

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 298**

51 Int. Cl.:

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/US2010/042308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11009061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10735143 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2453890**

54 Título: **Composiciones que comprenden un inhibidor de colinesterasa para tratar trastornos cognitivos**

30 Prioridad:

17.07.2009 US 226425 P

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

03.03.2021

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive, T2-7H
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**STAUBLI, URSULA V. y
DONELLO, JOHN E.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 809 298 T3

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

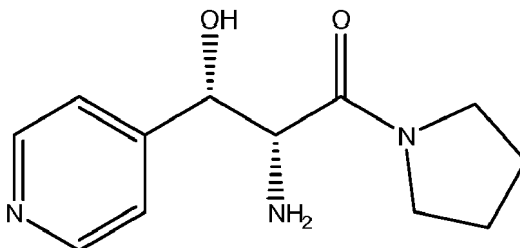
DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden un inhibidor de colinesterasa para tratar trastornos cognitivos

5 En el presente documento se divulga una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un trastorno cognitivo seleccionado del grupo que consiste en una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio confusional, una demencia y un trastorno de aprendizaje, que comprende:

10 (i) el inhibidor de colinesterasa fisostigmina, y

(ii) un compuesto representado por la fórmula I:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los inhibidores de colinesterasa tienen muchos efectos secundarios no deseables, tales como náuseas, diarrea, insomnio, calambres musculares, sudación y temblores.

20 Los inventores han descubierto que la administración del compuesto de fórmula I con un inhibidor de colinesterasa permite tratar un trastorno cognitivo seleccionado del grupo que consiste en una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio confusional, una demencia y un trastorno de aprendizaje usando dosis significativamente menores de inhibidores de colinesterasa (en algunas realizaciones, tan bajas como la décima parte de la dosis habitual o incluso menores), proporcionando de ese modo un tratamiento eficaz con menos efectos secundarios.

Antecedentes

25 Los documentos WO 2008/109610, WO 2008/109285, WO 2008/109287 y WO 2009/012082 divulgan el compuesto de fórmula I y compuestos relacionados para su uso en el tratamiento de trastornos cognitivos, tales como demencia y ansiedad.

Descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra el efecto del compuesto X (compuesto de fórmula I) sobre la amplitud de fEPSP hipocámpico registrada en la rata con libre movimiento en comparación con fisostigmina sola y con fisostigmina combinada con el compuesto X. Los resultados estadísticos para cada tratamiento que usa comparaciones dentro del grupo se indican mediante asteriscos (para valores exactos, véase la tabla 1). Las comparaciones entre tratamientos implicaron pruebas de la t para datos independientes, cuyos resultados se ilustran al lado de las líneas de conector respectivas (usando grupos a lo largo de pruebas de la t para datos independientes). BL= nivel inicial antes de la inyección de vehículo.

40 La figura 2 muestra el efecto del compuesto X sobre la amplitud de fEPSP cortical registrada en la rata con libre movimiento en comparación con fisostigmina sola y con fisostigmina combinada con el compuesto X. Los resultados estadísticos para cada uno de los tres tratamientos que usan comparaciones dentro del grupo se indican mediante asteriscos (para valores exactos, véase la tabla 2). Las comparaciones entre tratamientos implicaron pruebas de la t para datos independientes, cuyos resultados se ilustran al lado de las líneas de conector respectivas (usando pruebas de la t para datos independientes a lo largo de los grupos).

45 La figura 3 muestra el efecto del compuesto X sobre la amplitud de fEPSP cortical registrada en la rata con libre movimiento en comparación con galantamina sola y con galantamina combinada con el compuesto X. Los resultados estadísticos para cada uno de los tres tratamientos que usan comparaciones dentro del grupo se indican mediante asteriscos (para valores exactos, véase la tabla 3). Las comparaciones entre tratamientos implicaron pruebas de la t para datos independientes, cuyos resultados se ilustran al lado de las líneas de conector respectivas (usando pruebas de la t para datos independientes a lo largo de los grupos).

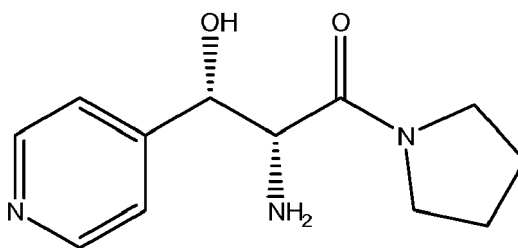
Descripción detallada de la invenciónInhibidores de colinesterasa

