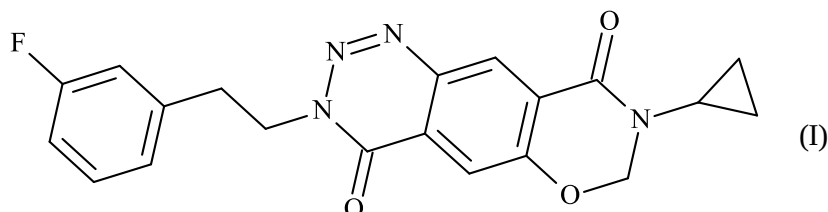


**NUEVA ASOCIACIÓN ENTRE LA
8-CICLOPROPIL-3-[2-(3-FLUOROFENIL)ETIL]-7,8-DIHIDRO-3H-
[1,3]OXAZINO[6,5-*g*][1,2,3]BENZOTRIAZINA-4,9-DIONA
Y UN INHIBIDOR DE LA ACETILCOLINESTERASA
Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LA CONTIENEN**

**LES LABORATOIRES SERVIER
35, RUE DE VERDUN
92284 SURESNES CEDEX
FRANCIA**

**INVENTORES : Sylvie BRETIN
 Maria PUEYO**

La presente invención se refiere a una nueva asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona de fórmula (I):



o una de sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa para la obtención de composiciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento cerebral y con las enfermedades neurodegenerativas.

La 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona es un modulador alostérico positivo de los receptores glutamatérgicos AMPA descrito en la solicitud de patente WO 2008/085506. Más precisamente, el compuesto de fórmula (I) posee propiedades procognitivas, mejora la plasticidad sináptica y demuestra propiedades neuroprotectoras, lo que le confiere una actividad interesante en el tratamiento de los trastornos del sistema nervioso central y, más particularmente, en el tratamiento de los déficits cognitivos asociados con el envejecimiento cerebral y con las enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se refiere a la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona de fórmula (I) o sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa, así como a sus propiedades interesantes para el tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento cerebral y con las enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas ligadas al envejecimiento cerebral tales como la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por trastornos de la memoria y disfunciones

cognitivas. Los trastornos cognitivos están asociados generalmente con una disminución de la capacidad de las neuronas de sintetizar y liberar determinados neurotransmisores tales como, por ejemplo, glutamato y acetilcolina (Robbins et al., *Trends in Pharmacol. Sci.* 2006(3), 27, 141-148). Además, se observa una pérdida progresiva de la plasticidad sináptica y de los procesos neuronales, acelerándose esta pérdida neuronal en determinadas regiones específicas del cerebro. Los estudios patofisiológicos han indicado claramente que un déficit de la neurotransmisión glutamatérgica está asociado estrechamente con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Advokat et al., *Neuroscience & Biobehav. Rev.* 1992, 16, 13-24; Francis et al., *Progress in Neurobiology* 1992, 39(5), 517-545).

En el sistema glutamatérgico, el receptor de AMPA ("ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico") parece ser el más implicado en los fenómenos de excitabilidad neuronal fisiológica y, principalmente, en aquellos implicados en los procesos de memorización. Por ejemplo, se ha mostrado que el aprendizaje está asociado al aumento de la unión del AMPA a su receptor en el hipocampo, una de las zonas cerebrales esenciales para los procesos cognitivos.

En paralelo, se observa una degeneración progresiva de las neuronas colinérgicas durante el transcurso de la enfermedad de Alzheimer. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa tales como donepezil se utilizan habitualmente en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer con el fin de limitar la disminución de las tasas de acetilcolina en el cerebro bloqueando la acción de la acetilcolinesterasa. Se ha mostrado que los inhibidores de la acetilcolinesterasa, así como los moduladores alostéricos positivos de los receptores de AMPA, permitían mejorar las propiedades cognitivas en diferentes modelos animales de memoria episódica y de memoria de trabajo (Black, *Psychopharmacol.* 2005, 179, 154-163; O'Neill et al., *IDrugs* 2007, 10(3), 185-192; Yuede et al., *Behav. Pharmacol.*, 2007, 18(5-6), 347-363). La mejora de las funciones cognitivas puede basarse, por lo tanto, en dos tipos de estrategias, dirigidas bien a los receptores AMPA o glutamato, bien acetilcolina.

