

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 819**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008** **E 08806465 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2205245**

54 Título: **Uso terapéutico de las diaminofenotiazinas**

30 Prioridad:

03.10.2007 US 960544 P

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

28.09.2015

73 Titular/es:

**WISTA LABORATORIES LTD. (100.0%)
25 Bukit Batok Crescent The Elitist 06-13
Singapore 658066, SG**

72 Inventor/es:

**WISCHIK, CLAUDE MICHEL;
WISCHIK, DAMON JUDE;
STOREY, JOHN MERVYN DAVID y
HARRINGTON, CHARLES ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 819 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

Uso terapéutico de las diaminofenotiazinas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a métodos y materiales para usar en el tratamiento o profilaxis de las enfermedades, por ejemplo trastornos cognitivos, usando diaminofenotiazinas. En particular, se refiere a tratamiento que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas.

10

Antecedente de la técnica

Se ha demostrado anteriormente que los compuestos de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ) inhiben la agregación de proteína tau y alteran la estructura de las PHF, e invierten la estabilidad proteolítica del núcleo de la PHF (véase el documento WO96/30766, F Hoffman- La Roche). Se ha descrito el uso de dichos compuestos para el tratamiento y profilaxis de diferentes enfermedades, incluyendo la EA y la enfermedad de los cuerpos de Lewy, e incluye cloruro de metiltionio ("MTC").

15

El documento WO96/30766 describe, en el caso de la administración oral, una dosis diaria de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 700 mg, preferentemente de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg, dividida preferentemente en 1-3 dosis unitarias.

20

Otras divulgaciones de las fenotiazinas en el campo de los trastornos neurodegenerativos incluyen los documentos WO 02/075318, WO 2005/030676.

25

Se ha descrito en la materia que los compuestos DAPTZ pueden aparecer en forma cargada (oxidada) y forma no cargada (reducida o "leuco"). También se sabe que la absorción celular de estas difiere. Además, se sabe que dichos compuestos podrían, en principio, tener efectos hematológicos adversos y otros efectos secundarios en determinadas dosis.

30

El documento WO 02/055720 (The University Court of the University of Aberdeen) describe el uso de formas reducidas de diaminofenotiazinas específicamente para el tratamiento de varias enfermedades de agregación de proteínas, aunque la divulgación se refiere principalmente a las tauopatías. El documento WO 02/055720 describe un modelo farmacocinético preliminar basado en estudios de datos de excreción urinaria realizados en seres humanos, perros y ratas por DiSanto y Wagner, J Pharm Sci 1972, 61:1086-10 90 y 1972, 61:1090-10 94 y Moody et al., Biol Psych 1989, 26: 847-858. Se resalta además que la única forma de azul de metileno que atraviesa la barrera hematoencefálica tras su administración iv es la forma reducida. Basándose en la actividad in vitro de las formas reducidas de las diaminofenotiazinas de dicho documento, se sugirió una dosis diaria de 3,2-3,5 mg/kg, y también se han descrito dosis de 20 mg tds, 50 mg tds o 100 mg tds, combinadas con una cantidad doble de ácido ascórbico en mg de forma que se activara más del 90 % de la reducción antes de la ingestión.

35

40

Sin embargo, el documento WO 02/055720 no proporciona un modelo que integre los niveles de datos sanguíneo como el descrito por Peter et al. (2000) Eur J Clin Pharmacol 56: 247-250 ni proporciona un modelo validado por datos de un ensayo clínico. De hecho, como se describe a continuación, los datos de Peter et al. data contradicen los datos anteriores de DiSanto y Wagner en lo que se refiere a la semivida de eliminación terminal.

45

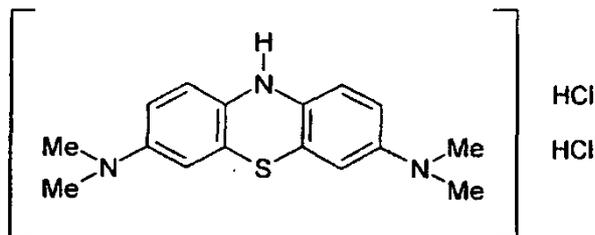
May et al. (Am J Physiol Cell Physiol, 2004, Vol. 286, pp. C1390-C1398) mostraron que los eritrocitos humanos reducen y captan secuencialmente MTC es decir que las células no captan el propio MTC, sino que en su lugar captan la forma reducida de MTC que atraviesa la membrana celular. También demostraron que la velocidad de captación es dependiente de las enzimas; y que tanto MTC como MTC reducido se concentran en las células (el MTC reducido se reequilibra ya en el interior de la célula para formar MTC).

50

Sin embargo, la optimización de una dosis terapéutica adecuada de los compuestos DAPTZ tales como MTC, y su formulación, en particular para optimizar la actividad deseada o minimizar los efectos secundarios adversos son problemas complejos. Una barrera importante para ello es la falta de un modelo farmacocinético adecuado. Así, puede considerarse que la provisión de un modelo de ese tipo, y por tanto la enseñanza para resolver uno o más de dichos problemas, proporcionaría una contribución a la técnica.

55

La solicitud PCT/GB2007/001103 no publicada de fecha anterior describe compuestos que incluyen:



- 5 Se puede considerar que estos compuestos son una forma reducida estabilizada en comparación con, por ejemplo, MTC.

10 El documento PCT/GB2007/001103 describe dosis unitarias que comprenden de 20 a 300 mg de los compuestos DAPTZ descritos en dicho documento por ejemplo, 30 a 200 mg, por ejemplo 30 mg, 60 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg. Una dosis adecuada del compuesto de DAPTZ está en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 25 mg (más normalmente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto por día por ejemplo 100 mg, 3 veces al día, 150 mg, 2 veces al día, 200 mg, 2 veces al día.

15 Descripción de la invención

15 El cloruro de metiltioninio ("MTC") es el principio activo de una preparación farmacéutica patentada (denominada como "rember™") que se desarrolló para el tratamiento de la EA y demencias relacionadas. Se ha realizado un ensayo clínico en el que se ha demostrado la eficacia terapéutica durante 50 semanas de tratamiento en la EA de leve a moderada.

20 Con los datos de dicho ensayo clínico, los presentes inventores han desarrollado un modelo farmacocinético novedoso completamente integrado aplicable a la dosis oral de los compuestos de DAPTZ incluyendo, pero sin limitación, MTC. El modelo tiene implicaciones importantes para definir los parámetros que determinan la dosificación oral óptima en términos de seguridad y eficacia, e implica nuevas modalidades de tratamiento para el tratamiento de los trastornos cognitivos. Se ha demostrado que el nuevo modelo es preciso porque predice la excreción urinaria, y predice correctamente la cinética en el compartimento del tejido cerebral verificado en el estudio con cerdos.

30 En resumen, el ensayo clínico mostró que el MTC tiene dos acciones farmacológicas sistémicas: efectos cognitivos y efectos hematológicos, pero inesperadamente, estas acciones se pueden separar. Específicamente, los efectos cognitivos no muestran una relación dosis-respuesta monotónica, mientras que los efectos hematológicos sí lo hacen. Los inventores proponen que dos especies diferentes son las responsables de ambos tipos de actividad farmacológica: MTC absorbido como la forma Leuco-MT no cargada que es la responsable de la actividad cognitiva beneficiosa, y MTC absorbido como especie dimérica oxidada que es la responsable de la oxidación de la hemoglobina. Puesto que estos efectos son mecánicamente diferentes, se pueden manipular por separado tal como para maximizar la biodisponibilidad del principio terapéuticamente activo (eficaz cognitivamente).

35 Así, estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la dosificación de ambos compuestos, DAPTZ oxidado o leuco-DAPTZ, en cada caso para maximizar la actividad terapéutica y, por tanto, reducir los efectos secundarios mediante la optimización de un régimen terapéutico y formulación relevante para el agente en cuestión.

40 *Compuestos de DAPTZ oxidados - formas de disolución rápida (no forman parte de la invención)*

45 Como puede observarse en la Figura 31A, existe una etapa de pérdida de eficacia, ya que el porcentaje de disolución de la cápsula observado a 30 minutos cae por debajo del 20 %. Esto confirma que una disolución rápida es un punto crítico de la actividad terapéutica, y se puede explicar por el papel fundamental del estómago en la absorción del resto metiltioninio (MT) en su forma terapéuticamente eficaz.

50 Específicamente, de acuerdo con la hipótesis de la disolución retardada, una forma de MT bastante diferente es la responsable de los efectos hematológicos secundarios. Se postula que se trata de un dímero, cuya formación se favorece en las condiciones alcalinas del intestino delgado y parte final del intestino grueso. Por tanto, los efectos hematológicos secundarios observados en el ensayo clínico fueron una consecuencia específica de la formulación de la cápsula de gelatina utilizada en el estudio (y, en particular, su velocidad de disolución - véase la Figura 7) en lugar de ser una característica inherente del propio resto MT, si se absorbe en el estómago.

55 Por tanto, en el diseño de una formulación mejorada de MTC u otros compuestos de DAPTZ, la consecución de la eficacia prevista está determinada de forma importante por el requisito de que la disolución del producto médico en investigación (es decir, comprimido o cápsula) sea mayor del 50 % en 30 minutos en condiciones normalizadas.

Así, en un aspecto, se describe un método de tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante un compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma oxidada como principio activo, en el que dicha dosis unitaria libera al menos un 50 % de dicho principio activo en un plazo de 30 minutos en condiciones normalizadas.

El tratamiento del trastorno cognitivo o del SNC será tal que se maximicen los efectos relativos beneficiosos cognitivos o del SNC comparados con los efectos hematológicos del compuesto DAPTZ (véase por ejemplo la Figura 7).

La disolución de la cápsula se determina por la cantidad de DAPTZ liberado en la fase acuosa de un fluido gástrico simulado (SGF) en condiciones de disolución normalizadas según la farmacopea europea y estadounidense. Esto se describe en el Ejemplo 11.

De esta forma, las dosis unitarias maximizarán la absorción en el estómago, y de forma más importante, minimizarán la formación de dímeros que se favorece en las condiciones alcalinas del intestino delgado y parte final del intestino grueso.

Preferiblemente, más de un 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 % o 50 % se absorberá en el estómago en menos de 30 minutos.

Las formulaciones y vehículos de administración adecuados para esta disolución rápida se describen más detalladamente a continuación.

La cantidad de DAPTZ oxidado en la forma farmacéutica será una cantidad terapéuticamente eficaz. Sin embargo, basándose en la descripción del presente documento, puede observarse que dosis muy elevadas (cuando se retrasa la disolución) conducirán solamente a una absorción limitada de la dosis nominal en el estómago mediante el mecanismo de la reductasa que conduce a una absorción retardada indeseable en el intestino delgado a mayor pH mediante la formación de dímeros.

Así, preferentemente, la dosis unitaria comprende menos de 120 mg, menos de 100, menos de 70, más preferentemente menos de 40-70 mg (por ejemplo, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o 70) y se administra 3 o 4 veces al día (véanse por ejemplo las Figuras 29 y 30 y 32 y 36).

Compuestos de DAPTZ oxidados - formas de retención gástrica (no forman parte de la invención)

Así, en un aspecto, se describe un método de tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante un compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma oxidada como principio activo, en el que dicha dosis unitaria queda gastrorretenida.

El tratamiento del trastorno cognitivo o del SNC será tal que se maximicen los efectos relativos beneficiosos cognitivos o del SNC comparados con los efectos hematológicos del compuesto DAPTZ (véase por ejemplo la Figura 7).

Una forma gastrorretenida quedará en el estómago preferentemente durante 30 minutos como mínimo, más preferentemente al menos 1,2, 3, 4,5, 6, 8, 12 horas o más.

Las formulaciones y vehículos de administración adecuados para gastrorretención se describen más detalladamente a continuación.

La cantidad de DAPTZ oxidado en la forma farmacéutica gastrorretenida será una cantidad terapéuticamente eficaz. Al minimizar el tránsito hacia el intestino delgado (y por tanto, la formación de dímeros terapéuticamente ineficaces), son factibles cargas mayores del DAPTZ oxidado. Así, preferentemente, la dosis unitaria comprende al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg, o más por ejemplo. 200, 300, 400, 500 mg.

Compuestos de DAPTZ reducidos

Las relaciones descritas en el presente documento tienen implicaciones en comparación con la solución habitual de consecución usando un régimen de dosificación más cómodo, es decir, dos veces al día o 1 vez al día. Estos regímenes de dosificación son en principio más deseables en pacientes con demencia, que son olvidadizos y por tanto necesitan que se les recuerde tomar su medicación. La solución convencional para conseguir un régimen de dosificación más cómodo es crear una formulación de liberación retardada. Sin embargo, los presentes análisis indican que, por el contrario, una formulación convencional de liberación lenta de una forma de DAPTZ oxidada de un producto terapéutico eliminaría esencialmente la eficacia, tal como se ilustra convenientemente por las propiedades de la cápsula de 100 mg en TRx-014-001 en los ejemplos del presente documento.

De esta manera, por los motivos anteriormente descritos, no sería factible generar una formulación de liberación retardada de un producto médico basado en DAPTZ oxidado. Sin embargo, esto no sería el caso para los productos farmacológicos en los que los compuestos de DAPTZ están en forma reducida. Esto se debe a que la forma leuco de dichos compuestos no pueden dimerizar, ya que no son moléculas 'planas' y no tienen la carga que permite estabilizar la forma dimérica mediante neutralización de cargas.

Así, en un aspecto adicional, se describe un método de tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, que padecen un trastorno hematológico en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante un compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma reducida cristalina estable como principio activo,

Tal como se describe a continuación, el compuesto es uno que vale para tratar un trastorno cognitivo o del SNC y para maximizar los efectos relativos beneficiosos cognitivos o del SNC comparados con los efectos hematológicos del compuesto DAPTZ.

En particular, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, la pérdida debida a la no absorción inicial en el estómago se reducirá en gran medida porque las formas cristalinas reducidas estables tienen mayor solubilidad que sus equivalentes oxidados, y no requieren la actividad de la tiazinadiazina reductasa (May et al., 2004) que se supone existe en el estómago y que presumiblemente es necesaria para la absorción (véase la absorción prevista in la Figura 33).

Se infiere por tanto que se podría conseguir una eficacia sustancialmente mayor y un régimen de dosificación superior usando la forma L-MTx del resto metiltioninio. La cantidad de DAPTZ reducido en la forma farmacéutica será una cantidad terapéuticamente eficaz.

En particular, una forma de liberación retardada (por ejemplo, 1 vez al día) del compuesto DAPTZ reducido a entre 100-1000 mg en principio no produciría las consecuencias adversas de la absorción retardada (véase la Figura 38). Así, a la luz de la descripción del presente documento, se pueden considerar dosificaciones de hasta 1000 mg o más (por ejemplo, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg) proporcionadas 1 vez al día.

Preferentemente, se trata de una formulación de liberación lenta o retardada, es decir, liberación menos de <50 % en 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas.

Como puede verse en las Figuras 34 y 35, se predice que se podría alcanzar un nivel de eficacia de -8,1 unidades ADAS-cog usando un régimen terapéutico de 100 mg del DAPTZ reducido (descrito como "forma L-MTx") administrada dos veces diarias. Esto también se puede conseguir con dosis de 60 mg 3 veces al día. Se esperarían niveles de eficacia incluso mayores usando 100 mg o más administrados 3 veces al día.

Puede describirse cómodamente que los compuestos de DAPTZ reducido de la presente invención se encuentran en una "forma reducida cristalina estabilizada" y se han descrito en la solicitud anteriormente presentada no publicada PCT/GB2007/001103. Se apreciará que, sin embargo, incluso estos compuestos pueden autooxidarse en cierta medida para obtener sus correspondientes formas oxidadas. De esta manera, es probable, si no inevitable, que las composiciones que comprenden la forma reducida cristalina estabilizada de los compuestos de DAPTZ de la presente invención contengan, como impureza, al menos parte del correspondiente compuesto oxidado.

En aspectos de la presente invención que se refieren a esta forma reducida cristalina estabilizada de los compuestos de DAPTZ, estos compuestos de DAPTZ oxidados pueden representar no más del 50 % en peso, por ejemplo, no más del 40 % en peso, por ejemplo, no más del 30 % en peso, preferentemente por ejemplo, no más del 20 % en peso, por ejemplo, no más del 10 % en peso, por ejemplo, no más del 5 % en peso, por ejemplo, no más del 3 % en peso, por ejemplo, no más del 2 % en peso, por ejemplo, no más del 1 % en peso del contenido total de DAPTZ en la forma farmacéutica.

Tratamiento

El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento en el contexto de tratar una afección, se refiere generalmente al tratamiento y terapia de un ser humano, en las que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la dolencia, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, regresión de la dolencia, mejora de la dolencia, y curación de la dolencia.

La presente invención incluye además medidas profilácticas (es decir, profilaxia, prevención).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto activo, el cual es efectivo para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con una pauta de tratamiento deseada.

De manera similar, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto activo, el cual es efectivo para producir algún efecto profiláctico deseado, y está en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con una pauta de tratamiento deseada.

El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, en las que dos o más tratamientos o terapias se combinan, por ejemplo, de manera secuencial o simultánea. Los tratamientos combinados se describen más detalladamente en lo sucesivo.

Trastornos cognitivos o del SNC

Se describen a continuación los trastornos cognitivos o del SNC preferidos. Otros trastornos neurodegenerativos se describen en los ejemplos a partir de ahora en el presente documento.

El trastorno cognitivo puede ser una taupatía de un paciente (véanse el documento WO96/30766). Así como la enfermedad de Alzheimer (EA), la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Pick y la parálisis progresiva supranuclear (PSP) parecen estar correlacionadas con una acumulación de agregados tau truncados patológicos en las células del giro dentado y células estrelladas piramidales del neocórtex, respectivamente. Otras demencias incluyen demencia fronto-temporal (FTD); parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17); complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC); degeneración palido-ponto-nigral (PPND); síndrome de Guam-ALS; degeneración palido-nigro-luysiana (PNLD); degeneración córtico-basal (CBD) y otras (véase Wischik *et al.* 2000, loc. cit, para una descripción detallada - especialmente la Tabla 5.1). El resto de enfermedades, que se caracterizan principal o parcialmente por una agregación tau anómala, se denominan en el presente documento como "taupatías".

En estos y otros aspectos de la invención relativos a las taupatías, preferentemente la taupatía se selecciona de la lista que consiste en las indicaciones anteriores, es decir, EA, enfermedad de Pick, PSP, FTD, FTDP-17, DDPAC, PPND, síndrome de Guam-ALS, PNLD, y CBD.

En una realización preferida, la taupatía es la enfermedad de Alzheimer (EA).

Cuando la enfermedad es cualquier taupatía, el método de tratamiento de la taupatía suele ser tal que el compuesto DAPTZ ocasiona la inhibición de la agregación de la proteína tau asociada con dicha patología y también la disolución de los agregados de tau en el cerebro de un paciente o sujeto. Como se describe en los siguientes Ejemplos. Los presentes inventores han demostrado que la disolución de dichos agregados es un efecto clave en la apertura de una ruta de eliminación (véanse por ejemplo las Figuras 6A y 6B).

En una realización, el trastorno cognitivo puede ser un desequilibrio cognitivo leve (MCI) por ejemplo, MCI amnésica. La solicitud provisional estadounidense anteriormente presentada 60/945.006 describe el uso de compuestos de DAPTZ para MCI. Aunque se sigue discutiendo en la bibliografía cuál es la naturaleza conceptual del MCI (véase Gauthier *et al.*, *Lancet*, 2006; 367: 1262-1270; Petersen RC *et al.* *Neuropathological features of amnesic mild cognitive impairment*. *Arch Neurol* 2006; 63: 665-6 72). La FDA estadounidense reconoce el MCI como una enfermedad diana válida. Se define por tener un grado menor de afección cognitiva aunque no cumple los criterios clínicos para un diagnóstico de demencia.

En una realización, el trastorno del SNC puede ser una sinucleinopatía como la enfermedad de Parkinson (EP).

La solicitud PCT anteriormente presentada PCT/GB2007/001105 describe el uso de compuestos de DAPTZ para el tratamiento de la EP y otras sinucleinopatías.

Las sinucleinopatías consisten actualmente en los siguientes trastornos: EP, demencia con cuerpos de Lewy (DCL), atrofia multisistémica (MSA), parkinsonismo inducido por fármacos (por ejemplo, producida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina [MPTP] o pesticidas tales como rotenona), y fallo autónomo puro (PAF).

Grupos de pacientes

Los sujetos adecuados para el método se pueden seleccionar sobre la base de factores convencionales.

De esta manera, por ejemplo, para la EA, la selección inicial de pacientes puede implicar uno cualquiera o más de: evaluación rigurosa por un médico experimentado; exclusión de diagnósticos no de EA siempre que sea posible por laboratorios adicionales y otras investigaciones; evaluación objetiva del nivel de función cognitiva usando una batería validada neuropatológicamente.

Para el MCI, los criterios representativos del MCI sindrómico incluye los rasgos: A. El paciente es casi normal sin demencia; B. Existe evidencia de deterioro cognitivo mostrado bien por un descenso temporal medido objetivamente

y/o informe de descenso subjetivo proporcionado por sí mismo o por un informante junto con pruebas cognitivas objetivas (por ejemplo, pruebas secundarias si se trata de la memoria); C. Se preservan las actividades de la vida diaria y las funciones instrumentales complejas bien están intactas o mínimamente afectadas (véase también Winblad, B. et al., (2004) Mild cognitive impairment - beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. J. Intern. Med. 256: 240-246). El paciente por lo general será uno que haya recibido un diagnóstico de MCI, pero uno no diagnosticado con EA (es decir, que no muestre demencia). El paciente puede, por ejemplo, tener una edad de más de 45, 50, 55 años. El paciente puede ser uno que cumpla uno o todos de los siguientes criterios con respecto a: (i) Estado Braak de 3 o menos, 2 o menos, 1 o menos; (ii) puntuación MMSE menor o igual a MMSE 24, 25, 26, 27, 28 o 29, más preferiblemente menor o igual a MMSE 24, 25, 26, lo más preferiblemente menor o igual a MMSE 24 o 25,.

El diagnóstico de la EP es bien conocido de los expertos en la materia.

Tal como se ha indicado anteriormente, los métodos de la presente invención están previstos para tratar un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente tal como maximizar los efectos relativos beneficiosos cognitivos o del SNC comparados con los efectos hematológicos del compuesto DAPTZ.

Así, el paciente puede ser uno conocido por padecer una hemoglobinopatía tal como anemia falciforme, talasemia, metahemoglobinemia; una anemia (por ejemplo, una anemia hemolítica); una neoplasia hematológica (por ejemplo, linfoma, mieloma, plasmacitoma o leucemia); una coagulopatía tal como hemofilia; y así sucesivamente. Además, el riesgo promedio de estas enfermedades se puede evaluar usando criterios convencionales, por ejemplo, síntomas, genética, edad, estilo de vida, etnicidad (por ejemplo, la anemia falciforme se produce más frecuentemente en personas -o sus descendientes- de partes del mundo tales como el África subsahariana). Una clase particular de pacientes en riesgo de padecer un trastorno hematológico serían los que tienen más de 70 años de edad, que pueden estar sujetos a dolencias anémicas relacionadas con la edad (por ejemplo, displasia mieloide).

Dosificación, formulaciones y vehículos de administración

En la divulgación del presente documento, el nivel de dosificación preciso seleccionado dependerá de varios factores incluyendo, pero sin limitación, la actividad del compuesto de DAPTZ particular, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales usados en combinación, de la severidad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, afección, el estado de salud general, e historial médico anterior del paciente.

Los fármacos o dosis unitarias (por ejemplo, un comprimido farmacéutico o una cápsula) con la carga adecuada, disolución, o propiedades de gastrorretención anteriormente descritas se pueden proporcionar a los expertos en la materia basándose en la divulgación del presente documento usando tecnologías convencionales, y dichas tecnologías convencionales no forman parte *per se* de la presente invención.

