caracteriza por un deterioro global de la función cognitiva que progresa lentamente y que deja a los pacientes en fase terminal condenados a la cama, incontinentes y dependientes de los cuidados de custodia. La muerte se produce, como promedio, 9 años después del diagnóstico (5).

20 La tasa de incidencia de la EA aumenta drásticamente con la edad. Las proyecciones demográficas de las Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se acercará a 370 millones hacia el año 2050. En la actualidad se estima que un 50 % de las personas mayores de 85 años de edad padecen la EA. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 50 años. El gran número de personas que necesitan cuidados constantes y otros servicios repercutirá gravemente sobre los recursos médicos, económicos y humanos (6).

25 El deterioro de la memoria es la característica temprana de la enfermedad e implica a la memoria episódica (memoria para sucesos del día a día). La memoria semántica (memoria para el significado verbal y visual) está implicada posteriormente en la enfermedad. Por el contrario, se conservan durante más tiempo la memoria de trabajo (memoria a corto plazo que implica las estructuras y los procedimientos usados para almacenar y manipular temporalmente la información) y la memoria procedimental (memoria inconsciente que es la memoria a largo plazo de competencias y procedimientos). A medida que progresa la enfermedad, aparecen otras características de deterioro del lenguaje, déficits de percepción visual y espacial, agnosias y apraxias.

30 El cuadro clínico clásico de la enfermedad de Alzheimer es suficientemente característico como para permitir la identificación en aproximadamente un 80 % de los casos (7). Sin embargo, existe heterogeneidad clínica y esto no sólo es importante para el tratamiento clínico, sino que proporciona la implicación adicional de tratamientos farmacológicos específicos para formas funcionalmente diferentes (8).

35 El distintivo patológico de la EA incluye placas amiloides que contienen β -amiloides ($A\beta$), ovillos neurofibrilares (NFT) que contienen la proteína τ , y disfunción y pérdida neuronal y sináptica (9-11). Durante la última década se han propuesto dos hipótesis principales sobre la causa de la EA: la «hipótesis de la cascada de amiloides», que establece que el proceso neurodegenerativo es una serie de sucesos desencadenados por el procesamiento anómalo de la proteína precursora de amiloides (APP) (12), y la «hipótesis de la degeneración del citoesqueleto neuronal» (13), que propone que los cambios del citoesqueleto son los sucesos desencadenantes. La teoría más ampliamente aceptada que explica la progresión de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada de amiloides (14-16) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en la determinación de los mecanismos que subyacen a la toxicidad asociada con las proteínas $A\beta$. La permeabilidad y remodelación microvasculares, la angiogénesis aberrante, y la descomposición de la barrera hematoencefálica se han identificado como sucesos clave que contribuyen a la toxicidad de la APP en la cascada de amiloides (17). Por el contrario, la proteína τ ha recibido mucha menos atención por parte de la industria farmacéutica que los amiloides debido a cuestiones tanto de fundamento como prácticas. Además, el cambio en la densidad sináptica es la lesión patológica que se correlaciona con el deterioro cognitivo mejor que con los otros dos. Los estudios han revelado que la enfermedad amiloide parece progresar de una manera específica de neurotransmisor, en la que las terminaciones colinérgicas aparecen como las más vulnerables, seguidas de las terminaciones glutamatérgicas y finalmente de las terminaciones GABAérgicas (11). El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del sistema nervioso de los mamíferos. En las afecciones patológicas, su acumulación anómala en la hendidura sináptica lleva a la hiperactivación de los receptores de glutamato (18). La acumulación anómala de glutamato en la hendidura sináptica lleva a la hiperactivación de los receptores de glutamato cuyo resultado son procesos patológicos y finalmente la muerte de las células neuronales. Este proceso, denominado excitotoxicidad, se observa normalmente en los tejidos neuronales durante los trastornos neurológicos agudos y crónicos.

Cada vez es más evidente que la excitotoxicidad está implicada en la patogenia de muchos trastornos de diversa causa, tales como: lesión de la médula espinal, apoplejía, lesión cerebral traumática, hipoacusia, alcoholismo y síndrome de abstinencia alcohólica, neuropatía alcohólica, o dolor neuropático, así como enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, y enfermedad de Huntington (19-21). El desarrollo de tratamientos eficaces contra estas enfermedades sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública debido a su incidencia, así como a la falta de tratamientos curativos.

Se usan dos tipos de medicamentos para mejorar o retrasar los síntomas de la EA, que se basan en algunos moduladores de la acetilcolinesterasa y bloqueadores de los receptores NMDA de glutamato (26-27).

Para contrarrestar la excitotoxicidad, se han analizado los antagonistas de NMDAR que se dirigen a distintos sitios de este receptor. Los antagonistas acompetitivos de NMDAR se dirigen al poro del canal iónico, reduciendo de este modo la entrada de calcio en las neuronas postsinápticas. Algunos de ellos han llegado a autorizarse. Como ejemplo, la memantina está autorizada actualmente para la enfermedad de Alzheimer moderada o grave. Se ha analizado desde el punto de vista clínico en otras indicaciones que incluyen un componente de excitotoxicidad, tal como dependencia del alcohol (fase II), esclerosis lateral amiotrófica (fase III), demencia asociada al párkinson (fase II), epilepsia, enfermedad de Huntington (fase IV), esclerosis múltiple (fase IV), enfermedad de Parkinson (fase IV) y lesión cerebral traumática (fase IV). Esta molécula, sin embargo, proporciona poco beneficio en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, ya que solo tiene efectos sintomáticos modestos. Otra estrategia para limitar la excitotoxicidad consiste en la inhibición de la liberación presináptica de glutamato. El riluzol, autorizado actualmente para la esclerosis lateral amiotrófica, mostró resultados alentadores en los modelos de isquemia y de lesión cerebral traumática (22-25). En la actualidad se está analizando en ensayos de fase II con esclerosis múltiple temprana, con enfermedad de Parkinson (no muestra ningún resultado mejor que el placebo), así como con lesión de la médula espinal. En 1995, el fármaco alcanzó el estatus de fármaco huérfano para tratar la esclerosis lateral amiotrófica y en 1996 para tratar la enfermedad de Huntington. Para tratar la depresión, en el documento US2010076075 también se ha sugerido el uso de antagonistas del receptor de tipo NMDA tales como memantina, felbamato, acamprosato y MRZ 2/579.

Las patentes internacionales WO2009133128, WO2009133141, WO2009133142 y WO2011054759 describen combinaciones de fármacos para ser usadas en el tratamiento de la EA. El documento US 2009/118365 se refiere al uso de baclofeno para tratar la espasticidad asociada al dolor musculoesquelético en un paciente.

A pesar de la investigación activa en esta área, todavía existe la necesidad de tratamientos eficaces alternativos o mejorados para los trastornos neurológicos, y, en particular, los trastornos neurológicos que están relacionados con la toxicidad por glutamato y/o β -amiloides. La presente invención da a conocer nuevos tratamientos contra dichas enfermedades neurológicas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP).

Compendio de la invención

Es un objetivo de la presente invención dar a conocer composiciones para tratar la Esclerosis Múltiple. Más en particular, la invención se refiere a composiciones para tratar la Esclerosis Múltiple relacionados con la toxicidad por glutamato y/o β -amiloide, basado en una politerapia con baclofeno y acamprosato.

La invención se origina, entre otros motivos, por el descubrimiento inesperado, por parte de los inventores, de que la politerapia con baclofeno y acamprosato proporciona un beneficio considerable e inesperado a los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que esta politerapia proporciona una protección considerable e inesperada de las células neuronales frente a las diversas lesiones encontradas en los trastornos neurológicos, que incluyen la toxicidad por glutamato. De este modo, esta politerapia con baclofeno y acamprosato constituye un tratamiento eficaz para los pacientes que padecen Esclerosis Múltiple, que están predispuestos a padecerlos, o se sospecha que los padecen.

El objeto de la presente invención se refiere a una composición según se define en las reivindicaciones. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones que comprenden (i) baclofeno o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, o arbaclofeno placarbil o ácido 3-(p-clorofenil)-4-hidroxibútrico, y (ii) acamprosato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, u homotaurina o sulfonato de etil dimetil amonio propano o taurina, para usar en el tratamiento de Esclerosis Múltiple (EM).

La composición de la invención puede contener baclofeno y acamprosato como únicos ingredientes activos. Otra posibilidad es que las composiciones puedan comprender otro u otros ingredientes activos adicionales. A este respecto, otro objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una combinación de baclofeno, acamprosato, y al menos un tercer compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, ácido aminocaproico, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, ifenprodilo, moxifloxacina, bromocriptina o torasemida, para ser usada en el tratamiento de Esclerosis Múltiple en un sujeto que lo necesita.

Como se describirá adicionalmente en la presente solicitud, los compuestos en una politerapia de la invención se

pueden administrar al sujeto simultáneamente, por separado, secuencialmente y/o repetidamente.

También se describe en el presente documento cualquier composición farmacéutica *per se* que comprenda una combinación de al menos dos compuestos como se ha definido anteriormente.

5 Las composiciones de la invención comprenden típicamente además uno o varios excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Además, los compuestos como se usan en la presente invención pueden estar en forma de sal. También pueden estar en forma de formulaciones de liberación prolongada. Se pueden usar también profármacos o derivados de los compuestos.

10 En una realización preferida, el compuesto se usa como tal o en forma de una sal, hidrato, éster, éter o formas de liberación sostenida del mismo. Una sal particularmente preferida para uso en la presente invención es el acamprosato de calcio.

En otra realización preferida, se usa un profármaco o derivado.

En esta memoria también se describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, en donde el procedimiento comprende mezclar baclofeno y acamprosato en un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En esta memoria también se describe un procedimiento para tratar esclerosis múltiple en un sujeto mamífero que la necesita, preferiblemente un ser humano que la necesita, en donde el procedimiento comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de una combinación de la invención.

20 En esta memoria también se describe un procedimiento para tratar la esclerosis múltiple en un sujeto mamífero que la necesita, preferiblemente un ser humano que la necesita, en donde el procedimiento comprende la administración simultánea, por separado o secuencial de una cantidad eficaz de baclofeno y acamprosato a dicho sujeto.

La invención puede usarse para tratar la Esclerosis Múltiple en cualquier sujeto mamífero, preferiblemente en algún ser humano, en cualquier etapa de la enfermedad. Tal como se describirá en los ejemplos, las composiciones de la invención son capaces de mejorar la afección patológica de dichos sujetos.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1: Validación del modelo experimental de toxicidad por β -amiloides humana en las células endoteliales usado para la identificación sistemática de fármacos. Una hora de tratamiento previo con el VEGF a 10 nM protegió significativamente la red capilar ante esta lesión por amiloides (+70 % de la red capilar en comparación con la intoxicación por amiloides).

30 Figura 2: Efecto de la politerapia con baclofeno (BCL) y acamprosato (ACP) sobre la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con β -amiloides. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, superior a un 40 %, en comparación con las células tratadas con el vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con la politerapia con acamprosato y baclofeno (A) mientras que, a esas concentraciones, el acamprosato (B) y el baclofeno (C) en monoterapia no tienen ningún efecto significativo sobre la intoxicación. $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo; «ns»: sin efecto significativo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

40 Figura 3: Efecto de la politerapia con baclofeno (BCL) y terbinafina (TBN) sobre la longitud total de la red capilar en los cultivos de HBMEC intoxicadas con β -amiloides. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, superior a un 40 %, en comparación con las células tratadas con el vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con la politerapia con terbinafina y baclofeno. *: $p < 0,05$; significativamente diferente del control (sin intoxicación).

45 Figura 4: Validación del modelo experimental de la toxicidad por β -amiloides humanos sobre las células neuronales usado para la identificación sistemática de fármacos. Una hora de tratamiento previo con estradiol (150 nM) o BDNF (50 ng/ml) protegió significativamente las neuronas ante esta lesión por amiloides (-94 %), lo que se considera como un control positivo para la neuroprotección. *: $p < 0,05$; significativamente diferente del control (sin intoxicación); $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

50 Figura 5: Efecto de la politerapia con acamprosato (ACP) y baclofeno (BCL) sobre la liberación de LDH en la toxicidad de $A\beta_{1-42}$ humano en las células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con el vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con la politerapia con acamprosato y baclofeno (A) mientras que, a esas concentraciones, el acamprosato (B) y el baclofeno (C) en monoterapia no tienen ningún efecto significativo sobre la intoxicación. $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente ante la intoxicación por $A\beta_{1-42}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente de vehículo; «ns»: sin efecto significativo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 6: Efecto de la politerapia con cinacalcet (CNC) y sulfisoxazol (SFX) sobre la liberación de LHD en la

toxicidad por $A\beta_{1-42}$ humano en las células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con el vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con la politerapia con cinacalcet y sulfisoxazol. *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo.

5 Figura 7: Efecto de la politerapia con acamprosato (ACP) y baclofeno (BCL) sobre la longitud total de la red de neuritas en las neuronas corticales intoxicadas con β -amiloides. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, superior a un 15 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se evita significativamente con la politerapia con acamprosato y baclofeno mientras que, a esas concentraciones, el acamprosato y el baclofeno en monoterapia no tienen efecto significativo sobre la intoxicación.
10 $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 8: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre el comportamiento, según se define mediante la prueba del laberinto en Y. El péptido amiloide produce una disminución significativa de la cognición según se mide mediante el porcentaje de alternancia (un 53,8 % frente a un 73,5 %). Este efecto perjudicial se evita significativamente (un 48,2 % de protección) mediante la combinación de acamprosato (0,2 (mg/kg)/día) y baclofeno (3 (mg/kg)/día). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 9: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre la memoria según se define mediante la evitación pasiva (tiempo de espera de escape). El péptido amiloide produce una disminución significativa en los rendimientos de memoria según se mide mediante el tiempo de espera de escape en comparación con el control. Este efecto perjudicial se evita significativamente (protección completa) mediante la combinación de acamprosato (0,2 mg/kg) y baclofeno (3 mg/kg). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunn).

Figura 10: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre la memoria según se definió mediante la evitación pasiva (tiempo de espera de cruce). El péptido amiloide produce una disminución significativa de los rendimientos de memoria según se mide mediante el tiempo de espera de cruce, superior en un 44 %, en comparación con el control. Este efecto perjudicial se evita significativamente (efecto de protección de un 78,8 %) mediante la politerapia con acamprosato (0,2 mg/kg) y baclofeno (3 mg/kg) mientras que, a esas concentraciones, el acamprosato y el baclofeno en monoterapia tienen un efecto inferior sobre la intoxicación. $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunn).

Figura 11: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre la densidad de neuronas en el hipocampo. El péptido amiloide produce una disminución significativa de la densidad neuronal según se mide mediante el número de neuronas por milímetro en el hipocampo, superior a un 21 %, en comparación con el control. Esta lesión neuronal se evita significativamente (un 63,2 % de las neuronas dañadas están protegidas) mediante la combinación de acamprosato (0,2 mg/kg) y baclofeno (3 mg/kg). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 12: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre la integridad de la barrera hematoencefálica. El péptido amiloide afecta a la barrera hematoencefálica (BBB) al inducir un incremento significativo de su permeabilidad, superior al 51 %, en comparación con el control. Esos daños en la barrera hematoencefálica se evitan significativamente (restauración del 66,6 % de la integridad) mediante la politerapia con acamprosato (0,2 mg/kg) y baclofeno (3 mg/kg). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 13: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre la densidad sináptica según se refleja mediante la concentración de sinaptofisina. El péptido amiloide afecta a la función de la sinapsis al inducir una disminución significativa de la concentración de sinaptofisina en el cerebro, superior al 34 %, en comparación con el control. Los daños de la densidad sináptica se evitan significativamente (76 %) mediante la politerapia con acamprosato (0,2 (mg/kg)/día) y baclofeno (3 (mg/kg)/día). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 14: Efecto protector de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre el estrés oxidativo en el hipocampo. El péptido amiloide induce un aumento significativo del estrés oxidativo en el hipocampo según se mide mediante la peroxidación lipídica, superior al 59 %, en comparación con el control. Este estrés oxidativo se evita significativamente (65,9 %) mediante la combinación de acamprosato (0,2 (mg/kg)/día) y baclofeno (3 (mg/kg)/día). $\diamond$: $p < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,05$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 15: Efecto de la politerapia con baclofeno y acamprosato contra la toxicidad por glutamato sobre las células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato se evita significativamente mediante la politerapia con baclofeno (400 nM) y acamprosato (1,6 nM) mientras que, a esas concentraciones, el baclofeno y el acamprosato en

monoterapia no tienen ningún efecto significativo sobre la intoxicación. $\diamond$: $p < 0,001$, significativamente diferente de la intoxicación por glutamato; (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 16: Efecto de la politerapia con donepezilo, acamprosato y baclofeno sobre las actuaciones de comportamiento y cognitivas según se define mediante la prueba del laberinto en Y. El péptido amiloide produce una disminución significativa de la cognición según se mide mediante el porcentaje de alternancia (un 51,5 % frente a un 71,8 %). Este efecto perjudicial se evita significativamente (un 98 % de protección) mediante la politerapia con donepezilo (0,25 (mg/kg)/día), acamprosato (32 (mg/kg)/día) y baclofeno (480 (μ g/kg)/día), mientras que a esas concentraciones, los fármacos en monoterapia no tienen efecto significativo. $\diamond$: $p < 0,01$, significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{25-35}$; *: $p < 0,01$, significativamente diferente del vehículo (ANOVA + prueba de Dunnett *post hoc*).