El término “inhibidor de colinesterasa”, tal como se usa en el presente documento, significa un compuesto que inhibe la degradación enzimática del neurotransmisor acetilcolina, aumentando de ese modo la duración de la acción de acetilcolina y sus niveles en el espacio sináptico. Dos enzimas son responsables principalmente de la degradación de acetilcolina, acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. “Inhibidor de colinesterasa” incluye un compuesto que inhibe o reduce de otro modo la acción de una o ambas de esas enzimas. El inhibidor de colinesterasa de la presente invención es fisostigmina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Las composiciones y los métodos de la invención contemplan que los inhibidores de colinesterasa son farmacéuticamente eficaces. “Farmacéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, significa que el inhibidor de colinesterasa es terapéuticamente útil en humanos. Por tanto, el término excluye aquellos inhibidores de colinesterasa usados como pesticidas, tales como aldicarb (2-metil-2-(metiltio)propionaldehído O-metilcarbamoiloxima), carbofurano (metilcarbamato de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranilo) y carbarilo (metilcarbamato de 1-naftilo), y aquellos inhibidores de colinesterasa que son demasiado tóxicos para los humanos que se usan como armas químicas, tales como sarín (2-(fluoro-metilfosforil)oxipropano), VX (S-[2-(diisopropilamino)etil]metilfosfonioato de O-etilo) y somán (3-(fluorometil-fosforil)oxi-2,2-dimetil-butano). La mayoría de inhibidores de colinesterasa que son pesticidas y armas químicas son cuasirreversibles o irreversibles; la mayoría de inhibidores de colinesterasa que son farmacéuticamente eficaces son reversible.

Compuestos de fórmula I

La composición farmacéutica para su uso de la invención incluye, además del inhibidor de colinesterasa fisostigmina, un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal del compuesto original que es adecuada para la administración a un animal o humano. Una sal comprende una o más formas iónicas del compuesto, tales como un ácido conjugado o una base conjugada, asociadas con uno o más contraiones correspondientes. Las sales pueden formar o incorporar uno o más grupos ácidos desprotonados (por ejemplo, ácidos carboxílicos), uno o más grupos básicos protonados (por ejemplo, aminas), o ambos (por ejemplo, zwitteriones).

Las sales farmacéuticamente aceptables de grupos funcionales ácidos pueden derivarse de bases orgánicas o inorgánicas. La sal puede comprender un ion mono o polivalente. De particular interés son los iones inorgánicos, litio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales orgánicas pueden formarse con aminas, particularmente sales de amonio, tales como mono, di y trialkilaminas o etanolaminas. Las sales también pueden formarse con cafeína, trometamina y moléculas similares. El ácido clorhídrico, o algún otro ácido farmacéuticamente aceptable, puede formar una sal con un compuesto que incluya un grupo básico, tal como una amina o un anillo de piridina.

Los métodos para producir el compuesto de fórmula I se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0036436.

Las composiciones útiles en el método de la invención pueden incluir además un excipiente. Dicho excipiente puede ser un portador o un diluyente; este se mezcla normalmente con el principio activo o se permite que diluya o encierre el compuesto activo. Si es un diluyente, el portador puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como excipiente o vehículo para el compuesto activo. Las formulaciones también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes conservantes, agentes edulcorantes y/o agentes aromatizantes.

Trastornos cognitivos

El término “trastorno cognitivo”, tal como se usa en el presente documento, se selecciona del grupo de una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, delirios confusionales, demencias y trastornos de aprendizaje.

En algunos casos, la causa de un trastorno cognitivo puede ser desconocida o incierta. En otros casos, el trastorno cognitivo puede asociarse con (es decir, estar provocado por o producirse en presencia de) otros estados caracterizados por daño a o pérdida de neuronas u otras estructuras implicadas en la transmisión de señales entre neuronas. Así, los trastornos cognitivos pueden asociarse con enfermedades neurodegenerativas, tales como

5 enfermedad de Alzheimer, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, hidrocefalia con presión normal, síndrome orgánico cerebral crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva o demencia senil (tipo Alzheimer); puede asociarse con traumatismo al cerebro, tal como el provocado por hematoma subdural crónico, conmoción cerebral, hemorragia intracerebral, o con otras lesiones al cerebro, tales como las provocadas por infección (por ejemplo, encefalitis, meningitis, septicemia) o intoxicación por fármacos o drogadicción; y puede asociarse con síndrome de Down y síndrome del cromosoma X frágil.

10 Los trastornos cognitivos también pueden asociarse con otros estados que alteran el funcionamiento normal del sistema nervioso central, incluyendo trastornos psiquiátricos tales como trastornos de ansiedad, trastornos disociativos, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia y trastornos somatomorfos y facticios; puede asociarse con estados del sistema nervioso periférico, tal como dolor crónico.

15 Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar trastornos cognitivos seleccionado del grupo de agnosias, amnesias, afasias, apraxias, delirios confusionales, demencias y trastornos de aprendizaje, independientemente de si se sabe o no su causa.

20 Los ejemplos de demencias que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen complejo de demencia asociado al sida, enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, demencia multiinfarto, enfermedad de Pick, demencia semántica, demencia senil y demencia vascular.

25 Los ejemplos de trastornos de aprendizaje que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen síndrome de Asperger, trastorno por déficit de atención, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, trastorno desintegrativo de la infancia y síndrome de Rett.