Por ejemplo, las unidades farmacológicas de disolución rápida (de compuestos de DAPTZ oxidados o reducidos) o las unidades farmacológicas de liberación retardada (para los compuestos de DAPTZ reducidos) se pueden proporcionar y someterse a ensayo procedentes de fuentes comerciales por ejemplo. Encap Drug Delivery (Units 4, 5 y 6, Oakbank Park Way, Livingston, West Lothian, EH53 0TH, Escocia, RU), Eurand (Via Martin Luther King, 13 20060, Pessano con Bornago, Milán) y así sucesivamente.

Las unidades de fármaco gastrorretenido también son ampliamente conocidas en la bibliografía de patentes (por ejemplo, los documentos US6207197, US5972389) y la bibliografía general, y se han utilizado durante muchos años - véase por ejemplo, Davis, et al., "Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine", Gut, 27(8):886-892 (1986); Fara, "Physiological limitations: gastric emptying and transit of dosage forms" in: Rate Control in Drug Therapy, L.F. Prescott, et al., Eds., Churchill Livingstone, Nueva York (1985). Davis, S.S. (2005) Formulation strategies for absorption windows Drug Discovery Today 10:249-257. Este último resalta que el proceso del tránsito GI en seres humanos y sus implicaciones para la administración de fármacos ya son bien comprendidos. Las formas farmacéuticas administradas a un estómago lleno tendrán un retraso en el vaciado. Un sistema multiparticulado, tal como uno que contenga microesferas o aglomerados, puede mezclarse con la comida y, en consecuencia, se vaciará junto con el alimento durante un periodo extendido de tiempo. Si las partículas administradas son grandes, no podrán atravesar el píloro constreñido con el alimento digerido, y deberá esperar hasta que el estómago esté vacío y en estado de ayuno. Por lo general, se espera que las partículas con un tamaño de hasta 10 mm se vacíen desde un estómago lleno. El momento exacto en el que las partículas se vacían también dependerá de su número y de sus posiciones relativas dentro del estómago. De este modo, se espera que una forma farmacéutica mayor de 15-20 mm y administrada con alimento active la gastrorretención. Dicha forma farmacéutica tendrá la oportunidad de vaciarse una vez que el alimento haya abandonado el estómago, cuando se produce el estado de ayuno.

Un sistema de una sola unidad (o multiparticulado) se puede vaciar rápidamente del estómago en ayunas. El momento en el que se vacía dependerá también del calendario de la onda de motilidad gástrica en relación a la dosificación. El píloro abierto tiene un diámetro de 15 mm en seres humanos. Un objeto mayor de ese tamaño difícilmente atravesará hacia el intestino delgado en ayunas (o con el estómago lleno). Basándose en este conocimiento, se han previsto varias soluciones de gastrorretención. Se dividen en dos categorías principales: (i)

partículas pequeñas que tienen propiedades bioadhesivas (y también propensión a flotar sobre el contenido del estómago); y (ii) objetos grandes que se hinchan que quedarán retenidos en el estómago debido a su tamaño. Estos sistemas con hinchado también pueden tener propiedades de flotación, proporcionadas habitualmente por la generación de dióxido de carbono.

5 La empresa de suministro de fármacos Depomed ha descrito comprimidos gastrorretentivos 'que se hinchan en el estómago que trata el comprimido como alimento no digerido, y no lo deja pasar al intestino delgado. El comprimido queda retenido en el estómago durante varias horas, donde puede suministrar su carga útil rápidamente o lentamente si se desea' (<http://www.depomedinc.com/products-pipeline.htm>).

10 Estos sistemas están basados en poli(óxido de etileno) (PEO) combinado con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) para producir un comprimido matriz de liberación prolongada que se puede hinchar. De acuerdo con la empresa, las moléculas candidatas incluyen metformina, gabapentina, ciprofloxacina y furosemida. Algunos comunicados de prensa informan de que Depomed ha completado los ensayos clínicos de Fase III con metformina una vez al día para el tratamiento de la diabetes de tipo II y con ciprofloxacina una vez al día para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, y que se ha presentado en la FDA nuevas solicitudes de fármaco (NDA) para ambos productos. La empresa también está realizando un ensayo clínico de Fase II con el diurético furosemida.

20 Un resumen reciente ha descrito un estudio de gammagrafía con marcado doble de comprimidos gastrorretentivos de furosemida de liberación controlada en voluntarios sanos. El procedimiento de doble marcaje permite la caracterización independiente de la erosión y el hinchado. Los comprimidos (y un control de liberación inmediata) se administraron tras un desayuno rico en grasa. La residencia gástrica de los comprimidos hinchados fue lo suficientemente prolongada para suministrar el fármaco a la parte superior del tracto GI. En consecuencia, la concentración de fármaco en plasma fue prolongada y, además, a diferencia de las anteriores formulaciones de liberación lenta notificadas en la bibliografía, no se produjo reducción en la biodisponibilidad. Desde el punto de vista del cumplimiento terapéutico del paciente, el comprimido gastrorretentivo produjo diuresis y natriuresis graduales, en lugar de la breve e intensa diuresis de inicio inmediato experimentado por los pacientes que tomaron comprimidos de furosemida convencionales de liberación inmediata

30 De esta manera, las formas farmacéuticas gastrorretenidas conocidas pueden ser aplicables a la presente invención, y en particular para su uso con formas de DAPTZ oxidadas.

Aunque es posible utilizar el compuesto de diaminofenotiazinio (por ejemplo, administrarse) en solitario, frecuentemente es preferible presentarlo como una composición o una formulación.

35 Preferentemente, el fármaco o dosis unitaria se proporciona como una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación, preparación, medicamento) que comprende el compuesto de DAPTZ, tal como se describe en el presente documento, y un transportador, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización, la composición es una composición antihelmíntica que comprende al menos un compuesto de diaminofenotiazinio, tal como se describe en el presente documento, junto con otro uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, transportadores diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la composición además otros principios activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

50 Los transportadores, diluyentes, excipientes, etc. adecuados pueden encontrarse en los textos farmacéuticos convencionales. Véase, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Additives", 2ª Edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edición, 1994.

55 La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada transportador, diluyente, excipiente, etc. debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación.

60 Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con un transportador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. Por lo general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con los transportadores (por ejemplo, transportadores líquidos, transportador sólido finamente dividido, etc.), y después dar forma al producto, si fuera necesario.

Tal como se ha indicado anteriormente, la formulación puede prepararse para proporcionar una liberación rápida o lenta; inmediata, retardada, temporizada, o liberación sostenida; o una combinación de los mismos.

Tratamientos combinados

5 Los tratamientos o terapias combinados, en los que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de manera secuencial o simultánea, se describirán con más detalle en lo sucesivo. Así, se entenderá que cualquiera de los usos médicos o métodos descritos en el presente documento se puede usar en un tratamiento combinado, por ejemplo, otro tratamiento para la EA, MCI, o PD respectivamente. Por ejemplo, un tratamiento de la EA que utiliza un compuesto de la invención puede estar combinado con un inhibidor de la colinesterasa tal como donepezilo (Aricept™), Rivastigmina (Exelon™) o Galantamina (Reminyl™).

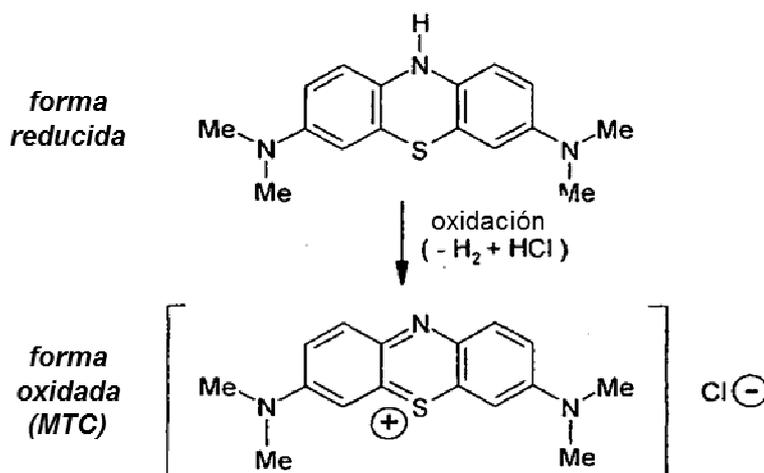
10 Un tratamiento que utiliza un compuesto de la invención junto con un antagonista del receptor de NMDA tal como memantina (Ebixa™, Namenda™).

15 Un tratamiento que utiliza un compuesto de la invención junto con un antagonista del receptor muscarínico.

20 Un tratamiento que utiliza un compuesto de la invención junto con un inhibidor de una proteína precursora amiloide de beta-amiloide (por ejemplo, un inhibidor del procesamiento de una proteína precursora amiloide que conduce al a generación de beta-amiloide).

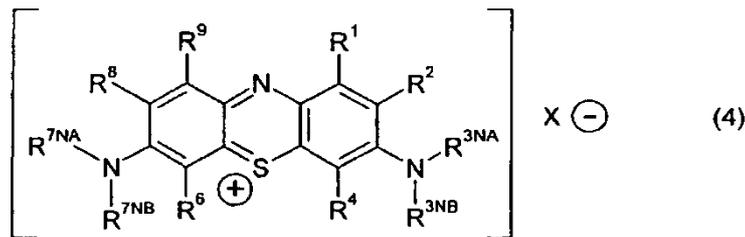
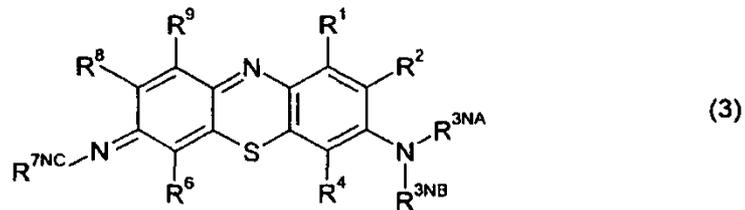
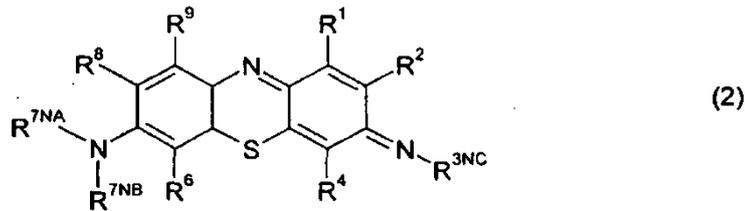
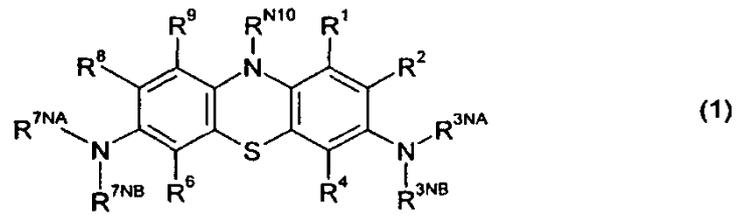
Compuestos DAPTZ de ejemplo

25 Las relaciones entre los compuestos de DAPTZ oxidados y reducidos se pueden ilustrar cómodamente usando MTC, una sal de fenotiazin-5-*io*. Esta se puede considerar convenientemente una "forma oxidada" cuando se considera con respecto al correspondiente compuesto de 10H-fenotiazina, N,N,N',N'-tetrametil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina, que se pueden considerar convenientemente como una "forma reducida":



30 Este aspecto de la invención se refiere a determinados compuestos de diaminofenotiazina y análogos de los mismos, que tienen una de las siguientes fórmulas, y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos (colectivamente denominados en el presente documento como "diaminofenotiazinas" o "compuestos de diaminofenotiazina"):

35

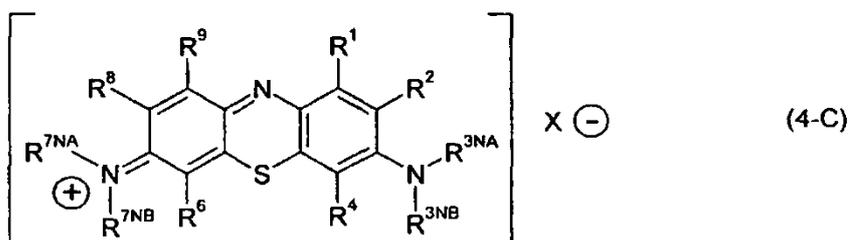
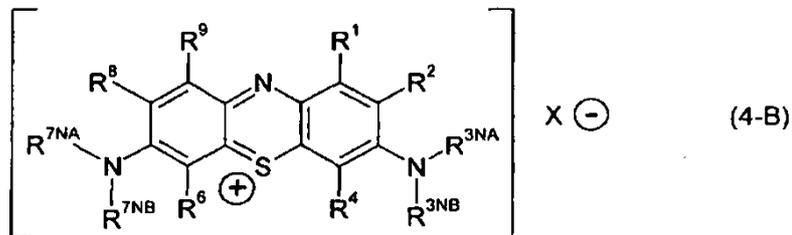


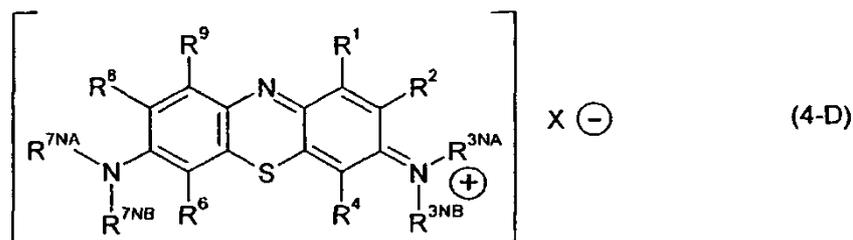
5 La Fórmula (1) representa gráficamente los compuestos en forma reducida, mientras que cada una de las Fórmulas (2), (3), y (4) representa gráficamente los compuestos en forma oxidada.

En una realización, los compuestos se seleccionan en los compuestos de fórmula (1), y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos.

10 Cada una de las estructuras anteriores es solamente una de las muchas estructuras resonantes equivalentes, y está previsto que cada una de estas quede abarcada por dicha estructura representativa. Por ejemplo, la estructura (4) es solamente una de las muchas estructuras resonantes equivalentes, algunas de las cuales se muestran a continuación, y está previsto que cada una de estas queden abarcadas por la estructura (4):

15





Sustituyentes en el átomo de carbono del anillo

5 En cada una de las fórmulas anteriores, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ se selecciona de forma independiente de:

- 10 -H;
 F; -Cl; -Br; -I;
 -OH; -OR;
 -SH; -SR;
 -NO₂;
 -C(=O)R;
 15 -C(=O)OH; -C(=O)OR;
 -C(=O)NH₂; -C(=O)NHR; -C(=O)NR₂; -C(=O)NR^{N1}R^{N2};
 -NH₂; -NHR; -NR₂; -NR^{N1}R^{N2};
 -NHC(=O)H; -NRC(=O)H; -NHC(=O)R; -NRC(=O)R;
 -R;

20 en la que cada R se selecciona independientemente entre:

- 25 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
 alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
 30 carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido;
 carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
 heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido;
 heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
 carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ sustituido; en los que, en cada grupo -
 35 NR^{N1}R^{N2}, independientemente, R^{N1} y R^{N2} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomo del anillo.

Los ejemplos de grupos -NR^{N1}R^{N2}, en los que R^{N1} y R^{N2} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomo del anillo, incluyen: pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, pirrolilo, y formas sustituidas, tales como formas N-sustituidas, tales como N-metil piperazino.

40 En una realización, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona de forma independiente de:

- 45 -H;
 -F; -Cl; -Br; -I;
 -OH; -OR;
 -C(=O)OH; -C(=O)OR;
 -R.

50 En una realización, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona de forma independiente de:

- H;
 -R.

55 En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de:

- alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido.

En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.

5 En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de: -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de: -Me y -Et.

En una realización, el grupo alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₄.

10 En una realización, el grupo alqueno C₂₋₆ es un grupo alqueno C₂₋₄.

En una realización, el grupo cicloalquilo C₃₋₆ es un grupo cicloalquilo C₃₋₄.

15 Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ alifáticos no sustituidos incluyen: metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, *terc*-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, etc.

Los ejemplos de grupos alqueno C₂₋₆ alifáticos no sustituidos incluyen: propen-1-ilo, propen-2-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, etc.

20 Los ejemplos de grupos cicloalquilo C₃₋₆ alifáticos no sustituidos incluyen: ciclopropilo, ciclopropil-metilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

En una realización, el grupo carboarilo C₆₋₁₀ es un grupo carboarilo C₆.

25 En una realización, el grupo heteroarilo C₅₋₁₀ es un grupo heteroarilo C₅₋₆.

En una realización, el grupo carboaril C₆₋₁₀ alquilo-C₁₋₄ es un grupo carboaril C₆-alquilo C₁₋₂.

30 Los ejemplos de grupos carboarilo C₆₋₁₀ no sustituidos incluyen: fenilo, naftilo.

Los ejemplos de grupos heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituidos incluyen: pirrolilo, tienilo, furilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo.

35 Los ejemplos de grupos carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ incluyen: bencilo, feniletilo.

En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) se seleccionan independiente entre:

40 -F; -Cl; -Br; -I;
-OH; -OR';
-SH; -SR';
-NO₂;
-C(=O)R';
45 -C(=O)OH; -C(=O)OR';
-C(=O)NH₂; -C(=O)NHR'; -C(=O)NR'₂; -C(=O)NR'^{N1}R'^{N2};
-NH₂; -NHR'; -NR'₂; -NR'^{N1}R'^{N2};
-NHC(=O)H; -N'RC(=O)H; -NHC(=O)R'; -N'RC(=O)R';
-R';

50 en la que cada R' se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
55 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ sustituido;

60 en los que, en cada grupo -NR'^{N1}R'^{N2}, independientemente, R'^{N1} y R'^{N2} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomo del anillo.

En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) se seleccionan independiente entre:

65 -F; -Cl; -Br; -I;

-OH; -OR;
-C(=O)OH; -C(=O)OR';
-R'.

5 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, salvo que cada R' se selecciona independientemente entre:

10 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;
carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido;
15 carboaril C₅₋₁₀ alquilo C₁₋₄ no sustituido.

En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroaril C₅₋₁₀ carboaril C₆₋₁₀ alquilo-C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, salvo que cada R' se selecciona independientemente entre:

20 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido.

25 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, salvo que cada R' se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.

30 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, salvo que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

35 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en el alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, salvo que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me y -Et.

En una realización, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona de forma independiente de: -H, -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

40 En una realización, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona de forma independiente de: -H, -Me, y -Et.

En una realización, cada una de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona de forma independiente de: -H y -Me.

45 En una realización, todos excepto cuatro R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ es H,

En una realización, todos excepto dos R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ es H,

En una realización, todos excepto un R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ es -H.

50 En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ es H,

Grupos amino.

55 En cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -H o es como se ha definido anteriormente para R; o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

60 Por ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente es como se ha definido anteriormente para R; o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

65 -H;

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
 carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
 heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
 carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
 carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
 heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
 carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀ alquilo C₁₋₄ sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

-H;
 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

-H;
 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido);
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
 alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;

o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se

selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, y -Et (por ejemplo, $-NR^{3NA}R^{3NA}$ es $-NH_2$, $-NHMe$, $-NMe_2$, $NHEt$, $-NEt_2$), o $-NMeEt$).

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, si están presentes, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H y -Me (por ejemplo, $-NR^{3NA}R^{3NA}$ es $-NH_2$, $-NHMe$, o $-NMe_2$).

En analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$, si están presentes, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -H o es como se ha definido anteriormente para R; o R^{7NA} y R^{7NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$, si están presentes, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente es como se ha definido anteriormente para R; o R^{7NA} y R^{7NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos del anillo.

En una realización, $-NR^{3NA}R^{3NB}$ y $-NR^{7NA}R^{7NB}$, si ambos están presentes, son iguales.

En una realización, $-NR^{3NA}R^{3NB}$ y $-NR^{7NA}R^{7NB}$, si ambos están presentes, son diferentes.

En cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} es independientemente -H o como se ha definido anteriormente para R.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} es independientemente como se ha definido anteriormente para R.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

-H;
alquilo C_{1-6} alifático no sustituido; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático no sustituido; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} no sustituido; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
carboarilo C_{6-10} no sustituido; carboarilo C_{6-10} sustituido;
heteroarilo C_{5-10} no sustituido; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
carboaril C_{6-10} alquilo C_{1-4} no sustituido; carboaril C_{6-10} alquilo C_{1-4} sustituido.

Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

alquilo C_{1-6} alifático no sustituido; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático no sustituido; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} no sustituido; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
carboarilo C_{6-10} no sustituido; carboarilo C_{6-10} sustituido;
heteroarilo C_{5-10} no sustituido; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
carboaril C_{6-10} alquilo C_{1-4} no sustituido; carboaril C_{6-10} alquilo C_{1-4} sustituido.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H;

alquilo C_{1-6} alifático no sustituido; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático no sustituido; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} no sustituido; cicloalquilo C_{3-6} sustituido.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

alquilo C_{1-6} alifático no sustituido; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático no sustituido; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} no sustituido; cicloalquilo C_{3-6} sustituido.

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H;

alquilo C_{1-6} alifático no sustituido;

alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido.

5 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo =NR^{3NC}, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido.

10 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo =NR^{3NC}, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

15 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo =NR^{3NC}, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, y -Et (por ejemplo, =NR^{3NC} es = NH, = NMe, o = NEt).

En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo =NR^{3NC}, si están presentes, R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H y -Me (por ejemplo, =NR^{3NC} es = NH o = NMe).

20 En analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo =NR^{7NC}, si están presentes, R^{7NC} es independientemente como se ha definido anteriormente para R^{3NC}.

Sustituyentes en el átomo de nitrógeno del anillo

25 Asimismo, en analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, R^{N10}, si están presentes, es independientemente como se ha definido anteriormente para R^{3NC} (o R^{7NC}).

Por ejemplo, en una realización, R^{N10}, si están presentes, se selecciona independientemente entre: -H y alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;

30 Por ejemplo, en una realización, R^{N10}, si están presentes, se selecciona independientemente entre: -H, -Me, y -Et.

Por ejemplo, en una realización, R^{N10}, si están presentes, se selecciona independientemente entre: -H y -Me.

35 Por ejemplo, en una realización, R^{N10}, si está presente, es independientemente -H.

Contraión

X⁻, si están presentes, es uno o más contraiones aniónicos para conseguir la neutralidad eléctrica.

40 Los ejemplos de contraiones aniónicos adecuados se describen a continuación con el encabezamiento "sales".

En una realización, X⁻ es independientemente un anión halógeno (es decir, un haluro).

45 En una realización, X⁻ es independientemente Cl⁻, Br⁻, o I⁻.

En una realización, X⁻ es independientemente Cl⁻.

En una realización, X⁻ es independientemente NO₃⁻.

50 *Isómeros*

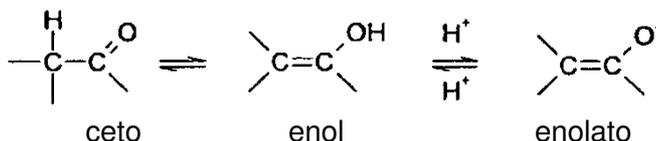
Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales, o anoméricas particulares. incluyendo, pero sin limitación, formas *cis* y *trans*; formas *E* y *Z*; formas *c-*, *t-*, y *r-*; formas *endo* y *exo*; formas *R-*, *S-*, y *meso-*; formas *D-* y *L-*; formas *d-* y *l-*; formas (+) y (-); formas ceto-, enol-, y enolato; formas *sin-* y *anti-*; formas *sinclinales* y *anticlinales*; formas α - y β -; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, silla, retorcida, de sobre, y semisilla; y combinaciones de las mismas, en lo sucesivo denominadas colectivamente "isómeros" (o "formas isoméricas").

60 Obsérvese que, excepto como se describe más adelante para formas tautoméricas, excluidas específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que se diferencian en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De manera similar, una referencia a un grupo orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo,

65

una referencia a una clase de estructuras puede incluir del mismo modo formas estructuralmente isoméricas que entran dentro de dicha clase (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta-, y para-metoxifenilo).