De forma sorprendente, la presente invención ha mostrado que los efectos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa se potencian por los de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona o de sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable. Así, la

coadministración de estos compuestos podría permitir mejorar los rendimientos cognitivos de los pacientes respecto a la simple administración de un inhibidor de acetilcolinesterasa sin observar o aumentar sin embargo los efectos perjudiciales asociados con el tratamiento (en particular, los trastornos gastro-intestinales tales como náusea o diarrea, las cefaleas o la fatiga). Dicho de otra manera, los tratamientos que utilizan dosis terapéuticas de inhibidor de acetilcolinesterasa inferiores a las utilizadas clásicamente en mono-administración se vuelven por lo tanto factibles, con rendimientos cognitivos equivalentes incluso superiores y efectos perjudiciales menores.

Más sorprendentemente, la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona, o una de sus sales de adición, administrada a una dosis subactiva y un inhibidor de la acetilcolinesterasa éste también administrado a una dosis subactiva provoca un efecto sinérgico con buenos rendimientos sobre la cognición.

Estos efectos, no previsibles, permiten considerar la utilización de las asociaciones entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona, o una de sus sales de adición, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa en el tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento cerebral y con las enfermedades neurodegenerativas. Se consideran particularmente los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer. Más particularmente, se consideran los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer en los pacientes que tienen síntomas depresivos.

Preferentemente, la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona se utiliza en la forma de base en el marco de la invención.

Entre los inhibidores de la acetilcolinesterasa según la invención, se elegirá entre fisostigmina, rivastigmina, galantamina, donepezil, tacrina o huperzina A. Según un modo de realización preferido, el inhibidor de la acetilcolinesterasa se elige entre donepezil, rivastigmina o galantamina. El donepezil se utiliza preferentemente en la forma de un hidrocloreto, la rivastigmina en la forma de un hidrógenotartrato y la galantamina en la

forma de un hidrobromuro. Ventajosamente, el inhibidor de la acetilcolinesterasa es el donepezil.

Más particularmente, la asociación de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y un inhibidor de la acetilcolinesterasa elegido entre donepezil, rivastigmina o galantamina, se utiliza en el tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer y, más particularmente los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer en los pacientes que tienen síntomas depresivos.

La invención también se refiere a la utilización de la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona o sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa, para la obtención de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento cerebral y con las enfermedades neurodegenerativas.

Más particularmente, la invención se refiere a la utilización de la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona o sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa elegido entre donepezil, rivastigmina o galantamina, para la obtención de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer y, más particularmente, los trastornos cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer en los pacientes que tienen síntomas depresivos.

La invención se refiere igualmente a las composiciones farmacéuticas que contienen la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona o sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa en combinación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ventajosamente, la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que contienen la asociación entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona o sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable, y un inhibidor de la acetilcolinesterasa elegido entre donezepil, rivastigmina o galantamina, en combinación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

En las composiciones farmacéuticas según la invención, la fracción másica en principios activos (masa de los principios activos sobre la masa total de la composición) está comprendida entre 5 y 50%.

Entre las composiciones farmacéuticas según la invención, se escogerán más particularmente las que convienen para la administración por vía oral, parenteral y principalmente intravenosa, per o transcutánea, nasal, rectal, perlingual, ocular, respiratoria y más específicamente los comprimidos simples o grageados, comprimidos sublinguales, cápsulas duras, comprimidos sublinguales, cápsulas, tabletas, preparaciones inyectables, aerosoles, gotas oculares o nasales, supositorios, cremas, pomadas, geles dérmicos, parches transdérmicos, etc...

Además de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y el compuesto inhibidor de la acetilcolinesterasa, las composiciones farmacéuticas según la invención contienen uno o varios excipientes o vehículos elegidos entre diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes de disgregación, estabilizantes, conservantes, absorbentes, colorantes, edulcorantes, aromatizantes, etc...