Figura 17: Comparación del efecto protector del tratamiento previo con acamprosato y su derivado homotaurina en los análisis de toxicidad por $A\beta_{1-42}$ humano con células corticales primarias de rata. El $A\beta_{1-42}$ produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con el vehículo. La intoxicación se evita de forma igualmente significativa con homotaurina y acamprosato (99 %, 8 nM). $\diamond$: $p < 0,0001$; significativamente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 18: Efecto de la politerapia con acamprosato y baclofeno sobre el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental progresiva crónica (EAE, por su nombre en inglés) según se define por la puntuación clínica. La inmunización induce una disminución significativa de las características físicas según se mide mediante la puntuación clínica. Este efecto perjudicial se evita significativamente ($p < 0,01$) mediante la politerapia con acamprosato (2 (mg/kg)/día) y baclofeno (30 (mg/kg)/día).

Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer nuevas composiciones para tratar la esclerosis múltiple (EM). La invención describe nuevas combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de dichas enfermedades y se pueden usar en cualquier sujeto mamífero.

También se describen en el presente documento composiciones adecuadas para tratar cualesquiera trastornos neurológicos, sean del sistema central o periférico, en particular trastornos en los que están implicadas lesiones a nervios o neuronas, excitotoxicidad por β -amiloides, por degradación de la BBB, o por glutamato. Ejemplos específicos de tales trastornos incluyen enfermedades neurodegenerativas, neuropatías, lesión de la médula espinal y abuso de sustancias como alcoholismo.

Trastornos neurodegenerativos hacen referencia a enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer y los trastornos relacionados, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), que incluyen una pérdida progresiva del funcionamiento de las neuronas y su muerte.

Las neuropatías hacen referencia a afecciones en las que están dañados los nervios del sistema nervioso periférico; esto incluye daños del sistema nervioso periférico provocados por factores genéticos, por enfermedad inflamatoria, o por sustancias químicas que incluyen fármacos (vincristina, oxaliplatino, alcohol etílico). El tratamiento de las neuropatías también incluye el tratamiento del dolor neuropático.

La invención es particularmente adecuada para tratar la Esclerosis Múltiple.

Tal como se usa en la presente memoria, «tratamiento» incluye la terapia, prevención, profilaxis, retraso o reducción de los síntomas provocados por, o de las causas de, las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente. La terminología tratamiento incluye en particular el control de la progresión de la enfermedad y de los síntomas asociados. La terminología tratamiento incluye en particular una protección frente a la toxicidad ocasionada por β -amiloides, o una reducción o retraso de dicha toxicidad, y/o una protección frente a la excitotoxicidad por glutamato, o una reducción o retraso de dicha toxicidad, en los sujetos tratados. La terminología tratamiento también designa una mejoría de los síntomas cognitivos o una protección de las células neuronales.

La terminología «tratamiento/terapia combinatoria/de combinación o politerapia» designa un tratamiento en el que al menos se coadministran baclofeno y acamprosato a un sujeto para provocar un efecto biológico. En una politerapia de acuerdo con esta invención, los al menos dos fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los al menos baclofeno y acamprosato se pueden administrar a través de diferentes vías y protocolos. Como resultado, aunque los fármacos de una politerapia se pueden formular conjuntamente, también se pueden formular por separado.

La terminología «profármaco», tal como se usa en la presente memoria, hacen referencia a cualquier derivado funcional (o precursores) de un compuesto de la presente invención, que, cuando se administra a un sistema biológico, genera dicho compuesto como resultado de, por ejemplo, reacción o reacciones químicas espontáneas, reacción o reacciones químicas catalizadas enzimáticamente, y/o reacción o reacciones químicas metabólicas. Los profármacos normalmente son inactivos o menos activos que el fármaco resultante y se pueden usar, por ejemplo,

para mejorar las propiedades fisicoquímicas del fármaco, para dirigir el fármaco a un tejido específico, para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco y/o para reducir los efectos secundarios indeseados. Algunos de los grupos funcionales frecuentes que son susceptibles de diseño de profármaco incluyen, pero no se limitan a, grupos carboxílico, hidroxilo, amina, fosfato/fosfonato y carbonilo. Los profármacos típicamente producidos mediante la modificación de estos grupos incluyen, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas y fosfatos. La orientación técnica específica para la selección de profármacos adecuados es de conocimiento común general (29-33). Además, la preparación de profármacos se puede realizar mediante los procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los procedimientos que se pueden usar para sintetizar otros profármacos se describen en numerosas revisiones sobre el tema (30; 34-40). Por ejemplo, el arbaclofeno placarbilo aparece en la base de datos de ChemID plus Advance (página web: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) y el arbaclofeno placarbilo es un profármaco bien conocido del baclofeno (41-42).

La terminología «derivado» de un compuesto incluye cualquier molécula que está funcional y/o estructuralmente relacionada con dicho compuesto, tal como un ácido, amida, éster, éter, variante acetilada, variante hidroxilada, o una variante alquilada (C₁-C₆) de tal compuesto. La terminología «derivado» también incluye compuestos relacionados estructuralmente que han perdido uno o más sustituyentes según se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, la homotaurina es un derivado desacetilado del acamprosato. Los derivados preferidos de un compuesto son moléculas que tienen un grado sustancial de similitud con dicho compuesto, tal como se determina mediante los procedimientos conocidos. Los compuestos similares, junto con sus índices de similitud con una molécula precursora, se pueden encontrar en numerosas bases de datos tales como PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) o DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>). En una realización más preferida, los derivados deberían tener un índice de similitud de Tanimoto mayor de 0,4, preferiblemente mayor de 0,5, más preferiblemente mayor de 0,6, incluso más preferiblemente mayor de 0,7, con un fármaco precursor. El índice de similitud de Tanimoto se usa ampliamente para medir el grado de similitud estructural entre dos moléculas. El índice de similitud de Tanimoto se puede calcular mediante software tal como el Detector Subgrafo de Moléculas Pequeñas (43-44), disponible en línea (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Los derivados preferibles deberían estar relacionados tanto estructural como funcionalmente con un compuesto precursor, es decir, que también deberían retener al menos parte de la actividad del fármaco precursor, más preferiblemente deberían tener una actividad protectora frente a la toxicidad por Aβ o por glutamato.

La terminología «derivados» también incluye metabolitos de un fármaco, por ejemplo, una molécula que es resultado de la modificación o modificaciones (bioquímicas) o procesamiento de dicho fármaco después de la administración a un organismo, normalmente a través de sistemas enzimáticos especializados, y que muestra o retiene una actividad biológica del fármaco. Se han descrito metabolitos que son responsables de gran parte de la acción terapéutica del fármaco precursor. En una realización específica, un «metabolito» tal como se usa en la presente memoria designa un fármaco modificado o procesado que retiene al menos parte de la actividad del fármaco precursor, preferiblemente que tiene una actividad protectora frente a la toxicidad por Aβ o a la toxicidad por glutamato.

La terminología «sal» se refiere a una sal por adición de ácido inorgánico u orgánico, farmacéuticamente aceptable y relativamente no tóxica, de un compuesto de la presente invención. La formación de la sal farmacéutica consiste en el emparejamiento de una molécula de fármaco ácido, básico o zwitteriónico con un contraión para crear una versión salina del fármaco. En la reacción de neutralización se pueden usar una amplia variedad de especies químicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen, por lo tanto, las obtenidas al hacer reaccionar el compuesto principal, que actúa como una base, con un ácido inorgánico u orgánico para formar una sal, por ejemplo, sales del ácido acético, ácido nítrico, ácido tartárico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico o ácido cítrico. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención también incluyen aquellas en las que las principales funciones del compuesto son como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, o colina. Aunque la mayor parte de las sales de un principio activo dado son bioequivalentes, algunas pueden tener, entre otras, propiedades de aumento de solubilidad o de biodisponibilidad. La selección de sales es ahora una operación convencional común en el procedimiento de desarrollo de fármacos tal como enseñaron H. Stahl y C.G. Wermuth en su manual (45).

Según se explica anteriormente, en el presente documento se describen combinaciones de fármacos particulares que tienen un efecto fuerte inesperado sobre varios procesos biológicos implicados en los trastornos neurológicos. Por lo tanto, estas combinaciones de fármacos representan nuevas estrategias para tratar los trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer y los trastornos relacionados, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o síndrome de abstinencia alcohólica, y lesión de la médula espinal. Más específicamente, la invención describe composiciones, que comprenden el baclofeno en combinación con acamprosato, que proporcionan un efecto significativo *in vivo* sobre los trastornos neurológicos.

De hecho, se muestra en la parte experimental, que las politerapias que comprenden baclofeno y acamprosato pueden mejorar de manera importante la afección de los pacientes que sufren trastornos neurológicos. En particular, los inventores han descubierto sorprendentemente que las politerapias con baclofeno y acamprosato tienen un efecto fuerte e inesperado sobre la longitud de la red capilar o sobre la liberación de LDH en las células nerviosas intoxicadas con β-amiloides, y representan nuevas estrategias terapéuticas contra la EA. Además, los ejemplos

muestran que, en una politerapia de la invención, el baclofeno puede ser eficaz a una dosis de 80 nM o inferior, y que el acamprosato puede ser eficaz a una dosis de 1 nM o inferior. Estos resultados son notables y particularmente ventajosos ya que, en dosis tan bajas, se evita cualquier posible efecto secundario.

Además, estas combinaciones protegen con eficacia a las células neuronales de diversas afecciones tales como la toxicidad por glutamato, el estrés oxidativo, y evita la permeabilización de la BBB o la apoptosis inducida de las células neuronales que están implicadas en varios trastornos neurológicos.

Por lo tanto, la presente invención propone una nueva terapia para los trastornos neurológicos, basada en composiciones de baclofeno y acamprosato. Más en particular, la presente invención describe una nueva terapia para la Esclerosis Múltiple.

En este sentido, en una realización particular, la invención se refiere a una composición que comprende baclofeno y acamprosato para su uso en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple.

La invención describe también el uso de baclofeno y acamprosato para la fabricación de un medicamento para tratar la EM. Los números CAS ilustrativos para el baclofeno y el acamprosato se dan a conocer en la tabla 1 que viene a continuación. La tabla 1 también indica, de una manera no limitativa, sales comunes, racematos, profármacos, metabolitos o derivados de estos compuestos usados en las composiciones de la invención.

Tabla 1

Fármaco	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
Acamprosato y compuestos relacionados		
Acamprosato	77337-76-9 ; 77337-73-6	ND
Homotaurina	3687-18-1	0,73
Sulfonato de etil dimetil amonio propano	/	0,77
Taurina	107-35-7	0,5
Baclofeno y compuestos relacionados		
Baclofeno	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3	ND
Acido 3-(p-clorofenil)-4-hidroxibutírico	/	Metabolito
Arbaclofeno placarbilo	847353-30-4	Profármaco

En Hanafi et al., 2011 (41) se proporcionan ejemplos específicos de profármacos de baclofeno, en particular ésteres de baclofeno y carbamatos de ésteres de baclofeno, que son de interés particular para el envío al SNC. El baclofeno placarbilo, tal como se ha mencionado anteriormente, también es un profármaco bien conocido y, por lo tanto, se puede usar en lugar del baclofeno en las composiciones de la invención.

El baclofeno y el acamprosato se pueden usar solos o se pueden combinar adicionalmente con otros compuestos. En este sentido, en una realización en particular, las composiciones de la invención pueden comprender adicionalmente al menos un compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, ácido aminocaproico, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, ifenprodilo, moxifloxacina, bromocriptina o torasemida. Los números CAS ilustrativos para cada uno de estos compuestos se dan a conocer en la tabla 2 que viene a continuación:

Tabla 2

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Ácido aminocaproico	60-32-2
Bromocriptina	25614-03-3
Cabergolina	81409-90-7
Carbenoxolona	5697-56-3
Cinacalcet	226256-56-0
Cinarizina	298-57-7
Dietilcarbamazina	90-89-1
Difilina	479-18-5
Eplerenona	107724-20-9
Etomidato	33125-97-2
Fenoldopam	67227-57-0
Ifenprodilo	23210-56-2 o 23210-58-4
Leflunomida	75706-12-6
Levosimendán	141505-33-1
Metimazol	60-56-0
Mexiletina	5370-01-4 o 31828-71-4
Moxifloxacina	354812-41-2
Fenformina	114-86-3
Prilocaína	721-50-6 o 14289-31-7 o 14289-32-8
Quinacrina	83-89-6
Sulfisoxazol	127-69-5
Sulodexida	57821-29-1
Terbinafina	91161-71-6
Torasemida	56211-40-6 o 72810-59-4
Trimetazidina	5011-34-7 o 13171-25-0
Zonisamida	68291-97-4

En una realización particular, la invención se refiere al uso de esta combinación para tratar la EM o un trastorno relacionado en un sujeto que la necesita. Tal como se describe en los ejemplos, las politerapias que usan al menos baclofeno y acamprosato tienen un fuerte efecto inesperado sobre los procesos biológicos que conducen a lesiones neuronales. Además, estas politerapias también mostraron *in vivo* una capacidad muy eficaz para corregir los síntomas de las enfermedades neurológicas. Estas combinaciones representan por lo tanto nuevas estrategias para tratar trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o síndrome de abstinencia alcohólica, y lesión de la médula espinal. Estas composiciones evitan de forma eficaz la toxicidad del péptido β -amiloide ($A\beta$) o la excitotoxicidad por glutamato sobre las células neuronales. Además, *in vivo*, estas composiciones conducen a una mejoría de varios síntomas

cognitivos, así como a una protección de las células neuronales. Por lo tanto, representan procedimientos nuevos y potentes para tratar dichos trastornos.

El apartado experimental muestra, además, que las composiciones que se han mencionado anteriormente también son eficaces i) en la protección, de forma sinérgica, de las células neuronales *in vitro* frente a la excitotoxicidad por glutamato, y ii) en conferir beneficio clínico en modelos *in vivo* para las enfermedades relacionadas con la excitotoxicidad por glutamato.

Las composiciones de la invención pueden comprender 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, más preferiblemente 2, 3 o 4 fármacos distintos para la politerapia EM en un sujeto que la necesita. En una realización preferida, los fármacos de la invención se usan en combinación o combinaciones para la administración combinada, por separado o secuencial, con el fin de proporcionar el efecto más eficaz.

La invención describe composiciones para ser usadas en el tratamiento de EM, que comprenden una de las siguientes combinaciones de fármacos, para la administración combinada, por separado o secuencial:

- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato y dietilcarbamazina,
- baclofeno y acamprosato y cinacalcet,
- baclofeno y acamprosato y sulfisoxazol,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- baclofeno y acamprosato e ifenprodilo,
- baclofeno y acamprosato y mexiletina,
- baclofeno y acamprosato y eplerenona,
- baclofeno y acamprosato y levosimendán,
- baclofeno y acamprosato y terbinafina, o
- baclofeno y acamprosato y leflunomida.

Tal como se describe en el apartado experimental, las politerapias proporcionan en los seres humanos un efecto terapéutico y biológico sustancial que mejora la enfermedad de Alzheimer o los trastornos relacionados. Ellas inducen un fuerte efecto neuroprotector frente a la toxicidad por A β y dan resultados positivos en actuaciones de comportamiento y en ensayos bioquímicos *in vivo*. Los resultados muestran que las composiciones de la invención i) corrigen de manera eficaz las vías moleculares desencadenadas, *in vivo*, por agregados de A β y ii) conducen a la mejoría de las deficiencias neurofisiológicas observadas en los animales enfermos tal como la supervivencia neuronal o la integridad de las sinapsis.

Además, los resultados presentados también muestran que las politerapias anteriores tienen un importante efecto neuroprotector sinérgico frente a la excitotoxicidad por glutamato (figura 15), una vía que está implicada en diversas enfermedades neurológicas tales como EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o síndrome de abstinencia alcohólica, o lesión de la médula espinal. Estos tratamientos dan resultados positivos en los modelos *in vivo* o *in vitro* de estas enfermedades.

Además, los resultados *in vivo* también muestran que las composiciones de la invención restauran de forma eficaz la integridad de la barrera hematoencefálica y evitan, retrasan, o disminuyen el mecanismo que desencadena la apoptosis, que se sabe que está alterado en varias enfermedades neurológicas.

Además, la interacción sinérgica particularmente elevada observada para estos dos fármacos permite usar concentraciones de fármaco que no muestran ningún efecto cuando se usan en monoterapia. Además, tal como se muestra en la sección experimental, la politerapia con baclofeno y acamprosato potencia el beneficio terapéutico para la enfermedad de Alzheimer en comparación con otras politerapias. Estas composiciones evitan con eficacia los efectos tóxicos de la proteína o del péptido β -amiloide sobre las células humanas y en un modelo *in vivo*, y representan nuevos y potentes procedimientos para tratar dicho trastorno.

Por tanto, esta invención también describe una composición como se define arriba para tratar la EM. Tal como se ha indicado anteriormente, en una politerapia de la presente invención, los compuestos o fármacos se pueden formular juntos o por separado, y se administran juntos, por separado o secuencialmente.

En esta memoria también se describe el uso de una composición tal como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar la EM.

Las composiciones de la invención comprenden típicamente uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, para su uso en la presente invención, los fármacos o los compuestos normalmente se mezclan con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 En este sentido, esta invención describe un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, en donde el procedimiento comprende la mezcla de los compuestos anteriores en un excipiente o vehículo apropiado.

Por ejemplo, la invención describe un procedimiento que comprende mezclar baclofeno y acamprosato en un excipiente o vehículo apropiado.

10 De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, tal como se ha indicado anteriormente, los compuestos se usan tal cual o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, un profármaco, un derivado, o una forma de liberación sostenida de los mismos.

Aunque es muy eficaz *in vitro* e *in vivo*, según el sujeto o la afección específica, la politerapia de la invención se puede usar adicionalmente en conjunto o en asociación o en combinación con otros fármacos o tratamientos beneficiosos para la afección neurológica tratada en los sujetos.