- 5 La exclusión anterior no es válida para formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto-, enol-, y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado más abajo), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiolo, N-nitroso/hidroxiato, y nitro/aci-nitro.



- 10 Obsérvese que se incluyen específicamente en el término "isómero", compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹H, ²H (D), y ³H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹¹C, ¹²C, ¹³C y ¹⁴C; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹⁶O y ¹⁸O; y similares.
- 15 Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluyen todas esas formas isoméricas, incluyendo compuestos (completa o parcialmente) racémicos y otras mezclas de los mismos. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento, u otros métodos, de una manera conocida.

20

Sales

- Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Se describen ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, págs. 1-19.

- Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces una sal puede formarse con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metal alcalino, tales como Na⁺ y K⁺, cationes de metal alcalinotérreo, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes, tales como Al³⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Son ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados, aquellos obtenidos a partir de etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

- Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces una sal puede formarse con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de ácidos inorgánicos adecuados: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso.

- Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de ácidos orgánicos adecuados: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalen carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laúrico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados poliméricos incluyen, pero sin limitación, aquellos obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

- El compuesto también puede proporcionarse en forma de una sal mixta (es decir, el compuesto en combinación con una sal, o con otra sal). Por ejemplo, la sal mixta de cloruro de metil-tioninio - cloruro de cinc (MTZ) es una sal mixta de cloruro de metil-tioninio (MTC), una sal de cloruro, y otra sal, cloruro de zinc. Está previsto que dichas sales mixtas queden abarcadas en la expresión "y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos".

- Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto en particular también incluye formas de sal del mismo.

Hidratos y solvatos

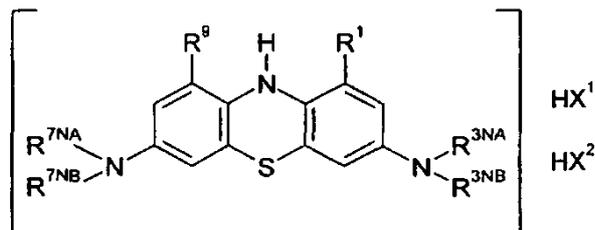
- Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar un solvato correspondiente del principio activo. El

término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto, sal o compuesto) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

- 5 Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto en particular también incluye formas de solvato del mismo.

Compuestos de DAPTZ reducidos cristalinos reducidos

- 10 Estos compuestos se describen en la solicitud no publicada anteriormente presentada PCT/GB2007/001103, y son compuestos de 3,7- diamino-10 H-fenotiazina con la siguiente fórmula:



- 15 en la que:

cada uno de R^1 y R^9 se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alquenoilo C_{2-4} , y alquilo C_{1-4} halogenado;

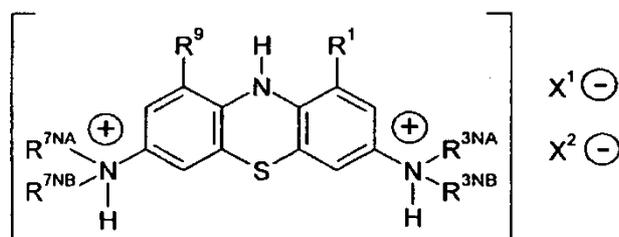
- 20 cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alquenoilo C_{2-4} , y alquilo C_{1-4} halogenado;

cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alquenoilo C_{2-4} , y alquilo C_{1-4} halogenado;

cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido prótico;

- 25 y sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Aunque sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, los inventores creen que es posible, si no probable, que los compuestos existan en la siguiente forma:



- 30 Aunque los compuestos DAPTZ son ellos mismos sales, también se pueden proporcionar en forma de una sal mixta (es decir, el compuesto DAPTZ en combinación con otra sal). Está previsto que dichas sales mixtas queden abarcadas en la expresión "y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos". Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto en particular también incluye sales del mismo.

- 40 Los compuestos de DAPTZ también puede proporcionarse en forma de un solvato o hidrato (es decir, El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto, sal o compuesto) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc. A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto en particular también incluye formas de solvato del mismo.

- 45 En una realización, los grupos alquilo C_{1-4} se seleccionan entre: grupos alquilo C_{1-4} lineales, tales como -Me, -Et, -nPr, -iPr, y -nBu; grupos alquilo C_{3-4} ramificados, tales como -iPr, -iBu, -sBu, y -tBu; y grupos alquilo C_{3-4} cíclicos, tal como -cPr y -cBu.

En una realización, los grupos alquenoilo C_{2-4} se seleccionan entre grupos alquenoilo C_{1-4} lineales, tal como -CH=CH₂ (vinilo) y -CH₂-CH=CH₂ (alilo).

- 50 En una realización, los grupos alquilo C_{1-4} halogenados se seleccionan entre: -CF₃, -CH₂CF₃, y -CF₂CF₃.

Los grupos R¹ y R⁹

En una realización, cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, -Et, o -CF₃.

5 En una realización, cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, o -Et.

En una realización, R¹ y R⁹ son iguales.

En una realización, R¹ y R⁹ son diferentes.

10

En una realización, cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H,

En una realización, cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -Me,

15 En una realización, cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -Et.

Los grupos R^{3NA} y R^{3NB}

20 Cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, y alquilo C₁₋₄ halogenado.

En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, y alquilo C₁₋₄ halogenado.

25 En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, o -CF₃.

En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, o -CF₃.

30 En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me o -Et.

En una realización, R^{3NA} y R^{3NB} son iguales.

En una realización, R^{3NA} y R^{3NB} son diferentes.

35 En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me.

En una realización, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Et.

Los grupos R^{7NA} y R^{7NB}

40 Cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, y alquilo C₁₋₄ halogenado.

45 En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄, y alquilo C₁₋₄ halogenado.

En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, o -CF₃.

50 En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂, o -CF₃.

En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me o -Et.

En una realización, R^{7NA} y R^{7NB} son iguales.

55 En una realización, R^{7NA} y R^{7NB} son diferentes.

En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me.

En una realización, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Et.

60

En una realización, R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} son iguales.

En una realización, R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido en el presente documento, con la condición de que al menos uno de R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} es *diferente de* -Et.

65

Salvedades opcionales

En una realización, el compuesto es como se ha definido en el presente documento, pero con la condición de que R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} no son cada uno -Et.

5

En una realización, el compuesto es como se ha definido en el presente documento, pero con la condición de que:

si: cada uno de R^1 y R^9 es -H;
entonces: R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} no son cada uno -Et.

10

Los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$

En una realización:

15 cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} , o alquilo C_{1-4} halogenado; cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} , o alquilo C_{1-4} halogenado; opcionalmente con la condición de que al menos uno de R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} es diferente de -Et.

En una realización:

20

cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, $-\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, o $-\text{CF}_3$;
cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, $-\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, o $-\text{CF}_3$;
opcionalmente con la condición de que al menos uno de R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} es diferente de -Et.

En una realización:

25 cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} es independientemente -Me o -Et;
cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me o -Et;
opcionalmente con la condición de que al menos uno de R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} es diferente de -Et.

30

En una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son iguales.

En una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son diferentes.

35 En una realización, cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ se selecciona independientemente entre: $-\text{NMe}_2$, $-\text{NEt}_2$, $-\text{N}(\text{nPr})_2$, $-\text{N}(\text{Bu})_2$, $-\text{NMeEt}$, $-\text{NMe}(\text{nPr})$, y $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)_2$.

En una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son iguales, y se seleccionan independientemente entre: $-\text{NMe}_2$, $-\text{NEt}_2$, $-\text{N}(\text{nPr})_2$, $-\text{N}(\text{Bu})_2$, $-\text{NMeEt}$, $-\text{NMe}(\text{nPr})$, y $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)_2$.

40

En una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son iguales, y se seleccionan independientemente entre: $-\text{NMe}_2$ y $-\text{NEt}_2$.

En una realización, cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es: $-\text{NMe}_2^+$.

45

En una realización, al menos uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es *diferente de* $-\text{NEt}_2$.

En una realización, cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es diferente de $-\text{NEt}_2$.

50 Por ejemplo, en una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son iguales, y se seleccionan entre: $-\text{NMe}_2$, $-\text{N}(\text{nPr})_2$, $-\text{N}(\text{Bu})_2$, $-\text{NMeEt}$, $-\text{NMe}(\text{nPr})$, y $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)_2$.

Los grupos HX^1 y HX^2

55 Cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido prótico.

Los ejemplos de ácidos próticos incluyen, por ejemplo, ácidos inorgánicos, tales como ácidos halohídricos (por ejemplo, HCl, HBr, HI), ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4), y ácidos orgánicos, tales como ácido carbónico (H_2CO_3) y ácido acético (CH_3COOH).

60

En una realización, cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido monoprótico.

En una realización, cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido halohídrico (es decir, un ácido halohídrico).

65

En una realización, cada uno de HX^1 y HX^2 se selecciona independientemente entre HCl, HBr, y HI.

En una realización, HX¹ y HX² son iguales.

En una realización, HX¹ y HX² son diferentes.

5 En una realización, HX¹ y HX² son iguales, y se seleccionan independientemente entre HCl, HBr, y HI. En este caso, el compuesto (un compuesto de diamino-fenotiazina) se puede denominar convenientemente como un "sal de bis(haluro de hidrógeno) de diamino-fenotiazina".

10 En una realización, HX¹ y HX² son cada uno HCl. En este caso, el compuesto se puede denominar convenientemente como un "sal de bis(cloruro de hidrógeno) de diamino-fenotiazina".

En una realización, HX¹ y HX² son cada uno HBr. En este caso, el compuesto se puede denominar convenientemente como un "sal de bis(bromuro de hidrógeno) de diamino-fenotiazina".

15 En una realización, X¹ y X² son cada uno HI. En este caso, el compuesto se puede denominar convenientemente como un "sal de bis(yoduro de hidrógeno) de diamino-fenotiazina".

Algunas combinaciones preferidas

20 En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, o -Et; y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂ o -NEt₂.

25 En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, o -Et; y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂.

30 En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂ o -NEt₂.

35 En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂.

40 En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, o -Et; y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂ o -NEt₂; y cada uno de HX¹ y HX² se selecciona independientemente entre HCl, HBr, y HI.

45

En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, -Me, o -Et; y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂; y cada uno de HX¹ y HX² se selecciona independientemente entre HCl, HBr, y HI.

50

En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂ o -NEt₂; y cada uno de HX¹ y HX² se selecciona independientemente entre HCl, HBr, y HI.

55

En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, y
cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es independientemente -NMe₂; y cada uno de HX¹ y HX² se selecciona independientemente entre HCl, HBr, y HI.

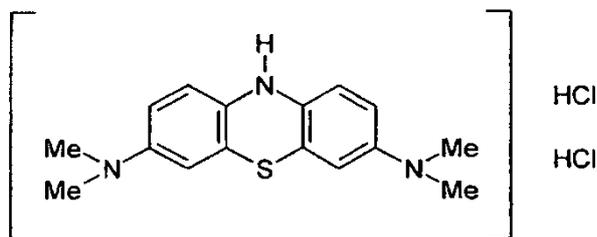
60

En una realización:

cada uno de R¹ y R⁹ es independientemente -H, y

65

cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es independientemente $-NMe_2$; y cada uno de HX^1 y HX^2 es HCl,

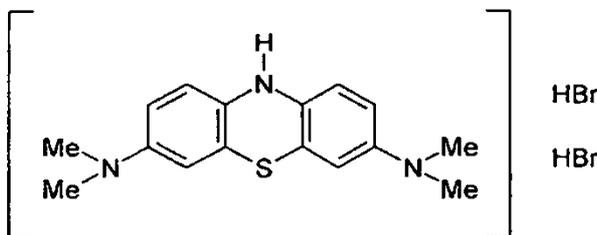


5

En una realización:

cada uno de R^1 y R^9 es independientemente $-H$, y cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es independientemente $-NMe_2$; y cada uno de HX^1 y HX^2 es HBr,

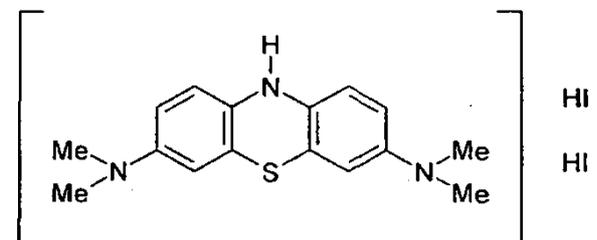
10



15

En una realización:

cada uno de R^1 y R^9 es independientemente $-H$, y cada uno de los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ es independientemente $-NMe_2$; y cada uno de HX^1 y HX^2 es HI,



20

Variación isotópica

En una realización, uno o más de los átomos de carbono del compuesto son ^{11}C , ^{13}C , o ^{14}C . En una realización, uno o más de los átomos de carbono del compuesto es ^{11}C .

25

En una realización, uno o más de los átomos de carbono del compuesto es ^{13}C .

En una realización, uno o más de los átomos de carbono del compuesto es ^{14}C .

30

En una realización, uno o más de los átomos de nitrógeno del compuesto es ^{15}N .

En una realización, uno o más o todos los átomos de carbono de uno o más o todos los grupos R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , R^{7NB} , R^1 , R^9 y R^{10} es ^{11}C . (O ^{13}C). (O ^{14}C).

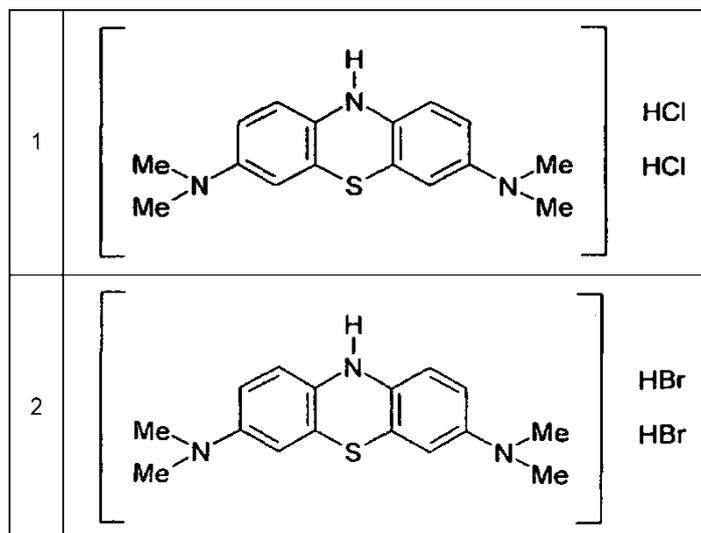
35

En una realización, uno o más o todos los átomos de carbono de uno o más o todos los grupos R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , y R^{7NB} es ^{11}C . (O ^{13}C). (O ^{14}C).

40

En una realización, los grupos $-N(R^{3NA})(R^{3NB})$ y $-N(R^{7NA})(R^{7NB})$ son iguales, y son: $-N(^{11}CH_3)_2$. (O $-N_pCH_3)_2$). (O $-N(^{14}CH_3)_2$).

En una realización, el compuesto se selecciona entre los siguientes compuestos, y sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.



5 *Otros aspectos de la invención*

Cuando se describe en el presente documento cualquier método de tratamiento, también se describen:

10 Un compuesto de DAPTZ para su uso en un método de tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, que padecen un trastorno hematológico en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante dicho compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma reducida cristalina estable como principio activo.

15 Uso de un compuesto de DAPTZ en la preparación de una dosis unitaria de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, que padecen un trastorno hematológico en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante dicho compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma reducida cristalina estable como principio activo.

20 En un aspecto, la invención proporciona una unidad de fármaco para el tratamiento de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, que padecen un trastorno hematológico en el que dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante un compuesto de DAPTZ, cuya dosis unitaria contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma reducida cristalina estable como principio activo, a una dosificación descrita anteriormente (por ejemplo, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg), y que tiene una velocidad de disolución descrita anteriormente (por ejemplo, <50 % en 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, o 5 horas).

Ligandos

30 También se contempla el uso adicional como indicador de diagnóstico o pronóstico, por ejemplo, como ligando para marcar agregados de proteínas en el cerebro. Los hallazgos del presente documento en los que el efecto cognitivo (dependiente de la concentración en el cerebro) comparado con el efecto hematológico negativo (que se deduce procede de la formación de dímeros) tienen implicaciones también para su uso como ligando.

35 Dichos compuestos de DAPTZ (ligandos) pueden incorporarse, conjugarse con, quelarse con, o asociarse de cualquier otra forma con, otros grupos químicos, tales como isótopos detectables estables e inestables, radioisótopos, átomos emisores de positrones, marcadores de resonancia magnética, tintes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos, restos terapéuticos, o cualquier otro resto que pueda ayudar en una aplicación de pronóstico, diagnóstico, o terapéutica.

40 Por ejemplo, en una realización, el compuesto de DAPTZ es como se ha definido en el presente documento, pero con la limitación adicional de que el compuesto incorpora, está conjugado con, está quelado con, o está asociado de cualquier otra forma con, uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) etiquetas detectables, por ejemplo, isótopos, radioisótopos, átomos emisores de positrones, marcadores de resonancia magnética, tintes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos, o restos terapéuticos.

45 En una realización, el compuesto de DAPTZ es un ligando así como una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta de la proteína tau (o proteína tau agregada), e incorpora, está conjugado con, está quelado con, o está asociado de cualquier otra forma con, uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) etiquetas detectables. Por ejemplo, en una

realización, el compuesto de DAPTZ es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que el compuesto incorpora, está conjugado con, está quelado con, o está asociado de cualquier otra forma con, uno o más (por ejemplo, 1,2, 3, 4, etc.) etiquetas detectables.

5 Los compuestos de DAPTZ marcados (por ejemplo, cuando se ligan a la proteína tau o a la proteína tau agregada) se pueden visualizar o detectar por cualquier medio adecuado, y el experto en la materia apreciará que se puede usar cualquier medio de detección adecuado conocido en la técnica.

10 Por ejemplo, el compuesto de DAPTZ (ligando-etiqueta) se puede detectar de forma adecuada incorporando un átomo emisor de positrones (por ejemplo, ^{11}C) (por ejemplo, como el átomo de carbono de uno o más grupos alquilo sustituyentes, por ejemplo, grupos metilo sustituyentes) y detectar el compuesto usando tomografía de emisión de positrones (PET) tal como es conocido en la técnica.

15 Dichos compuestos de DAPTZ marcados con ^{11}C se puede preparar adaptando de varias formas los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, análogamente a los métodos descritos en los documento WO 02/075318 (véanse las Figuras 11a, 11b, 12) y WO 2005/030676.

20 Se describe un método para marcar una proteína enferma agregada asociada con un trastorno degenerativo en el cerebro de un paciente que padece un trastorno hematológico cuando dicha proteína enferma agregada es una que sea susceptible de marcarse con un compuesto de DAPTZ, cuyo método comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ en forma reducida cristalina estable como principio activo marcado.

25 Las proteínas enfermas agregadas, los compuestos de DAPTZ, y trastornos neurodegenerativos se describen en otra parte en el presente documento.

Los métodos pueden comprender además la etapa de determinar la presencia y/o la cantidad de dicho compuesto unido a dicha proteína agregada y correlacionar el resultado de la determinación con la patología del sujeto.

30 Cuando se describe en el presente documento cualquier método de marcado, diagnóstico o pronóstico, también se describen:

35 un compuesto de DAPTZ para su uso en dicho método y uso de un compuesto de DAPTZ en la preparación de un indicador diagnóstico o pronóstico utilizando dicho método. Las correspondientes realizaciones, preferencias, e individualizaciones, descritas en el presente documento se aplican *mutatis mutandis* a estos aspectos.

40 A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros indicados o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros.

45 Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un transportador farmacéutico" incluye mezclas de dos o más tales transportadores, y similares.

50 Los intervalos se expresan normalmente como de "aproximadamente" un valor particular, y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando dicho intervalo se expresa, otra realización incluye desde el un valor particular y/o el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", debe entenderse que el valor particular forma otra realización.

Todas las combinaciones compatibles de las realizaciones descritas anteriormente están descritas explícitamente en el presente documento como si cada una de dichas combinaciones se citara de forma específica e individual.

55 Cualquier subtítulo del presente documento es simplemente por comodidad, y no debe tomarse como limitante de la descripción de ninguna forma.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes. Los expertos en la materia inventarán otras realizaciones de la invención a la luz de estas.

60 Figuras

65 Figura 1. Diseño de estudio del ensayo clínico TRx-014-001 y 009. Los números corresponden a los pacientes en cada etapa del estudio. 323 pacientes entraron en el estudio base, un sujeto se aleatorizó pero no recibió medicación. Los sujetos se trataron con MTC o placebo según se indica. Tras 24 semanas y 50 semanas, los sujetos continuaron en 2 extensiones (E1 y E2) del ensayo clínico y después continuaron con el ensayo clínico

TRx-014-009. Por motivos éticos, los que recibieron placebo en las primeras 24 semanas recibieron 100 mg dvd en E1. "tvd" significa dosificación con una frecuencia de tres veces al día, y "dvd" significa dosificación a una frecuencia de dos veces al día.

5 Figura 2. Respuesta al tratamiento en CDR moderados a las 24 semanas. Para este gráfico, las convenciones de marcado de "plac" se refieren al placebo, "bajo" se refiere a bajo (100 mg) (véase la nota al pie 1, Tabla 1) "30 mg" se refiere a una dosis de 30 mg tvd y "60 mg" se refiere a una dosis de 60 mg tvd.

10 Figura 3. Comparación de los efectos del tratamiento de rember™ observados mediante adquisición de imagen funcional del cerebro mediante SPECT. Se observa una disminución en el flujo sanguíneo cerebral regional (rCBF) en forma de zonas de color blanco en el cerebro.

15 (1) El análisis SPM muestra regiones en las que la visita 4 tuvo rCBF significativamente inferiores que en la visita 1 en los sujetos tratados con placebo. Umbral de la diferencia $p < 0,005$, corregido $p < 0,05$ para comparaciones múltiples, con significación tanto de vóxel como de cluster. R = derecha, L = izquierda, A = anterior, P = posterior. La pareja superior de cada panel representa vistas anterior (izquierda) y posterior (derecha) respectivamente.

20 (2) El análisis SPM no muestra regiones en las que la visita 4 tuvo rCBF significativamente inferiores que en la visita 1 en los sujetos tratados con rember™ a 30 mg o 60 mg tvd. Umbral de la diferencia $p < 0,005$, corregido $p < 0,05$ para comparaciones múltiples, con significación tanto de vóxel como de cluster.

(3) Ubicaciones de la diferencia dependiente del tratamiento en el descenso entre el valor inicial y la visita 4 en sujetos con CDR leve tratados con placebo, comparado con aquellos tratados con rember™ a 30/60 mg tvd. Umbral de la diferencia $p < 0,005$, corregido $p < 0,05$ para comparaciones múltiples, con significación tanto de vóxel como de cluster.

25 Figura 4. Cambio en ITT/OC ADAS-cog desde los valores iniciales y curvas ajustadas. Para este gráfico, las convenciones de marcado de "placlow" se refiere a sujetos que inicialmente se aleatorizaron al placebo, y que después se cambiaron a una dosis de 100 mg dvd tras 24 semanas, "bajo" se refiere a una dosis baja (100 mg) tvd, "30 mg" se refiere a una dosis de 30 mg tvd y "60 mg" se refiere a una dosis de 60 mg tvd.

30 Figura 5. Disolución de cápsulas en fluido intestinal simulado por dosificación: Las cápsulas de (A) 30 mg y (B) 100 mg se disolvieron inicialmente y después de 24 meses de almacenamiento. La disolución de la cápsula de 100 mg fue más lenta que la de la cápsula de 30 mg y esta diferencia aumentó con el tiempo transcurrido desde la fabricación.

35 Figura 6A. Rember™ inhibe los eventos de nucleación y la agregación de tau autocatalítica.

Figure 6B. Rember™ abre una nueva ruta de eliminación para los agregados de tau.