Los ejemplos de afasia que pueden tratarse con los métodos de la invención incluyen afasia progresiva no fluente.

30 Los compuestos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar pacientes que tienen deficiencias en actividades mentales que son leves o que de otro modo no interfieren significativamente con la vida diaria. El deterioro cognitivo leve es un ejemplo de dicho estado: un paciente con deterioro cognitivo leve presenta síntomas de demencia (por ejemplo, dificultades con el lenguaje o la memoria), pero la gravedad de estos síntomas es tal que un diagnóstico de demencia puede no ser apropiado. Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar deterioro cognitivo leve y otras formas similares menos graves de trastornos cognitivos.

35 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden el inhibidor de colinesterasa farmacéuticamente eficaz fisostigmina y un compuesto de fórmula I.

40 *Dosis*

45 Las composiciones farmacéuticas para su uso según la invención pueden formularse de modo que un paciente reciba una dosis de un inhibidor de colinesterasa fisostigmina que es normalmente eficaz, cuando se administra por separado, para tratar el trastorno cognitivo para el que está indicado el inhibidor de colinesterasa, y una dosis de un compuesto de fórmula I que es normalmente eficaz, cuando se administra por separado, para tratar el trastorno cognitivo. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden formularse de modo que las dosis de cada compuesto pueden ser aquellas que sean ineficaces o mínimamente eficaces cuando los compuestos se administran solos. Esto permite administrar a un paciente una formulación de la invención que es tan eficaz como dosis más grandes del inhibidor de colinesterasa fisostigmina y un compuesto de fórmula I administrados solos, pero eso es menos probable que conduzca a efectos secundarios. Sin embargo, esto no significa que las formulaciones de la invención comprendan inhibidores de colinesterasa y compuestos de fórmula I sólo en tales dosis que son, cuando se administran solos, mínimamente eficaces: es probable que a un paciente que se le administra una composición que comprende la dosis habitual de tales compuestos experimente una mejora que es mayor que la mejora que experimentaría el paciente cuando se le administran los compuestos solos.

55 La dosis precisa y la frecuencia de administración dependen de la gravedad y naturaleza del estado del paciente, del modo de administración, de la potencia y farmacodinámica del compuesto particular empleado y del juicio del médico tratante. La determinación de la dosis es un asunto rutinario que se encuentra bien dentro de la capacidad de alguien experto habitual en la técnica. Además, las dosis de anticonvulsivos que alivian el dolor para el tratamiento de convulsiones, comentadas en secciones previas, pueden usarse como guía.

60 Puede ser deseable administrar una dosis del inhibidor de colinesterasa fisostigmina y el compuesto de fórmula I que es ineficaz o mínimamente eficaz cuando los compuestos se administran solos. La determinación de dicha dosis es un asunto rutinario. Dichas dosis típicas se exponen a continuación:

65 Tabla 2 - Dosis de inhibidores de colinesterasa que no se encuentran dentro del alcance de la presente invención que

generalmente son ineficaces o mínimamente eficaces, cuando se administran solos, para tratar demencia en pacientes adultos

COMPOSICIÓN	DOSIS INEFICACES
Donepezilo	< 5 a 10 mg una vez al día
Galantamina	< 8 a 12 mg dos veces al día
Rivastigmina	< 3 a 6 mg dos veces al día

- 5 Si se desea administrar una dosis del inhibidor de colinesterasa que sea eficaz cuando se administra solo, puede usarse generalmente en exceso de las dosis indicadas anteriormente.

Excipientes y formas de dosificación

- 10 Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que, para la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención, el inhibidor de colinesterasa fisostigmina y un compuesto de fórmula I pueden mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables que se conocen bien en la técnica.

- 15 Una composición farmacéutica que va a administrarse por vía sistémica puede confeccionarse como polvo, pastilla, comprimido, o similares, o como disolución, emulsión, suspensión, aerosol, jarabe o elixir adecuado para administración oral o parenteral o inhalación.

- 20 Para las formas de dosificación o los medicamentos sólidos, los portadores sólidos no tóxicos incluyen, pero no se limitan a, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, polialquilenglicoles, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las formas de dosificación sólidas pueden estar no recubiertas o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, por tanto, proporcionar una acción sostenida a lo largo de un periodo más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo del tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse mediante la técnica descrita en las patentes estadounidenses n.º 4.256.108, n.º 4.166.452 y n.º 4.265.874 para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para controlar la liberación. Las formas de dosificación líquidas farmacéuticamente administrables pueden comprender, por ejemplo, una disolución o suspensión de uno o más de los compuestos actualmente útiles y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tales como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de ese modo una disolución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, y similares. Los ejemplos típicos de tales agentes auxiliares son acetato de sodio, monolaurato de sorbitano, trietanolamina, acetato de sodio, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos actuales de preparación de tales formas de dosificación se conocen, o resultarán evidentes, por aquellos expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16ª edición, 1980. La composición de la formulación que va a administrarse, en cualquier caso, contiene una cantidad de uno o más de los compuestos actualmente útiles en una cantidad eficaz para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

- 40 En general, la administración parenteral se caracteriza por inyección, o bien por vía subcutánea, por vía intramuscular o bien por vía intravenosa. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, o bien como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección o bien como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables que van a administrarse también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, y similares.

Composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de un trastorno cognitivo según las reivindicaciones

- 50 Las composiciones de la invención son útiles para tratar trastornos cognitivos seleccionados del grupo que consiste en una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio confusional, una demencia y un trastorno de aprendizaje. "Tratar", tal como se usa en el presente documento, tratar de forma médica. Incluye, por ejemplo, administrar un compuesto de la invención para evitar la aparición de un trastorno cognitivo, así como aliviar su gravedad.

- 55 A un paciente que tiene un trastorno cognitivo se le puede administrar una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de colinesterasa y un compuesto de fórmula I. Sin embargo, estos compuestos también pueden administrarse por separado, administrarse uno inmediatamente después del otro o administrarse uno en un corto intervalo después del otro (por ejemplo, 5-15 minutos, o 15-30 minutos, o 30 minutos - 1 hora), o administrarse uno en un intervalo más prolongado después del otro (por ejemplo, 1-2 horas, 2-4 horas, 4-6 horas, 6-12 horas o 12-24 horas).
- 60 Un compuesto también puede administrarse de forma más frecuente que el otro, por ejemplo, administrarse un inhibidor de colinesterasa una o más veces al día y un compuesto de fórmula I dos o más veces al día (o viceversa).

Ejemplos

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

5 Ejemplo 1

Transmisión sináptica excitatoria basal en el hipocampo y la corteza de la rata con libre movimiento

10 Se llevaron a cabo experimentos en ratas Sprague-Dawley macho con libre movimiento a las que se le implantó electrodos profundos de estimulación y registro en el hipocampo y la corteza olfativa para (1) caracterizar el efecto de un compuesto de fórmula 1 ((2R,3S)-2-amino-3-hidroxi-3-(piridin-4-il)-1-(pirrolidin-1-il)propan-1-ona) ("compuesto X") sobre la transmisión sináptica excitatoria basal, una medición positivamente asociada con el rendimiento conductual y la codificación de la información; y (2) determinar una posible interacción en la transmisión sináptica cuando el compuesto X se aplica conjuntamente con fisostigmina, un miembro de la familia de inhibidores de colinesterasa que
15 tiene eficacia procognitiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

El compuesto X por sí mismo potencia significativamente la transmisión sináptica excitatoria hipocámpica, y fue eficaz de manera similar a la potenciación de la transmisión en la corteza olfativa. La fisostigmina tuvo efectos marginales sobre la transmisión sináptica en el hipocampo y la corteza a las dosis sometidas a prueba. La fisostigmina, cuando
20 se aplicó conjuntamente con el compuesto X, facilitó la transmisión sináptica hasta un grado que fue significativamente mayor que el aumento obtenido con el compuesto X solo tanto para el hipocampo como para la corteza. Esta sinergia entre dos clases de compuestos estructural y funcionalmente muy diferentes sugiere que los efectos procognitivos del compuesto X pueden magnificarse con compuestos colinérgicos ya aprobados para la enfermedad de Alzheimer.

25 *Métodos*

Se registraron respuestas postsinápticas excitatorias del campo (fEPSP) provocadas por estimulación eléctrica en animales con libre movimiento con electrodos profundos implantados de forma permanente en el hipocampo y la corteza olfativa. El experimento 1 comparó el efecto de un nivel de dosis (6 mg/kg, i.p.) del compuesto X sobre las fEPSP hipocámpicas y corticales con datos de control del vehículo.
30

Sujetos

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho, de 3 meses de edad en el momento de la cirugía. Los animales se alojaron individualmente y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 con alimento y agua disponibles a voluntad.
35

Preparación para la electrofisiología hipocámpica y cortical crónica

La preparación de animales con electrodos implantados de manera crónica siguió los procedimientos tal como se describe esencialmente en el trabajo publicado anteriormente (U. Staubli y J. Scafidi, J. J. Neurosci. 17: 4820-4828 (1997)). Para los registros del hipocampo, el electrodo de estimulación se colocó en la vía perforante dentro de la corteza entorrinal, y el electrodo de registro en el hilio de la circunvolución dentada hipocámpica. Para el registro de la corteza olfativa, el electrodo de estimulación se colocó en la cintilla olfativa y el electrodo de registro en la capa I de la corteza piriforme.
40
45