15 También se describen en el presente documento otros tratamientos que se usan conjuntamente con el fármaco o fármacos o con la combinación o combinaciones de fármaco o fármacos de acuerdo con la presente invención, pueden comprender uno o varios fármacos que mejoran los síntomas de la EM, o el fármaco o fármacos que se podrían usar para el tratamiento paliativo de este trastorno. Por ejemplo, los resultados muestran también que las politerapias que se han mencionado anteriormente tienen un importante efecto sinérgico de neuroprotección cuando se combinan con donepezilo (figura 16). De este modo, los tratamientos ilustrativos que se pueden usar con las politerapias de la invención son donepezilo (CAS: 120014-06-4), gabapentina (CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), rivastigmina (123441-03-2) o memantina (CAS: 19982-08-2).

20 En este sentido, en una realización en particular, las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden combinar adicionalmente con extractos de *Ginkgo biloba*. Los extractos adecuados incluyen, sin limitación, extractos de *Ginkgo biloba*, extractos de *Ginkgo biloba* mejorados (por ejemplo enriquecidos con ingredientes activos o con reducción de contaminantes) o cualquier fármaco que contenga extractos de *Ginkgo biloba*.

25 El tratamiento de acuerdo con la invención se puede administrar en casa, en la consulta del médico, en clínicas, en ambulatorios, o en un hospital, de modo que el médico pueda observar los efectos del tratamiento de cerca y hacer los ajustes que sean necesarios.

30 La duración del tratamiento depende de la etapa de la enfermedad que se está tratando, de la edad y la afección del paciente, y de cómo responde el paciente al tratamiento. La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada componente de la politerapia se pueden controlar de forma independiente. Por ejemplo, un fármaco se puede administrar por vía oral, mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La politerapia se puede administrar en ciclos de administración y descanso que incluyen períodos de descanso para que el organismo del paciente tenga la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario imprevisto hasta la fecha. Los fármacos también se pueden formular juntos de tal manera que todos los fármacos se introducen con una administración.

35 La administración de cada fármaco de la politerapia puede ser mediante cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del fármaco que, combinado con el otro componente, sea capaz de mejorar la afección del paciente o de tratar de manera eficaz la enfermedad o el trastorno.

40 Si bien es posible que los fármacos de la combinación se administren como el producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, a la que también se hace referencia en el presente contexto como formulación farmacéutica. Las composiciones posibles incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica (que incluyen transdérmica, vestibular y sublingual), o parenteral (que incluyen subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

45 Es más habitual que estas formulaciones farmacéuticas se prescriban al paciente en «envases para el paciente» que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de las dosis individuales medidas para ser usadas durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, normalmente en un envase de tipo blíster. Los envases para el paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en las que un farmacéutico divide el suministro de un producto farmacéutico para un paciente a partir de un suministro a granel, en los que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el envase para el paciente, que normalmente falta en las prescripciones tradicionales. La inclusión de un prospecto ha demostrado mejorar el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Por lo tanto, la invención incluye adicionalmente una formulación farmacéutica, según se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con el material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En dicho envase para el paciente, el uso previsto de una formulación para politerapia se puede deducir de las instrucciones, instalaciones, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar al uso de la formulación más adecuada para el tratamiento. Dichas medidas hacen que un envase para el paciente sea específicamente adecuado y esté adaptado para ser usado en el tratamiento con la

politerapia de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido, en cualquier cantidad apropiada, en cualquier sustancia de vehículo adecuada. El fármaco puede estar presente en una cantidad de hasta un 99 % en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración oral, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalada, cutánea (parche), u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, 5 píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, pociones, dispositivos para administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones, o aerosoles.

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

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para liberar básicamente el fármaco activo inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o período de tiempo predeterminado después de la administración.

Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración básicamente constante del fármaco en el organismo durante un período de tiempo prolongado, (ii) formulaciones que después de un lapso de tiempo predeterminado crean una concentración básicamente constante del fármaco dentro del organismo durante un período de tiempo prolongado, (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un período de tiempo predeterminado al mantener un nivel de fármaco relativamente eficaz y constante en el organismo con una minimización simultánea de los efectos secundarios indeseables asociados a las fluctuaciones de la concentración plasmática de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, mediante la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo, o en él, y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco mediante el uso de vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula diana en particular.

La administración de fármacos en la forma de una formulación de liberación controlada es especialmente preferible en los casos en los que el fármaco tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración en el plasma que conduce a efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración en el plasma que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación de la dosis letal media (DL50) a la dosis eficaz media (DE50)), (ii) una ventana de absorción estrecha en el tubo digestivo, o (iii) una semivida biológica muy corta de manera que se requiere una dosificación frecuente durante un día con el fin de mantener la concentración en el plasma a un nivel terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de una serie de estrategias con el fin de obtener la liberación controlada en la que la velocidad de liberación es mayor que la tasa de metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante la selección apropiada de diversos parámetros de formulación e ingredientes, que incluyen, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y revestimientos de liberación controlada. Por lo tanto, el fármaco se formula con los excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, después de la administración, libera el fármaco de una manera controlada (composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias individuales o múltiples, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches, y liposomas).

Formas sólidas de dosificación para uso oral

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

Los comprimidos pueden estar sin revestir o se pueden revestir mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y la absorción en el tubo digestivo para proporcionar así una acción sostenida durante más tiempo. El revestimiento puede estar adaptado para liberar la sustancia farmacológicamente activa con un patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o puede estar adaptada para que no libere la sustancia farmacológicamente activa hasta después de pasar por el estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento pelculado (por ejemplo, a base

de hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (por ejemplo, a base de copolímero de ácido metacrílico, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca, y/o etilcelulosa). Se puede usar un material de retardo temporal tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de los cambios químicos no deseados, (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia activa farmacológica). El revestimiento se puede aplicar sobre la forma de dosificación sólida de una manera similar a la que se describe en la Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Los fármacos se pueden mezclar juntos en el comprimido o se pueden dividir. Por ejemplo, un primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y un segundo fármaco está en el exterior, de tal manera que una porción sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar en forma de comprimidos masticables, o como cápsulas duras de gelatina en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas blandas de gelatina en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida, o aceite de oliva. Los polvos y los granulados se pueden preparar con los ingredientes que se han mencionado anteriormente en comprimidos y cápsulas de una manera convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral, por ejemplo, se pueden preparar para liberar el fármaco activo mediante el control de la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológicamente activa.

La liberación controlada por disolución o por difusión se puede conseguir mediante el revestimiento apropiado de un comprimido, cápsula, microgránulo, o formulación granulada de fármacos, o mediante la incorporación del fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento que se han mencionado anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, glicocera, cera de ricino, cera de carnaúba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol, y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnaúba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarburo halogenado.

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

Líquidos para administración oral

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

Composiciones parenterales

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

Las composiciones para uso parenteral se pueden dar a conocer en formas de dosificación individual (por ejemplo, en ampollas de dosis individuales), o en viales que contienen varias dosis y en las que se puede añadir un conservante adecuado (véase a continuación). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de administración para la implantación o se puede presentar en forma de un polvo seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su

uso. Aparte del fármaco o fármacos activos, la composición puede incluir vehículos y/o excipientes adecuados aceptables para la vía parenteral. El fármaco o fármacos activos se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares, para la liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes de ajuste del pH, y/o agentes dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el fármaco o fármacos activos adecuados se disuelven o se suspenden en un vehículo líquido aceptable para la vía parenteral. Entre los vehículos y los disolventes aceptables que se pueden usar están el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro de sodio. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, de etilo o de n-propilo). En los casos en los que solo uno de los fármacos es moderadamente o poco hidrosoluble, se puede añadir un agente solubilizador o potenciador de la disolución, o el disolvente puede incluir un 10-60 % p/p de propilenglicol o similar.

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

Vías alternativas

25 Aunque es menos preferible y menos ventajoso, se pueden contemplar otras vías de administración, y por lo tanto otras formulaciones. En este sentido, para la aplicación rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen los supositorios (de tipo emulsión o suspensión), y las cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación típica de supositorio, el fármaco o fármacos activos se combinan con una base de supositorio apropiada farmacéuticamente aceptable tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada, y diversas bases hidrosolubles o dispersables como polietilenglicoles. Se pueden incorporar diversos aditivos, potenciadores, o tensioactivos.

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

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

45 Las composiciones farmacéuticas que se han descrito anteriormente para la administración tópica en la piel también se pueden usar en conexión con la administración tópica en o cerca de la parte del organismo que se va a tratar. Las composiciones se pueden adaptar para su aplicación directa o para la aplicación por medio de dispositivos de administración de fármacos especiales tales como apósitos, o como alternativa emplastos, compresas, esponjas, tiras, u otras formas de material flexible adecuado.

Dosificaciones y duración del tratamiento

50 Se observará que los fármacos de la politerapia se pueden administrar de forma simultánea, ya sea en la misma o en diferentes formulaciones farmacéuticas o secuencialmente. Si hay administración secuencial, el retraso en la administración del segundo (o adicional) ingrediente activo no debería ser tal como para perder el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una politerapia de acuerdo con esta descripción es que la politerapia debería tener como objetivo el uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso previsto de una politerapia se puede inferir a partir de instalaciones, suministros, adaptaciones y/u otros medios para ayudar con el uso de la combinación de acuerdo con la invención.

55 Las cantidades terapéuticamente eficaces de los fármacos en una combinación de la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que son eficaces para reducir los síntomas, detener o ralentizar la progresión de la enfermedad una vez que se ha manifestado clínicamente, o prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la

enfermedad.

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

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

La terminología «forma de dosificación unitaria» se refiere a unidades físicamente independientes (tales como cápsulas, comprimidos, o cilindros de jeringas cargadas) adecuadas como dosificaciones unitarias para seres humanos, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material o materiales calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La cantidad de cada fármaco en una composición de dosificación individual preferida depende de varios factores que incluyen el procedimiento de administración, la masa corporal y la edad del paciente, la etapa de la enfermedad, el riesgo de posibles efectos secundarios en función del estado de salud general de la persona a tratar. Además, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de un agente terapéutico) acerca de un paciente en particular puede afectar a la dosis usada.

Excepto cuando se responde a los casos especialmente muy afectados, en los que se pueden requerir dosis más altas, la dosificación preferida de cada fármaco en la politerapia normalmente se encontrará dentro del intervalo de dosis no superior a la dosificación que normalmente se prescribe para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o se ha demostrado que son seguras en los estudios clínicos de fase III.

Una ventaja notable de la invención es que cada compuesto se puede usar a dosis bajas en una politerapia, mientras que produce, en politerapia, un beneficio clínico considerable para el paciente. La politerapia puede ser eficaz de hecho a dosis en las que los compuestos tienen en monoterapia un bajo efecto o ningún efecto. En consecuencia, una ventaja particular de la invención reside en la capacidad de usar dosis subóptimas de cada compuesto, es decir, dosis que son más bajas que las dosis terapéuticas que se prescriben normalmente, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5, o incluso más preferiblemente 1/10 de las dosis terapéuticas. En los ejemplos particulares, se usan dosis de tan solo 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, o incluso inferiores, de las dosis terapéuticas.

A dichas dosificaciones subterapéuticas, los compuestos no presentarían ningún efecto secundario, mientras que la combinación o combinaciones de acuerdo con la invención son totalmente eficaces.

Una dosificación preferida corresponde a cantidades de un 1 % a un 50 % de las que se prescriben normalmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

La dosificación más preferida puede corresponder a cantidades de un 1 % a un 10 % de las que se prescriben normalmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

Los ejemplos específicos de dosificaciones de fármacos para uso en la invención se proporcionan a continuación:

- Acamprosato entre 1 y 1000 mg/día, preferiblemente inferior a 400 mg al día, más preferiblemente inferior a 200 mg/día, incluso más preferiblemente inferior a 50 mg/día, en donde dichas dosificaciones son particularmente adecuadas para la administración oral.

- Baclofeno entre 0,01 y 150 mg al día, preferiblemente inferior a 100 mg al día, más preferiblemente inferior a 50 mg/día, incluso más preferiblemente inferior a 25 mg/día, en donde dichas dosificaciones son particularmente adecuadas para la administración oral.

- Ácido aminocaproico por vía oral de aproximadamente 0,1 g a 2,4 g al día,

- Bromocriptina por vía oral de aproximadamente 0,01 a 10 mg al día,

- Dietilcarbamazina por vía oral de aproximadamente 0,6 a 600 mg al día,

- Cabergolina por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día,

- Cinacalcet por vía oral de aproximadamente 0,3 a 36 mg al día,

- Cinarizina por vía oral de aproximadamente 0,6 a 23 mg al día,

- Difilina por vía oral de aproximadamente 9 a 320 mg al día,

- Eplerenona por vía oral de aproximadamente 0,25 a 10 mg al día,

- Ifenprodilo por vía oral de aproximadamente 0,4 a 6 mg al día,
- Leflunomida por vía oral de aproximadamente 0,1 a 10 mg al día,
- Levosimendán por vía oral de aproximadamente 0,04 a 0,8 mg al día,
- Mexiletina por vía oral de aproximadamente 6 a 120 mg al día,
- Moxifloxacina por vía oral de aproximadamente 4 a 40 mg al día,
- Fenformina por vía oral de aproximadamente 0,25 a 15 mg al día,
- Quinacrina por vía oral de aproximadamente 1 a 30 mg al día,
- Sulfisoxazol por vía oral de aproximadamente 20 a 800 mg al día,
- Sulodexida por vía oral de aproximadamente 0,05 a 40 mg al día,
- Terbinafina por vía oral de aproximadamente 2,5 a 25 mg al día,
- Torasemida por vía oral de aproximadamente 0,05 a 4 mg al día,
- Trimetazidina por vía oral de aproximadamente 0,4 a 6 mg al día,
- Zonisamida por vía oral de aproximadamente 0,5 a 50 mg al día.

Cuando la composición comprende, como principio activo, solamente baclofeno y acamprosato, estos dos compuestos se pueden usar en diferentes proporciones, por ejemplo, a una proporción en peso de acamprosato/baclofeno comprendida entre 0,05 y 1000 (p/p), preferiblemente entre 0,05 y 100 (p/p), más preferiblemente entre 0,05 y 50 (p/p).

Se habrá de entender que la cantidad del fármaco administrado en realidad será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección o afecciones a tratar, la composición exacta a administrar, la edad, el peso, y la respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente, y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores están destinados a proporcionar una orientación general y apoyo para las enseñanzas en la presente memoria, pero no se pretende que limiten el alcance de la invención.

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

Ejemplos

El cuidado y la cría de animales, así como las experimentaciones, se realizan de acuerdo con las directrices del Comité de Investigación y Cuestiones Éticas de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (I.A.S.P.) (1983).

A) TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA TOXICIDAD POR A β

Estos experimentos son sólo con fines ilustrativos. En esta serie de experimentos, a las politerapias candidatas se les ha analizado su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del A β ₁₋₄₂ humano. El A β ₁₋₄₂ es el péptido completo que constituye los agregados encontrados en las biopsias de pacientes humanos que padecen la EA. El efecto se determina en diversos tipos de células, para documentar adicionalmente la actividad de las combinaciones en modelos *in vitro* que ilustran diferentes características fisiológicas de la EA. Los estudios *in vivo* también se realizan en un modelo de ratón para la EA que confirma este efecto protector mediante la evaluación del efecto de las combinaciones sobre i) el comportamiento cognitivo de los animales y ii) en los distintivos moleculares (inducción de la apoptosis, inducción de estrés oxidativo, inducción de la vía de inflamación) de la EA.

I. LAS POLITERAPIAS DE BACLOFENO Y ACAMPROSATO EVITAN LA TOXICIDAD DEL A β ₁₋₄₂ HUMANO IN VITRO

I.1. Efecto sobre la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano sobre células HBME humanas

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

Las células cerebrales endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC, ScienCell Ref: 1000, congeladas en el pase 10) se descongelaron rápidamente en un baño de agua a +37 °C. El sobrenadante se puso inmediatamente en 9 ml de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Pan Biotech ref: P04-03600) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (FCS; GIBCO ref: 10270-106). La suspensión celular se centrifugó a 180 x g durante 10 min a +4 °C y los sedimentos se suspendieron en medio CSC sin suero (CSC sin suero, Cell System,

Ref: SF-4Z0-500-R, Lote 51407-4) con un 1,6 % de RocketFuel sin suero (Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, Lote 54102), un 2 % de penicilina a 10.000 U/ml y estreptomycin a 10 mg/ml (PS; Pan Biotech ref: P06-07100 lote 133080808) y se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (sistema de angiogénesis biocoat con capa de matrigel, BD, Ref 354150, lote A8662) en un volumen final de 100 µl. En el soporte de matrigel, las células cerebrales endoteliales comenzaron espontáneamente el proceso de morfogénesis de la red capilar (33).

Se realizaron tres cultivos independientes por afección, 6 pocillos por afección.

Tratamiento con los compuestos problema y con el amiloide β_{1-42} humano

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

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

Una hora después de la siembra de las HBMEC sobre matrigel, los compuestos problema y el VEGF-165 se disolvieron en el medio de cultivo (+ DMSO al 0,1 %) y a continuación se incubó con HBMEC durante 1 hora antes de la aplicación del $A\beta_{1-42}$ (en un volumen final por pocillo de cultivo de 100 µl). Una hora después de la incubación de los compuestos problema o el VEGF (dos horas después de la siembra de células sobre matrigel), se añadieron 100 µl del péptido $A\beta_{1-42}$ a una concentración final de 2,5 µM diluido en medio de control en presencia de los compuestos problema o del VEGF (en un volumen/pocillo total de 200 µl), para impedir que el fármaco se diluya más.