40 Figura 7. Relación entre el tiempo de disolución y los efectos relativos cognitivos y hematológicos. El % de disolución se α ajustó según los siguientes cálculos:

45 Se determinó en primer lugar un índice de actividad cognitiva (CI) como el efecto de tamaño ADAS-cog normalizado a las 50 semanas en cada dosis nominal con respecto al tamaño máximo del efecto observado a las 50 semanas, usando las estimaciones por mínimos cuadrados del tamaño del efecto. Se expresó el correspondiente índice de actividad hematológica (HI) como el cambio normalizado en el recuento de glóbulos rojos a las 24 semanas para cada dosis nominal con respecto al mayor tamaño del efecto observado en los glóbulos rojos. Se seleccionaron los puntos temporales de 50 semanas para los efectos cognitivos y de 24 semanas para los efectos hematológicos porque los efectos correspondientes eran máximos en ese momento. La actividad cognitiva relativa se expresó como el cociente $CI/(CI+HI)$ y la actividad hematológica relativa se expresó como el cociente $HI/(CI+HI)$, y, en ambos casos, estas actividades relativas se normalizaron a sus correspondientes máximos para todas las dosis. Se utilizó un cálculo similar para expresar el porcentaje relativo del MTC disponible en solución antes o 30 minutos después con respecto al total, basado en los datos de solubilidad de las cápsulas de 24 meses de edad, cuando las diferencias de disolución entre las concentraciones de las cápsulas es máximo.

55 Las relaciones calculadas explícitamente se pueden expresar de la siguiente forma:

$$\frac{\alpha CI}{\alpha CI + (1 - \alpha) HI} \equiv \frac{D_{30}}{D_{total}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\frac{(1 - \alpha) HI}{\alpha CI + (1 - \alpha) HI} \equiv \frac{(1 - D_{30})}{D_{total}} \dots\dots\dots(2)$$

60 donde α es un factor de escalado para relacionar las unidades de CI con las unidades de HI (mediante

estimación por mínimos cuadrados, se encontró que tenía un valor de 0,645). D_{30} es el porcentaje de MTC total disponible procedente de las cápsulas de 24 meses a los 30 minutos, y D_{total} es la dosis nominal total eventualmente disuelta.

5 Figura 8. Relaciones dosis-respuesta implicadas a las 50 semanas. Tamaños del efecto calculados usando estimaciones por mínimos cuadrados a las 50 semanas. La dosis terapéutica eficaz disponible de la cápsula de 100 mg fue equivalente a una dosis de aproximadamente 25 mg, lo que indica que las cápsulas no permiten proporcionar el suministro y absorción de la dosis nominal en una forma terapéuticamente activa.

10 Figura 9. Diferencias en parámetros clave de los glóbulos rojos en ratas entre MTC y L-MTx administrados por vía oral durante 14 días en las dosis diarias indicadas. Las diferencias se muestran en términos de cambio observado con L-MTx con respecto a MTC. Por ejemplo, a una dosis de 150 mg/kg de L-MTx, el recuento de glóbulos rojos aumentó en $>1 \times 10^6/\mu\text{l}$ y la concentración promedio de hemoglobina celular aumentó en 3 pg/dl. El análisis estadístico de los datos se muestra en la Tabla 4. Abreviaturas y unidades: RBC: recuento de glóbulos rojos, 10^6 ; HB: hemoglobina, g/dl; MCV: volumen celular medio, fL; MCHC: concentración promedio de hemoglobina celular, g/dl; RETI: recuento de reticulocitos, % de glóbulos rojos.

20 Figura 10. Tasas de excreción urinaria promedio para MTC oxidado (Ox-MT) procedente de 7 sujetos humanos adultos tras una dosis de 10 mg oral (promedio, SE). (De DiSanto y Wagner, 1972b).

Figura 11. Tasas de excreción urinaria promedio para leuco-MTC (L-MT) procedente de 7 sujetos humanos adultos tras una dosis de 10 mg oral (promedio, SE). (De DiSanto y Wagner, 1972b).

25 Figura 12. Tasa de excreción urinaria para Ox-MTC tras una dosis de 10 mg oral.

Figura 13. Tasa de excreción urinaria para L-MTC tras una dosis de 10 mg oral.

30 Figura 14. Concentración de Ox-MT en sangre completa tras administración intravenosa de 100 mg de MTC (de Peter et al., 2000).

Figura 15. Concentración de Ox-MT en sangre completa tras administración oral de 100 mg de MTC con (círculos abiertos) o sin (círculos sólidos) 800 mg de Mesna (promedio, SE) (de Peter et al., 2000).

35 Figura 16. Estimación de la biodisponibilidad aparente basada en la excreción de MT total (es decir Ox-MT + L-MT) a T-infinito tras la dosificación oral, cuando la curva se ha ajustado a la ecuación empírica:

$$\text{Recuperación urinaria} = 88,9 - (88,9 \times \text{dosis}) / (69,7 + \text{dosis})$$

40 Tenga en cuenta el valor menor de lo esperado ("P" marcado) para la dosis de 100 mg, resultado notificado por Peter et al. (corregido para la excreción esperada en 48 horas).

45 Figura 17. Tasa de excreción urinaria de MTC total ($\mu\text{mol/h}$) durante los intervalos de tiempo indicados tras administración i.v. (barras de color negro) y oral (barras de color gris) de MTC. Promedio SE, $n = 7$ (de Peter et al., 2000).

Figura 18. Primera etapa del modelo: ajustar los datos de concentración en sangre tras una sola dosis intravenosa de 100 mg de MTC y datos de la excreción urinaria escalada tras una única dosis oral de 10 mg de MTC.

50 Figura 19. Ajuste entre los datos de concentración en sangre tras la administración intravenosa observados por Peter et al. (Tabla 7) y previstos por el modelo representado gráficamente en la Figura 18.

55 Figura 20. Ajuste de la excreción urinaria escalada observada de Ox-MT tras una sola dosis oral de 10 mg de MTC según DiSanto y Wagner (Tabla 5) y predicción del modelo (mostrada en la Figura 18) tras una sola dosis intravenosa de MTC (100 mg).

60 Figura 21. Ajuste de la excreción urinaria escalada observada de L-MT tras una sola dosis oral de 10 mg de MTC según DiSanto y Wagner (Tabla 5) y predicción del modelo (mostrada en la Figura 18) tras una sola dosis intravenosa de MTC (100 mg).

Figura 22. Segunda etapa del modelo: ajustar los datos de concentración en sangre tras una sola dosis oral de 100 mg de MTC y datos de la excreción urinaria escalada tras una única dosis oral de 10 mg de MTC.

65 Figura 23. Ajuste entre los datos de concentración en sangre tras la administración oral observados por Peter et al. (Tabla 7) y previstos por el modelo representado gráficamente en la Figura 22.

- Figura 24. Ajuste de la excreción urinaria escalada observada de Ox-MT tras una sola dosis oral de 10 mg de MTC según DiSanto y Wagner (Tabla 5) y predicción del modelo (mostrada en la Figura 22) tras una sola dosis oral de MTC (100 mg).
- 5 Figura 25. Ajuste de la excreción urinaria escalada observada de L-MT tras una sola dosis oral de 10 mg de MTC según DiSanto y Wagner (Tabla 5) y predicción del modelo (mostrada en la Figura 22) tras una sola dosis oral de MTC (100 mg).
- 10 Figura 26. Comparación de las tasas de excreción urinaria promedio de MT total indicadas por Peter et al. y las previstas por el modelo oral mostrado en la Figura 22 para los mismos intervalos. Se muestra la comparación de la excreción total durante 24 horas.
- 15 Figura 27. Reproduce la Figura 16, pero incluye la predicción del modelo ("M") para la excreción de MTC. El valor del modelo es más cercano al previsto por otros estudios que la estimación notificada por Peter et al. ("P").
- 20 Figura 28. Salidas del modelo oral para C2 (sangre), C4 y C3 se muestran reescalados a sus correspondientes máximos. Estos se comparan con un modelo triexponencial aplicado al nivel medido de MT en cerebro de cerdo tras una única dosis oral.
- 25 Figura 29. Relación entre la eficacia clínica observada de rember™ y el nivel promedio estacionario previsto de MT en C3 para el régimen de dosificación de 3 días. También se muestran los niveles estacionarios previstos de MT en C3 para los regímenes de dosificación de 2 días y 1 día.
- 30 Figura 30. Relación entre la eficacia clínica observada de rember™ y el nivel promedio estacionario previsto de MT en C2 para el régimen de dosificación de 3 días. También se muestran los niveles estacionarios previstos de MT en C2 para los regímenes de dosificación de 2 días y 1 día.
- 35 Figura 31A. Diferencia entre el tamaño del efecto observado y el tamaño del efecto previsto en función del porcentaje de disolución de la cápsula a 30 minutos. La disolución de la cápsula se determina por la cantidad de MTC liberado en la fase acuosa en las condiciones de disolución normalizadas según la farmacopea europea y estadounidense.
- Figura 31B. Relación entre el nivel estacionario esperado de MT en el compartimento central (C2, es decir, sangre) y la pérdida observada de glóbulos rojos a las 24 expresado (expresado como fracción de cambio con respecto al intervalo normal).
- 40 Figura 32. Relación entre la dosis real actual ("dosis") y la dosis eficaz ("dosis ef") según los datos de excreción urinaria.
- 45 Figura 33. Comparación de la fracción absorbida prevista para MTC y L-MTx suponiendo que la administración de la forma L- MTx elimina la no absorción en el estómago (es decir, C1 en la Figura 22).
- Figura 34. Relación entre la eficacia clínica esperada de una forma basada en L-MTx del resto metiltioninio y nivel promedio estacionario previsto de MT en C3 para una gama de regímenes de dosificación, de 1 día a 3 días.
- 50 Figura 35. Relación entre la eficacia clínica esperada de una forma basada en L-MTx del resto metiltioninio y nivel promedio estacionario previsto de MT en C2 (sangre) para una gama de regímenes de dosificación, de 1 día a 3 días.
- 55 Figura 36. Relación dosis-respuesta observada para el efecto del MTC en la formulación de cápsula usada en el ensayo clínico TRx- 014-001 sobre la pérdida de glóbulos rojos y relación dosis respuesta basada en MTC y esperada para una forma basada en L-MTx de un producto medicinal de metiltioninio administrada en las dosis indicadas con una frecuencia de 3 días.
- 60 Figura 37. Varios modelos cuantitativos para la progresión y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, tal como se describe en el Ejemplo 12.
- 65 Figura 38. Relación entre la eficacia clínica esperada de una preparación basada en L-MTx para una formulación de liberación lenta de 1 día.
- Figura 39. Efecto diferencial de los inhibidores de diferentes sitios sobre la ruta de agregación tau. El esquema de la izquierda muestra el sitio de inhibición de la entrada de tau en la ruta de agregación de tau (entrada) y el sitio de la eliminación potenciado de los agregados de tau de dicha ruta. El efecto de los cambios en ambos sitios sobre los niveles de PHF en las neuronas se muestra en el panel derecho. La inhibición de la entrada disminuye inicialmente el nivel de los PHF, antes de que la velocidad de formación continúe al mismo nivel que antes. La

eliminación potenciada de los agregados de tau, sin embargo, da como resultado una disminución estacionaria en el nivel de agregados tau.

Figura 40. Agregación de tau y su eliminación en la enfermedad de Alzheimer. Los oligómeros pueden tanto ensamblarse en PHF filamentosos y/o entrar en la ruta de eliminación endosómica-lisosómica.

Ejemplos

Ejemplo 1- Ensayo clínico en Fase 2 TRx-014-001

Resumen

Se llevó a cabo un estudio exploratorio de búsqueda de dosis en Fase 2 de 50 semanas para el tratamiento de la demencia leve y moderada de tipo Alzheimer usando un producto farmacéutico en investigación (IMP) en el cual el MTC era el principio activo farmacéutico (API). El estudio era un estudio aleatorizado doblemente enmascarado controlado por placebo cuyo objetivo primario era investigar los efectos de MTC en tres dosis (30, 60 y 100 mg, cada una tres veces al día) comparado con placebo sobre la capacidad cognitivas (medida según la escala ADAS-cog: escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer - subescala cognitiva). Se aleatorizadas 322 sujetos, de los que 245 (74 %) completaron las primeras 24 semanas de tratamiento. De estos, 227 (93 %) decidieron continuar el tratamiento durante 6 meses más, de los que 177 (78 %) completaron 50 semanas de tratamiento el 2 de julio de 2007. El análisis final comprende el análisis de la población ITT/OC (Intención de tratar/caso observado) de los 245 sujetos que completaron 24 semanas de tratamiento, y 177 sujetos que completaron 50 semanas de tratamiento el 2 de julio de 2007. El diseño del estudio se resume en la Figura 1. Por motivos éticos, los sujetos inicialmente aleatorizados para recibir placebo durante la primera fase de 6 meses se cambiaron a la dosis de 100 mg durante la segunda fase de extensión de 6 meses del estudio ("E1").

Análisis de 24 semanas

El resultado preespecificado primario fue un análisis ITT/OC del cambio en la puntuación de ADAS-cog desde la inicial a las 24 semanas usando un enfoque de análisis de covarianza que incluyó una evaluación de la interacción entre el efecto del tratamiento con rember™ y la gravedad inicial definida mediante CDR (escala de puntuación de demencia clínica). Este análisis demostró un efecto positivo de rember™ a 60 mg tvd que consiguió una significación estadística en las poblaciones ITT/OC e ITT/LOCF (intención de tratar/última observación registrada). Se encontró que la gravedad de la CDR al principio era un cofactor muy significativo, y cuando se incluyó en el modelo, mostró que el efecto de rember™ era significativo a las 24 semanas solamente en sujetos que tenían un CDR moderado en el momento inicial. La falta de descenso en sujetos con CDR leve tratados con placebo evitó el análisis de eficacia en este grupo en las primeras 24 semanas. Sin embargo, la eficacia de rember™ se confirmó en este grupo mediante análisis funcional por barrido cerebral a las 24 semanas, y por ADAS-cog a las 50 semanas.

Tabla 1. Tamaño del efecto ADAS-cog a las 24 semanas en sujetos con CDR moderada (en unidades ADAS-cog)

Dosis ⁽¹⁾	Estimación	CI 95 %,	valor p ⁽²⁾
bajo (100 mg)	-0,42	-4,24, 3,40	0,826
30 mg	-4,02	-7,30, -0,74	0,0172
60 mg	-5,41	-9,31 -1,52,	0,0073

1. La dosis de 100 mg se cita como la dosis baja (100 mg)" para indicar que en la presente formulación, la eficacia terapéutica de la cápsula de 100 mg no se corresponde con la dosis nominal.
 2. El valor p es de un ensayo sobre si el valor es significativamente diferente del placebo.

En el análisis del subgrupo de la población ITT/OC que tenía CDR moderado al principio (Figura 2), el tamaño del efecto de rember™ a la dosis de 60 mg tvd fue -5,4 unidades ADAS-cog y 3,4 unidades MMSE (miniexploración del estado mental) (no se muestran los datos de MMSE). Aunque los sujetos tratados con placebo disminuyeron en 5,1 unidades ADAS-cog, no hubo evidencia de descenso en sujetos tratados con rember™ at 30 mg o 60 mg tvd durante 24 semanas. Las variables no cognitivas del resultado (que miden la perturbación psiquiátrica y la capacidad para realizar las actividades cotidianas) también confirmaron las propiedades estabilizadoras de la enfermedad y el tamaño de eficacia de rember™ en el grupo moderado. Los sujetos que recibieron rember™ a la dosis 60 mg tvd, mostraron un tamaño del efecto de 1,4 - 1,9 unidades en la escala CGIC (impresión de cambio clínico global) a las 24 semanas con respecto al placebo, registrado por asesores clínicos enmascarados para el resto de medidas de resultado. La relación de riesgo del no descenso en CGIC para los sujetos tratados con rember™ a la dosis de 60 mg fue 9 veces mejor que el placebo. El parámetro de suma de recuadros de CDR, otra medida clínica global, mostró un beneficio de -1,7 unidades. Finalmente, rember™ a la dosis de 60 mg mostró un beneficio significativa en la medida ADFACS (escala de evaluación funcional de la enfermedad de Alzheimer) de las actividades de la vida cotidiana, con un tamaño del efecto de 3,1 a 6,1 unidades durante 24 semanas. En todos los análisis psicométricos a las 24 semanas, la cápsula de 100 mg mostró una eficacia mínima, consistente con una formulación defectuosa de las cápsulas a esta concentración de dosis descrito más adelante.

La dosis de 100 mg se cita como la dosis *baja* (100 mg)" para indicar que en la presente formulación, la eficacia terapéutica de la cápsula de 100 mg no se corresponde con la dosis nominal. Esto se describe con más detalle en los ejemplos siguientes.

5 **Análisis funcional por barrido cerebral**

La prevención del descenso durante 24 semanas se confirmó independientemente mediante el análisis de los cambios funcionales por barrido cerebral en 135 sujetos que se sometieron a dos barridos SPECT separados 6 meses de promedio (Figura 3). Mientras que los sujetos que recibieron placebo mostraron el modelo esperado de deterioro en las regiones frontales y temporo-parietales del cerebro, los sujetos que recibieron rember™ a 30 mg o 60 mg no mostraron evidencias de deterioro en ninguna región del cerebro. Cuando el subgrupo que tenía CDR moderado al principio se examinó por separado también hubo evidencia de un descenso prominente en los 6 meses en los sujetos tratados con placebo, que representaba una pérdida del 8 % de funcionamiento del volumen neuronal. El efecto del tratamiento observado en la población completa también se observó en el subgrupo con CDR leve, lo que demuestra la eficacia de rember™ en CDR EA leve. El hecho de que hay evidencia objetiva del deterioro funcional progresivo en el subgrupo leve sin la correspondiente evidencia de descenso en ninguna de las escalas psicrométricas durante 6 meses confirma la potente influencia de la reserva cognitiva en la EA leve, que aporta confusión. En su conjunto, a pesar de este efecto, los déficits funcionales iniciales mostrados en el barrido SPECT se correlacionan fuertemente con la puntuación ADAS-cog inicial, y la ventaja del tratamiento con rember™ mostrado en la escala ADAS-cog estaba igualmente correlacionada con el beneficio funcional demostrado mediante el barrido SPECT. La acción de rember™ observada mediante el barrido funcional del cerebro sugiere la capacidad de rember™ para revertir la patología del agregación tau, que se sabe que se produce en las mismas regiones del cerebro que las que muestran defectos funcionales en el barrido cerebral, es responsable de su capacidad para evitar el descenso en la función cerebral cortical en las mismas regiones. Dada la mayor sensibilidad de SPECT en la detección tanto del descenso como de los efectos del tratamiento, y su capacidad para predecir la respuesta al tratamiento (véase el análisis de 50 semanas a continuación), se concluyó que se podría utilizar SPECT como medida derivada o marcador proxy en futuros ensayos clínicos destinados a demostrar la modificación de la enfermedad.

30 **Análisis de 50 semanas**

El estudio de 50 semanas amplió y confirmó los hallazgos del estudio de 24 semanas, y demostró beneficios significativos en sujetos que padecen CDR tanto leve como moderada en las poblaciones globales ITT/OC e ITT/LOCF (Figura 4; Tablas 2 y 3). Los sujetos originalmente aleatorizados para recibir placebo se cambiaron a la dosis baja (100 mg) dvd tras 24 semanas. Esto se denomina como el grupo de tratamiento "placebo-bajo". Debido a la eficacia mínima de la dosis baja (100 mg) en cualquiera de las escalas psicrométricas durante las primeras 24 semanas de tratamiento, el grupo de tratamiento placebo-bajo sirvió convenientemente como grupo de comparación de la dosis menos expuesta para el estudio de 50 semanas.

El descenso promedio observado para el estudio de 50 semanas en los sujetos tratados con placebo fue 7,8 unidades ADAS-cog (Figura 4). En los sujetos tratados con rember™ a una dosis de 60 mg tvd, el descenso observado durante 50 semanas no fue significativamente diferente de cero tanto en la escala ADAS-cog como en la escala MMSE para los sujetos. En la escala ADAS-cog, aproximadamente el 60 % de los sujetos mejoraron o siguieron igual a las 50 semanas. En la escala MMSE, el 62 % mejoraron o siguieron igual a las 50 semanas. El riesgo de un paciente sin descenso en cualquiera de las escalas fue aproximadamente 3,4 veces mejor a la dosis de 60 mg que en placebo- *bajo*. Los correspondientes tamaños del efecto fueron -6,8 unidades ADAS-cog y 3,2 unidades MMSE durante el ensayo clínico de 50 semanas. Además del efecto sobre la evolución de la enfermedad, hubo una mejora sintomática inicial a las 15 semanas de 1,6 unidades ADAS-cog y de 0,8 unidades MMSE a la dosis de 60 mg, comparable a la observada con inhibidores AChE.

Tabla 2. Tamaños del efecto inferidos del análisis de efectos mixtos a las 50 semanas (en unidades ADAS-cog)

Dosis	Estimación	CI 95 %	valor p ⁽¹⁾
bajo (100 mg)	-4,04	-7,21, -0,87	0,0124
30 mg	-3,87	-6,90, -0,84	0,0126
60 mg	-6,78	-9,74, -3,82	<0,0001

1. El valor p es de un ensayo sobre si el valor es significativamente diferente del placebo.

Tabla 3. Tamaños del efecto inferidos del análisis por mínimos cuadrados a las 50 semanas (en unidades ADAS-cog)

Dosis	Estimación	CI 95 %	valor p ⁽¹⁾
bajo (100 mg)	-3,59	-5,81, -1,37	0,0015
30 mg	-4,37	-6,83, -1,92	0,0005
60 mg	-6,50	-8,89, -4,14	<0,0001

1. El valor p es de un ensayo sobre si el valor es significativamente diferente del placebo.

No hubo deterioro en las escalas no cognitivas en los sujetos con CDR leve en el grupo del placebo durante 50 semanas. Los resultados no cognitivos a las 50 semanas en los sujetos con CDR moderada confirmó los hallazgos de los análisis a las 24 semanas. El NPI (inventario neuropsiquiátrico) demostró beneficios para el tratamiento con rember™ durante 50 semanas. Aunque los sujetos en el brazo del placebo tuvieron un descenso de 9,6 unidades en la escala de perturbación del paciente y de 4,9 unidades en la escala de estrés del cuidador, no se observó este descenso en sujetos tratados continuamente con rember™ durante 50 semanas, con los correspondientes tamaños del efecto mejores de -9,2 unidades y -4,6 unidades.

El grupo de placebo-bajo comparado con el grupo bajo (100 mg) proporcionó una aproximación cercana a un diseño de inicio retardado para confirmar que rember™ es un modificador de la enfermedad en un sentido normativo formal. Los sujetos que comenzaron más tarde el tratamiento con una dosis mínima de eficacia terapéutica aparente según ADAS-cog durante el periodo inicial de 24 semanas permanecieron significativamente diferentes a las 50 semanas con respecto a los sujetos que habían estado recibiendo la dosis baja (100 mg) continuamente. Además, los sujetos tratados de forma continuada con la dosis baja (100 mg) mostraron retardo en la tasa de evolución de la enfermedad. Aunque hubo cierta diferencia en el régimen de dosificación con cápsulas entre los dos grupos (tvd vs. dvd), los efectos secundarios hematológicos, que mostraron un evidente perfil dosis-respuesta, no fueron distinguibles con respecto a los dos regímenes de dosificación, respaldando la equivalencia aproximadamente de la exposición biológica, y por tanto respaldando la inferencia de que rember™ es un modificador de la enfermedad. Esto también está confirmado por la capacidad de rember™ para detener la evolución de la enfermedad durante 50 semanas a la dosis de 60 mg, y reducir la tasa de evolución de la enfermedad a las dosis de 30 mg y baja (100 mg) a las 50 semanas.