Registro de ratas con libre movimiento

Diez días tras la recuperación de la cirugía, se aclimataron los animales a la jaula de registro, así como a la unión de un cable de registro a la plataforma de la cabeza. Las sesiones de registro comenzaron ajustando las intensidades de corriente (25-100 μ A) y la duración del pulso del pulso de estimulación monofásico (100-250 μ s) para producir un potencial postsináptico excitatorio del campo (fEPSP) que fue del 50-60% de la amplitud máxima de la respuesta libre máxima de la población que oscilaba normalmente entre 4 y 8 mV. Se amplificaron y filtraron las señales de registro con una banda de paso de 1 Hz a 5 kHz y se introdujeron en un software especializado de ejecución de PC (NacGather) que digitaliza las mediciones y almacena las respuestas provocadas. Las sesiones de registro de nivel inicial en las que se provocaron fEPSP cada 20 s se llevaron a cabo diariamente durante 20-45 min durante al menos 3 días, y sólo se seleccionaron los animales que mostraron y mantuvieron fEPSP monosinápticos provocados adecuados y estables para su estudio posterior.
50
55

Pruebas farmacológicas

Los animales hipocámpicos (sujetos con electrodos implantados en el hipocampo) se asignaron al azar a uno de 3 grupos, es decir, compuesto X solo, compuesto X más fisostigmina, fisostigmina sola. Los animales corticales (sujetos con electrodos implantados en la corteza olfativa) se asignaron al azar a 3 grupos, es decir, compuesto X solo, compuesto X más fisostigmina o fisostigmina sola. Para cada prueba, se registraron respuestas de nivel inicial durante al menos 15 minutos para establecer la estabilidad, seguido por la inyección de disolución de vehículo (ddw) y el registro durante otros 20 min para verificar que el procedimiento de inyección o el vehículo no afectaban a las
60
65

respuestas de nivel inicial. Si se observaban cambios en el nivel inicial mayores de más del 5%, el experimento se finalizó para ese día. Al resto de animales se les inyectó con compuesto de prueba 20 min después del vehículo, y se continuó el registro de fEPSP durante al menos 2 horas, pero 4 h si el efecto farmacológico todavía estaba presente a las 2 h. En los casos en los que se usaron animales de manera repetida, un mínimo de tres días de reposo farmacológico siguió a cada sesión de prueba. Las respuestas se muestrearon una vez cada 20 s a lo largo de todo el experimento.

Compuestos de prueba

El compuesto X se mantuvo congelado a aproximadamente -20°C en una nevera como un polvo. Inmediatamente antes, se disolvió el polvo en agua doblemente destilada (ddw) para elaborar una reserva 12 mg/ml y luego se diluyó al 50% para la inyección a 6 mg/kg a un volumen final de 1 ml/kg.

La fisostigmina (hemisulfato de eserina) se adquirió de Sigma Aldrich y se disolvió en ddw para elaborar una disolución de reserva 1 mg/ml. Para la inyección, se diluyó la reserva 10x y se administró a 0,1 mg/kg a un volumen final de 1 ml/kg.

Para el tratamiento de combinación del compuesto X y fisostigmina, la disolución de reserva 12 mg/ml del compuesto X y la reserva 1 mg/ml de fisostigmina se diluyeron al 50% y al 10%, respectivamente, y se inyectaron a un volumen final de 1 ml/kg.

Todos los compuestos se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.).

Cálculos

Todos los datos electrofisiológicos se recogieron y digitalizaron mediante el sistema de adquisición de neurodatos NacGather 2.0.7.2, y luego se analizaron usando el programa NacShow y se representaron gráficamente usando el programa GraphPad Prism. Todos los resultados se expresaron con respecto a los valores de amplitud de fEPSP a lo largo de un periodo de nivel inicial de 15 min antes de la inyección de vehículo y se presentan como la media ± EEM. Para los efectos farmacológicos sobre la transmisión sináptica excitatoria (amplitud de fEPSP), se realizaron comparaciones estadísticas para cada compuesto por separado, usando pruebas de la t de dos vías para datos emparejados entre datos promediados para todo el periodo de vehículo antes del fármaco de 15 min frente a los datos promediados a lo largo de un periodo después del fármaco de 15 min, identificados cuando se muestra el aumento más grande. Las comparaciones estadísticas entre efectos facilitadores de los tratamientos de combinación (compuesto X con fisostigmina) frente al compuesto X solo o inhibidores de colinesterasa solos, respectivamente, se realizaron usando pruebas de la t unilateral para datos independientes entre valores máximos después del fármaco promediados a lo largo de 15 min. El valor de significación se estableció a p<0,05 (indicado por *), p<0,01 (indicado por **) y p<0,001 (indicado por ***).