Organización de las placas de cultivo

Se sabe que el VEGF-165 es una isoforma proangiogénica del VEGF-A, y se usó para todos los experimentos de este estudio como compuesto de referencia. El VEGF-165 es una de las isoformas del VEGF más abundante implicadas en la angiogénesis. El VEGF se usó como compuesto problema de referencia a 10 nM (figura 1).

Se valoraron las siguientes condiciones:

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

Cuantificación de la red capilar

Se tomaron 2 fotografías por pocillo con lentes de 4x, usando el analizador InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) en transmisión de luz. Todas las imágenes se tomaron en las mismas condiciones. El análisis de las redes de la angiogénesis se realizó con el software Developer (GE Healthcare). Se valoró la longitud total de la red capilar.

Procesamiento de datos

Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin amiloides = 100 %) para expresar la lesión por amiloides. Todos los valores se expresaron como media $\pm$ SEM (error estándar de la media) de los 3 cultivos (n = 6 pocillos por afección). Los análisis estadísticos se realizaron en las diferentes condiciones (ANOVA UNILATERAL seguido por la prueba de Dunnett cuando se podía, versión 5.0 del software Statview).

Resultados

La combinación de baclofeno y acamprosato proporciona un efecto protector significativo frente a la toxicidad del péptido $A\beta_{1-42}$ humano en el modelo de HBMEC (se observa una reducción de un 24 % de la lesión por el péptido $A\beta_{1-42}$), tal como se muestra en la figura 2. Los resultados muestran claramente que la intoxicación por el péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 2,5 µM) se evita significativamente mediante la politerapia farmacológica, mientras que, a esas concentraciones, los fármacos en monoterapia no tienen efecto significativo sobre la intoxicación en las condiciones experimentales que se han descrito anteriormente.

Por el contrario, la politerapia con baclofeno y terbinafina (que se presenta aquí sólo para fines de comparación)

proporciona una protección más débil (se observa una reducción de un 15 % de la lesión por el péptido A β_{1-42}) frente al A β_{1-42} (figura 3).

Así pues, aunque estas dos combinaciones permiten una protección frente al A β_{1-42} , destaca con claridad la politerapia con baclofeno y acamprosato. En efecto, estos fármacos a concentraciones que no tienen ningún efecto en monoterapia permiten la protección significativa de las células HBME humanas frente al A β_{1-42} cuando se usan en politerapia. Además, la politerapia con baclofeno y acamprosato es más eficaz que la politerapia con baclofeno y terbinafina. Dicho efecto del baclofeno y del acamprosato representa una mejora notable de un 60 % en comparación con, por ejemplo, el efecto de la politerapia con baclofeno y terbinafina.

Además, la concentración de baclofeno usada en la politerapia con baclofeno y acamprosato es mucho menor que la concentración de baclofeno usada en la politerapia con baclofeno y terbinafina (reducción de 25 veces).

I.2 Efecto sobre la toxicidad del péptido A β_{1-42} humano sobre las células de neuronas corticales primarias.

Cultivo de neuronas corticales primarias

Se cultivaron neuronas corticales de rata tal como se ha descrito en Singer et al. (47). Las ratas hembra recién preñadas de 15 días de gestación se sacrificaron por dislocación cervical (ratas Wistar) y los fetos se retiraron del útero. Se retiró la corteza y se colocó en un medio de Leibovitz (L15) enfriado con hielo que contenía un 2 % de penicilina a 10.000 U/ml y estreptomycin a 10 mg/ml, y un 1 % de seroalbúmina bovina (BSA). Las cortezas se disociaron por tripsinización durante 20 min a 37 °C (0,05 %). La reacción se detuvo mediante la adición de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía DNasal de calidad II y un 10 % de suero de ternera fetal (FCS). Las células se disociaron mecánicamente entonces mediante 3 pases seguidos a través de una pipeta de 10 ml y se centrifugaron a 515 x g durante 10 min a +4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un medio de cultivo definido que consistía en Neurobasal complementado con B27 (2 %), L-glutamina (0,2 mM), un 2 % de solución de PS y 10 ng/ml de BDNF. Las células viables se contaron en un citómetro de Neubauer usando el ensayo de exclusión con azul tripano. Las células se sembraron a una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se revistieron previamente con poli-L-lisina (10 µg/ml)) y se cultivaron a +37 °C en un aire humidificado (95 %)/atmósfera de CO₂ (5 %).

Se realizarán tres cultivos independientes por afección, 6 pocillos por afección.

Tratamiento con los compuestos problema y con el β_{1-42} amiloide humano

Brevemente, el péptido A β_{1-42} se reconstituyó en medio de cultivo definido a 40 µM (solución madre) y se agitó lentamente a +37 °C durante 3 días en la oscuridad. El medio de control se preparó en las mismas condiciones.

Después de 3 días, se usó la solución sobre neuronas corticales primarias como sigue a continuación:

Después de 10 días de cultivo de las neuronas, los compuestos problema se disolvieron en medio de cultivo (+ DMSO al 0,1 %) y a continuación se preincubó con neuronas durante 1 hora antes de la aplicación del A β_{1-42} (en un volumen final de cultivo por pocillo de 100 µl). Una hora después de la incubación con el compuesto o compuestos problema, se añadieron 100 µl del péptido A β_{1-42} a una concentración final de 10 µM diluido en presencia del fármaco o fármacos, para evitar que el compuesto o compuestos problema se diluyan más. Las neuronas corticales se intoxicaron durante 24 horas. Se realizaron tres cultivos independientes por afección, 6 pocillos por afección.

Se usaron BDNF (50 ng/ml) y estradiol- β (150 nM) como control positivo y compuesto de referencia, respectivamente. Se realizarán tres cultivos independientes por afección, 12 pocillos por afección.

Organización de las placas de cultivo

El estradiol- β a 150 nM se usó como control positivo (figura 4).

El estradiol- β se disolvió en medio de cultivo y se preincubó durante 1 h antes de la aplicación del amiloide β_{1-42} .

Se valoraron las siguientes condiciones:

- **PLACA DE CONTROL:** 12 pocillos/afección

- *Control negativo:* medio solo + DMSO al 0,1 %
- *Intoxicación:* amiloide β_{1-42} (10 µM) durante 24 h.
- *Compuesto de referencia:* Estradiol (150 nM) 1h.

- **PLACA DE FÁRMACO:** 6 pocillos/afección

- *Control negativo:* medio solo + DMSO al 0,1 %

- *Intoxicación:* amiloide β_{1-42} (10 μ M) durante 24 h.
- *Compuesto o compuestos problema:* compuesto o compuestos problema - 1 hora seguido de amiloide β_{1-42} (10 μ M) durante 24 h.

Ensayo de actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

- 5 24 horas después de la intoxicación, se retiró el sobrenadante y se analizó con el kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche Applied Science, ref: 11644793001, lote: 11800300). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la toxicidad celular se basa en la medida de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde el citosol de las células teñidas al sobrenadante.

Procesamiento de datos

- 10 Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin amiloides = 100 %) para expresar la lesión por amiloides. Todos los valores se expresaron como media $\pm$ SEM (error estándar de la media) de los 3 cultivos (n = 6 pocillos por afección). Los análisis estadísticos se realizaron en las diferentes condiciones (ANOVA UNILATERAL seguido por la prueba de Dunnett cuando se podía, versión 5.0 del software Statview).

Resultados

- 15 La politerapia con baclofeno y acamprosato induce un efecto protector significativo frente a la toxicidad del péptido $A\beta_{1-42}$ humano (mejora un 34 % supervivencia celular) en las células neuronales corticales primarias, tal como se muestra en la figura 5. Los resultados muestran con claridad que la intoxicación por el péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ a 10 μ M) se evita significativamente mediante la politerapia, mientras que, a esas concentraciones, el baclofeno o el acamprosato en monoterapia no tienen ningún efecto significativo sobre la intoxicación.

- 20 Pero el contrario, aunque sea activa en este modelo, la politerapia con sulfisoxazol y cinacalcet proporciona menos protección frente al $A\beta_{1-42}$ (19 %, figura 6).

- 25 De este modo, mientras que esas dos politerapias permiten una protección frente al $A\beta_{1-42}$, destaca con claridad la politerapia con baclofeno y acamprosato. En efecto, a concentraciones que no tienen efecto en monoterapia, los fármacos producen una protección significativa de las células neuronales corticales primarias frente al $A\beta_{1-42}$ cuando se usan en politerapia. Además, la politerapia con baclofeno y acamprosato es mucho más eficaz que la politerapia con sulfisoxazol y cinacalcet. Dicho efecto del baclofeno y el acamprosato representa una mejora notable de un 60 % en comparación con, por ejemplo, el efecto de la politerapia con sulfisoxazol y cinacalcet.

- 30 Tomados en conjunto, estos resultados muestran un efecto positivo notable e inesperado de las politerapias con baclofeno y acamprosato en varios modelos *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. El efecto observado es muy superior al provocado por otras politerapias con baclofeno (por ejemplo, baclofeno y terbinafina), u otras politerapias activas (sulfisoxazol y cinacalcet).

- 35 Se ha realizado una comparación de la actividad de protección del acamprosato y la homotaurina sobre las células corticales (figura 17). Esos resultados muestran que el derivado de acamprosato denominado homotaurina permite una protección eficaz frente al $A\beta_{1-42}$. En el contexto de esta invención, el baclofeno o el acamprosato se pueden sustituir de este modo por sus derivados, siempre que esos derivados sean eficaces en el ensayo que se describe en la presente memoria.

I.3. Protección frente a la toxicidad del $A\beta_{1-42}$ en un modelo de crecimiento de neuritas y de funcionalidad de las sinapsis

- 40 Se cultivaron las neuronas corticales de rata tal como se describe en Singer et al. (35). Las ratas hembras recién preñadas de 15 días de gestación se sacrificaron por dislocación cervical (ratas Wistar) y los fetos se retiraron del útero. Se retiró la corteza y se colocó en medio de Leibovitz (L15) enfriado con hielo que contenía un 2 % de penicilina a 10.000 U/ml y estreptomycin a 10 mg/ml, y un 1 % de seroalbúmina bovina (BSA). Las cortezas se disociaron con tripsina durante 20 min a 37 °C (0,05 %). La reacción se detuvo mediante la adición de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía DNase1 de calidad II y un 10 % de suero de ternera fetal (FCS). A continuación, las células se disociaron mecánicamente mediante 3 pases seguidos a través de una pipeta de 10 ml y se centrifugaron a 515 x g durante 10 min a +4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un medio de cultivo definido que consistía en neurobasal complementado con B27 (2 %), L-glutamina (0,2 mM), un 2 % de solución de PS y 10 ng/ml de BDNF. Las células viables se contaron en un citómetro de Neubauer usando el ensayo de exclusión con azul tripano. Las células se sembraron a una densidad de 30.000
- 50 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se revistieron previamente con poli-L-lisina (10 μ g/ml)) y se cultivaron a +37 °C en un aire humidificado (95 %)/atmósfera de CO₂ (5 %).

Después de 10 días de cultivo, las células se incuban con los fármacos. Transcurrida 1 hora, las células se intoxican mediante 2,5 μ M de β -amiloide (1-42; Bachem) en medio definido sin BDNF, pero junto con los fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 24 horas. El BDNF (10 ng/ml) se usa como control positivo (neuroprotector).

Se realizaron tres cultivos independientes por cada afección, 6 pocillos por afección.

Longitud de las neuritas y número de sinapsis

Después de 24 horas de intoxicación, el sobrenadante se retira y las neuronas corticales se fijan mediante una solución fría de etanol (95 %) y ácido acético (5 %) durante 5 min. Después de la permeabilización con un 0,1 % de saponina, las células se bloquean durante 2 h con PBS que contiene suero fetal de ternera al 1 %. A continuación, las células se incuban con anticuerpo monoclonal contra la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2; Sigma) o contra la sinaptofisina (SYN, S5798, Sigma) junto con anticuerpos anti-PSD95 (P246, Sigma) con el fin de cuantificar las sinapsis. Estos anticuerpos tiñen específicamente los cuerpos celulares y las neuritas de neuronas de neuronas (MAP2) o elementos pre- y post-sinápticos (SYN y PSD95, respectivamente).

Estos anticuerpos se revelan con IgG de cabra anti-ratón conjugadas con Alexa Fluor 488 (Molecular Probe). Los núcleos de las neuronas se marcaron con un marcador fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA).

Se toman 10 fotografías por pocillo con el analizador InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con lentes de 20 x. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones. El análisis de la red de neuritas se realiza con el software Developer (GE Healthcare) para valorar la longitud total de la red de neuritas.

Resultados

La politerapia con baclofeno y acamprosato induce un efecto protector significativo frente a la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano (mejora un 80 % la red de neuritas) en las células de neuronas corticales primarias, tal como se muestra en la figura 7. Los resultados muestran claramente que la intoxicación por el péptido amiloide humano (A β ₁₋₄₂ a 2,5 μ M) se evita significativamente con la politerapia, mientras que a esas concentraciones, el baclofeno o el acamprosato en monoterapia no tienen ningún efecto significativo sobre la intoxicación.

Además, la longitud total de la red de neuritas tratadas con esta politerapia no es más significativamente diferente que la de las células de control. Por lo tanto, esta politerapia permite una protección eficaz de las células de neuronas corticales frente a la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano, pero también un crecimiento de neuritas comparable al de una célula neuronal cortical sana.

II. LAS POLITERAPIAS CON BACLOFENO Y ACAMPROSATO EVITAN LA TOXICIDAD DEL A β ₂₅₋₃₅ HUMANO IN VIVO

Animales

Durante todo el estudio se usan ratones Swiss macho. Los animales se alojan en jaulas de plástico, con libre acceso a comida y agua en el laboratorio, excepto durante los experimentos de comportamiento, y se mantienen en un entorno regulado, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (la luz se enciende a las 8:00). Los experimentos se realizan en una habitación experimental insonorizada y con regulación de aire, a la que los ratones se han habituado al menos 30 minutos antes de cada experimento.

Tratamiento de combinación

El fármaco o fármacos se administran cada día mediante sonda (por vía oral). El péptido β ₂₅₋₃₅ y el péptido β ₁₋₄₂ desordenado (control) se disolvieron en agua bidestilada estéril, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los péptidos β -amiloides se administran a continuación por vía intracerebroventricular (i.c.v.). Brevemente, cada ratón se anestesia ligeramente con éter, y se les inserta unilateralmente una aguja con calibre de acero inoxidable 1 mm a la derecha del punto de la línea media equidistante de cada ojo, a una distancia igual entre los ojos y los oídos y perpendicular al plano del cráneo. Los péptidos o el vehículo se administran gradualmente en el plazo de aproximadamente 3 s. Los ratones muestran un comportamiento normal al cabo de 1 min tras la inyección. El sitio de administración se comprueba mediante la inyección de tinta china en experimentos preliminares. Ni la inserción de la aguja ni la inyección del vehículo tienen ninguna influencia significativa en la supervivencia, ni en las respuestas de comportamiento ni en las funciones cognitivas.

Tratamiento con fármacos o fármacos

El día -1, es decir, 24 h antes de la inyección del péptido A β ₂₅₋₃₅, se administran combinaciones de fármaco o la solución de vehículo, por vía oral mediante sonda dos veces al día (a las 8:00 y a las 18:00).

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

Entre el día 0 y el día 7 se le administran fármacos, politerapia de fármacos o la solución de vehículo por vía oral mediante sonda una o dos veces al día (a las 8:00 y a las 18:00). Un grupo de animales recibe donepezilo (compuesto de referencia - 1 (mg/kg/día) por vía oral mediante sonda en una inyección única (a las 8:00). Los fármacos se solubilizan en agua y se preparan en el momento justo antes de cada administración mediante sonda.

El día 7 se analizan todos los animales para determinar el rendimiento de alternancia espontánea en el ensayo de laberinto en Y, un índice de la memoria espacial a corto plazo.

Los días 7 y 8 se valora la memoria contextual a largo plazo de los animales mediante el procedimiento de evitación pasiva de tipo retirada.

- 5 El día 8 se sacrifican los animales. Se les extrae el cerebro y se mantiene a -80°C para análisis adicionales.

Las politerapias potencian las actuaciones de comportamiento y cognitiva de los animales intoxicados

Prueba de rendimiento de alternancia espontánea en el laberinto en Y

- 10 El día 7 se analizaron todos los animales por el rendimiento de alternancia espontánea en el laberinto en Y, un índice de la memoria espacial a corto plazo. El laberinto en Y está hecho con cloruro de polivinilo de color gris. Cada brazo tiene 40 cm de largo, 13 cm de alto, 3 cm de ancho en la parte inferior, 10 cm de ancho en la parte superior, y convergen con el mismo ángulo. Cada ratón se coloca en el extremo de un brazo y se le permite el movimiento libremente a través del laberinto durante una sesión de 8 min. Las series de entradas en los brazos, que incluyen los posibles retornos al mismo brazo, se comprueban visualmente. Una alternancia se define como las entradas en los tres brazos en ocasiones consecutivas. El número de alternancias máximas es por lo tanto el número total de
- 15 entradas en los brazos menos dos y el porcentaje de alternancia se calcula como $(\text{alternancias reales} / \text{alternancias máximas}) \times 100$. Los parámetros incluyen el porcentaje de alternancia (índice de memoria) y el número total de entradas en los brazos (índice de exploración). Se descartan los animales que muestran un comportamiento extremo (porcentaje de alternancia $< 25\%$ o $> 85\%$ o un número de entradas en los brazos < 10). Normalmente, esto representa un 0-5 % de los animales. Esta prueba sirve por otro lado para analizar, a nivel del comportamiento, el
- 20 impacto y el efecto amnésico inducido en los ratones mediante la inyección de $\text{A}\beta_{25-35}$.