Resumen de la seguridad clínica de rember™

El perfil global de eventos adversos fue sustancialmente mejor en el ensayo clínico rember™ que para los inhibidores de AChE (acetilcolina esterasa) a las dosis de tratamiento óptimas notificadas en la revisión de Cochrane (Birks, 2006). No hubo diferencias significativas en el riesgo de los sujetos tratados con rember™ a 30 mg o 60 mg tvd que se retiraron, que experimentaron cualquier evento adverso o se retiraron debido a un evento adverso, en comparación con los inhibidores de AChE. La diarrea fue el evento adverso más frecuente notificado por los sujetos tratados con rember™, especialmente con la dosis baja (100 mg), muy probablemente debido al tránsito del rember™ no absorbido en el intestino distal, ocasionando la repoblación de la flora intestinal debido a la leve actividad antibiótica de MTC que está bien documentada en la bibliografía (Kristiansen y Amaral, 1997; Gunics *et al.*, 2000). Aunque los sujetos que reciben rember™ tienen mayor riesgo de desarrollar diarrea de lo notificado por los inhibidores de AChE, los sujetos tratados con rember™ notificaron significativamente menos náuseas, vómito, anorexia y dolor abdominal, cefalea, fatiga y agitación. La experiencia de algunos de los centros del ensayo clínico indicó que la diarrea se puede controlar con preparaciones probióticas adecuadas (por ejemplo, una preparación seca de lactobacillus).

No se observaron cambios de significancia clínica en ninguno de los parámetros químicos clínicos rutinarios. Se observaron pequeñas reducciones en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, metahemoglobina y recuento de glóbulos blancos en sujetos tratados con rember™, y estos cambios estaban relacionados con la dosis. Los cambios fueron poco importantes para la dosis de 30 mg tvd, pero se convirtieron en estadísticamente significativos para las dosis de 60 mg y *baja* (100 mg) tvd. En el caso de los parámetros de los glóbulos rojos, aparecieron durante 24 semanas, pero se resolvieron durante 50 semanas, excepto por la evidencia de que la dosis 60 mg tvd aumentó los niveles de metahemoglobina a las 24 semanas para estabilizarse posteriormente. A esta dosis, el nivel promedio de metahemoglobina aumentó desde el valor promedio normal de 0,4 % al 0,8 % de hemoglobina, pero aún por debajo del límite superior normal (1 %). En el caso de los glóbulos blancos, de nuevo los cambios fueron poco importantes para la dosis de 30 mg tvd, pero para la dosis de 60 mg los valores disminuyeron y después se estabilizaron en niveles no significativamente diferentes de la dosis de 30 mg durante 50 semanas. Se concluye que la oxidación de la hemoglobina mediante una forma oxidada del resto metilitioninio es el mecanismo más probable responsable de los cambios en los parámetros de los glóbulos rojos.

Durante el periodo del estudio, ninguno de estos cambios fue clínicamente significativo, y todos siguieron estando comprendidos en el intervalo normal. Por tanto, se concluyó que los cambios no producen preocupación suficiente en términos de relación de riesgo/beneficio que afecte el futuro desarrollo clínico de las dosis de 30 mg y 60 mg. La presente formulación de la dosis *baja* (100 mg) no es adecuada para desarrollo clínico adicional debido a un peor perfil de eficacia/efectos secundarios descrito a continuación.

Ejemplo 2 - Formulación y concentración del producto farmacéutico en investigación (IMP)

La formulación de rember™ usada en TRx-014-001 consistió en cápsulas de gelatina azul/azul Tamaño 1 que contenían un relleno semisólido compuesto de MTC, Gelucire 44/14 y Aerosil 200. Se fabricaron tres concentraciones por cápsula, que solo se diferenciaban en el peso de relleno, con concentraciones objetivo de 30, 60 y 100 mg de MTC, respectivamente. Se proporcionó un placebo correspondiente que contenía solamente Gelucire 44/14. Las cápsulas de gelatina dura y la gelatina utilizada para la protección de las cápsulas cumplen las directrices actuales respecto a las encefalopatías espongiiformes transmisibles.

La uniformidad de las cápsulas se analizó mediante el ensayo de uniformidad de aspecto y peso de llenado (modificado a partir de USP 27), pureza cromatográfica (TLC según lo especificado en USP 27) y disolución usando el método de paleta rotatoria de la farmacopea europea y la farmacopea estadounidense. Se produjeron seis lotes de fabricación, que se sometieron a ensayo para determinar la uniformidad y la estabilidad.

5 En estos estudios de disolución se descubrió que la disolución de la cápsula de 100 mg en todas las condiciones *in vitro* era más lenta que la de la cápsula de 30 mg y que esta diferencia aumentaba con el tiempo transcurrido desde la fabricación (Figura 5). La cápsula de 60 mg tuvo un perfil de disolución intermedio con respecto a los datos de 30 mg y 100 mg mostrados en la Figura 5. Otros estudios han mostrado que la reticulación acelerada de las
10 cápsulas de gelatina en presencia de MTC con elevado peso de llenado (es decir, especialmente cápsulas de 100 mg) disminuyó la probabilidad de rotura de la cápsula inicial, aunque la disolución posterior desde la cápsula rota fue rápida. Se ha descubierto que el MTC liberado desde la cápsula retenía el nivel de bioactividad esperado en el ensayo de agregación *in vitro* Tau (WO96/030766).

15 Este retraso en la disolución de la cápsula de 100 mg es probable que desplace el sitio de absorción primario desde el estómago al intestino delgado, llevando tanto a una absorción reducida (produciendo diarrea) y la absorción de la mayoría de la dosis bioactiva como una especie dimérica terapéuticamente inactiva. La dosis-respuesta implicada descrita más detalladamente a continuación indica que, en la presente formulación, la dosis disponible equivalente cognitivamente activa disponible desde la cápsula de 100 mg era ~25 mg, cuando se comparó con las actividades
20 cognitivas de las dosis de 30 mg y 60 mg.

La presente formulación limita la extensión en la que se pueden explorar clínicamente dosis elevadas de rember™ en futuros ensayos clínicos. Como se describe más detalladamente a continuación, no existe base teórica para una meseta de eficacia a la dosis de 60 mg. Se concluyó que la meseta aparente a 60 mg tvd refleja una combinación de limitaciones de la solubilidad, disolución y absorción del rember™ a dosis elevadas.
25

Ejemplo 3 - Modelo matemático de la eficacia

30 Se ha desarrollado un modelo cinético matemático para intentar comprender mejor el proceso de agregación de Tau y su relación cuantitativa con el deterioro cognitivo. La estructura del modelo se ilustra más adelante en la Figura 6, y muestra las constantes de velocidad relevantes.

Se usó una amplia gama de entrada de datos experimentales para derivar estimaciones de las constantes de velocidad clave en el modelo anterior. Estos incluyeron *inter alia*: estudios clínico-patológicos cuantitativos que vinculan la agregación de Tau y la puntuación MMSE en el hombre, la estimación de la velocidad de evolución de las etapas de Braak con el tiempo (Braak y Braak, 1991), relaciones dosis de fármaco-respuesta en modelos celulares y ensayo de unión a Tau *in vitro*, relaciones dosis de fármaco-respuesta en la reducción de la patología Tau en animales transgénicos, y un modelo farmacocinético que vincula la dosis con los niveles estimados disponibles de rember™ en el cerebro de animales y en el hombre, descritos con más detalle a continuación.
35

40 Los datos del ensayo clínico se utilizaron para validar este modelo de eficacia que, a su vez, explica las relaciones entre agregación de Tau, demencia clínica y perfil de eficacia de rember™. Específicamente, no se necesitan formalmente asunciones adicionales que implican la acumulación de proteína β -amiloide u otros factores neurotransmisores desconocidos. Es sorprendente, dada la complejidad de la patofisiología de la EA generalmente asumida en el campo, que un conjunto extremadamente pequeño de hipótesis y constantes de la velocidad puedan proporcionar la base completa de un conjunto de relaciones que se pueden definir formalmente y que vinculan la velocidad de la evolución de la demencia clínica, la dinámica de la cascada de agregación de Tau ilustrada anteriormente y la eficacia de la intervención terapéutica con un inhibidor de Tau.
45

50 Existen importantes inferencias a extraer del modelo para explicar el mecanismo de acción de rember™. Aunque aparece *priori*, y generalmente se asume en el campo, que la inhibición de la velocidad de agregación de Tau mediante la reducción de la velocidad de k_3 (es decir, la inhibición del lado *de entrada*) sería importante para explicar la eficacia, esto no resulta del modelo matemático. El modelo se puede usar para mostrar que el impacto de un fármaco teórico que actúa solamente en el lado de entrada de la cascada de agregación (por ejemplo, estrategias para reducción la alimentación de productos corriente arriba en el estadio de tau agregada) proporcionaría solamente una reducción transitoria escalonada e la agregación de Tau que se compensaría con el tiempo debido a una continuidad en la agregación. En otras palabras, el impacto teórico de dicho fármaco sería solamente sintomático, y no alteraría la velocidad de avance de la enfermedad, *incluso aunque el mecanismo para ser un modificador potencial de la enfermedad porque se dirige a la patología primaria*. El modelo muestra que seguiría existiendo acumulación progresiva de agregados de Tau con el tiempo, y a la misma velocidad que sin el fármaco. Esto se debe principalmente a que la ruta de eliminación de los agregados de Tau permanece inactiva en los sujetos con EA y se deteriora con el tiempo a una velocidad que se puede medir por la velocidad de la evolución de la etapa de Braak con el tiempo. En el caso de posibles estrategias contra Tau, esto se aplica especialmente a enfoques que estarían basados en la inhibición de la fosforilación de Tau, incluso si se supone que la fosforilación de tau es fundamental para la velocidad de agregación de Tau, lo que discuten los inventores (por ejemplo, Wischik et al., 1997). Esto se aplica además a los argumentos basados en la velocidad a la que la proteína β -amiloide debería, de
60
65

forma aún desconocida, desencadenar la agregación de Tau, como afirman las versiones actuales de la teoría A β de la patogénesis de EA (por ejemplo, Selkoe, 2004).

5 La acción terapéutica más importante de rember™ se basa en su capacidad para potenciar la eliminación de los agregados de Tau mediante **disolución de los agregados** y la liberación de la Tau previamente agregada en forma de un monómero que se procesa por una ruta de eliminación mucho más eficaz, es decir, la ruta proteosómica. En términos del modelo, la acción clave de rember™ es potenciar o ampliar la constante de velocidad k4b en la Figura 6B. En efecto, esto amplía una nueva ruta de eliminación de los agregados de Tau anteriormente no disponible. Esta nueva ruta de eliminación, la ruta de eliminación proteosómico, se representa gráficamente por la constante de velocidad kb4 en la Figura 6B.

15 El potente efecto de la eliminación mejorado en el modelo cinético se debe al efecto autocatalítico de los agregados, ya que la velocidad de agregación es directamente proporcional a la concentración de agregados. Este es el mecanismo primario responsable del cambio previsto a largo plazo en la velocidad de evolución de la enfermedad, que se descubrió en el ensayo clínico TRx- 014-001. El modelo suscita la posibilidad de que rember™, si se proporciona mucho antes de la evolución de la enfermedad (es decir, en o incluso antes de la MCI clínica), también podría modificar el deterioro estructural en la ruta de eliminación neuronal y proporcionan un fundamento adicional para utilizar rember™ como tratamiento preventivo primario.

20 Un rasgo adicional del modelo cinético es que predeciría un efecto sintomático temprano debido a la disolución inicial de la carga de agregados de Tau existente. El modelo predice que este impulso inicial de la eliminación de los agregados existente contribuye a una mejora sintomática temprana. Esto también se descubrió en el ensayo clínico en Fase 2 con rember™.

25 La última acción modificadora de la enfermedad de rember™ depende de la extensión de la velocidad constante de producción de oligómeros de Tau, y la degradación continua de la ruta de eliminación ELM/proteosómica con el tiempo (que es el determinante final de la velocidad de progresión inherente a través de las etapas de Braak con el tiempo), puede neutralizarse con una eliminación mejorado debido a la solvatación/solubilización de los oligómeros de Tau. Puesto que estos factores son directamente proporcionales a la concentración de agregados, pequeños cambios en el perfil farmacocinético del fármaco pueden tener un importante impacto sobre la velocidad de evolución de la enfermedad. Estos rasgos del modelo se descubrieron, de nuevo, en el ensayo clínico en Fase 2, y resaltan la necesidad de maximizar la biodisponibilidad de las especies terapéuticamente activas que se absorben. En particular, no existe ningún mecanismo inherente en el modelo, en su forma actual, que tenga prevista una meseta dosis-respuesta.

35

Ejemplo 4 - Relación entre la actividad cognitiva y la actividad hematológica

40 Se produjeron defectos en la formulación de la cápsula de 100 mg, resumidos anteriormente, que condujeron a un mayor retraso en la disolución con el tiempo desde la fabricación. Otros estudios *in vitro* han mostrado que esto probablemente se debe a la reticulación acelerada de las cápsulas de gelatina en presencia de MTC con elevado peso de llenado (es decir, cápsulas de 100 mg).

45 Los estudio *in vitro* publicados sugieren que la absorción de MTC es un proceso complejo que depende, en parte, de una actividad de una tiazina-colorante reductasa de la superficie celular (Merker *et al.*, 1998; Merker *et al.*, 2002; May *et al.*, 2004). Se ha desarrollado un modelo farmacocinético ("PK") (descrito más detalladamente a continuación) basado en estudios publicados en seres humanos (DiSanto y Wagner, 1972a,b,c; Peter *et al.*, 2000) que sugiere que la semivida de desaparición del MTC en el compartimento de absorción primario es de 30 minutos, consistente con que el estómago sea el principal sitio de absorción para un MTC ingerido por vía oral.

50 MTC se encuentra fuertemente ionizado cuando está en su forma oxidada a pH 7 en un entorno no reductor. De este modo, tiene baja solubilidad en lípidos. Sin embargo, la reducción a la forma reducida ("L-MT") por la adición de dos electrones conduce a especies no cargadas que se absorben rápidamente. Los estudios *in vitro* sugieren que esta etapa de reducción solamente puede tener lugar fisiológicamente a pH bajo. Esto explicaría correctamente porqué es el estómago el sitio de absorción primaria más probable. Los estudios en roedores, cerdos y primates, indican que la forma predominante del resto metiltioninio descubierto en los tejidos es la forma L-MT incolora, y que tras la administración oral, solamente una pequeña parte contribuye a la forma oxidada, que se puede medir fácilmente en sangre. Es por tanto probable que solamente la forma L-MT pueda atravesar la barrera hematoencefálica, donde se establece un nuevo estado estacionario entre las formas reducidas y oxidadas dentro de las neuronas. Tras la administración intravenosa, se pueden detectar niveles de la forma oxidada en sangre sustancialmente más elevados que tras la administración oral de la misma dosis (Peter *et al.*, 2000). Otros estudios PK en cerdos han demostrado que esto se debe a una diferencia en el nivel de la forma L-MT circulante tras la administración oral, y no, como sugieren Peter *et al.*, debido a una mala biodisponibilidad de la vía oral. Esto sugiere que MTC experimenta reducción durante la absorción oral y la posterior distribución en el tejido.

65 En las circunstancias en las que se retrasa la disolución, como en el caso de la cápsula de 100 mg utilizada en el ensayo clínico con rember™, es probable que solo se haya producido la absorción limitada de la dosis nominal

mediante el mecanismo de la reductasa descrito. Esto llevaría a una absorción retardada desde el intestino delgado a un pH mayor. Sobre la base de los estudios *in vitro*, se deduce que estas circunstancias favorecerían la formación de un dímero de monómeros MTC oxidados que está bien descrita en la bibliografía (Rabinowitch y Epstein, 1941; Lewis *et al.*, 1943; Spencer y Sutter, 1979). Debido al apilado antiparalelo, el dímero no tiene carga neta. Por tanto, se esperaría que una disolución retardada condujera a una absorción retardada de MTC en estado oxidado al pH más elevado del intestino delgado. De los estudios *in vitro*, no se esperaría que el dímero tuviera actividad terapéutica, sino que tendría efectos hematológicos debido a su capacidad de oxidar la hemoglobina.

Esta hipótesis de disolución retardada es coherente con los datos derivados del ensayo clínico con rember™. Esencialmente, el ensayo clínico mostró que el MTC tiene dos acciones farmacológicas sistémicas: efectos cognitivos y efectos hematológicos. Los efectos cognitivos no muestran una relación dosis-respuesta monotónica, mientras que los efectos hematológicos sí lo hacen (Figura 8). Esto sugiere que dos especies diferentes son las responsables de ambos tipos de actividad farmacológica: MTC absorbido como la forma L-MT no cargada que es la responsable de la actividad cognitiva beneficiosa, y MTC absorbido como especie dimérica oxidada que es la responsable de la oxidación de la hemoglobina. Si esto fuera así, se esperaría poder derivar una relación que vinculara el tiempo de disolución con las dos actividades farmacológicas diferentes para diferentes concentraciones de cápsula. Se ha descubierto indudablemente que este es el caso, como se muestra en la Figura 8.

Se descubrió una correlación muy fuerte ($r = 0,996$) entre la disolución normalizada expresada como porcentaje disuelto antes o después de 30 minutos, y los índices relativos normalizados de actividad cognitiva o actividad hematológica. Para la disolución relativa, se calculó el porcentaje de la disolución total que se produce *in vitro* antes o después de 30 minutos. El correspondiente reparto de la actividad farmacológica total se derivó como se muestra en la Figura 7.

Se debe recordar que la actividad cognitiva relativa para cada dosis nominal se expresa como proporción de la actividad farmacológica total (es decir, cognitiva y hematológica) para cada dosis nominal. Por tanto, aunque la dosis de 30 mg tiene un efecto cognitivo absoluto menor que la dosis de 60 mg, tiene un índice relativo de actividad cognitiva mayor con respecto a la actividad farmacológica total, ya que tiene menos actividad hematológica que la dosis de 60 mg.

Por el contrario, la falta de una relación dosis-respuesta monótona observada en el análisis de la puntuación ADAS-cog a las 50 semanas implica que la dosis terapéutica eficaz disponible de la cápsula de 100 mg era como se indica en la Figura 8, es decir, aproximadamente 25 mg, o un cuarto de la dosis nominal, similar a la dosis de 30 mg en su actividad a las 50 semanas. Este es el motivo por el que, en el análisis presentado anteriormente, la dosis de 100 mg se indicaba como "baja (100 mg)" para denotar que la formulación de estas cápsulas no permitió proporcionar el suministro y absorción de la dosis nominal esperada en esta forma terapéuticamente activa. Parecería que un determinante principal de la actividad terapéutica del cerebro es dependiente de la absorción en la forma L-MT, que puede estar mediada por la capacidad de esta forma para atravesar la barrera hematoencefálica.

Este análisis sugiere que es posible disociar los efectos cognitivos beneficiosos del resto metil-tioninio del MTC de sus indeseables efectos hematológicos si se optimiza la formulación. Tal como se ha descrito en la solicitud de patente no publicada anteriormente presentada (PCT/GB2007/001103, cuyo contenido se ha incorporado por referencia en el presente documento de manera específica), una forma novedosa de sal reducida estabilizada (designada como "L-MTx") tendría la ventaja de rodear la actividad reductasa que es necesaria para la absorción del resto metiltioninio del MTC. Se ha descubierto que el L-MTx estable tiene mayor solubilidad que el MTC, y tras su disolución permanece sustancialmente en su estado reducido incoloro durante más de 1 h, lo que permite la absorción directa como especie de metiltioninio reducida. Una ventaja adicional del L-MTx estabilizado puede ser que se puede conseguir una eficacia incluso superior porque se pueden absorber dosis más elevadas de la forma terapéuticamente activa sin limitación derivada de la capacidad de la tiazina colorante reductasa gástrica por una parte, y los efectos secundarios hematológicos y la diarrea por la otra. Eso se analiza detalladamente más adelante.

Como se predice en el presente análisis, se ha descubierto que la forma de sal L-MT tiene una toxicidad hematológica significativamente inferior que el MTC. La Figura 9 muestra las diferencias entre MTC y L-MTx para una gama de dosis orales en términos de parámetros clave de glóbulos rojos en ratas que recibieron una dosis diaria durante 14 días. Como se puede observar, los animales que recibieron dosis de L-MTx tienen recuentos de glóbulos rojos ("RBC") mayores, mayores niveles de hemoglobina ("HB") y mayor concentración de hemoglobina en glóbulos rojos ("MCHC"). El volumen corpuscular medio ("MCV") fue menor, lo que indica que se liberan más glóbulos rojos maduros desde la médula ósea, y que la reticulosis ("RETI") inducida por los efectos hemolíticos del MTC era reducida.

Tabla 4. Análisis estadístico de las diferencias en los parámetros clave en glóbulos rojos en ratas entre las dosis de MTC y L-MTx.

Dosis (mg/kg)	Diferencia con respecto a MTC Hemoglobina (g/dl)	valor p
0 ⁽¹⁾	-0,39	0,427
15 ⁽²⁾	0,80	0,106

45 ⁽²⁾ ,	1,43	0,00465
150 ⁽²⁾ ,	3,03	<0,0001
Concentración promedio de hemoglobina celular (g/dl)		
0 ⁽¹⁾	0,26	0,780
15 ⁽²⁾	0,80	0,392
45 ⁽²⁾ ,	1,93	0,0414
150 ⁽²⁾	6,05	<0,0001
Volumen celular medio (fl)		
0 ⁽¹⁾ :	0,08	0,961
15 ⁽²⁾	-1,18	0,475
45 ⁽²⁾ ,	-7,07	<0,0001
150 ⁽²⁾	-9,14	<0,0001
Recuento de glóbulos rojos (10⁶/ml)		
0 ⁽¹⁾ :	-0,27	0,171
15 ⁽²⁾	0,41	0,041
45 ⁽²⁾ ,	1,17	<0,0001
150 ⁽²⁾	1,06	<0,0001
Reticulocitos (% de glóbulos rojos)		
0 ⁽¹⁾	-0,08	0,973
15 ⁽²⁾	-0,54	0,816
45 ⁽²⁾	-6,53	0,0063
150 ⁽²⁾	-7,59	0,0022
Reticulocitos (% de glóbulos rojos)		
1. El valor p es de un ensayo sobre si el valor de una sola dosis de vehículo es significativamente diferente de cero.		
2. El valor p es de un ensayo sobre si el valor es significativamente diferente de una sola dosis de vehículo.		

Ejemplo 5 - Estudios disponibles

- 5 Como puede observarse de la discusión anterior, la optimización de una dosis terapéutica adecuada de MTC y su formulación es un punto complejo. Una barrera importante para ello es la falta de un modelo farmacocinético adecuado. Aunque se han realizado intentos de generar un modelo PK, son contradictorios y no tienen en cuenta todos los datos disponibles. Por tanto, se necesitó un enfoque completamente nuevo para desarrollar un modelo PK. Antes de presentarlo, se resumen los datos y modelos disponibles.
- 10 Se han publicado tres estudios de MTC en seres humanos. Estos se resumen en primer lugar, y después discuten conjuntamente. Existe otro estudio adicional publicado en seres humanos (Rengelshausen et al., (2004) Pharmacokinetic interaction of chloroquin and metilene blue combination against malaria. Eur. J. Clin. Pharmacol. 60: 709-715) que no se utiliza en el presente documento, ya que su metodología y sus hallazgos son similares a los de Peter et al. (2000) descrito a continuación.
- 15 **1) Estudio de la técnica anterior 1**
- El primer estudio sistemático de referencia se llevó a cabo por DiSanto y Wagner (1972) y se notifica en una serie de tres artículos, dos de los cuales se resumen a continuación.
- 20 1a) DiSanto AR y Wagner JG (1972a) Pharmacokinetics of highly ionized drugs I: whole blood, urine and tissue assays. J Pharmaceut Sc 61: 598-6 01
- El artículo informa de un método de análisis de MTC en sangre completa, orina y tejidos. Esencialmente, el método consiste en preparar la matriz acuosa con una elevada concentración de sales (> 2 M), extraer el MTC en dicloroetano, y medir la absorbancia del extracto total en dicloroetano a 660 nm. Se encontró en la orina una forma leuco estabilizada del MTC ("leuco-MTC"), pero no se identificó químicamente. Esta se podría haber analizado convirtiéndola en primer lugar en "MTC libre" por adición de HCl 5 N y calentando en un baño de agua en ebullición durante 2 min antes de su extracción en dicloroetano. La diferencia entre el MTC recuperado de la orina después del tratamiento ácido y el MTC recuperado sin tratamiento ácido ("MTC libre") se notifica como "leuco-MTC".
- 30 1b) DiSanto AR y Wagner JG (1972b) Pharmacokinetics of highly ionized drugs II: absorption, metabolism and excretion in man and dog after oral administration. J Pharmaceut Sc 61: 1086-10 90.
- 35 En este estudio, 7 varones voluntarios adultos con edades comprendidas entre 21 y 40 años y que pesaban entre 54,5 y 95,3 kg tomaron 10 mg de MTC USP. Se recogió orina en los intervalos tabulados a continuación. Las tasas de excreción urinaria promedio del MT oxidado ("Ox-MT", también denominado "MT libre") y leuco-MT ("L-MT") con sus correspondientes errores estándar se muestran en la Tabla 5, y en las Figuras 10 y 11.