A título de ejemplo y de manera no limitativa, se pueden citar:

- para los diluyentes: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, glicerina;
- para los lubricantes: sílice, talco, ácido esteárico y sus sales de magnesio y de calcio, polietilen glicol;
- para los aglutinantes: silicato de aluminio y de magnesio, almidón, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona;

- para los disgregantes: agar, ácido algínico y su sal de sodio, las mezclas efervescentes.

Los compuestos de la asociación pueden administrarse de manera simultánea o secuencial. La vía de administración preferida es la vía oral. Otra vía de administración ventajosa es el parche transdérmico. Las composiciones farmacéuticas correspondientes pueden permitir la liberación instantánea o diferida de los principios activos. Por otra parte, los compuestos de la asociación pueden administrarse en la forma de dos composiciones farmacéuticas distintas, conteniendo cada una uno de los principios activos, o bien en la forma de una única composición farmacéutica, en la que los principios activos están mezclados.

Las composiciones farmacéuticas preferidas son los comprimidos.

La posología útil varía según el sexo, la edad y el peso del paciente, la vía de administración, la naturaleza de la afección y los tratamientos eventualmente asociados y se escalona entre 1 y 200 mg de 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona en equivalente base cada 24 horas, y más preferentemente 5 a 50 mg al día. La dosis de inhibidor de la acetilcolinesterasa será igual o inferior a la utilizada cuando se administra solo. En el caso del donepezil, la posología está comprendida entre 0,5 y 30 mg al día, siendo las dosis diarias preferidas de 5 y 10 mg. En el caso de la rivastigmina, la posología está comprendida entre 0,5 y 20 mg al día, siendo las dosis diarias preferidas de 1,5 y 14 mg. En el caso de la galantamina, la posología está comprendida entre 1 y 30 mg al día, siendo las dosis diarias preferidas de 8 y 24 mg.

ESTUDIO FARMACOLÓGICO

EJEMPLO A: Experimento en un modelo de memoria episódica, el ensayo de discriminación contextual en serie

Los efectos de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino [6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y del donepezil (este último utilizado en la forma de un hidrocloreuro), administrados solos o en combinación, se estudiaron utilizando un ensayo de discriminación contextual en serie en el ratón C57BL/6 de edad media 14-15 meses (n = 12 por grupo) (Célérier et al., *Learn Mem.* 2004, 11(2), 196-204; Tronche et al., *Behav. Brain Res.* 2010, 215(2), 255-260). En este modelo, los ratones de edad media presentan respecto a los ratones jóvenes una disfunción específica de la memoria contextual, sin déficit de memoria espacial. Este modelo es pertinente para evaluar los efectos de los productos en el enfermedad de Alzheimer porque los pacientes que padecen esta demencia presentan igualmente, y de manera muy precoz, trastornos de memoria episódica contextual (Gold et al., *Expert Rev. Neurother.* 2008, 8(12), 1879-1891).

Los ratones, puestos en una caja con bordes elevados, aprenden dos tipos de discriminaciones espaciales consecutivas (D1: suelo blanco y D2: suelo negro) sobre un suelo con cuatro agujeros, en el que sólo uno de los agujeros tiene cebo, y esto de manera opuesta entre D1 y D2. Cada discriminación se realiza sobre un suelo específico (blanco o negro), que constituye el contexto interno específico para cada discriminación. Veinticuatro horas después de la etapa de aprendizaje, los ratones se vuelven a poner sobre el suelo contextual blanco y se miden los parámetros siguientes:

- el porcentaje de respuestas correctas (es decir, % de inclinaciones de la cabeza en el agujero en el que se ha puesto cebo durante el ejercicio de adquisición sobre el suelo blanco),
- el porcentaje de respuestas interferentes (es decir, % de inclinaciones de la cabeza en el agujero en el que se ha puesto cebo durante el ejercicio de adquisición sobre el suelo negro, el último contexto presentado a los ratones),

- y el porcentaje de errores (es decir, % de inclinaciones de la cabeza en los dos agujeros en los que no se ha puesto cebo durante la adquisición, ni sobre el suelo blanco, ni sobre el suelo negro) (véase la Figura 1).