Prueba de evitación pasiva

- 25 El aparato es una caja con dos compartimentos (15 x 20 x 15 cm de altura) con uno iluminado con paredes de cloruro de polivinilo de color blanco y el otro oscurecido con paredes de cloruro de polivinilo de color negro y un suelo de rejilla. Una puerta de guillotina separa cada compartimento. Una lámpara de 60 W colocada a 40 cm por encima del aparato ilumina el compartimento blanco durante el experimento. Mediante un generador aleatorio de descargas (Instrumentos Lafayette, Lafayette, EE.UU.) se podrían distribuir por el suelo de rejilla descargas eléctricas aleatorias en las patas (0,3 mA durante 3 s). La puerta de guillotina está cerrada inicialmente durante la sesión de entrenamiento. Cada ratón se coloca en el compartimento blanco. Después de 5 s, se levanta la puerta.
- 30 Cuando el ratón entra en el compartimento oscuro y coloca todas las patas en el suelo de rejilla, se cierra la puerta y se libera la descarga en las patas durante 3 s. Se anota el tiempo de espera de cruce, es decir, el tiempo de espera necesario para entrar en el compartimento oscurecido, y se anota el número de vocalizaciones. La prueba de retención se realiza 24 h después del entrenamiento. Cada ratón se coloca de nuevo en el compartimento blanco. Después de 5 s se levanta la puerta, y se registran hasta 300 s de tiempo de espera de cruce y de tiempo de espera de escape, es decir, el tiempo necesario para regresar al compartimento blanco.

- 35 Se observan resultados positivos en las actuaciones de comportamiento y en los ensayos bioquímicos realizados 7 días después de la inyección por vía i.c.v. del péptido β_{25-35} .

La politerapia con baclofeno y acamprosato induce un efecto protector significativo sobre las actuaciones de comportamiento y cognitiva de los animales intoxicados, tal como se muestra en las figuras 8, 9 y 10.

- 40 En la figura 8, con sólo un 53,8 % de alternancia, los ratones intoxicados exhiben una memoria espacial a corto plazo fuertemente afectada en comparación con el control. Con una mejora de más de un 48 % de su porcentaje de alternancia en comparación con el control, se evita significativamente el deterioro en los ratones tratados con baclofeno y acamprosato.

- 45 Del mismo modo, las figuras 9 y 10 muestran que los animales intoxicados han empeorado las actuaciones conductuales y cognitivas de acuerdo con su puntuación en el tiempo de espera de escape y el tiempo de espera de cruce, respectivamente. En ambas pruebas, la politerapia con baclofeno y acamprosato permite una corrección significativa del deterioro. El tiempo de espera de escape de los ratones tratados con esta politerapia no es significativamente más diferente que la de los ratones de control (figura 9) y el tiempo de espera de cruce (figura 10) se incrementa significativamente mediante las politerapias de la invención con un mayor efecto de la politerapia en comparación con los fármacos en monoterapia.

- 50 El deterioro de la memoria es la característica precoz de la enfermedad de Alzheimer y estos resultados muestran claramente que el efecto tóxico del péptido amiloide en las actuaciones conductuales y cognitivas (incluida la memoria) se evitan significativamente mediante las combinaciones de la invención.

- 55 Además, la figura 16 muestra que la dosis extremadamente baja de baclofeno (480 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)/día), acamprosato (32 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)/día) y donepezilo (0,25 (mg/kg)/día) se puede combinar para permitir una protección completa de las actuaciones conductual y cognitiva de los ratones tal como se mide mediante la prueba del laberinto en Y. Mientras

que el donepezilo, a esta concentración, no tiene ningún efecto significativo (32 % de protección) sobre la memoria espacial a corto plazo, su uso junto con la politerapia con baclofeno y acamprosato permite una protección completa (98 %) de las actuaciones cognitivas de los ratones intoxicados. Las politerapias de la invención, por lo tanto, se pueden combinar además con otros tratamientos con el fin de potenciar su acción.

5 Las politerapias mejoran la afectación neurofisiológica de las enfermedades neurológicas

Se analizan las politerapias en el modelo *in vivo* de intoxicación por A β . Se valoran sus efectos sobre varios parámetros que se ven afectados en las enfermedades neurológicas:

- Nivel de expresión de las caspasas 3 y 9, considerado como un indicador de la apoptosis,

- Peroxidación lipídica, considerada como un marcador para el nivel de estrés oxidativo,

10 - Ensayo de expresión de GFAP, considerado como un marcador del nivel de la inflamación del cerebro,

- Integridad de la barrera hematoencefálica,

- Integridad de la sinapsis general (ELISA de sinaptofisina).

- Cuantificación de neuronas viables en la CAI

Integridad de la barrera hematoencefálica

15 El diseño experimental sobre la intoxicación animal por A β es el mismo que en la parte III.

El posible efecto protector de las politerapias sobre la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) se analiza en los ratones a los que se inyectó por vía intracerebroventricular (i.c.v.) el péptido amiloide β_{25-35} oligomérico (A β_{25-35}) o el péptido A β_{25-35} desordenado (Sc.A β) de control, 7 días después de la inyección.

20 El día 7 después de la inyección de A β_{25-35} , los animales se analizaron para determinar la integridad de la BBB mediante el uso del procedimiento de EB (azul de Evans). Se sabe que el tinte EB se une a la seroalbúmina después de la inyección periférica y se ha usado como trazador de la seroalbúmina.

25 El tinte EB (2 % en solución salina, 4 ml/kg) se inyecta por vía intraperitoneal (i.p.) 3 h antes de la perfusión transcardiaca. Los ratones se anestesian a continuación por vía i.p. con 200 μ l de mezcla de ketamina a 80 mg/kg, xilazina a 10 mg/kg, y entonces se abre el tórax. Los ratones se someten a perfusión transcardiaca con 250 ml de solución salina durante aproximadamente 15 min hasta que el líquido de la aurícula derecha se vuelve incolora. Después de la decapitación, se retira el cerebro y se divide en tres regiones: corteza cerebral (izquierda + derecha), hipocampo (izquierdo + derecho), diencefalo. A continuación, cada región cerebral se pesa para medir cuantitativamente la extravasación de EB-albúmina.

30 Las muestras se homogeneizan en solución salina tamponada con fosfato y se mezclan por agitación vorticial después de la adición de ácido tricloroacético al 60 % para precipitar la proteína. Las muestras se enfrían a 4 °C, y después se centrifugan 30 min a 10.000 g, a 4 °C. Al sobrenadante se le mide a 610 nm la absorbancia de EB con un espectrofotómetro.

EB se cuantifica tanto como

35 μ g/mg de tejido cerebral mediante el uso de una curva patrón, obtenida con concentraciones conocidas de EB-albúmina.

μ g/mg de proteína.

Integridad global de la sinapsis (ELISA de sinaptofisina)

40 Se ha elegido la sinaptofisina como marcador de la integridad de la sinapsis y se analiza con un kit comercial de ELISA (USCN, Ref. E90425Mu). Las muestras se preparan a partir de tejidos hipocámpicos y se homogeneizan en un tampón de extracción específico tal como lo describe el fabricante y la bibliografía de referencia.

45 Los tejidos se enjuegan con PBS enfriado con hielo (0,02 mol/l, pH 7,0-7,2) para retirar completamente el exceso de sangre y se pesan antes de la congelación con nitrógeno y la conservación a -80 °C. Los tejidos se cortan en trozos pequeños y se homogeneizan en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada en hielo frío con un homogeneizador de vidrio. La suspensión resultante se sonica con un disruptor celular ultrasónico o se somete a dos ciclos de congelación y descongelación para romper aún más las membranas celulares. A continuación, los homogeneizados se centrifugan durante 5 min a 5.000 g y el sobrenadante se analiza inmediatamente.

Todas las muestras se analizan por triplicado.

La cuantificación de las proteínas se realiza con el kit de ensayo de proteínas con BCA (ácido bicinconínico) de Pierce (Pierce, n.º de ref. 23227) para evaluar el rendimiento de extracción y permitir la normalización.

La concentración de proteínas totales se calcula a continuación a partir de las diluciones de la curva patrón y sirven para normalizar los resultados del ELISA.

5 *Cuantificación de las neuronas viables en los CAI*

El día 8 se anestesia cada ratón por vía intraperitoneal con 200 µl de una mezcla de ketamina a 80 mg/kg y xilazina a 10 mg/kg, y se perfunde por vía transcardial con 100 ml de solución salina seguido por 100 ml de paraformaldehído al 4 %. Se retira cada cerebro y se mantiene durante 24 h después de la fijación en solución de paraformaldehído al 4 % a 4 °C.

10 Después de la posfijación, los cerebros se lavan en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), a continuación se retira el cerebelo y los prosencéfalos se colocan en una plataforma Vibratom (Leica VT1000S, Leica, Wetzlar, Alemania) para el corte.

15 Los cerebros se cortan en secciones frontales (20 µm de espesor) con un Vibratom (Leica VT1000S, Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones en serie se colocan en placas de 24 pocillos con PBS. A continuación, se seleccionan para que incluyan la formación del hipocampo y se colocan 9 secciones en la tira de vidrio recubierta con gelatina (un portaobjetos por animal para el violeta de cresilo). Todos los portaobjetos se secan a temperatura ambiente durante 48 h para evitar el despegado. Los portaobjetos se conservan a temperatura ambiente hasta que se produce la tinción con violeta de cresilo.

20 Las secciones se tiñen con el reactivo de violeta de cresilo al 0,2 % (Sigma-Aldrich), a continuación se deshidratan con etanol absoluto, se tratan con tolueno, y se montan con el medio de Mountex (BDH Laboratory Supplies, Poole, Dorset, Reino Unido).

25 Después del montaje, los portaobjetos se mantienen a temperatura ambiente para el secado de 24 h. La exploración de la zona de CAI se realizó con un microscopio óptico (Dialux 22, Leitz), y digitalización de los cortes con una cámara CCD (Sony XC-77CE, Sony, París, Francia) con el software NIHImage® v1.63 (NIH). La medida de CAI y el número de células piramidales se procesan con ImageJ® (NIH). Los datos se expresan como la media de nueve cortes de células piramidales de CAI por milímetro para cada grupo (número de CAI del hipocampo izquierdo y derecho) (49).

Prueba de estrés oxidativo

30 Los ratones se sacrificaron por decapitación y ambos hipocampos se retiraron con rapidez, se pesaron y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta que se analizaron. Después de la descongelación, los hipocampos se homogeneizan en metanol frío (1/10 p/v), se centrifugan a 1.000 g durante 5 min y el sobrenadante se coloca en un tubo Eppendorf. El volumen de reacción de cada homogeneizado se añade a FeSO₄ a 1 mM, H₂SO₄ a 0,25 M, naranja de xilenol a 1 mM, y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Después de leer la absorbancia a 580 nm (A580 1), se añadieron a la muestra 10 µl de hidropéroxido de cumeno (CHP) a 1 mM y se incubó durante 35 30 min a temperatura ambiente para determinar el nivel máximo de oxidación. La absorbancia se mide a 580 nm (A580 2). El nivel de peroxidación de lípidos se determina como equivalentes de CHP (CHPE, por su nombre en inglés) de acuerdo con: $CHPE = A580\ 1/A580\ 2 \times [CHP]$ y se expresa en forma de equivalentes de CHP por peso de tejido y como porcentaje de los datos del grupo de control.

Prueba de inducción de la vía de las caspasas y prueba de expresión de GFAP

40 Los ratones se sacrifican por decapitación y ambos hipocampos se retiran con rapidez, se enjuagan en PBS enfriado en hielo (0,02 mol/l, pH 7,0-7,2) para retirar el exceso de sangre, se pesan cuidadosamente y se mantienen en nitrógeno líquido hasta que se analizan. Los tejidos se cortan en trozos pequeños y se homogeneizan en 1 ml de PBS enfriado en hielo con un homogeneizador de vidrio. La suspensión resultante se sonica con un disruptor celular ultrasónico o se somete a dos ciclos de congelación y descongelación para romper aún más las membranas celulares. A continuación, los homogeneizados se centrifugan a 5.000 g durante 5 min y el sobrenadante se analiza 45 inmediatamente.

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

50 La cuantificación de las proteínas se realiza con el kit de ensayo de proteínas con BCA (ácido bicinconínico) de Pierce (Pierce, n.º de ref. 23227) para evaluar el rendimiento de extracción y permitir la normalización.

La politerapia con baclofeno y acamprosato induce un efecto protector significativo sobre las funciones neurofisiológicas de los animales intoxicados tal como se muestra en las figuras 11, 12, 13 y 14. Con una protección de más de un 60 % en comparación con los animales intoxicados sin tratar, la combinación es eficaz para la protección de las neuronas (figura 11) y la densidad sináptica (figura 13).

Del mismo modo, la figura 12 muestra que la politerapia con baclofeno y acamprosato protege la integridad de la BBB (76 %) en comparación con los animales intoxicados sin tratar.

Por último, esta politerapia es eficaz para reducir del estrés oxidativo global inducido por los A β en el cerebro de los animales tratados en comparación con los animales intoxicados sin tratar (figura 14).

- 5 Tal como se muestra en la parte A de los ejemplos, se han protegido varias funciones neurológicas con deficiencias en numerosos trastornos neurológicos, que incluyen trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer y los trastornos relacionados, y los síntomas se han retardado o reducido mediante la politerapia con baclofeno y acamprosato.

B) PREVENCIÓN DE LA TOXICIDAD POR GLUTAMATO EN LAS CÉLULAS NEURONALES

- 10 En este conjunto de experimentos adicionales, se ha analizado si los compuestos candidatos son capaces de prevenir o reducir los efectos tóxicos de la toxicidad por glutamato en las células neuronales. La toxicidad por glutamato está implicada en la patogénesis de enfermedades neurológicas o trastornos tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, neuropatías, alcoholismo o síndrome de abstinencia alcohólica, o lesión de la médula espinal. Los
15 fármacos se analizan primero de forma individual, y luego se analiza su acción en politerapia.

Procedimientos

La eficacia de las combinaciones de fármacos de la invención se valora sobre células neuronales corticales primarias. El protocolo que se usa en estos ensayos es el mismo que el que se ha descrito en el apartado A.1.2 mencionado anteriormente.

20 *Pruebas de toxicidad por glutamato*

El efecto neuroprotector de los compuestos se valora mediante la cuantificación de la red de neuritas (inmunotinción de neurofilamentos (NF)), que revela específicamente las neuronas glutamatérgicas.

- Después de 12 días de cultivo de las neuronas, los fármacos de las politerapias candidatas se disuelven en el medio de cultivo (+ DMSO al 0,1 %). Las politerapias candidatas se preincuban a continuación con neuronas durante 1
25 hora antes de la lesión por glutamato. Una hora después de la incubación, se añade el glutamato durante 20 min, a una concentración final de 40 μ M, en presencia de las politerapias candidatas, con el fin de evitar que los fármacos se diluyan más. Al final de la incubación se cambia el medio por medio con la politerapias candidata, pero sin glutamato. El cultivo se fija 24 horas después de la lesión por glutamato. El MK801 (hidrogenomaleato de dizocilpina, 77086-22-7 - 20 μ M) se usa como control positivo.

- 30 Después de la permeabilización con saponina (Sigma), las células se bloquean durante 2 h con PBS que contiene suero de cabra al 10 %, a continuación las células se incuban con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra los anticuerpos antineurofilamentos (NF, Sigma). Este anticuerpo se revela con IgG de cabra anti-ratón conjugada con Alexa Fluor 488.

- 35 Los núcleos de las células se marcan con un marcador fluorescente (solución de Hoechst, SIGMA), y se cuantifica la red de neuritas. Se usan seis pocillos por afección para valorar la supervivencia neuronal en 3 cultivos diferentes.

Resultados

- La politerapia con baclofeno y acamprosato proporciona un efecto protector frente a la toxicidad por glutamato para las células de neuronas corticales. Como se observa a modo de ejemplo en la figura 15, las combinaciones de la
40 invención protegen fuertemente a las neuronas de la toxicidad por glutamato en las condiciones experimentales que se han descrito anteriormente. Hay que destacar que se observa una protección eficaz al usar concentraciones de fármacos en las que los fármacos usados en monoterapia tienen un efecto protector inferior. La politerapia con baclofeno y acamprosato induce una mejora de más de un 200 % en comparación con el acamprosato en monoterapia y superior a un 47 % en comparación con el baclofeno usado en monoterapia.

45 C) MEJORA DE OTROS TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA EXCITOTOXICIDAD POR GLUTAMATO MEDIANTE EL USO DE POLITERAPIAS DE LA INVENCION

- El efecto protector *in vitro* que se ha mencionado anteriormente frente a la toxicidad por glutamato que tienen los fármacos y las politerapias de fármacos de la invención, combinado con los efectos protectores a modo de ejemplo en la presente memoria en varios modelos de EA, instó a los inventores a analizar estos fármacos y politerapias en algunos modelos de otras enfermedades en cuya patogenia también interviene la toxicidad por glutamato, como la
50 EM, la ELA y el dolor neuropático.

I) EFECTO PROTECTOR DE LAS POLITERAPIAS EN UN MODELO IN VIVO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Para demostrar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención en el tratamiento de la esclerosis múltiple

se usa un modelo en el que los ratones inmunizados con la glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (inmunizados con MOG) desarrollan la EAE progresiva crónica.

Animales y productos químicos

- 5 Las ratonas hembra C57L/6J (8 semanas de edad) se adquieren en Janvier (Francia); después de dos semanas de habituación, las ratonas hembra (10 semanas de edad) desarrollan parálisis crónica después de la inmunización con el péptido MOG (glucoproteína de mielina de oligodendrocitos). La encefalomiелitis experimental se induce con el kit de Hooke de PTX (toxina pertúsica) con emulsión de MOG₃₅₋₅₅/CFA (EK-0110, EK-0115, laboratorios Hooke) para la inducción de EAE. El kit de control es CK-0115 (laboratorios Hooke).