Tabla 5. Tasas de excreción y error estándar ("se") para el MTC oxidado ("Ox-MT") y MTC reducido ("L-MT") según DiSanto y Wagner (1972).

Tiempo (h)	Tiempo inter (h)	Ox-MT (µg/h)	se-Ox	L-MT (mg/h)	se-L
0,5	0,25	2,31	1,06	14,01	6,98
1	0,75	20,59	5,05	385,06	97,98
2	1,5	38,66	7,50	659,14	104,79
3	2,5	50,56	14,50	474,29	96,93
4	3,5	40,66	8,76	384,43	49,37
6	5	53,01	12,37	290,50	49,26
9	7,5	42,86	17,55	120,29	29,91
24	16,5	37,99	6,43	78,72	13,77
33	28,5	24,34	7,53	41,87	9,91
48	40,5	11,02	2,43	26,77	5,18
57	52,5	5,00	1,16	14,11	5,49
72	64,5	4,98	1,31	7,88	2,29
81	76,5	2,53	0,69	6,39	2,05
96	88,5	1,74	0,48	3,09	1,53
105	100,5	1,23	0,43	3,02	1,60
120	112,5	0,88	0,28	1,91	0,83

Tabla 6. Datos de excreción urinaria para Ox-MTC y L-MT

Parámetro	Libre	Leuco
Kel	0,2263	0,2430
K12	0,7506	0,2962
K21	0,2381	0,1040
Ka	0,1626	0,9654
Tlag (h)	0,2078	0,2381
VcF (l)	29,7918	8,2607
Correlación (prom., obs vs pred)	0,9878	0,9920
Parámetros secundarios no compartimentales		
F	0,1483	0,4982
Vc (l)	4,4188	4,1152
Cl (l/h)	6,7420	2,0074
ABC (µg/h)	1483,24	4981,55
Excreción urinaria (% del total)	22,94 %	77,06 %
MRT (h)	24,5000	16,8774
T½ (distribución, h)	0,5930	1,1530
T½ (eliminación, h)	15,0364	16,4953

En la tabla se utilizan las siguientes abreviaturas normalizadas: Kel (velocidad de eliminación terminal constante), K12 (velocidad constante de transferencia desde el posible compartimento 1 al compartimento 2), K21 (velocidad constante de transferencia desde el posible compartimento 2 al compartimento 1), Ka (constante de velocidad de absorción), Tlag (tiempo de retraso en la absorción antes de que el fármaco aparezca en el compartimento central (es decir, la sangre)). VcF (Vc x F), F (biodisponibilidad calculada), Vc (volumen de distribución teórico del fármaco en el compartimento central), AUC (área bajo la curva, una medida del fármaco total en sangre), MRT (tiempo medio de residencia, tiempo hasta que se elimina un 63,2 % de la dosis administrada), T½ (semivida).

5

De los datos de excreción urinaria, Ox-MT y L-MT difieren con respecto a la fase de distribución y biodisponibilidad aparente. Sin embargo, la semivida de eliminación terminal (-16 h) y el volumen central aparente corregido (4 l) son

comparables (Tabla 6). La recuperación urinaria total es de 6,465 mg (es decir, un 65 % de la dosis), de la que un 23 % se excreta como Ox-MT y un 77 % se excreta como L-MT.

2) Estudio de la técnica anterior 2

Este se describe en Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterberg BH (2000) Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral metilene blue. Eur J Clin Pharmacol 56: 247-250.

En este estudio, 7 voluntarios humanos (4 varones, 3 mujeres) con edades 19 - 53 recibieron MTC 100 mg (313 μ M) en 3 con al menos 1 semana de separación, bien como una única inyección i.v (20 mg/ml en NaCl al 0,9 % durante 30 s) o dos cápsulas de gelatina de 50 mg, o dos cápsulas de gelatina de 50 mg junto con 800 mg de Mesna (mercaptoetanosulfonato de sodio). Se incluyó el efecto farmacocinético de la administración simultánea de Mesna debido al uso clínico del MTC en pautas quimioterapéuticas contra el cáncer basadas en ifosfamida en las que se administra Mesna simultáneamente para evitar la urotoxicidad.

La metodología analítica de la sangre difiere de la utilizada por DiSanto y Wagner en los siguientes aspectos:

- Inclusión de un patrón interno
- Uso de hexanosulfonato de sodio como par iónico para potenciar la extracción en dicloroetano
- Separación cromatográfica con una columna Nucleosil 100-5 CN con fase móvil isocrática, con monitorización del flujo de salida a 660 nm.

Peter et al. también midieron la excreción urinaria de Ox-MT y L-MTC en 24 h, pero solamente notificaron promedios de excreción total en intervalos que finalizaban a las 2, 4, 6, 10, 14, 24 h después de la dosis. Se dice que el modelo analítico en orina era esencialmente idéntico al de DiSanto y Wagner.

Los autores no tabularon los resultados, pero los mostraron gráficamente como se reproduce en las Figuras 14 y 15.

Se han leído los datos de dichos gráficos, y se tabulan a continuación.

Tabla 7. Concentración de Ox-MT en sangre completa tras administración IV de 100 mg de MTC.

Tiempo (h)	Ox-MT en sangre (μ mol/l)
0,09	6,06
0,15	3,32
0,24	1,73
0,33	1,65
0,5	0,78
0,65	0,61
0,83	0,39
1,01	0,41
1,99	0,26
4	0,18.

Tabla 8. Concentración de Ox-MT en sangre completa tras administración oral de 100 mg de MTC (promedio con y sin Mesna).

Tiempo (h)	Ox-MT en sangre (μ mol/l)
0	0
0,09	0,00064
0,15	0,0011
0,24	0,0064
0,33	0,017
0,5	0,041
0,83	0,055
1,01	0,064
1,99	0,069
4	0,038

Peter et al notificaron los siguientes parámetros farmacocinéticos (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos notificados por Peter et al. (2000) para MTC administrado por las vías intravenosa y oral.

Parámetro	IV	Oral
ABC (µmol/min/ml)	0,134	0,011
Cl (l/h) ¹	3	
% de dosis excretada en orina a las 24 h	28,6	18,6
<i>Eliminación estimada T_{1/2}:</i>		
sangre (1 - 4 h, h)	5,25	
orina (4 - 24 h, h)		6,6
<i>1. Cl: eliminación, el volumen de sangre aclarada de fármaco en unidades de tiempo.</i>		

5 Peter et al. destacaron además que la fracción de MT excretada en la orina en la forma L-MB era aproximadamente 1/3 del total, y esto no difirió entre la dosificación oral e IV.

3) Estudio de la técnica anterior 3

10 Este se describe en Moody JP, Allan SM, Smith AHW, Naylor GJ (1989) Metilene blue excretion in depression. Biol Psychiat 26: 847-858.

15 Se trata de un estudio limitado de excreción urinaria en 24 h durante un periodo de ensayo de 3 semanas en sujetos con depresión que toman 15 mg/día (5 mg t.v.d.) o 300 mg/día (100 mg t.v.d.). La recogida de orina en veinticuatro horas se obtuvieron de 7 sujetos al final de 7, 14 o 21 días de tratamiento. Se dice que el método analítico en orina como el de DiSanto y Wagner. Los resultados se resumen en la Tabla 10 siguiente.

Tabla 10. Resumen de datos de excreción urinaria de MTC en seres humanos según el estudio de Moody et al. (1989).

Estudio de dosis repetida (15 mg/24 h)		Ox-MT (mg)	L-MT (mg)	
	Días			
	7	6,1	7,2	
	14	5,3	8	
	21	6,1	6,4	
excreción urinaria en 24 h (mg)		5,8	7,2	
% de excreción urinaria total		44,8%	55,3%	
F (biodisponibilidad aparente)		0,39	0,48	
Estudio de dosis repetida (300 mg/24 h)				
	Días			
	7	43,9	75,6	
	14	41,1	71,6	
	21	45,2	60,4	
excreción urinaria en 24 h (mg)		43,4	69,2	
% de excreción urinaria total		38,6%	61,5%	
F (biodisponibilidad aparente)		0,14	0,23	
Estudio de dosis única		Ox-MT (mg)	L-MT (mg)	Total-MT (mg)
	Dosis (mg)			
	25	14,9	2,8	17,7
	50	28,1	2,7	30,8
	100	33,5	6	39,5
% de excreción urinaria total				
	25	84,2%	15,8%	
	50	91,2%	8,8%	
	100	84,8%	15,2%	
F (biodisponibilidad aparente)				
	25	0,60	0,11	0,71
	50	0,56	0,054	0,62
	100	0,34	0,060	0,40

20 Los datos de dosis única de este estudio se combinaron con los estudios de DiSanto y Wagner y Peter et al. para proporcionar una estimación de la biodisponibilidad oral aparente basándose en la excreción urinaria a 48 h de la MT total.

Discusión de los resultados clave

Existen varios aspectos en los que los modelos desarrollados sobre la base de los datos tabulados anteriormente son inconsistentes. El más importante es que la semivida de eliminación terminal deducida por Peter et al. (5,5 - 6,3 h) a partir del análisis de los datos de concentración en sangre son inconsistentes con la semivida de eliminación terminal deducida por DiSanto y Wagner (15 - 16,5 h) a partir de los datos de excreción urinaria. También es inconsistente con la decoloración prolongada de la orina observada tras la administración intraquirúrgica IV de MTC para localizar las glándulas paratiroides para cirugía (Kuriloff y Sanborn, 2004). El problema surge porque Peter et al. (2000) basaron sus estimaciones en los datos de la sangre obtenidos a las 4 h o a las 12 h en el caso de Rengelshausen et al. (2004) que siguieron el mismo enfoque farmacocinético. Este análisis no consigue tener en cuenta la fase de eliminación terminal, debido a las dificultades técnicas que aparecen en la estimación de los niveles de Ox-MT en sangre, incluso usando CL-EM (cromatografía de líquidos - espectrometría de masas) una vez que los niveles en sangre son inferiores a los límites de detección. La fase de eliminación terminal se puede analizar mejor usando los datos de excreción urinaria. Aunque es bien sabido que la tasa de excreción urinaria puede proporcionar una forma válida de estimar la constante de velocidad de eliminación en sistemas simples (por ejemplo, Gibaldi y Perrier (1982) *Pharmacokinetics*), el problema con los datos disponibles sobre MTC es complejo, y no existe una forma evidente de vincular los datos en sangre y los datos de excreción urinaria en un único modelo integrado coherente que pueda tener en cuenta ambos casos de dosificación oral e IV. Proporcionar una solución a este problema es fundamental para el desarrollo de un modelo predictivo adecuado que se pueda utilizar para estimar la dosificación de MTC u otras formas de MT para el tratamiento de la EA y en otros contextos terapéuticos. La solución a este problema se describe a continuación.

Ejemplo 6 - Desarrollo de un modelo farmacocinético integrado*i) Biodisponibilidad oral*

Los datos de Peter et al. proporcionan una indicación útil de los niveles sanguíneos después de la administración oral, comparados con la administración IV. La comparación de los valores de ABC en el periodo de tiempo de 4 horas indica que los niveles en sangre después de la administración oral son el 8,2 % de los observados tras la administración IV. Sin embargo, esta estimación no se puede utilizar para determinar la biodisponibilidad oral. Es inconsistente con los datos de recuperación de orina de 24 h de Peter et al., donde se descubrió que la recuperación de orina tras la dosificación oral era el 65 % de la obtenida tras la dosificación IV (véase Tabla 5). Esta cifra es comparable con los datos de excreción urinaria obtenidos en los estudios de DiSanto y Wagner y de Moody et al.

Los datos de estos estudios se combinaron en la Figura 16 para proporcionar una estimación global de la biodisponibilidad oral. Se sugiere una cifra entre 40 % - 80 % dependiendo de la dosis en el intervalo 10 - 100 mg. Es también evidente de la Figura 16 que existe una reducción de la biodisponibilidad dependiente de la dosis tal como se determina mediante la recuperación de orina tras la dosificación oral.

Existe, por tanto, una discrepancia entre la estimación de la biodisponibilidad oral determinada a partir de las mediciones directas en sangre y la determinada a partir de la excreción urinaria. Esto implica que los bajos niveles en sangre observados tras la dosificación oral no se pueden explicar simplemente por una limitación en la absorción, como sugieren Peter et al. (2000). Es más probable que los bajos niveles en sangre observados tras la dosificación oral reflejen una diferencia en el volumen de distribución aparente de MTC administrado por vía oral y por la vía IV. La captación temprana rápida en el tejido fue confirmada por DiSanto y Wagner que notificaron que un 29,8 % de la dosis intravenosa del MTC podría recuperarse en el corazón, pulmón, hígado y riñón a los 2 minutos después de la administración en rata. Esta imagen de una fase temprana de distribución rápida seguida 10 h después por una fase de eliminación lenta también es consistente con los datos de excreción urinaria mostrados en las Figuras 12 y 13. Por tanto, los datos en sangre recogidos en el transcurso de 4 h, según Peter et al., no son suficientes para definir una estimación válida de la redistribución de MT entre los compartimentos de absorción, central y periférico.

ii) Modelo construido combinando los datos sanguíneos de Peter et al. (Tablas 7 y 8) y los datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner (Tabla 5)

Un enfoque para derivar un modelo farmacocinético a partir de los estudios disponibles es utilizar ecuaciones diferenciales lineales para determinar directamente un sistema de compartimentos que se puedan ajustar a los conjuntos de datos disponibles. Los datos utilizados son el conjunto de datos de DiSanto y Wagner de excreción urinaria para 7 sujetos relacionado en la Tabla 5, que tiene en cuenta la excreción diferencial entre Ox-MT y L-MT. Esto se combina con los datos de niveles sanguíneos de Peter et al. relacionados en las Tablas 7 y 8, también basados en 7 sujetos. Se supone que los datos de DiSanto y Wagner se pueden vincular con los conjuntos de datos de concentración en sangre tras dosificación oral e IV después de un escalado adecuado sobre la base de que los perfiles de excreción urinaria determinados por Peter et al. eran similares para las dos vías de administración (Figura 17).

Sin embargo, el conjunto de datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner se utiliza para el ajuste con preferencia sobre los datos de Peter et al. porque este último no tiene en cuenta explícitamente la excreción

diferencial entre Ox-MT y L-MT, y porque los intervalos de muestreo son más amplios comparados con los disponibles del conjunto de datos de DiSanto y Wagner.

La modelización se realizó en dos etapas:

5 En la primera etapa, los datos de concentración en sangre de Peter et al. a las 4 h después de una sola dosis IV de 100 mg de MTC se combinaron con el conjunto de datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner a 120 h para una única dosis oral de MTC de 10 mg. La segunda etapa fue ver si el mismo sistema compartimental, o uno similar, se puede usar para ajustar los datos de concentración de sangre de Peter et al. después de una
10 única dosis oral de 100 mg de MTC, combinados con el conjunto de datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner a 120 h para una única dosis oral de MTC de 10 mg. En ambos casos, los parámetros de escalado para permitir la diferencia de 10 veces en la dosis se estimaron mediante los correspondientes modelos.

15 La Figura 18 muestra la mejor distribución de compartimentos y las correspondientes constantes de velocidad que se pudieran ajustar a los tres conjuntos de datos (datos de concentración en sangre tras la dosificación IV de Peter et al [Tabla 7], datos de Ox-MT en orina [Tabla 5] y datos de L-MT en orina [Tabla 5] de DiSanto y Wagner). El compartimento central es C2. Los parámetros de escalado para permitir el hecho de tener una diferencia de diez veces entre las dosis utilizadas para obtener los conjuntos de datos en sangre y en orina se estimaron explícitamente mediante el modelo de Ox-MT en orina (S-Ox) y L-MT en orina (S-L) y se muestran en la Tabla 11. La
20 solución al modelo requiere dos compartimentos periféricos, mostrados como C3 y C4 en la Figura 18, y un compartimento de excreción adicional (C5). Existen dos salidas desde C5, uno que representa la excreción urinaria observada escalada para L-MT (designada K50 en la Tabla 11), y una segunda salida que representa una pérdida no medida (designada como K500 en la Tabla 11), que se supone representa el metabolismo hepático secundario de MT que se excreta mediante la bilis como metabolito no medido. La salida de C3 (designada K30 en la Tabla 11)
25 representa la cantidad media como Ox-MT urinaria. Los porcentajes mostrados representan repartos de la excreción total prevista a las 120 h, estimadas a partir de los correspondientes valores de ABC.

Los parámetros estimados por el modelo se relacionados en la Tabla 11 siguiente.

30 Tabla 11. Los parámetros del modelo estimados a partir de una única dosis intravenosa de 100 mg de MTC. Las constantes de velocidad son las indicadas en la Figura 18. K50 es la constante de la velocidad de tasa de excreción urinaria a partir de C5, y K500 es la presunta constante de velocidad de excreción hepática a partir de C5. V2 es el volumen de distribución aparente de MT en C2 calculado por el modelo. SOx y S-L son los parámetros de escalado calculados por el modelo para tener en cuenta el hecho de que los datos urinarios proceden de un experimento en el
35 que MTC se administró a una dosis oral de 10 mg, y los datos en sangre proceden de un experimento en el que MTC se administró como una sola dosis IV de 100 mg.

Parámetro	Estimación
K23	1,60
K24	3,94
K30	0,0093
K32	0,088
K42	0,87
K45	0,28
K50	0,78
K500	0,081
S-Ox	10,6
S-L	6,3
V2	66,03
Correlaciones (observadas vs previstas):	
Sangre	0,98
Ox-MT urinario	0,96
L-MT urinario	0,98

40 En la segunda etapa, el mismo modelo básico se ajustó a los datos de concentración en sangre de Peter et al. tras una sola dosis oral de 100 mg de MTC (Tabla 8), y los datos escalados de excreción urinaria de DiSanto y Wagner (Tabla 5) tras una sola dosis oral de 10 mg de MTC.

45 La Figura 22 muestra la mejor distribución de compartimentos y las correspondientes constantes de velocidad que se pudieran ajustar a los tres conjuntos de datos (datos de concentración en sangre tras la dosificación oral de Peter et al [Tabla 7], datos de Ox-MT en orina [Tabla 5] y datos de L-MT en orina [Tabla 5] de DiSanto y Wagner). El modelo oral supone dos compartimentos adicionales antes del compartimento central (C2). Son C1 (el compartimento de absorción primario, que se supone que corresponde al estómago), y un segundo compartimento pre-central (C6, que supuestamente representa el metabolismo hepático con el metabolismo de primer paso). Existe una pérdida de C1 (designada K100 en la Tabla 12) que presuntamente representa el MTC no absorbido, y una pérdida adicional desde C6 (designada K600 en la Tabla 12) que presuntamente representa la pérdida debida al

metabolismo de primer paso. Los parámetros de escalado para permitir el hecho de tener una diferencia de diez veces entre las dosis utilizadas para obtener los conjuntos de datos en sangre y en orina se estimaron explícitamente mediante el modelo de Ox-MT en orina (S-Ox) y L-MT en orina (S-L) y se muestran en la Tabla 12. Como para el modelo IV, la solución al modelo requiere dos compartimentos periféricos, mostrados como C3 y C4 en la Figura 22, y un compartimento de excreción adicional (C5). Existen dos salidas desde C5, uno que representa la excreción urinaria observada escalada para L-MT (designada K50 en la Tabla 12), y una segunda salida que representa una pérdida no medida (designada como K500 en la Tabla 12), que teóricamente representa el metabolismo hepático secundario de MT que se excreta mediante la bilis como metabolito no medido. La salida de C3 (designada K30 en la Tabla 12) representa la cantidad media como Ox-MT urinaria. Los porcentajes mostrados representan repartos de la salida total prevista del sistema de excreción a las 120 h, estimadas a partir de los correspondientes valores de ABC.

Los parámetros estimados por el modelo se relacionados en la Tabla 12 siguiente.

Tabla 12. Los parámetros del modelo estimados a partir de una única dosis oral de 100 mg de MTC.

Parámetro	Estimación
K100	0,44
K16	1,68
K23	1,39
K24	0,67
K30	0,016
K32	0,091
K42	0,00095
K45	2,059
K50	1,45
K500	0,61
K600	0,20
K62	0,35
S-Ox	12,3
S-L	19,6
Vc2 (l)	319,9
Correlaciones (observadas vs previstas):	
Ox-MT en sangre	0,99
Ox-MT urinario	0,98
L-MT urinario	0,99

Los factores de escalado para los valores de Ox-MT y L-MT en orina de DiSanto y Wagner (dosis de 10 mg, oral) para ajustar a los datos de Peter et al (dosis de 100 mg, oral) se estimaron explícitamente para la versión oral del modelo como S-Ox y S-L respectivamente. Se requiere una modificación adicional para conseguir ajustar los datos orales que fue la introducción de un tiempo de retraso en los datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner. Este retraso se estimó como una función no lineal comprendida entre 0,2 y 1 h para tiempos de excreción anteriores a 1 h, y un tiempo de retraso constante de 1 h posteriormente.

Como puede observarse en la Tabla 11 y 12, se produjo una correlación muy alta (siempre mayor de 0,96) entre los conjuntos de datos de entrada y salida del modelo, como se puede ver fácilmente de las Figuras 19-21 y 23-25. El modelo proporciona, por tanto, un ajuste cercano a los datos experimentales.

iii) Comparaciones de las salidas del modelo con otras fuentes de datos

Como comprobación del modelo oral, sus salidas se compararon con los demás conjuntos de disponibles.

Las salidas del modelo oral (Figura 22) se compararon en primer lugar con las velocidades de excreción urinaria notificadas por Peter et al. (2000) y mostradas anteriormente en la Figura 18. Esta comparación se muestra más adelante en la Figura 26. Se consiguió una buena concordancia global, además del intervalo de recogida de 2-4 h, cuando el nivel notificado por Peter et al. fue la mitad de lo previsto por el modelo. Excluyendo este valor, la correlación entre ambos fue 0,86. La excreción total en 24 horas previsto por el modelo y la notificada por Peter et al. también se compararon en la Figura 26. El modelo predice que la excreción urinaria total era el 23 % de la dosis, mientras que la estimación de Peter et al. fue del 18,6 %.

Como comprobación adicional del modelo, la excreción urinaria total prevista en 48 h se comparó con los datos mostrados anteriormente en la Figura 16, que compila los datos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner y Moody et al. Esto se muestra de nuevo en la Figura 27 con la salida del modelo indicado por "M", y los datos de Peter et al. indicados por "P".

Finalmente, se realizó una comparación entre las predicciones compartimentales y los resultados de un estudio oral

5 en el que cerdos recibieron una dosis única de 20 mg/kg, y se determinaron los niveles de MT en el cerebro. Se administró a los cerdos una administración oral única de MTC a un nivel de dosis diana de 20 mg/kg de peso corporal. La sangre (0,5), 1,2, 4, 8, 12, 24 y 48 h) y la orina (1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, y 24 h) se recogieron en puntos temporales regulares hasta 48 h. Dos animales se sacrificaron en cada uno de los puntos a 1, 8, 24 y 48 h después de la dosis y se guardaron muestras del cerebro. Se realizó la evaluación farmacocinética de la base libre de MTC sobre sangre completa y las muestras de tejido cerebral. Se extrajeron de cada animal dos lotes de muestras de tejido cerebral que se analizaron esencialmente como se describe en Peter et al (2000).