Los resultados muestran que estos ratones de edad media tratados con el vehículo presentan un porcentaje de respuestas correctas cercano al nivel de la casualidad en este ensayo sobre placas con 4 agujeros ($\approx 25\%$). Después de un tratamiento crónico de 9 días de hidrocloreto de donepezil (0,1 mg/kg de base por vía oral), se observa un ligero aumento no significativo del porcentaje de respuestas correctas respecto al vehículo (35,5% frente a 26,4% véase la Figura 2). En cambio, la tasa de respuestas correctas aumenta significativamente más de 40% respecto al vehículo después de un tratamiento crónico de 9 días de 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona a las dosis de 0,1 y 0,3 mg/kg por vía oral (43,7% a 0,1 mg/kg y et 48% a 0,3 mg/kg de respuestas correctas) (compuesto denominado S en la Figura 2). Finalmente, la administración de la asociación de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3] benzotriazina-4,9-diona (0,1 mg/kg de base por vía oral) con donepezil (0,1 mg/kg de base por vía oral) da lugar a un aumento significativo de la tasa de respuestas correctas ya que estas respuestas son superiores a 100% respecto al vehículo solo (61,1% de respuestas correctas con esta asociación frente a 26,4% vehículo solo). Estos resultados muestran una potenciación neta de los efectos del donepezil en presencia de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3] benzotriazina-4,9-diona.

Además, se ha observado una muy buena correlación entre el aumento de la tasa de respuestas correctas y la disminución de la tasa de respuestas interferentes, confirmando así el efecto específico de cada compuesto y de su asociación sobre la memoria contextual. Así, la administración de la asociación de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona (0,1 mg/kg de base por vía oral) con el donepezil (0,1 mg/kg de base por vía oral) aumenta significativamente la fuerza de la memoria contextual (respuestas correctas – respuestas interferentes) respecto a la observada con los compuestos solos. Este aumento observado para la asociación no puede explicarse por una simple aditividad de los efectos de los compuestos administrados

solos y muestra una sinergia de actividad de los dos compuestos cuando se coadministran (véase la Figura 3).

Los resultados ponen claramente de manifiesto que la administración de 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y de donepezil en asociación permite obtener un efecto sinérgico importante completamente inesperado. Por otra parte, los análisis farmacocinéticos han mostrado que no había ninguna interacción de tipo farmacocinético entre los dos tratamientos que pudiera justificar o interferir con el efecto sinérgico descrito anteriormente.

EJEMPLO B: Ensayo de observación primaria de Irwin

Los efectos en términos de seguridad de la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y del donepezil (este último en la forma de un hidrocloreuro), administrados solos o en asociación, se han estudiado utilizando el ensayo de observación primaria de Irwin en el ratón C57BL/6 (n = 4 individuos por grupo).

Los cambios comportamentales, los síntomas fisiológicos y neurotóxicos, la temperatura rectal, así como el diámetro de la pupila se registraron según una rejilla de observación estandarizada, derivada de la de Irwin.

Se ha observado que la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona (de 3 a 100 mg/kg de base por vía oral) y el donepezil (a 0,3 y 1 mg/kg de base por vía oral) proporcionados solos o en coadministración en agudo no inducían ningún cambio en el ratón según la rejilla de observación estandarizada. A una dosis más alta (3 y 10 mg/kg de base por vía oral), el donepezil administrado solo induce temblores, una sedación ligera a moderada, una disminución del tono muscular y una disminución de la reactividad al tacto. No se observó ninguna potenciación de los efectos observados bajo donepezil a 3 y a 10 mg/kg cuando se coadministra con la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona (de 3 a 100 mg/kg de base por vía oral). Además, en este estudio los análisis farmacocinéticos han mostrado que no había ninguna interacción

de tipo farmacocinético entre los dos tratamientos que pudiera justificar o interferir con las observaciones descritas anteriormente.

En conclusión, los resultados presentados anteriormente ponen de manifiesto una sinergia de actividad entre la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y el donepezil en términos de rendimientos cognitivos, y esto con un buen perfil de seguridad y sin interacción farmacocinética.