Procedimiento experimental

- 10 La encefalomiелitis experimental se induce mediante el procedimiento siguiente:

El día 0 se realizan dos inyecciones subcutáneas de 0,1 ml cada una, una en la parte posterior superior de la ratona y una en la parte baja de la espalda. Cada inyección contiene 100 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 µg de H37Ra de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado y se emulsiona en el adyuvante completo de Freund (CFA) (laboratorios Hooke). La emulsión proporciona el antígeno necesario para expandir y diferenciar los linfocitos T autoinmunitarios específicos contra MOG.

15 Se realizan dos inyecciones intraperitoneales de 500 ng de toxina pertúsica en PBS (kit de Hooke) 2 horas (día 0) y 24 horas (día 1) después de la inyección de MOG. La toxina pertúsica potencia el desarrollo de la EAE, al proporcionar más adyuvante.

20 Las ratonas desarrollan EAE 8 días después de la inmunización y permanecen crónicamente paralizadas durante la duración del experimento. Después de la inmunización, a las ratonas se les observan diariamente los síntomas clínicos en un procedimiento con ocultación. Los animales se mantienen en una instalación libre de patógenos convencionales y todos los experimentos se realizan de acuerdo con las directrices establecidas, y aprobadas, por el comité local permanente de bioética.

Grupos experimentales y tratamiento con fármacos:

- 25 Grupos de ratonas hembra, tal como se describen, se homogeneizan en peso antes de la inmunización:

- Grupo de control: inyección de vehículo en las mismas condiciones de las ratonas EAE (desde el día -1 al día 28, el placebo se administra a diario)

- Grupo de EAE: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertúsica (días 0 y 1); a partir del día -1 al día 28, el placebo se administra diariamente por vía oral

- 30 - EAE + control positivo: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertúsica (días 0 y 1); a partir del día -1 al día 28, se administra dexametasona diariamente por vía oral.

- EAE + grupo de tratamiento: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertúsica (días 0 y 1). Los tratamientos comienzan un día antes de la inmunización y se prolongan hasta el día 28.

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

- 35 El software Statistica (Statsoft Inc.) se usa para todo el análisis estadístico. Se usan análisis de ANOVA y pruebas de t de Student para analizar la puntuación de la enfermedad clínica. Se considera significativo $P < 0,05$.

40 Los retrasos en la aparición de la enfermedad, puntuación clínica y retraso de la muerte, se han comparado entre cada grupo para el grupo «inmu» de referencia con las curvas de Kaplan-Meier y un modelo de Cox (paquete de R 'survival'). Los valores de p resultantes son unilaterales y analizan la hipótesis de que sea mejor que el grupo de referencia «inmu».

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

Puntuación de la cola:

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

Puntuación de las extremidades posteriores:

Puntuación = 0	Un ratón normal tiene un paso enérgico y no arrastra las patas
Puntuación = 1	Alguno de los siguientes ensayos es positivo: A - Ensayo de volteo: mientras se mantiene la cola entre el dedo pulgar y el índice, se voltea el animal sobre su espalda y se observa el tiempo que necesita para enderezarse. Un ratón sano se girará inmediatamente. Un retraso sugiere debilidad de las extremidades posteriores. B - Colocar el ratón en la parte superior de la jaula de alambre y observarlo mientras la cruza de un lado al otro. Si una o ambas extremidades se deslizan con frecuencia entre las barras, se considera que hay una parálisis parcial.
Puntuación = 2	Los dos ensayos anteriores son positivos.
Puntuación = 3	Una o ambas extremidades posteriores muestran signos de parálisis, pero se conservan algunos movimientos; por ejemplo: el animal puede agarrarse y aferrarse a la cara interna de la parte superior jaula de alambre durante un breve instante antes de soltarse.
Puntuación = 4	Cuando ambas extremidades traseras están paralizadas y el ratón las arrastra cuando se mueve.

Puntuación de las extremidades anteriores:

Puntuación = 0	Un ratón normal usa sus patas delanteras activamente para agarrar y caminar, y mantiene la cabeza erguida.
Puntuación = 1	Puede caminar, pero es difícil debido a una debilidad en una pata o en ambas, por ejemplo, las patas delanteras se consideran débiles cuando el ratón tiene dificultad para agarrar la cara interna de la parte superior de la jaula de alambre. Otro signo de debilidad es la cabeza colgando hacia abajo.
Puntuación = 2	Cuando una extremidad anterior está paralizada (imposibilidad de agarrar y el ratón gira alrededor de la extremidad paralizada). En este momento, la cabeza también ha perdido gran parte del tono muscular.
Puntuación = 3	El ratón no se puede mover, y la comida y el agua son inalcanzables.

5 Puntuación de la vejiga:

Puntuación = 0	Un ratón normal tiene el control total de su vejiga.
Puntuación = 1	Un ratón se considera incontinente cuando la parte inferior de su cuerpo está empapada de orina.

La puntuación global para cada animal se determina mediante la adición de todas las categorías que se han mencionado anteriormente. La puntuación máxima para los animales vivos es de 10.

Resultados: Las politerapias son eficaces en un modelo de EM

10 En los ratones «EAE + grupo de tratamiento» se observa una mejora significativa de la puntuación clínica global para la politerapia con baclofeno y acamprosato.

La politerapia con baclofeno (30 (mg/kg)/día) y acamprosato (2 (mg/kg)/día) indujo un efecto protector significativo frente al desarrollo de la EAE crónica progresiva y, por tanto, confirmó el efecto beneficioso de la composición contra el tratamiento de la esclerosis múltiple (figura 18). Con la reducción de más de un 30 % de los síntomas, los resultados muestran claramente que la combinación induce una reducción significativa del desarrollo de la enfermedad a partir del día 13. Este resultado confirma el efecto notable positivo de la politerapia con baclofeno y acamprosato en la protección neuronal que incluye la desmielinización y sus implicaciones.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que esta combinación permite la protección eficaz de las neuronas frente a muchas agresiones que intervienen en el desarrollo de enfermedades neurológicas tales como desmielinización o excitotoxicidad por β -amiloides, por degradación de la BBB, o por glutamato.

II.) EFECTO PROTECTOR DE LAS POLITERAPIAS EN LOS MODELOS DE ELA.

- 5 Estos experimentos son sólo con fin ilustrativo. El efecto de las politerapias de acuerdo con la presente invención sobre la ELA se han demostrado *in vitro*, en un modelo de cocultivo, e *in vivo*, en un modelo de ratón para la ELA. Los protocolos y los resultados se presentan en este apartado.

II.1 Efecto protector frente a la toxicidad por glutamato en los cultivos primarios de cocultivo de nervio y músculo

Cocultivos primarios de células nerviosas y musculares

- 10 El músculo humano se prepara de acuerdo con un procedimiento que se ha descrito anteriormente a partir de porciones de biopsia de paciente sano (48). Las células musculares se establecen a partir de células disociadas (10000 células por pocillo), sembradas en placas revestidas con gelatina al 0,1 % en placas de 48 pocillos y se hacen crecer en un medio de proliferación que consiste en la mezcla de medio MEM y medio M199.

- 15 Inmediatamente después de la fusión de las células satélite, en la monocapa muscular se colocan a 1 explante por pocillo (en el área central) de cortes transversales enteros de médula espinal de embriones de 13 días de edad de ratas Wistar que llevan unidos los ganglios de la raíz dorsal (DRG, por su nombre en inglés). Los DRG son necesarios para conseguir una buena relación de inervaciones. Los cultivos inervados se mantienen en el medio mezclado. Después de 24 horas en los cocultivos habituales, se observan las neuritis que emergen de los explantes de la médula espinal. Entran en contacto con miotubos e inducen las primeras contracciones después de 8 días.
- 20 Rápidamente a partir de ese momento, las fibras musculares inervadas situadas en la proximidad de los explantes de la médula espinal se contraen continuamente de forma virtual. Las fibras inervadas son morfológica y espacialmente diferentes a las de las no inervadas y se podrían distinguir fácilmente de ellas.

Se realiza un cocultivo (6 pocillos por afección).

Lesión por glutamato

- 25 El día 27 se incuban los cocultivos con compuestos candidato o riluzol una hora antes de la intoxicación por glutamato (60 μ M) durante 20 min. A continuación se lavan los cocultivos y los compuestos candidatos o el riluzol se añaden durante un periodo adicional de 48 horas. Después de este tiempo de incubación, los cocultivos sin fijar se incuban con α -bungarotoxina acoplada a Alexa 488 a una concentración de 500 nmol/l durante 15 min a temperatura ambiente. Entonces, los cocultivos se fijan con PFA durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la permeabilización con un 0,1 % de saponina, los cocultivos se incuban con anticuerpo anti-neurofilamentos (NF).
- 30

Estos anticuerpos se detectan con IgG de cabra anti-ratón conjugadas con Alexa Fluor 568 (Molecular Probe). Los núcleos de las neuronas están marcados con un marcador fluorescente (solución de Hoechst).

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

- 35 Para cada afección se realizan 2 x 10 fotografías por pocillo con el Incell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare), con un aumento de 20 x. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones.

Resultados

La politerapia con baclofeno y acamprosato protege eficazmente a las neuronas motoras y a las placas motoras en el modelo de cocultivo.

- 40 *II.2 – Las politerapias son eficaces en el modelo de ratón con ELA*

Los experimentos se realizan en ratones macho. Ratones macho transgénicos B6SJL-Tg(SOD1)²Gur/J y su control (respectivamente SN2726 y SN2297 de los Laboratorios Jackson, Ben Harbor, Estados Unidos y distribuidos por Charles River en Francia) se eligen en este conjunto de experimentos para imitar la ELA.

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

Asignación al azar de los animales:

La asignación de grupo y la aleatorización de los animales se basan en el peso corporal; para cada grupo, la aleatorización se realiza un día antes del primer tratamiento.

Administración del fármaco

Los ratones reciben dosis con el tratamiento de fármacos candidato diluidos en el vehículo a partir del 60º día de nacimiento hasta la muerte. Las soluciones diluidas de fármacos candidato se preparan con agua a temperatura ambiente justo antes empezar la administración.

- 5 • En agua potable:

El riluzol se añade en agua potable a una concentración final de 6 mg/ml (ajustado para cada peso corporal medio del grupo) en ciclodextrina al 5 %. Como un ratón bebe aproximadamente 5 ml/día, la dosis estimada que se administra es de 30 (mg/kg)/día, que es una dosis que se demostró que aumentaba la supervivencia de los ratones.

- 10 - La ciclodextrina se usa como vehículo a la concentración final de un 5 %, diluida en agua a temperatura ambiente a partir de la solución de reserva (ciclodextrina al 20 %).

- Administración oral (por la boca):

- Las combinaciones de fármacos se administran por vía oral, cada día.

- La ciclodextrina se usa como vehículo a la concentración final del 5 %, diluida en agua a temperatura ambiente a partir de la solución de reserva (ciclodextrina al 20 %).

15 *Observación clínica*

La observación clínica de cada ratón se realiza cada día, desde el primer día de tratamiento (60 días de edad) hasta la muerte (o el sacrificio). La observación clínica consiste en el estudio de las pruebas de comportamiento: inicio de la parálisis, «pérdida de extensión», «pérdida del reflejo de enderezamiento», y observación de la marcha general:

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

- La prueba de pérdida de extensión consiste en la notificación de temblores o sacudidas y la posición de las extremidades posteriores (colgante o extendida hacia fuera) cuando el ratón se suspende por la cola.

- 25 - El ensayo de pérdida del reflejo de enderezamiento evalúa la capacidad que tiene el ratón para enderezarse por sí mismo en el plazo de 30 s después de ser girado hacia cada lado. El reflejo de enderezamiento se pierde cuando el ratón es incapaz de enderezarse por sí solo. La pérdida del reflejo de enderezamiento determina el estadio final de la enfermedad: se sacrifica todo ratón que no puede enderezarse por sí mismo.

Resultados: Las politerapias son eficaces en el modelo in vivo de ELA

Se observa una mejoría de la enfermedad en los animales enfermos tratados con la politerapia con baclofeno y acamprosato.

30 III.) EFECTO PROTECTOR DE LAS POLITERAPIAS DE LA INVENCION EN LA NEUROPATÍA INDUCIDA POR OXALIPLATINO COMO MODELO IN VIVO PARA EL DOLOR NEUROPÁTICO.

Las politerapias de la presente invención se analizan *in vivo*, en modelos adecuados de neuropatía periférica, es decir, el modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino y el modelo crónico de neuropatía inducida por oxaliplatino. Los animales, los protocolos y los resultados se presentan en este apartado.

35 *Cría de animales*

Estos experimentos son sólo con fin ilustrativo. Se usan ratas Sprague-Dawley (CERJ, Francia), con un peso de 150 a 175 g al comienzo de la parte experimental del tratamiento con oxaliplatino (D₀). Los animales se alojan en un animalario con acceso restringido en una habitación de temperatura (19,5 °C a 24,5 °C) y humedad relativa (45 % a 65 %) controladas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con acceso a voluntad al pienso granulado convencional de laboratorio y al agua durante todo el estudio. Se alojan 4 o 5 animales por jaula y se guarda un período de aclimatación de una semana antes de cualquier ensayo.

Diseño experimental

Se usan los siguientes cuatro grupos de ratas en todos los experimentos:

Grupos de control:

- 45 Grupo 1: Vehículo de oxaliplatino (agua destilada), i.p. / vehículo de combinación o combinaciones candidatas (agua destilada), oral, cada día.

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

oral, cada día.

Grupo 3: 3 mg/kg de oxaliplatino i.p. / monoterapia en agua destilada, oral, cada día x 9.

Grupos de prueba de la composición:

5 Grupo 4: 3 mg/kg de oxaliplatino i.p. / combinación o combinaciones candidatas en agua destilada, oral, cada día x 9.

Grupo 5: 3 mg/kg de oxaliplatino i.p. / gabapentina (100 mg/kg) en agua destilada, oral, los días de análisis (es decir D₁ y D₈);

El vehículo y los elementos problema se administran todos los días desde el D-1 al D7 (el día antes del último día de análisis), mientras que la gabapentina se administra en los días de análisis (120 minutos antes del análisis).

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

Inducción de la neuropatía

15 La neuropatía aguda es inducida por una sola inyección intraperitoneal de oxaliplatino (3 mg/kg). La neuropatía periférica crónica es inducida por inyecciones intraperitoneales repetidas de oxaliplatino (3 mg/kg, i.p.) los días 0, 2, 4 y 7 (CD = 12 mg/kg, i.p.). La neuropatía crónica en los seres humanos es acumulativa también y se observa con más frecuencia en los pacientes que han recibido dosis totales de oxaliplatino ≥ 540 mg/m², lo que corresponde a ~15 mg/kg como dosis acumulada en las ratas (Cersosimo R.J. 2005).

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

20 - La hiperalgesia térmica es el primer síntoma. Se puede medir mediante la prueba de la acetona o con la prueba de inmersión de la cola;

- La hiperalgesia mecánica aparece más tarde. Se puede cuantificar con la prueba de Von Frey o con la prueba de presión plantar.

Dosificación y pruebas con animales

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

Prueba de la acetona

30 Se valora la alodinia fría con la prueba de la acetona mediante la medida de las respuestas a la estimulación térmica no nociceptiva el D1 (alrededor de 24 horas después de la primera inyección de 3 mg/kg de oxaliplatino (efecto agudo del oxaliplatino)), y el D8 (efecto crónico del oxaliplatino).

35 En la prueba de la acetona, el tiempo de espera de la retirada de la pata trasera se mide después de la aplicación de una gota de acetona en la superficie plantar de ambas patas traseras (tiempo de reacción) y se puntúa la intensidad de la respuesta (puntuación de frío). El tiempo de reacción para el efecto de enfriamiento de la acetona se mide en el plazo de 20 s (límite) después de la aplicación de la acetona. Las respuestas a la acetona también se clasifican en la siguiente escala de 4 puntos: 0 (no hay respuesta), 1 (retirada rápida, contracción de la pata), 2 (retirada prolongada o contracción marcada de la pata), 3 (contracción repetida de la pata con lametón o mordisco).

Para cada grupo experimental, los resultados se expresan como:

40 - El tiempo de reacción definido como el tiempo, expresado en segundos, necesario para desencadenar la reacción de la pata (media de 6 medidas para cada rata en conjunto $\pm$ SEM).

- La puntuación de frío acumulada definida como la suma de las 6 puntuaciones para cada rata en conjunto $\pm$ SEM. La puntuación mínima es 0 (sin respuesta en ninguna de las 6 pruebas) y la puntuación máxima posible es 18 (contracción repetida y lametón o mordisco de las patas en cada una de las seis pruebas).

Análisis estadísticos

45 Se realiza la prueba de Student, unilateral, de tipo 3. El nivel de significación se establece en $p < 0,05$; todos los grupos se comparan con el grupo de enfermos + vehículo (grupo tratado con oxaliplatino). En las figuras se muestran las medias y el error estándar de la media.

Resultados

5 El oxaliplatino indujo una disminución significativa del tiempo de reacción de retirada de la pata después de la aplicación de acetona (grupo de enfermos + vehículo) durante el transcurso del tiempo. Esta disminución es progresiva y significativa a partir del día 1 (modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino) hasta el día 8 (modelo crónico) en comparación con el grupo con vehículo.