10 El tejido cerebral (500 mg) se mezcló en vórtex y después se extrajo con dicloroetano (5 ml) y la fase orgánica se llevó a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El extracto se capturó con metanol, y se separó mediante HPLC de fase inversa usando detección por ultravioleta. El método se validó con patrones internos para el intervalo de 10 a 2000 ng de MTC por gramo de tejido. La precisión promedio entre ocasiones para MTC fue del 107 %, 95 % y 105 % a 20, 100 y 1600 ng/g, respectivamente, y el coeficiente de variación para cada nivel no fue superior al 20 %.

15 Se encontró que la semivida de eliminación terminal en el cerdo era de 23,5 horas, tanto para la sangre como para el cerebro, consistente con los hallazgos de excreción urinaria de DiSanto y Wagner, lo que indica que la fase de eliminación terminal es mucho más larga de lo estimado tanto por Peter et al. (2000) o para Rengelshausen et al. (2004).

20 Para utilizar los datos obtenidos en cerdos para determinar si el modelo compartimental humano predice los niveles en el cerebro, la base temporal de los datos de cerdo se reescaló a la correspondiente semivida humana (15,7 h).

25 Los resultados se muestran en la Figura 28. Todos los compartimentos se reescalaron a sus correspondientes máximos. Puede observarse en la Figura 28 que el compartimento central (C2, sangre) y C4 se siguieron entre sí muy de cerca, indicando que MT se intercambia libremente entre C2 y C4.

30 Por otra parte, la eliminación de MT del cerebro de cerdo se puede usar para seguir la eliminación prevista desde C3, y no desde C4. Por tanto, de los dos compartimentos internos del modelo (C4 y C3), puede observarse que C3 proporciona una predicción de los niveles esperados en el cerebro.

iii) Interpretación del modelo farmacocinético integrado para MTC

35 Las características cinéticas principales de los modelos oral e intravenoso se comparan a continuación. a) *Modelo IV humano*

Las características cinéticas clave del modelo intravenoso humano se resumen en la Tabla 13. Los datos se han normalizado para el caso de una dosis única de 100 mg (313 µM).

Tabla 13. Resumen de las características cinéticas clave del modelo PK intravenoso humano.

Modelo intravenoso								
	A-T _{1/2} ¹	D-T _{1/2} ¹	E-T _{1/2} ¹	ABC ²	ABC-out ³	%ABC-out ³	T _{máx} ⁴	MRT ⁵
Compartimentos centrales								
C2	0,1	1,4	17,9	286				16,3
C4	0,1	1,4	17,9	984			0,5	17,1
Compartimento profundo								
C3	1,3	1,4	17,9	4645			4,0	26,6
Compartimento de excreción								
C5	0,6	1,6	17,9	320			2,0	18,2
Salidas postcentrales								
C500					2377	8,2 %		
Ur-Ox-MT					3707	12,8 %		
Ur-L-MT					22836	79,0 %		
Salidas totales					28920			

1. Para cada uno de los compartimentos se calcularon las semividas de la fase de absorción (A-T_{1/2}), una fase de

distribución (D-T₀) y una fase de eliminación (E-T₀) en horas usando una aproximación triexponencial a los datos de salida del modelo.
 2. Se ha calculado la ABC₀ (μmol-h/l) para MT en cada uno de los compartimentos "interiores".
 3. Se ha calculado la ABC₀ (μmol-h/l) para MT en cada uno de los compartimentos postcentrales que se muestran mediante el porcentaje.
 4. La T_{máx} es el tiempo calculado (h) tras la dosis para la que el nivel de MT en el compartimento interior es máximo.
 5. MRT es el tiempo medio de residencia en cada compartimento, calculado como el tiempo necesario para que se elimine el 63,2 % de la dosis administrada.

Compartimentos centrales. Como se puede observar en la Tabla 13, y también en la Figura 28, los perfiles cinéticos de MT en los compartimentos C2 y C4 son esencialmente idénticos, lo que respalda el concepto de que la forma de MT en C4 se encuentra en un equilibrio de intercambio rápido entre la forma medida como el nivel sanguíneo de Ox-MT en sangre en C2. Como el compartimento C4 es el determinante principal de la excreción urinaria de la forma L-MT medida en orina, se concluye que la forma C4 de MT representa el lado L-MT del equilibrio L-MT - Ox-MT que se produce en el organismo. Tras la administración IV, la cantidad de MT en C4 alcanza su máximo nivel en 30 minutos, y posteriormente se elimina a la velocidad de eliminación terminal habitual.

Compartimento profundo. En contraste, puede observarse que C3 en el caso IV tiene propiedades dinámicas diferentes. Transcurren 4 h entre la administración y la consecución del máximo nivel de C3, y el tiempo de residencia medio en C3 es sustancialmente más prolongado que en cualquier de C2 o C4. A la luz de los datos obtenidos en el cerebro de cerdo, se infiere que el compartimento C3 representa la combinación de MT que está cinéticamente atrapado en el interior de las células, tal como describieron May et al. (2004).

De acuerdo con May et al. (2004), MT debe estar en la forma L-MT para atravesar la membrana celular. En el interior de la célula se produce un nuevo equilibrio L-MT - Ox-MT, que está determinado por una combinación del ambiente predominantemente reductor del medio intracelular y el pH prevalente en el interior de la célula (~ pH 7). Experimentos realizados *in vitro* (no mostrados) indicaron que es muy difícil mantener a MT en estado reducido a pH 7 usando agentes reductores fisiológicamente aceptables a concentraciones fisiológicamente aceptables. Esto es, a pH 7, MT tenderá a existir predominantemente en el estado Ox- MT que no es adecuado para las condiciones predominantemente reductoras que se mantienen en el interior de la célula. Sin embargo, en la forma Ox- MT, MT no puede difundirse al exterior celular. Esto crea las condiciones de un nuevo equilibrio en el que MT queda atrapado dentro de las células, llevando a una acumulación del MT intracelular contra un gradiente de concentración, que se puede demostrar en cultivo tisular (no se muestra). Esto explica la observación farmacocinética, paradójica por otra parte, de que MT tanto se distribuye rápidamente a los tejidos tras administración IV (como notificaron DiSanto y Wagner), pero sin embargo se elimina mucho más lentamente. Así, DiSanto y Wagner descubrieron que, transcurridos 2 minutos desde una dosis administrada IV en ratas, se pudo recuperar aproximadamente el 25 % de los órganos principales.

De acuerdo con el modelo IV humano, el nivel de MT que se mide en orina como la forma Ox-MT está estrechamente relacionada cinéticamente con la especie que queda atrapada en el ambiente intracelular, incluyendo el cerebro, como indican los datos obtenidos en el cerebro de cerdo.

b) Modelo oral humano

Las características cinéticas clave del modelo oral humano se resumen en la Tabla 14. Los datos se han normalizado para el caso de una dosis única de 100 mg (313 μM).

Tabla 14. Resumen de las características cinéticas clave del modelo PK oral humano (para más detalles, véanse las notas al pie de la Tabla 13).

Modelo oral									
		A-T _{1/2}	D-T _{1/2}	E-T _{1/2}	ABC	AUC-out	%AUC-out	T _{máx}	MRT
Compartimentos de entrada									
	C1				154				0,5
	C6				467			0,9	2,4
Compartimentos centrales									
	C2	0,5	1,3	15,7	184			2,0	15,7
Compartimentos centrales									
	C4	0,5	1,3	15,7	60			2,0	16,0
Compartimento profundo									
	C3	1,4	1,3	15,7	2345			5,0	25,0
Compartimento de excreción									
	C5	0,7	1,4	15,7	61			2,0	16,5
Salidas precentrales									
	C100					7329	23,0 %		

	C600				9869	31,0 %		
Salidas precentrales								
	C500				3422	10,7 %		
	Ur-Ox-MT				3202	10,0 %		
	Ur-L-MT				8060	25,3 %		
Salidas totales								
					31882			

5 *Compartimento de absorción primaria.* En el modelo oral existen 2 compartimentos de entrada (C1 y C6) antes de la aparición de MT en los compartimentos centrales (C2 y C4). Como se describe anteriormente en la sección *Relación entre la actividad cognitiva y hematológica*, las propiedades de C1 son fundamentales para determinar la biodisponibilidad y la forma en que se absorbe MT. Como se muestra en la Tabla 14, el tiempo de residencia promedio en C1 es de 30 minutos. Puede calcularse que el 50 % de MT se absorbe en 30 minutos, y que el 90 % de MT se absorbe desde C1 en 1 h. Esto indica que C1 es el estómago, donde el pH bajo (pH ~ 2) favorece la conversión mediada de MT en la forma de L-MT mediada por enzimas, que se absorbe rápidamente (May et al., 2004). Es importante resaltar que el 23 % del MTC administrado escapa a la absorción, y por tanto se pierde (mostrado como C100 en la Tabla 14). Por tanto, la absorción desde C1 es también fundamental para determinar la cantidad de MTC que atraviesa el tracto gastrointestinal hasta el intestino distal, donde la leve actividad antibiótica de MTC produce diarrea por repoblación de la flora del intestino distal. Las propiedades de C1 son por tanto fundamentales para optimizar la absorción y la eficacia de MTC, y minimizar los efectos secundarios, tanto del MTC no absorbido (diarrea) como del MTC absorbido, tal como se muestra en el ensayo clínico (efectos secundarios hematológicos).

20 *Compartimentos centrales.* Como para el modelo IV, las propiedades cinéticas de los compartimentos C2 y C4 son esencialmente idénticas al modelo oral. La diferencia significativa entre los casos IV y orales es que la constante de velocidad K24 (3,94) es cuatro veces superior en el caso IV que en el caso oral (K24: 0,67). Esto indica que, tras la administración IV, existe un flujo importante del Ox-MT administrado a la forma L-MT. En contraste, en el caso oral, la mayoría de MT ya se ha reducido a la forma L-MT antes de entrar en los compartimentos centrales.

25 Una diferencia significativa adicional que se puede observar entre el modelo IV y el modelo oral es que el volumen aparente estimado de la distribución de MT es mucho mayor en el caso oral (320 l, Tabla 12) que en el caso IV (66 l, Tabla 11). Esta diferencia de casi 4 veces es la explicación principal de la baja concentración de Ox-MT observada en la sangre después de la administración oral que tras la administración IV. Esto fue explicado erróneamente por Peter et al. (2000) como una baja biodisponibilidad. Aunque es verdad que aproximadamente la mitad de la dosis administrada por vía oral se pierde debido a una combinación de no absorción (el C100 perdido en la Tabla 14 y la Figura 22), y el metabolismo de primer paso (el C600 perdido en la Tabla 14 y la Figura 22), la ABC de C2 en el caso oral es el 64 % de la ABC de C2 AUC en el caso IV. Por tanto, la biodisponibilidad aparente determinada por las relaciones de la ABC en sangre es muy similar a la biodisponibilidad aparente calculada a partir de los datos de excreción en orina de DiSanto y Wagner, lo que indica que el 65 % de la dosis administrada se pueda recuperar en la orina para el caso de la dosis de 10 mg.

35 *Compartimento profundo.* El nivel máximo de MT se observa en los compartimentos centrales 2 h después de la administración. En contraste, el nivel punta se alcanza en el compartimento profundo (C3) solamente a las 5 h de la administración. De nuevo, el tiempo de residencia medio de MT en C3 es sustancialmente más prolongado que en los compartimentos centrales (25 h comparado con 16 h). Por tanto, las características de C3 son esencialmente idénticas en los modelos de dosificación IV y oral.

40 Es importante comparar la biodisponibilidad aparente de MT en C3, que es representativo de los niveles cerebrales, entre las rutas de dosificación oral e i.v. La ABC de C3 oral es el 50 % de la ABC de C3 IV. Por tanto, esencialmente la mitad de la dosis oral está disponible en las células, comparado con el caso IV.

45 **Ejemplo 7 - Implicaciones del modelo farmacocinético integrado para la dosificación**

Un modelo farmacocinético integrado es una herramienta fundamental necesaria para:

- 50 • optimización del régimen terapéutico
- optimización de la formulación
- establecer relaciones entre el nivel en sangre y la eficacia

55 El parámetro de planificación clave que se puede derivar del modelo farmacocinético es la predicción de los niveles estacionarios conseguidos con la dosificación repetida. Será evidente que un modelo que asuma una semivida de eliminación terminal de 5 - 6 h (Peter et al., 2000; Rengelshausen et al., 2004) producirá estimaciones bastante diferentes del régimen terapéutico óptimo en el que la semivida de eliminación es de 16 h. Se puede estimar del modelo integrado desarrollado que un régimen terapéutico óptimo de 3/día tendrá implicaciones bastante diferentes en lo que respecta a la predicción de los niveles estacionarios asumiendo una semivida de eliminación de 6 h o de

16 h. De esta manera, si la estimación de Peter et al. fuera cierta, entonces el factor de acumulación (R, es decir, la relación entre el nivel de estado estacionario para una dosis única) que se observaría para una dosificación cada 8 h sería 1,4. En contraste, si la estimación de 16 h es cierta, entonces, el correspondiente valor de R es 4,8 para una dosificación cada 8 horas. Esto implica que habría una diferencia de 3,4 veces en el nivel estacionario esperado para MT (en la sangre y el cerebro) de acuerdo con los dos modelos. Es por tanto difícil determinar una relación precisa entre la dosis y la eficacia o los efectos secundarios sin un modelo farmacocinético válido.

La variable interviniente fundamental que vincula dosis y eficacia es una estimación de los niveles estacionarios de MT en los compartimentos críticos a frecuencias de dosificación que varían de forma regular. El modelo permite que esta se determine como los niveles estacionarios promedio previstos en C2 y C3, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Niveles estacionarios medios de MT previstos en el compartimento C2 y C3 en función de la frecuencia de dosificación (valores en μmol).

	C2	C3
3/día	4,8	295,5
2/día	3,2	197,0
1/día	1,6	98,5

Correlación entre la eficacia clínica observada y prevista basándose en el modelo farmacocinético integrado humano oral

Los inventores examinan en primer lugar la relación entre la eficacia clínica observada (tamaño de efecto en unidades ADAS-cog a las 50 semanas) y el nivel estacionario de MT previsto en el compartimento profundo (C3) que, como se ha descrito anteriormente, se correlaciona con los niveles cerebrales medidos en cerdo. Esto es, la cantidad de MT en C3 y la concentración de MT en cerebro están relacionadas por una constante que depende de la fracción de MT que alcanza el cerebro, y la precisión de la detección de MT total en el cerebro. Como este factor de escalado es actualmente desconocido en el caso humano, para los fines de discusión adicional, la cantidad de MT en C3 se toma como un valor cercano al nivel cerebral esperado. La relación se muestra en la Figura 29.

Como puede observarse en la Figura 29, existe una relación muy próxima entre el nivel estacionario promedio previsto de MT en el cerebro y el tamaño del efecto clínico de rember™ en TRx-014-001 para las dosis 30 mg³/día y 60 mg 3/día. La relación no contempla la cápsula de 100 mg por las razones anteriormente indicadas en la sección *Relación entre la actividad cognitiva y la actividad hematológica*. Esencialmente, el retraso en la disolución de la formulación de la cápsula de 100 mg utilizada en TRx-014-001 no permitió proporcionar la absorción de MTC en su forma terapéuticamente activa.

Se puede definir una relación idéntica entre el nivel estacionario de MT en sangre (es decir, determinado mediante C2) y tamaño del efecto, como se muestra en la Figura 30.

Dosificación e implicaciones para la formulación de la correlación entre la eficacia clínica observada y prevista basándose en el modelo farmacocinético integrado humano oral

Para los análisis anteriores, existe la expectativa de una relación dosis-respuesta monótonica entre los niveles de MT en sangre que se pueden medir clínicamente y el tamaño del efecto. A partir de esta, se pueden calcular los nomogramas adecuados que tienen en cuenta la metodología de medición. Esto es, la eficacia se puede relacionar con los niveles sanguíneos, y los niveles terapéuticos en sangre se pudieron especificar usando la metodología analítica adecuada.

Otra implicación de la relación mostrada en la Figura 30 es calcular la relación entre la disolución observada de la cápsula y el déficit de eficacia, es decir, la diferencia en el tamaño del efecto entre el tamaño del efecto observado y el tamaño del efecto previsto. Esto se muestra en la Figura 31. Como puede observarse en la Figura 31, existe una etapa de pérdida de eficacia, ya que el porcentaje de disolución de la cápsula observado a 30 minutos cae por debajo del 20 %. Esto confirma las conclusiones alcanzadas anteriormente en la sección *Relación entre la actividad cognitiva y la actividad hematológica*, y confirma que una disolución rápida es un punto fundamental de la actividad terapéutica. Como se ha analizado adicionalmente en la sección *Interpretación del modelo farmacocinético integrado para MTC*, esto se puede explicar por el papel fundamental del estómago en la absorción del resto MT en su forma terapéuticamente eficaz.

Por tanto, en el diseño de una formulación mejorada de MTC, la consecución de la eficacia prevista está determinada de forma importante por el requisito de que la disolución del producto médico en investigación (es decir, comprimido o cápsula) sea mayor del 50 % en 30 minutos en condiciones normalizadas.

Las relaciones descritas en el presente documento tienen implicaciones en comparación con la solución habitual de consecución con un régimen de dosificación más cómodo, es decir, dos veces al día o 1 vez al día. Estos regímenes de dosificación serían más deseables en pacientes con demencia, que son olvidadizos y por tanto necesitan que se les recuerde tomar su medicación. La solución convencional para conseguir un régimen de dosificación más cómodo

es crear una formulación de liberación retardada. Sin embargo, los presentes análisis indican que, por el contrario, a una carga muy alta, una formulación de liberación lenta de una forma de MTC oxidada de un producto terapéutico eliminaría esencialmente la eficacia, tal como se ilustra convenientemente por las propiedades de la cápsula de 100 mg en TRx-014-001.

Una inferencia adicional que se puede extraer de las Figuras 29 y 30 es que la dosis de una forma basada en MTC de un producto terapéutico necesitaría administrarse en una dosis unitaria de 120 mg o más para conseguir un nivel de eficacia comparable al observado en el ensayo clínico TRx-014-001 con la dosis unitaria de 60 mg administrada 3 veces al día.

Una inferencia adicional que se puede extraer de las Figuras 29 y 30 es que se necesitaría una dosis unitaria de 100 mg o más administrada 3 veces al día para conseguir un nivel de eficacia mayor que el observado en el ensayo clínico TRx-014-001. Sin embargo, como se analiza en la sección *Resumen del ensayo clínico en Fase 2 TRx-014-001* existe una limitación en la cantidad de MTC que se puede administrar en la presente formulación debido a los crecientes efectos hematológicos adversos y diarrea a dosis iguales o superiores a 100 mg 3 veces al día.

Implicaciones de las formulaciones y regímenes terapéuticos mejorados

Como puede observarse en la Figura 31A, existe una etapa de pérdida de eficacia, ya que el porcentaje de disolución de la cápsula observado a 30 minutos cae por debajo del 20 %.

Por tanto, en el diseño de una formulación mejorada de MTC, la consecución de la eficacia prevista está determinada de forma importante por el requisito de que la disolución del producto médico en investigación (es decir, comprimido o cápsula) sea mayor del 50 % en 30 minutos en condiciones normalizadas.

Las relaciones descritas en el presente documento tienen implicaciones en comparación con la solución habitual de consecución con un régimen de dosificación más cómodo, es decir, dos veces al día o 1 vez al día. Estos regímenes de dosificación serían más deseables en pacientes con demencia, que son olvidadizos y por tanto necesitan que se les recuerde tomar su medicación. La solución convencional para conseguir un régimen de dosificación más cómodo es crear una formulación de liberación retardada. Sin embargo, los presentes análisis indican que, por el contrario, una formulación de liberación lenta de una forma de MTC oxidada de un producto terapéutico eliminaría esencialmente la eficacia, tal como se ilustra convenientemente por las propiedades de la cápsula de 100 mg en TRx-014-001.

Una inferencia adicional que se puede extraer de las Figuras 29 y 30 es que la dosis de una forma basada en MTC de un producto terapéutico necesitaría administrarse en una dosis unitaria de 120 mg o más para conseguir un nivel de eficacia comparable al observado en el ensayo clínico TRx-014-001 con la dosis unitaria de 60 mg administrada 3 veces al día.

Una inferencia adicional que se puede extraer de las Figuras 29 y 30 es que se necesitaría una dosis unitaria de 100 mg o más administrada 3 veces al día para conseguir un nivel de eficacia mayor que el observado en el ensayo clínico TRx-014-001. Sin embargo, como se analiza en la sección *Resumen del ensayo clínico en Fase 2 TRx-014-001* existe una limitación en la cantidad de MTC que se puede administrar en la presente formulación debido a los crecientes efectos hematológicos adversos y diarrea a dosis iguales o superiores a 100 mg 3 veces al día.

Correlación entre la eficacia clínica observada y los efectos secundarios hematológicos previstos basándose en el modelo farmacocinético integrado humano oral

Los inventores consideran ahora la relación entre el nivel estacionario esperado de MT en C2 (sangre) y los efectos secundarios hematológicos observados en el estudio TRx-014-001. La pérdida de glóbulos rojos a las 24 semanas se toma como la variable indicativa más informativa. La relación se muestra más adelante en la Figura 31B.

Como puede observarse en la Figura 31B, el nivel de pérdida de glóbulos rojos es mucho más alto que el nivel estacionario previsto de MT en la sangre. Esto confirma fuertemente la hipótesis de disolución retardada detallada en la sección *Relación entre actividad cognitiva y actividad hematológica*. Específicamente, de acuerdo con la hipótesis de la disolución retardada, una forma de MT bastante diferente es la responsable de los efectos hematológicos secundarios. Se postula que se trata de un dímero, cuya formación se favorece en las condiciones alcalinas del intestino delgado y parte final del intestino grueso. Por tanto, los efectos secundarios hematológicos observados en TRx-014-001 fueron una consecuencia específica de la formulación de la cápsula de gelatina utilizada en el estudio, y es improbable que sea un rasgo inherente del propio resto MT, si se absorbe en el estómago como se ha descrito.

Ejemplo 8 - Implicaciones para composiciones y regímenes terapéuticos mejorados**Absorción y eficacia**

5 Como puede observarse en el análisis anterior, los factores que limitan la eficacia terapéutica que se puede conseguir usando un producto medicinal basado en MTC son una combinación de limitaciones de la absorción y limitaciones debidas a efectos adversos. Esta sección describe cómo estas limitaciones se pueden superar a la luz del análisis posibilitado por el desarrollo del modelo farmacocinético integrado.

10 Los inventores comparan en primer lugar la dosis real con la dosis eficaz en la Figura 32, calculada usando la misma relación descrita en la Figura 16.

15 Como se puede observar, el factor limitante de la eficacia es una combinación entre la limitación en la absorción y el metabolismo de primer paso anteriormente descrito. Esto se combina para limitar de forma importante la ventaja que, teóricamente, se podría conseguir al aumentar la dosis. Indudablemente, la meseta de eficacia aparente sugerida anteriormente en la Figura 7 se determina casi en su totalidad por la limitación de la dosis eficaz que se puede suministrar usando un producto medicinal basado en la forma actual de MTC.

20 La solicitud anteriormente presentada no publicada PCT/GB2007/001103 describe determinadas formas salinas reducidas estabilizadas del resto de metiltioninio (denominadas en lo sucesivo como "L-MTx"). Los inventores han utilizado aquí el modelo farmacocinético integrado, y la relación definida en el mismo con el efecto terapéutico observado en TRx-014-001 para determinar cómo se puede utilizar esta novedosa combinación material para optimizar el tratamiento de la EA basándose en el resto metiltioninio.

25 Los inventores consideran en primer lugar la fracción prevista de L-MTx administrada por vía oral que se esperaría que se absorbiera. Esta se calcula sobre la base de que la pérdida debida al metabolismo de primer paso (es decir, la pérdida desde C6 designada como C600 en la Tabla 14 y mostrada en la Figura 22) no se eliminaría mediante la dosificación con la forma L-MTx. Sin embargo, se espera que la pérdida debida a la no absorción inicial desde C1 (es decir, la pérdida desde C1 designada como C100 en la Tabla 14 y mostrada en la Figura 22) no se eliminaría mediante la dosificación con la forma L-MTx. Esto se debe a que la forma L-MTx (especialmente la sal de dibromhidruro, PCT/GB2007/001103) tiene una solubilidad más de dos veces mayor que MTC, y se esperaría que rodeara la tiazina-colorante reductasa (May et al., 2004) que se supone existe en el estómago y que presumiblemente es necesaria para la absorción. Basándose en estas suposiciones, la fracción prevista de la dosis absorbida, calculada a partir de los datos proporcionados por el modelo, se muestra en la Figura 33.