Resultados

La tabla 1 muestra el efecto de fisostigmina, compuesto X y compuesto X combinado con fisostigmina sobre la transmisión sináptica excitatoria hipocámpica en la rata con libre movimiento. Los efectos farmacológicos se evaluaron midiendo cambios en la amplitud de fEPSP en presencia de fármaco con respecto a cambios que se producían tras la inyección de vehículo inmediatamente antes de la administración de fármaco. El compuesto X, tanto por sí solo como aplicado conjuntamente con fisostigmina, potenció significativamente los fEPSP hipocámpicos, a diferencia de la fisostigmina que no provocó ninguna alteración significativa en la transmisión basal. Además, la facilitación producida por la aplicación conjunta del compuesto X con fisostigmina fue significativamente mayor que la observada con el compuesto X solo o la fisostigmina sola (véase la figura 1).

Tabla 1

TRATAMIENTO	DOSIS (MG/KG)	AMPLITUD DE fEPSP DEL VEHÍCULO [% DE NIVEL INICIAL DE PREVEHÍCULO ± EEM]	AMPLITUD DE fEPSP DEL FÁRMACO [% DE NIVEL INICIAL DE PREVEHÍCULO ± EEM]	VALOR DE P (FÁRMACO FRENTE A VEHÍCULO)
Fisostigmina	0,1	0,86 + 0,49	2,33 + 2,91	0,62
Compuesto X	6,0	-1,24 + 0,43	7,86 + 2,98	0,05*
Compuesto X más fisostigmina	6,0 más 0,1	-1,0 + 0,44	18,1 + 2,04	0,02*

La tabla 1 muestra que el compuesto X a 6 mg/kg i.p. solo (n=5) y combinado con fisostigmina a 0,1 mg/kg i.p. (n=3) tuvo una actividad facilitadora significativa sobre la transmisión sináptica excitatoria basal en el hipocampo de ratas Sprague-Dawley con libre movimiento. La fisostigmina por sí sola (n=3) fue inactiva, no demostrando ninguna potenciación significativa de la transmisión sináptica basal. Se muestran los valores de comparación de pruebas de la

t (bilaterales, para datos emparejados) individuales.

5 La tabla 2 muestra el efecto fisostigmina, compuesto X y compuesto X combinado con fisostigmina sobre la transmisión sináptica excitatoria en la corteza olfativa. Los efectos farmacológicos se evaluaron midiendo cambios en la amplitud de fEPSP en presencia de fármaco con respecto a cambios que se producían tras la inyección de vehículo inmediatamente antes de la administración de fármaco. El compuesto X, tanto por sí solo como aplicado conjuntamente con fisostigmina, potenció significativamente los fEPSP hipocámpicos. La fisostigmina también provocó un aumento significativo en la transmisión basal, pero este efecto era significativamente menor que el observado con el compuesto X solo o el compuesto X aplicado conjuntamente con fisostigmina (véase la figura 2). Además, la
10 facilitación producida por la aplicación conjunta del compuesto X más fisostigmina fue significativamente mayor que la observada con el compuesto X solo (véase la figura 2).

Tabla 2

TRATAMIENTO	DOSIS (MG/KG)	AMPLITUD DE fEPSP DEL VEHÍCULO [% DE NIVEL INICIAL DE PREVEHÍCULO ± EEM]	AMPLITUD DE fEPSP DEL FÁRMACO [% DE NIVEL INICIAL DE PREVEHÍCULO ± EEM]	VALOR DE P (FÁRMACO FRENTE A VEHÍCULO)
Fisostigmina	0,1	0,54 + 0,23	5,30 + 0,69	0,004**
Compuesto X	6,0	0,17 + 0,60	10,67 + 1,67	0,00002***
Compuesto X más fisostigmina	6,0 más 0,1	0,64 + 1,00	17,51 + 3,06	0,0004**

15 La tabla 2 muestra que el compuesto X a 6 mg/kg i.p. solo (n=11) y combinado con fisostigmina a 0,1 mg/kg i.p. (n=7) tuvo una actividad facilitadora significativa sobre la transmisión sináptica excitatoria basal en la corteza olfativa de ratas Sprague-Dawley con libre movimiento. La fisostigmina por sí sola (n=5) también produjo una potenciación significativa de la transmisión sináptica basal. Se muestran los valores de comparación de pruebas de la t (bilaterales, para datos emparejados) individuales. La facilitación producida por la fisostigmina sola fue significativamente más
20 pequeña que la obtenida tanto con el compuesto X solo como con el compuesto X más fisostigmina combinados.