• Efecto antialodínico en el modelo agudo y en el modelo crónico de neuropatía inducida por oxaliplatino

10 La politerapia con baclofeno y acamprosato se analiza en los dos modelos de neuropatía inducida por oxaliplatino. Induce una disminución significativa de la puntuación de frío acumulativa y un aumento significativo del tiempo de reacción en comparación con el grupo tratado con vehículo y oxaliplatino. En conclusión, esta politerapia farmacológica protege de la neuropatía aguda y crónica

Referencias

1. Crook R. *et al.* (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4 (4): 452-5.
2. Houlden H., Baker M., *et al.* (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48 (5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., *et al.* (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8 (6): 1537-42.
4. Verkkoniemi A., Kalimo H., *et al.* (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60 (5): 483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5 (9): 677-85.
6. Suh Y.H. y Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54 (3): 469-525.
7. Blacker D., Albert M.S., *y col l.* (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51 (12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., *y col .* (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5 (4): 393-7.
9. Glenner G.G., Wong C.W., *et al.* (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2 (6): 357-69.
10. Ballatore C., Lee V.M., *et al.* (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8 (9): 663-72.
11. Bell K.F. y Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545 (1): 11-21.
12. Hardy J.A. y Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256 (5054): 184-5.
13. Braak H. y Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82 (4): 239-59.
14. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15 (1): 84-7.
15. Hardy J. y Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297 (5580): 353-6.
16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18 (4): 903-22.
17. Zlokovic B. V., The Blood Brain Barrier In Health And Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron review.* 2008, 57, 178-201.
18. Budd Haeberlein, S.L. y S.A. Lipton, *Excitotoxicity in neurodegenerative disease*, en *Encyclopedia of neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Elsevier. p. 77-86.
19. Hughes, J.R., *Alcohol withdrawal seizures*. *Epilepsy Behav*, 2009. 15 (2): p. 92-7.
20. Kim, A.H., G.A. Kerchner, y C. DW, *Blocking Excitotoxicity*, en *CNS Neuroprotection*, F.W. Marcoux y D.W. Choi, Editors. 2002, Springer: Nueva York. p. 3-36.
21. Hama A, Sagen J., Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J Neurotrauma.* Enero de 2011; 28 (1): 127-34.
23. Malgouris, C., *et al.*, *Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils*. *J Neurosci*, 1989. 9 (11): p. 3720-7.
24. Wahl, F., *et al.*, *Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats*. *Eur J Pharmacol*, 1993. 230 (2): p. 209-14.
25. Wahl, F., *et al.*, *Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain*

injury. Brain Res, 1997. 756 (1-2): p. 247-55.

26. McGleenon B.M., Dynan K.B. y Passmore A.P. (1999). Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*. 48 (4): 471-480.

27. Parsons C.G., Danysz W, Quack G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 38 (6): 735-67.

28. Magnaghi V, *et al*. GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: a cross-interaction with neuroactive steroids. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006, 28: 89-102.

29. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. y Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem*. 47, 2393-2404 (2004).

30. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. y Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab*. 4, 461-485 (2003).

31. Heimbach, T. *et al*. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm*. 261, 81-92 (2003).

32. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. y Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res*. 16, 1331-1343 (1999).

33. Steffansen, B. *et al*. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci*. 21, 3-16 (2004).

34. Stella, V. y *co*Prodrugs: Challenges and Rewards (AAPS, Nueva York, 2007).

35. Wermuth, CG. The Practice of Medicinal Chemistry. (Hardbound, 2003). Part VI, Chap 33: Designing prodrugs and bioprecursors.

36. Pezron, I. *et al*. Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, Vol. 12, N° 3, 331-340 (2002).

37. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).

38. Stella, V. J. y Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59, 677-694 (2007).

39. Higuchi, T.; Stella, V. eds. Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. *ACS Symposium Series*. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.

40. Roche, E. B. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. *American Pharmaceutical Association: Washington*, DC (1977).

41. Lal, R., *et al*., Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330 (3): p. 911-21.

42. Feng Xu, Ge Peng, Thu Phan, Usha Dilip, Jian Lu Chen, Tania Chernov-Rogan, Xuexiang Zhang, Kent Grindstaff, Thamil Annamalai, Kerry Koller, Mark A. Gallop, David J. Wustrow, *Discovery of a novel potent GABAB receptor agonist*; Bioorg Med Chem Lett. 2011 Nov 1; 21 (21): 6582-5.)

43. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. An Introduction to Chemoinformatics. Springer 2007.

44. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader y J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1: 12 doi:10.1186/1758-2946-1-12

45. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) Handbook of *Pharmaceutical Salts*: Properties, Selection, and Use. Wiley-VCH; 2 edición (29 de Marzo de 2011).

46. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. *DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets*. *Nucleic Acids Res*. 36, Issuesuppl 1. D901-D906 (2008).

47. Singer C. *et al*. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999, 19 (7): 2455-2463.

48. Braun S, Croizatb B, Lagrange MC, Wartera JM, Poindron P. *Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures*. Volumen 136, Publicaciones Issues 1-2, Marzo de 1996, Páginas 17-23.

49. Meunier J, Ieni J, Maurice T. *The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid α 25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the G_A receptor.* Br J Pharmacol. 149, 998-1012, 2006.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (i) baclofeno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o arbaclofeno placarbil o ácido 3-(p-clorofenil)4-hidroxibútrico, y (ii) acamprosato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, u homotaurina o sulfonato de etil dimetil amonio propano o taurina, para el uso en el tratamiento de esclerosis múltiple en un sujeto que lo necesita.
2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos un compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, ácido aminocaproico, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, ifenprodilo, moxifloxacin, bromocriptina o torasemida, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha composición comprende al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos:
baclofeno y acamprosato,
baclofeno y acamprosato y dietilcarbamazina,
baclofeno y acamprosato y cinacalcet,
baclofeno y acamprosato y sulfisoxazol,
baclofeno y acamprosato y torasemida,
baclofeno y acamprosato e ifenprodilo,
baclofeno y acamprosato y mexiletina,
baclofeno y acamprosato y eplerenona,
baclofeno y acamprosato y levosimendán,
baclofeno y acamprosato y terbinafina, o
baclofeno y acamprosato y leflunomida,
o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos:
Baclofeno, acamprosato y donepezilo
baclofeno, acamprosato y rivastigmina,
baclofeno, acamprosato y memantina,
baclofeno, acamprosato y gabapentina,
o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
5. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende (i) baclofeno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o arbaclofeno placarbil o ácido 3-(p-clorofenil)-4-hidroxibútrico, y (ii) acamprosato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, u homotaurina o sulfonato de etil dimetil amonio propano sulfonato o taurina, como únicos agentes activos.
6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los compuestos de dicha composición se formulan o se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha composición se administra repetidamente al sujeto.
9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación acamprosato/baclofeno (peso/peso) está comprendida entre 0,05 y 1000.
10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis de

baclofeno es menor que 100 mg/día.

11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis de acamprosato es menor que 1000 mg/día.

5 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa una sal de calcio de acamprosato.