EJEMPLO C: Estudio de los potenciales excitadores post-sinápticos (EPSP) inducidos por estimulación eléctrica en el ratón despierto

La 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y la rivastigmina se han evaluado en electrofisiología sobre animal despierto solo después de administración oral única y en coadministración a dosis subactivas de los dos compuestos con el fin de estudiar un potencial sinérgico entre estos dos compuestos a nivel del hipocampo. El estudio de los EPSP inducidos por estimulación eléctrica en el ratón despierto permite estudiar de manera fisiológica un fenómeno electrofisiológico en la base de la actividad neuronal y vinculado con los procesos de memorización y aprendizaje. En efecto, el aprendizaje y la memoria necesitan cambios en los circuitos neuronales. También, la facilitación de las respuestas sinápticas por un producto o una asociación de producto que actúan sobre los potenciales excitadores post-sinápticos permitiría facilitar el aprendizaje o contrarrestar los déficits mnésicos ligados a la edad o que aparecen durante enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Shapiro, *Arch. Neurol.* 2001, 58, 874-881).

Los estudios se han efectuado como sigue:

Se anestesian ratones C57BL/6 de 3 meses de edad con 0,8-3% de halotano administrado mediante una máscara. Una vez anestesiados, se insertan electrodos de estimulación y de registro respectivamente en la vía perforante y el gyrus dentado del hipocampo de los animales. Después de la implantación de los electrodos, los ratones se mantienen entre 5 a 7 días en las jaulas con acceso libre al alimento y al agua con el fin de permitir una

recuperación completa. Cada animal implantado está solo en cada jaula hasta el final del experimento.

Después de la recuperación, se induce una línea base estable de respuestas evocadas utilizando impulsos pares (duración del impulso 100 μ s, negativo-positivo) administrados a 3 impulsos/minuto con el electrodo de estimulación situado en la vía perforante. Los intervalos entre impulsos se fijan a 40 ms (Gruart et al., *J. Neurosci.* 2006, 24, 1077-1087). Los EPSP de campo se supervisan hasta que se obtiene una línea base estable (durante 30 minutos). A continuación, se administran los productos o el vehículo y se registran los potenciales de campo evocados. Los compuestos se administran por vía oral solos o en coadministración a las dosis siguientes: rivastigmina (0,03 mg/kg, p.o.); 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona (compuesto denominado S en la Figura 4; 3 mg/kg, p.o.); vehículo (1% (p/v) hidroxietilcelulosa y 1% (v/v) polisorbato 80 en agua destilada). Por razones de cinética en relación con el t_{max} de cada uno de los productos, la administración de los compuestos se realizó como sigue: la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y la rivastigmina se administraron por sonda oral, respectivamente, 45 minutos y 30 minutos antes de la inducción de los impulsos pares tales como se han descrito anteriormente. Con el fin de que los grupos de animales sean homogéneos, los animales que reciben uno solo de los dos productos, reciben vehículo durante la segunda administración. Después, los potenciales evocados se registran durante aproximadamente 2,5 horas después de la última administración de compuesto o de vehículo.

Los resultados indican que a nivel de la línea base, todos los grupos son idénticos (diferencia no significativa) (véase la Figura 4, «línea base»). Después de la administración de los diferentes compuestos, los resultados son estadísticamente significativos (ANOVA dos factores entre los tratamientos y las sesiones; $p < 0,001$). Los análisis *post hoc* muestran:

- que administrado solo a la dosis única de 3 mg/kg p.o., la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona no induce modificación significativa de las amplitudes de los EPSP de campo respecto al grupo vehículo, excepto a 3 tiempos aislados (a 45, a 115 y a 120 minutos después de

la inducción de los impulsos pares), lo que indica que se trata de una dosis subactiva (véase la Figura 4, curva con triángulos y la Tabla 1);

- que administrado solo a la dosis única de 0,03 mg/kg, la rivastigmina no induce modificación significativa de las amplitudes de los EPSP de campo respecto al grupo vehículo, excepto a 3 tiempos aislados (a 45, a 65 y a 115 minutos después de la inducción de los impulsos pares), lo que indica que se trata de una dosis subactiva (véase la Figura 4, curva con cuadrados y la Tabla 1);

- la asociación de los dos compuestos, la 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3H-[1,3]oxazino[6,5-g][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona a la dosis única de 3 mg/kg p.o. y la rivastigmina a la dosis única de 0,03 mg/kg p.o. induce un aumento significativo de las amplitudes de los EPSP de campo respecto al grupo vehículo sobre la casi totalidad del periodo de registro (en particular de 25 a 80 minutos y de 90 a 95 minutos, y de 105 a 130 minutos y de 140 a 150 minutos después de la administración de la rivastigmina; $p < 0,05$) (véase la Figura 4, curva con cruces y la Tabla 1).