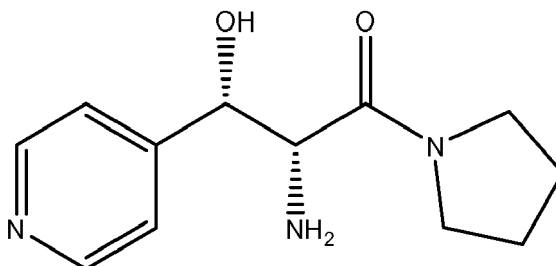
Estos experimentos muestran que el compuesto X, a una dosis que potencia la memoria en roedores, produjo un aumento significativo en la transmisión sináptica excitatoria basal hipocámpica y cortical, una medición positivamente asociada con el rendimiento conductual y el aprendizaje. Esta respuesta del compuesto X en la rata con libre movimiento se potenció significativamente mediante la administración conjunta de dosis por debajo del umbral de fisostigmina tanto en el hipocampo como en la corteza olfativa, y en un grado similar. La fisostigmina por sí sola a la misma dosis no afectó a la transmisión basal. Estos resultados demuestran que el compuesto X puede magnificar o
25 sinergizar con fisostigmina.
30

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un trastorno cognitivo seleccionado del grupo que consiste en una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio confusional, una demencia y un trastorno de aprendizaje que comprende:

(i) el inhibidor de colinesterasa fisostigmina, y

(ii) un compuesto de fórmula I

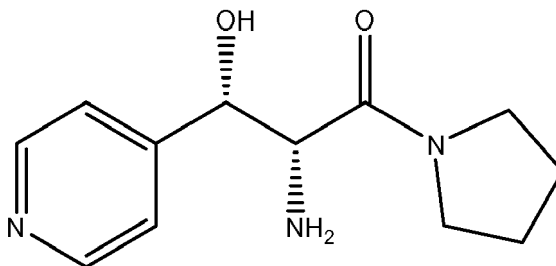


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, que comprende:

(i) el inhibidor de colinesterasa fisostigmina; y

(ii) un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el inhibidor de colinesterasa se administra a una dosis que es ineficaz o mínimamente eficaz para tratar dicho trastorno cognitivo cuando se administra solo.

3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el inhibidor de colinesterasa magnifica el efecto procognitivo del compuesto de fórmula I o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Combinación de una primera y una segunda composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un trastorno cognitivo seleccionado del grupo que consiste en una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio confusional, una demencia y un trastorno de aprendizaje, comprendiendo la primera composición farmacéutica el inhibidor de colinesterasa fisostigmina, y comprendiendo la segunda composición farmacéutica un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