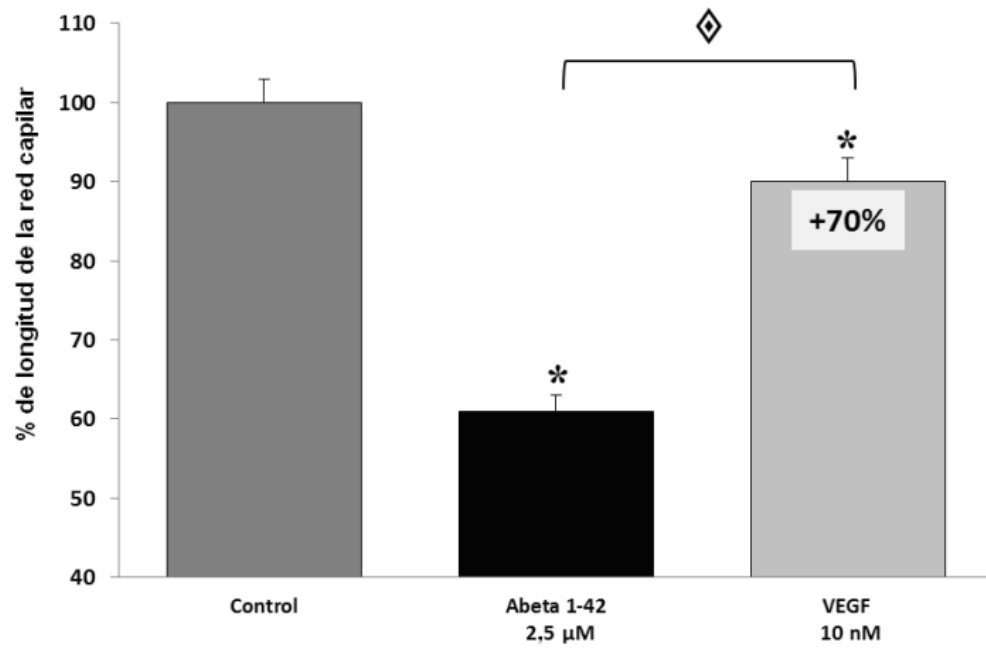


FIGURA 1

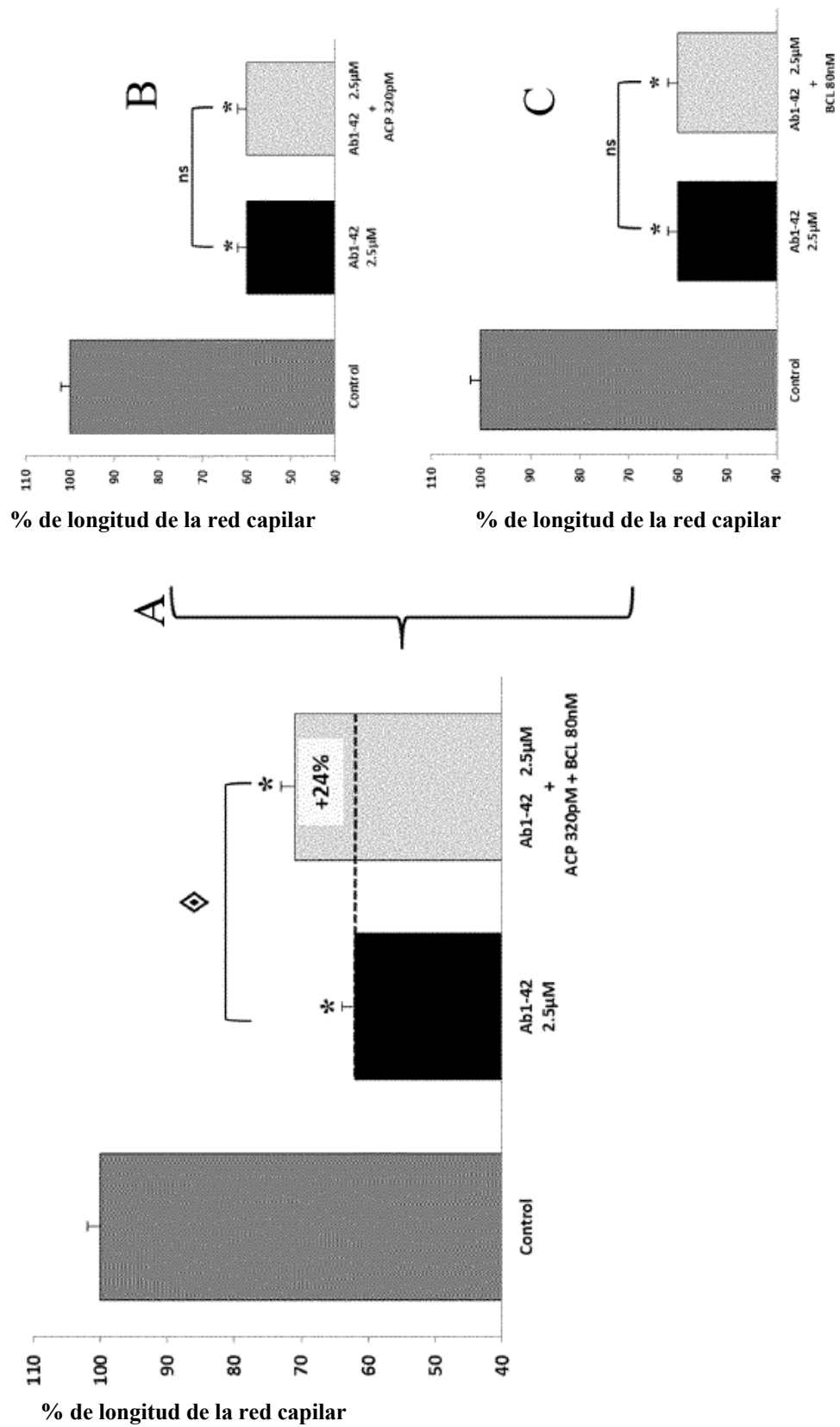


FIGURA 2

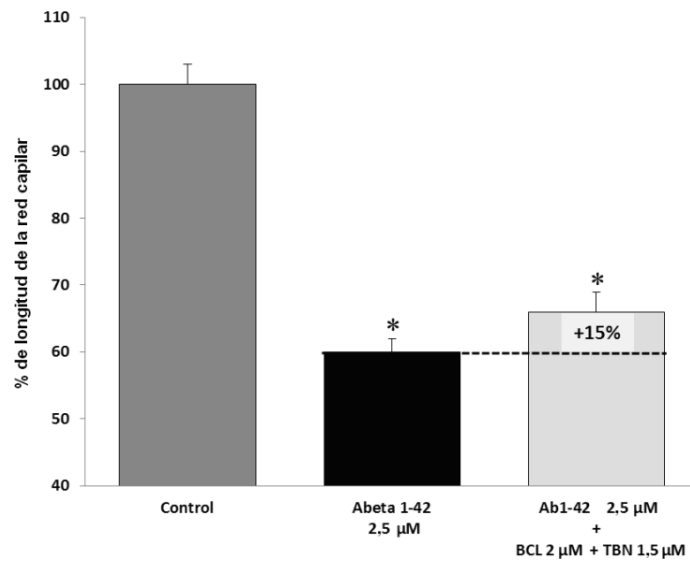


FIGURA 3

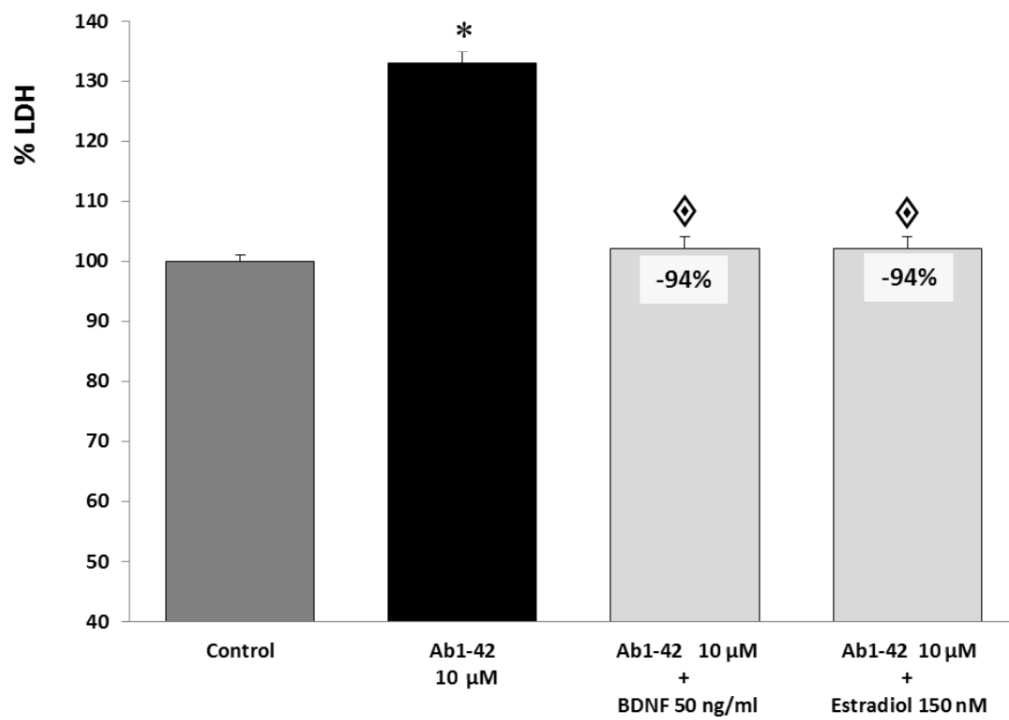


FIGURA 4

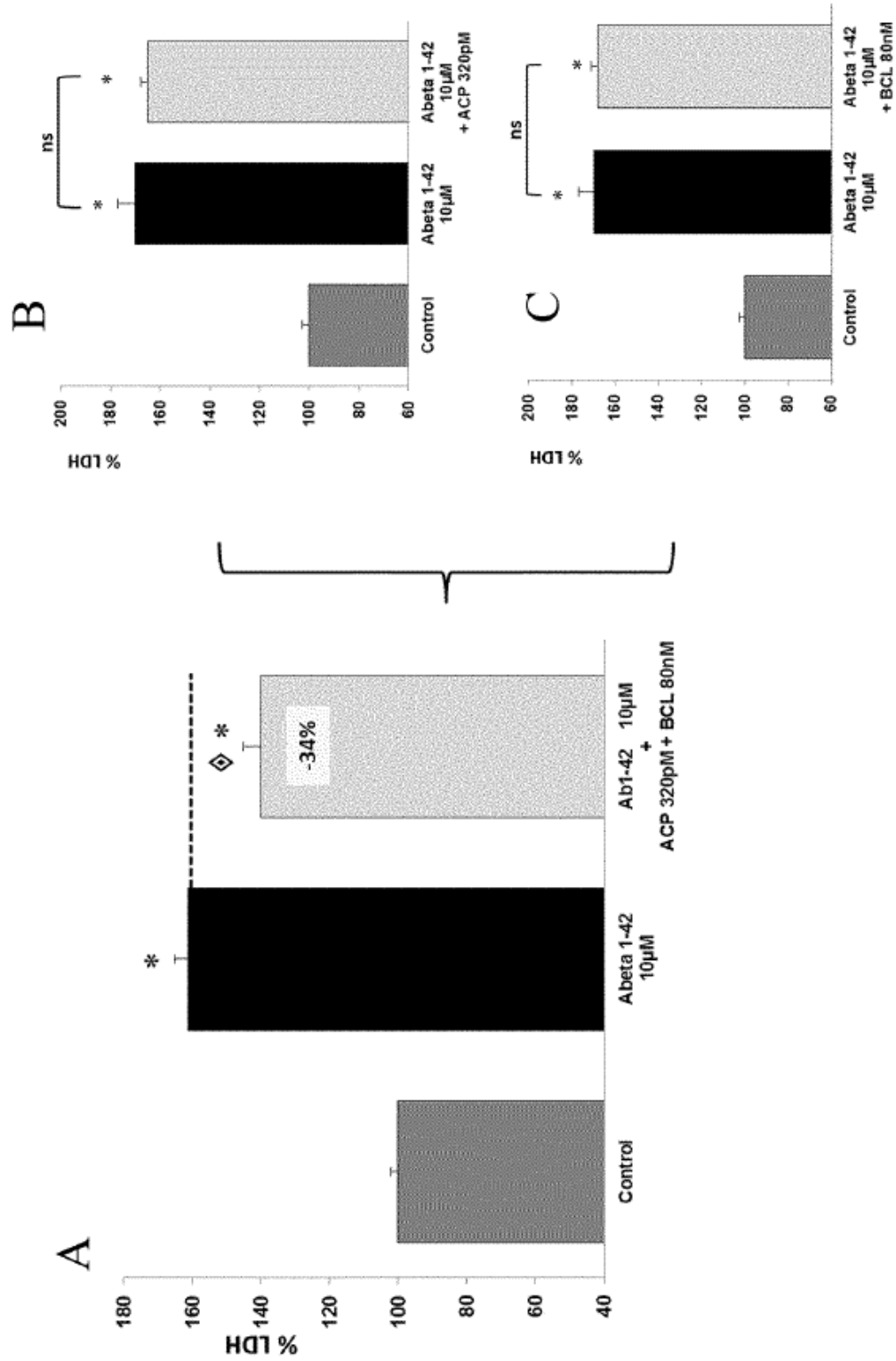


FIGURA 5

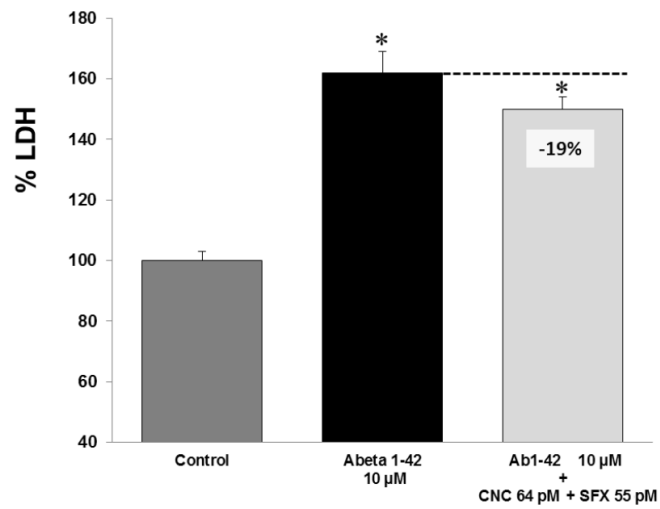


FIGURA 6

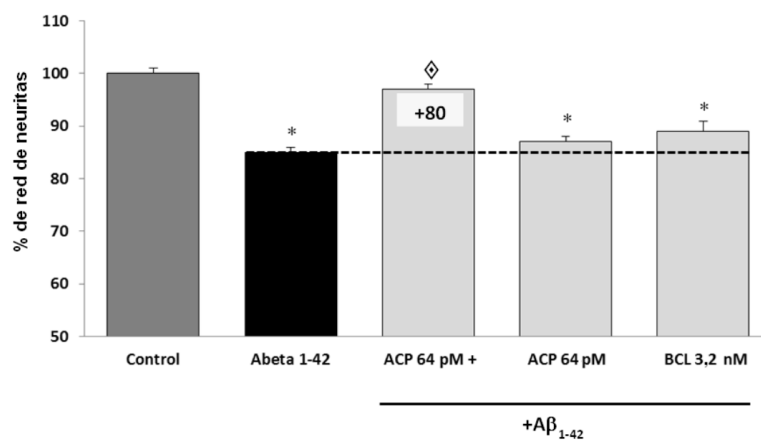


FIGURA 7

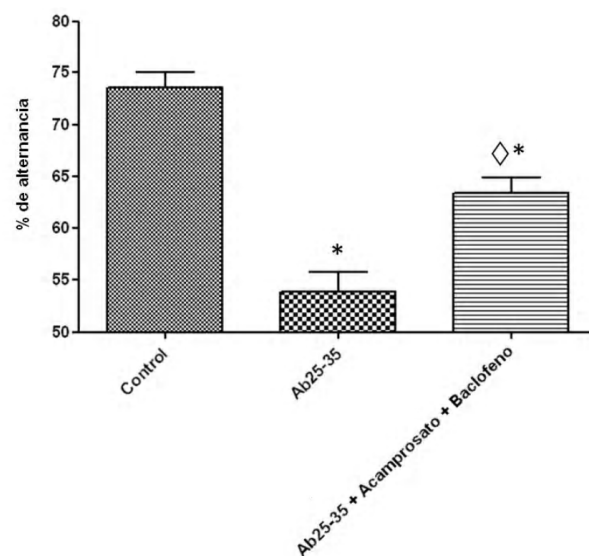


FIGURA 8

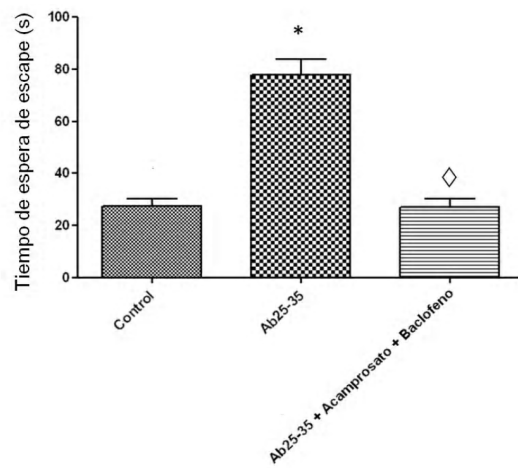


FIGURA 9

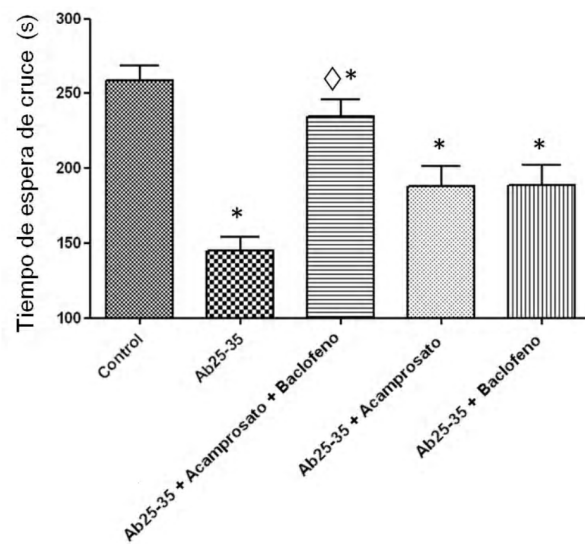


FIGURA 10

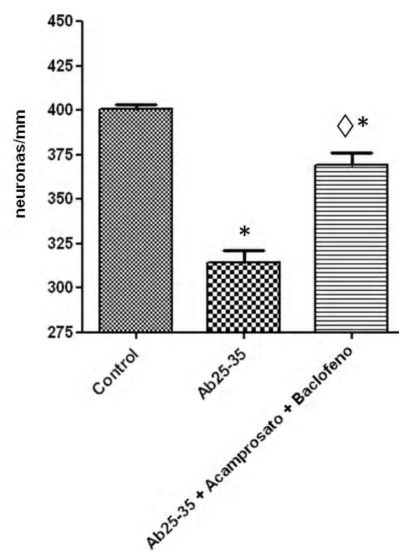


FIGURA 11

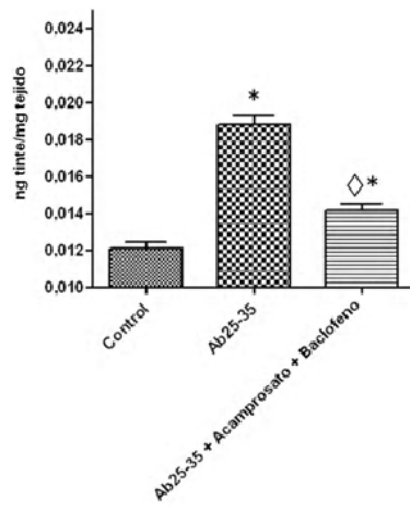


FIGURA 12

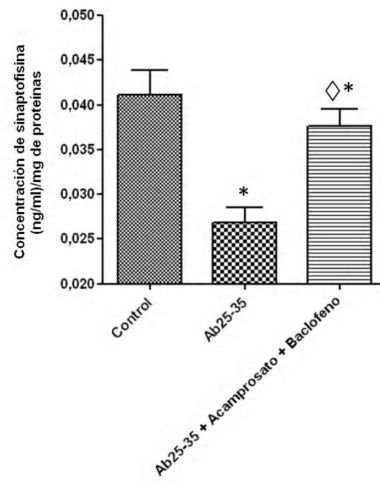


FIGURA 13

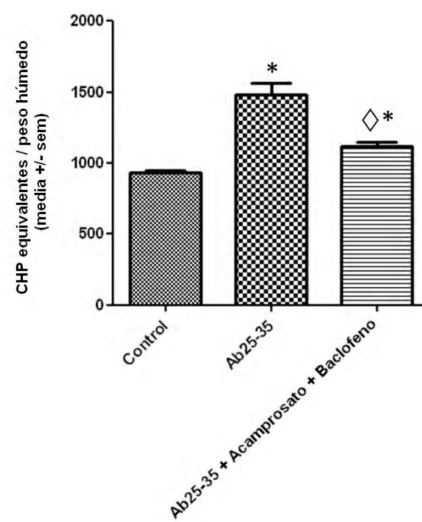


FIGURA 14

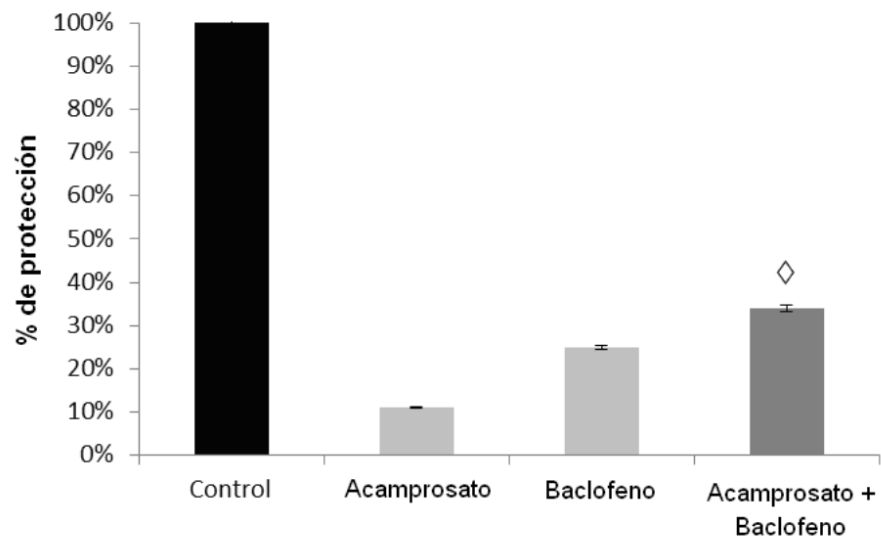


FIGURA 15

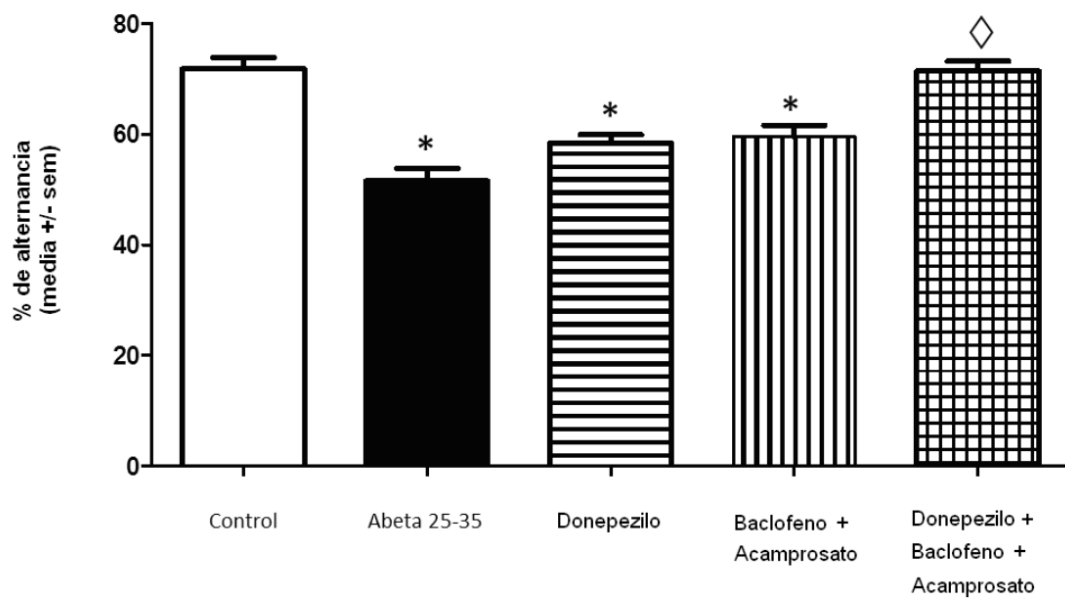


FIGURA 16

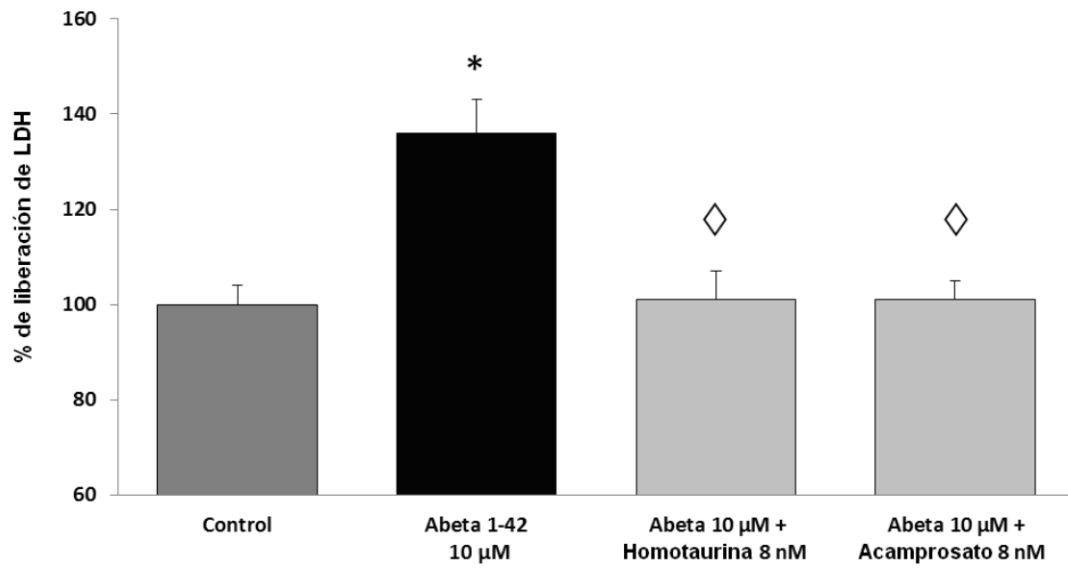


FIGURA 17

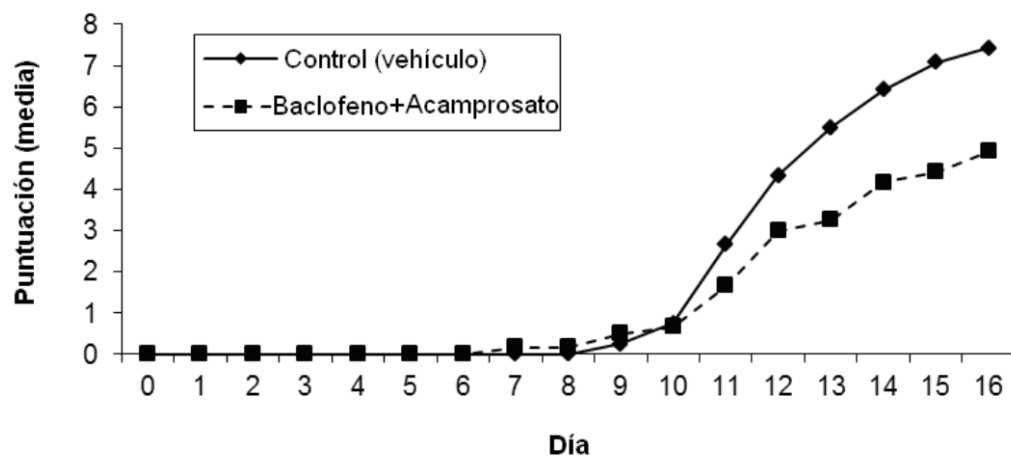


FIGURA 18