Tabla 1: Resultados de los análisis *post hoc*

Tiempo	VEHÍCULO		
	0,03 mg/kg rivastigmina	3,0 mg/kg Compuesto S	0,03 mg/kg rivastigmina + 3,0 mg/kg Compuesto S
Línea base-30	0,681	0,621	0,625
Línea base-25	0,987	0,997	0,997
Línea base-20	0,985	1,000	0,977
Línea base-15	0,135	0,399	0,348
Línea base-10	0,869	0,989	0,992
Línea base-5	0,705	0,886	0,921
5 minutos	0,725	0,277	0,183
10 minutos	0,939	0,954	0,449
15 minutos	0,833	0,549	0,265
20 minutos	0,861	0,960	0,633
25 minutos	0,639	0,205	<u>0,015</u>
30 minutos	0,853	0,424	<u>0,032</u>
35 minutos	0,894	0,738	<u>0,081</u>
40 minutos	0,241	0,229	<u>0,003</u>
45 minutos	<u>0,028</u>	<u>0,007</u>	<u>< 0,001</u>
50 minutos	0,660	0,244	<u>0,034</u>
55 minutos	0,230	0,310	<u>< 0,001</u>
60 minutos	0,225	0,243	<u>0,002</u>
65 minutos	<u>0,014</u>	0,118	<u>0,002</u>
70 minutos	0,530	0,584	<u>0,024</u>
75 minutos	0,254	0,284	<u>0,005</u>

Tiempo	VEHÍCULO		
	0,03 mg/kg rivastigmina	3,0 mg/kg Compuesto S	0,03 mg/kg rivastigmina + 3,0 mg/kg Compuesto S
80 minutos	0,904	0,856	<u>0,003</u>
85 minutos	0,972	0,980	0,156
90 minutos	0,356	0,596	<u>0,014</u>
95 minutos	0,526	0,197	<u>0,043</u>
100 minutos	0,971	0,592	0,161
105 minutos	0,558	0,688	<u>0,011</u>
110 minutos	0,632	0,601	<u>0,056</u>
115 minutos	<u>0,007</u>	<u>0,002</u>	<u>< 0,001</u>
120 minutos	0,163	<u>0,007</u>	<u>< 0,001</u>
125 minutos	0,251	0,243	<u>0,006</u>
130 minutos	0,311	0,521	<u>0,016</u>
135 minutos	0,536	0,979	0,103
140 minutos	0,323	0,337	<u>0,001</u>
145 minutos	0,810	0,810	<u>0,007</u>
150 minutos	0,413	0,362	<u>< 0,001</u>

Los resultados ponen claramente de manifiesto que la administración de 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y de rivastigmina en asociación permite obtener un efecto sinérgico importante completamente inesperado.

EJEMPLO D: Composición farmacéutica

Fórmula de preparación para 1.000 comprimidos con dosis de 5 mg de 8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]benzotriazina-4,9-diona y 10 mg de un inhibidor de la acetilcolinesterasa elegido entre donepezil, rivastigmina o galantamina:

8-ciclopropil-3-[2-(3-fluorofenil)etil]-7,8-dihidro-3*H*-[1,3]oxazino[6,5-*g*][1,2,3]
benzotriazina-4,9-diona 5 g
Inhibidor de la acetilcolinesterasa 10 g
Almidón de maíz 20 g
Maltodextrina..... 7,5 g
Sílice coloidal 0,2 g

Glicolato sódico de almidón	3 g
Estearato de magnesio	1 g
Lactosa.....	55 g