Figura 1

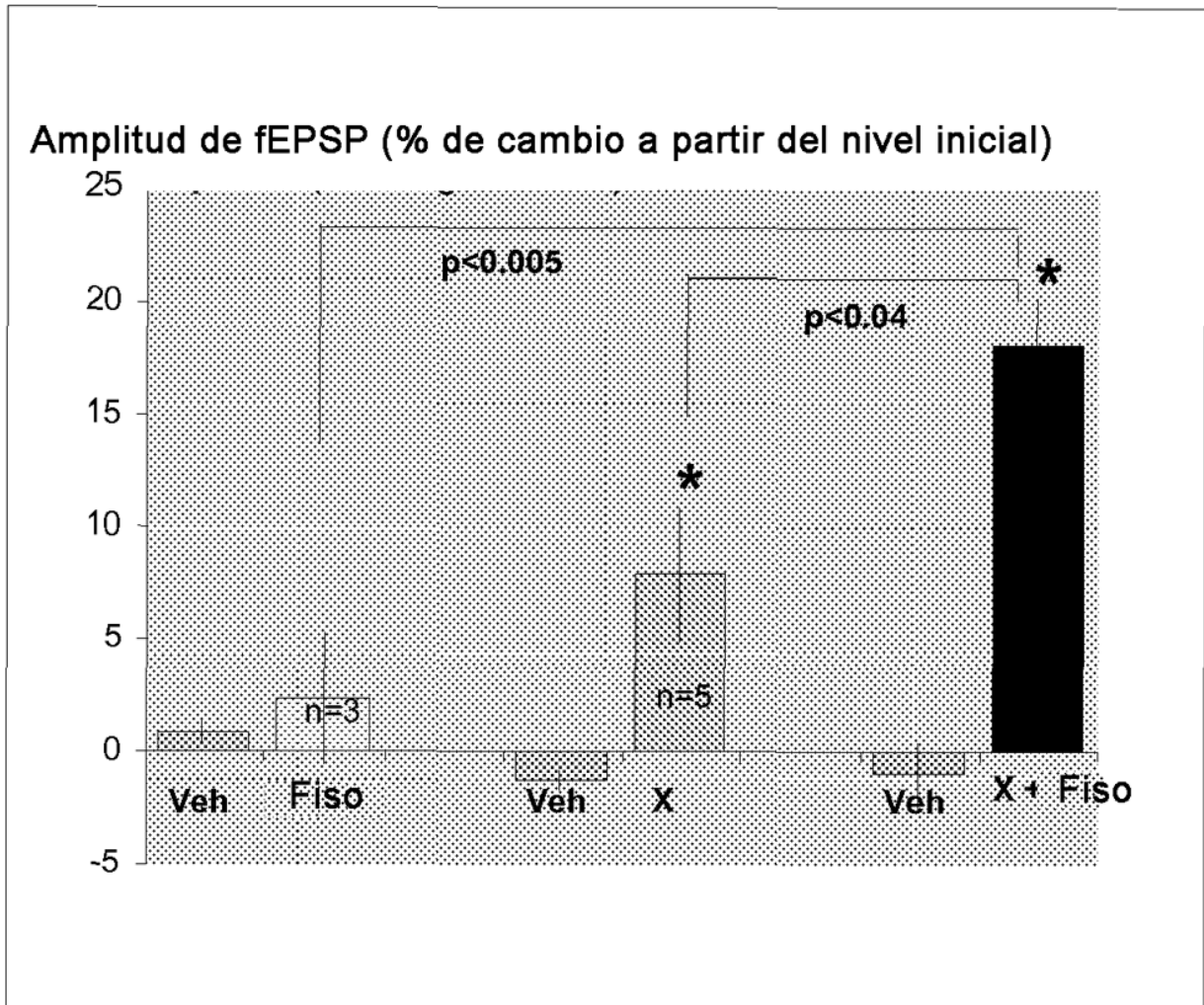


Figura 2

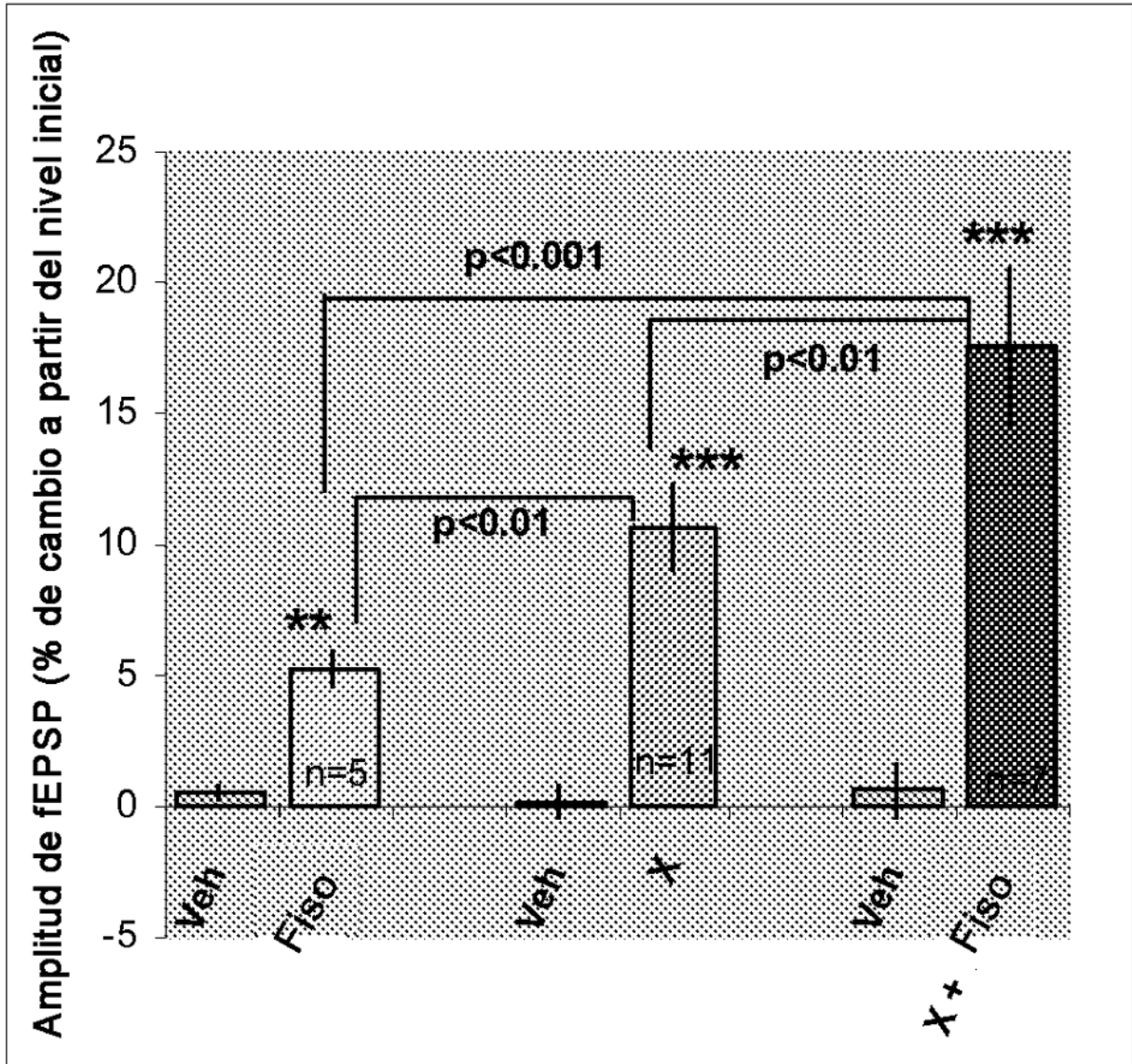


Figura 3