30 Específicamente, las pérdidas totales del compartimento precentral suman el 54 % de la dosis administrada para el caso de 100 mg. De esta pérdida total, el 43 % se debe a la no absorción desde C1. Esto se aplica a las dosis para estimar la biodisponibilidad esperada del L-MTx administrado lo que permite calcular la pérdida debida al metabolismo de primer paso.

40 Una vez se ha producido la absorción en el compartimento central, la eficacia prevista se puede determinar a partir de la relación anteriormente descrita que vincula el nivel estacionario en C2 o C3 con el tamaño del efecto observado. Esto se muestra para C3 en la Figura 34.

45 Las correspondientes relaciones entre la eficacia clínica esperada de una forma basada en L-MTx del resto metiltioninio y nivel promedio estacionario previsto de MT en C2 (sangre) para una gama de regímenes de dosificación, de 1 día a 3 días se muestran en la Figura 35..

50 Como puede verse en las Figuras 34 y 35, se predice que se podría alcanzar un nivel de eficacia de -8,1 unidades ADAS-cog usando un régimen terapéutico de 100 mg de la forma L-MTx administrada dos veces diarias que también se puede conseguir con dosis de 60 mg 3 veces al día. Se esperarían niveles de eficacia incluso mayores usando 100 mg o más administrados 3 veces al día.

55 Se infiere por tanto que se podría conseguir una eficacia sustancialmente mayor y un régimen de dosificación superior usando la forma L-MTx del resto metiltioninio.

Seguridad y tolerabilidad de la forma L-MTx dl resto metiltioninio

60 Como se describe anteriormente en la sección *Relación entre la actividad cognitiva y hematológica*, una limitación significativa de administrar dosis más altas de MTC para conseguir mejor eficacia se debe a las consecuencias combinadas de aumentar los efectos secundarios hematológicos y la mala tolerabilidad de la diarrea. Aunque es probable que la forma L-MTx reduzca sustancialmente la diarrea no es evidente que también lo haga con los efectos secundarios hematológicos.

65 Como se muestra anteriormente en la Figura 9 y la Tabla 4 de la sección *Relación entre la actividad cognitiva y hematológica*, se espera que la forma L-MTx tenga menos efectos secundarios hematológicos según los estudios en ratas anteriormente descritos. Además, tal como se ha descrito anteriormente en la sección *Correlación entre la*

eficacia clínica observada y los efectos secundarios hematológicos previstos basándose en el modelo farmacocinético integrado humano oral, es improbable que los efectos hematológicos sean inherentes al propio resto MT, en el intervalo de dosis requerido para la actividad contra la demencia. A dosis orales más altas, mostradas por ejemplo en el estudio anterior en rata, es evidente que se verán efectos secundarios hematológicos pero es improbable que estas dosis se alcancen en el uso clínico de las formas de producto medicinal basado en MTC.

Dada la relación dosis-respuesta observada en el estudio con ratas anteriormente descrito en la sección *Relación entre la actividad cognitiva y la actividad hematológica*, se puede calcular el efecto esperado sobre el recuento total de glóbulos rojos, como se muestra en la Figura 36. Como se puede observar, se espera que los efectos secundarios hematológicos esperados que se indexan por la disminución en el recuento de glóbulos rojos sean muy poco importantes.

Factibilidad de la formulación de liberación retardada para las formulaciones de la forma L-MTx sobre el resto metiltioninio

Aunque, por los motivos anteriormente descritos, no sería factible generar una formulación de liberación retardada de un producto médico basado en MTC, esto no sería el caso de una forma de resto metiltioninio basado en L-MTx. Esto se debe a que la forma leuco del resto metiltioninio no puede dimerizar. Esto se debe a que no es una molécula 'plana' (a diferencia de Ox-MT), y no tiene carga que permita estabilizar la forma dimérica mediante neutralización de cargas.

Por tanto, es probable que una formulación de liberación retardada del resto metiltioninio basado en L-MTx. fuera factible sin encontrar las consecuencias adversas de una absorción retardada. Esta se podría crear en una forma farmacéutica para tomar una vez al día.

Referencias de los Ejemplos 1-8

- Birks, J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Sist. de la base de datos Cochrane Rev. (1): CD005593. DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972a) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. I: Methylene blue - whole blood, urine and tissue assays. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61:598-602.
- DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972b) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. II. Methylene blue - absorption, metabolism, and excretion in man and dog after oral administration. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61:1086-1090.
- DiSanto, A.R., Wagner, J.G. (1972c) Pharmacokinetics of highly ionized drugs. III, Methylene blue - blood levels in the dog and tissue levels in the rat following intravenous administration. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61:1090-1094.
- Gunics, G., Motohashi, N., Amaral, L., Farkas, S. y Molnar, J. (2000) Interaction between antibiotics and nonconventional antibiotics on bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents 14:239-42.
- Kristiansen, J.E., Amaral, L. (1997) The potential management of resistant infection with non-antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 40:319-327.
- Lewis, G.N., Bigeleisen, J. (1943) Methylene blue and other indicators in general acids. The acidity function: J. Amer. Chem. Soc., 65:1144-1150.
- May, J.M., Qu, Z.C., Cobb, C.E. (2004) Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 286:C1390-C1398.
- Merker, M.P., Bongard, R.D., Kettenhofen, N.J., Okamoto, Y., Dawson, C.A. (2002) Intracellular redox status affects transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 282:L36-L43.
- Merker, M.P., Olson, L.E., Bongard, R.D., Patel, M.K., Linehan, J.H., Dawson, C.A. (1998) Ascorbate-mediated transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells. Am. J. Physiol., 274:L685-L693.
- Peter, C., Hongwan, D., Kupfer, A., Lauterburg, B.H. (2000) Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. Eur. J. Clin. Pharmacol., 56: 247-250.
- Rabinowitch, E., Epstein, L. (1941) Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue. J. Am. Chem. Soc. 63:69-78.
- Spencer, W., Sutter, J.R. (1979) Kinetic study of the monomer-dimer equilibrium of methylene blue in aqueous suspension. J. Phys. Chem., 83:1573-1576.
- Selkoe, D.J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nat. Cell. Biol., 6:1054-1061.
- Moody, J.P., Allan, S.M., Smith, A.H., Naylor, G.J. (1989). Methylene blue excretion in depression. Biol. Psychiatry; 26:850-852.
- Rengelshausen, J., Burhenne, J., Frohlich, M., Tayrouz, Y., Singh, S.K., Riedel, K.-D., Muller, O., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W.E., Mikus, G. & Walter-Sack, I. (2004) Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria. European Journal of Clinical Pharmacology 60:709-715.
- Wischik, C.M., Lai, R.Y.K., Harrington, C.R. (1997) Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. En Microtubule-Associated Proteins: Modifications in Disease. (eds. J. Avila, R. Brandt, y K. S. Kosik) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 185-241.
- Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982) Pharmacokinetics. 2ª edición Marcel Dekker Inc., Nueva York.

Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 82:239-259.

Kuriloff, D.B., Sanborn, K.V. (2004) Rapid intraoperative localization of parathyroid glands utilizing methylene blue infusion. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 131:616-6 22.

5

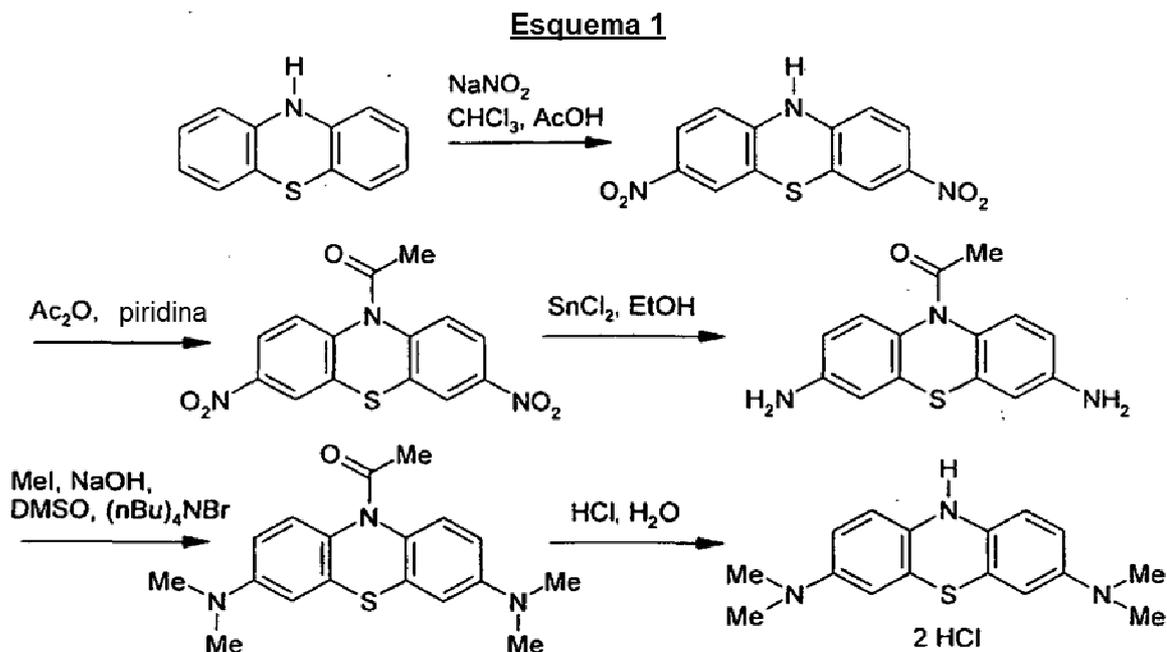
Ejemplo 9 - síntesis química de formas cristalinas reducidas estables de compuestos DAPTZ

La siguiente descripción se corresponde de forma general a la solicitud anteriormente presentada no publicada PCT/GB2007/001103 (incorporada específicamente en este documento por referencia) pero que se incluye en el presente documento solamente para ofrecer una exposición completa.

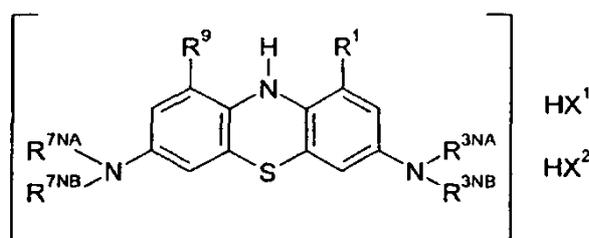
10

Por ejemplo, una fenotiazina adecuada se puede convertir en la correspondiente 3,7-dinitro-fenotiazina, por ejemplo, usando nitrilo de sodio con ácido acético y cloroformo. El grupo amino del anillo se puede proteger a continuación, por ejemplo, en forma de acetato, por ejemplo, usando anhídrido acético y piridina. Los grupos nitro se pueden reducir a continuación a grupos amino, por ejemplo, usando clorita de estaño(II) con etanol. A continuación, los grupos amino se pueden sustituir, por ejemplo, disustituir, por ejemplo, disustituir con metilo, por ejemplo, usando yoduro de metilo, hidróxido sódico, DMSO, y bromuro de tetra-n-butilamonio. El grupo amino del anillo se puede desproteger a continuación, por ejemplo, el grupo N-acetilo puede retirarse, por ejemplo, usando una disolución acuosa concentrada de ácido clorhídrico. Después se prepara la sal correspondiente, por ejemplo, usando una disolución acuosa concentrada de ácido clorhídrico, por ejemplo, al mismo tiempo que se realiza la desprotección. Un ejemplo de dicho método se ilustra en el siguiente esquema.

20



25 Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un compuesto de 3,7-diamino-10 H-fenotiazina de la siguiente fórmula, para su uso para llevar a cabo los métodos de tratamiento anteriormente descritos:



30

en la que R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} , R^{7NB} , HX^1 y HX^2 son como se han definido en el presente documento (por ejemplo, donde cada uno de HX^1 y HX^2 son HCl), que comprende las etapas de:

(vi) formación de la sal (SF).

35

En una realización, el método comprende las etapas de:

- (v) desprotección del amino del anillo (DP); y
- (vi) formación de la sal (SF).

5

En una realización, el método comprende las etapas de:

- (iv) sustitución de la amina (AS),
- (v) desprotección del amino del anillo (DP) opcional, y
- (vi) formación de la sal (SF).

10

En una realización, el método comprende las etapas de

- (iii) nitrorreducción (NR),
- (iv) sustitución de la amina (AS),
- (v) desprotección del amino del anillo (DP), y
- (vi) formación de la sal (SF).

15

En una realización, el método comprende las etapas de (v) desprotección del amino del anillo (AP) opcional,

20

- (iii) nitrorreducción (NR),
- (iv) sustitución de la amina (AS),
- (v) desprotección del amino del anillo (DP), y
- (vi) formación de la sal (SF).

25

En una realización, el método comprende las etapas de

- (i) nitración (NO),
- (ii) protección del amino del anillo (AP),
- (iii) nitrorreducción (NR),
- (iv) sustitución de la amina (AS),
- (v) desprotección del amino del anillo (DP), y
- (vi) formación de la sal (SF).

30

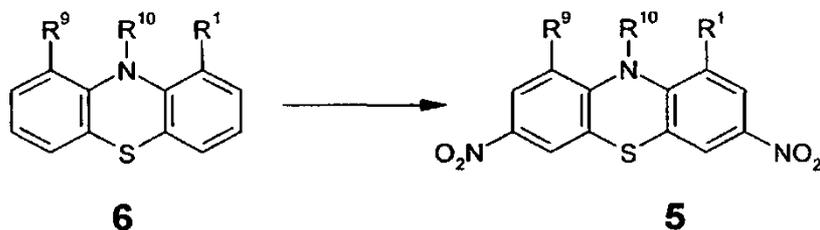
35 En una realización, las etapas se realizan en el orden citado (es decir, cualquier etapa de la lista se realiza a la vez que, o posterior a, la etapa anterior de la lista).

En una realización, la etapa de (v) desprotección del amino del anillo (AP) y la etapa de (vi) formación de la sal (SF) se realizan simultáneamente (es decir, en una etapa).

40

En una realización, la etapa de nitración (NO) es:

- (i) nitración (NO), en la que un 10H-fenotiazina se convierte en una 3,7-dinitro-10 H-fenotiazina, por ejemplo:



45

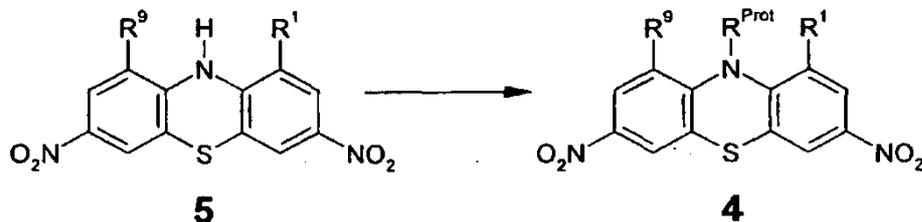
En una realización, la nitración se realiza con un nitrito, por ejemplo, nitrito de sodio, por ejemplo, nitrilo de sodio con ácido acético y cloroformo. En una realización, R¹⁰ es -H.

50

En una realización, la etapa de protección del amino del anillo (AP) es:

(ii) protección del amino del anillo (AP), en la que el grupo amino del anillo (-NH-) de una 3,7-dinitro-10 H-fenotiazina se convierte en un grupo amino protegido (-NR^{Prot}) del anillo, por ejemplo:

5

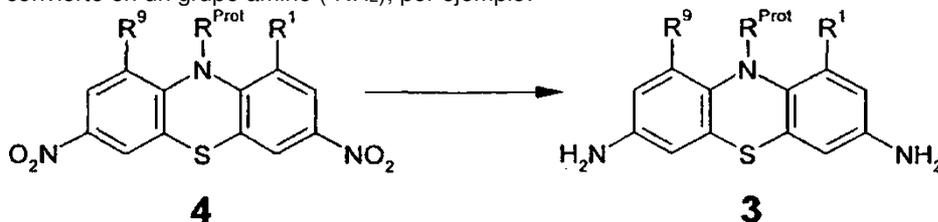


En una realización, la protección del amino del anillo se consigue mediante un acetato, por ejemplo, usando anhídrido acético, por ejemplo, usando anhídrido acético y piridina.

10

En una realización, la etapa de nitrorreducción (NR) es:

(iii) nitrorreducción (NR), en la que cada uno de los grupos nitro (-NO₂) de una 3,7-dinitro-10 H-fenotiazina protegida se convierte en un grupo amino (-NH₂), por ejemplo:



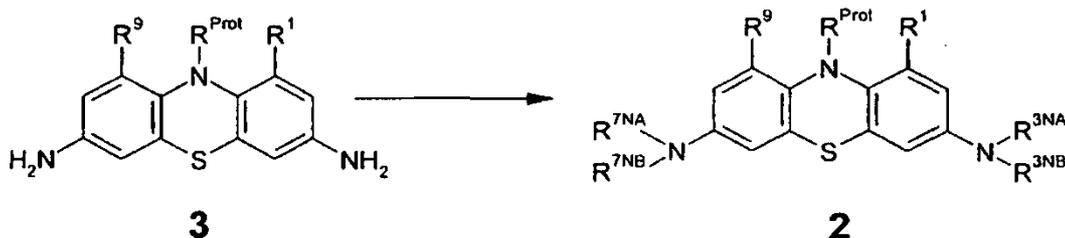
15

En una realización, la nitrorreducción se puede realizar usando, por ejemplo, cloruro de estaño(II), por ejemplo, cloruro de estaño(II) con etanol.

20

En una realización, la etapa de sustitución de la amina (AS) es:

(iv) sustitución de la amina (AS), en la que cada uno de los grupos amino (-NH₂) de una 3,7-diamino-10 H-fenotiazina protegida se convierte en un grupo amino disustituido, por ejemplo:



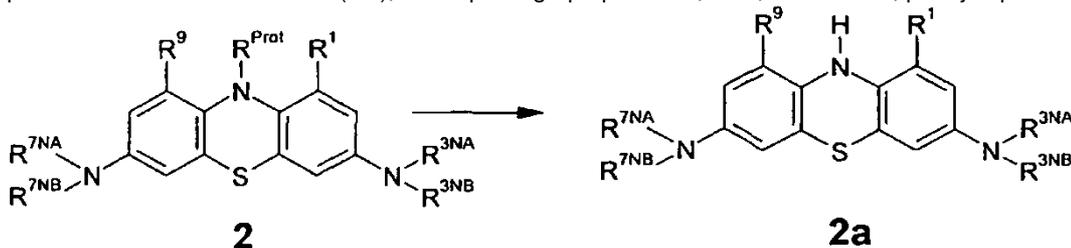
25

En una realización, la sustitución de la amina se realiza con un haluro de alquilo, por ejemplo, un yoduro de alquilo, por ejemplo, yoduro de metilo, por ejemplo, yoduro de metilo con hidróxido de sodio, DMSO, y bromuro de tetra-n-butilamonio.

30

En una realización, la etapa de desprotección del amino del anillo (DP) es:

(v) desprotección del amino del anillo (DP), en la que el grupo protector, R^{Prot}, se eliminan, por ejemplo:



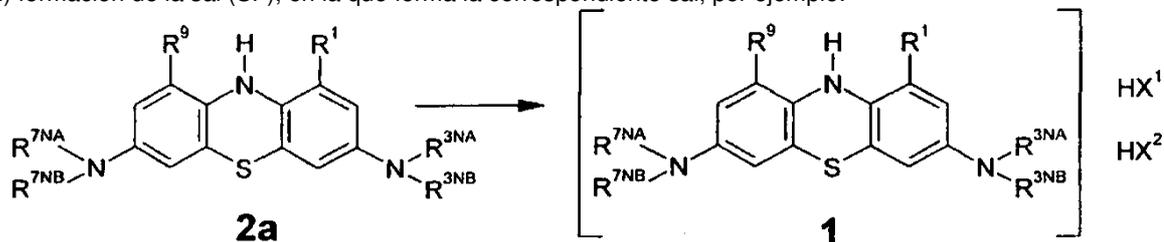
35

En una realización, la desprotección del amino del anillo se puede realizar usando un ácido, por ejemplo, ácido

clorhídrico, por ejemplo, disolución acuosa concentrada de ácido clorhídrico.

En una realización, la etapa es:

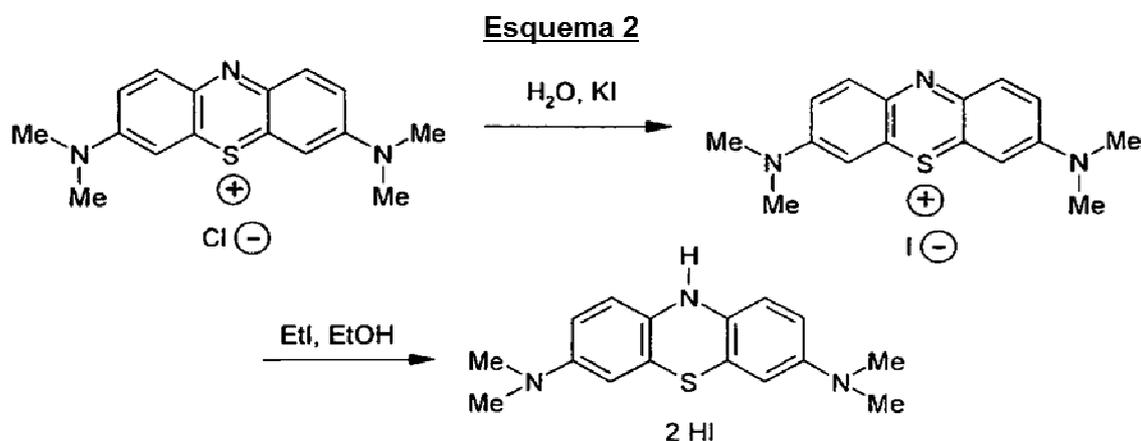
- 5 (vi) formación de la sal (SF), en la que forma la correspondiente sal, por ejemplo:



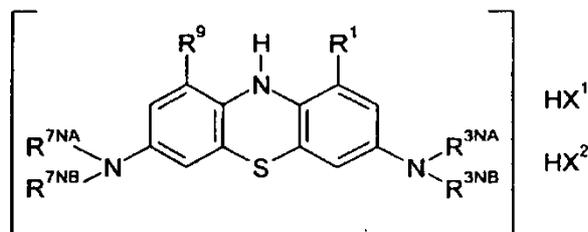
En una realización, la formación de la sal se puede realizar usando un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, por ejemplo, disolución acuosa concentrada de ácido clorhídrico.

- 10 En una realización, las etapas de desprotección del amino del anillo y de formación de la sal se realizan simultáneamente (es decir, en una etapa), por ejemplo, el compuesto (1) se forma a partir del compuesto (2) en una etapa.

- 15 En otro enfoque, un cloruro de tioninio adecuado (por ejemplo, cloruro de metiltioninio, MTC) se convierte en el correspondiente haluro, por ejemplo, por reacción con yoduro de potasio, por ejemplo, una disolución acuosa de yoduro de potasio. El yoduro de tioninio resultante se reduce a continuación, por ejemplo, con yoduro de etilo y etanol, y se forma la correspondiente sal. Un método similar se describe en Drew, H.D.K, y Head, F.S.H., "Derivatives of Methylene-blue," Journal of the Chemical Society, 1933, págs. 248-253. Un ejemplo de dicho método se ilustra en el siguiente esquema.
- 20



- 25 De esta manera, otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un compuesto de DAPTZ de la siguiente fórmula, para su uso para llevar a cabo los métodos de tratamiento anteriormente descritos:



- 30 en la que R¹, R⁹, R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA}, R^{7NB}, HX¹ y HX² son como se han definido en el presente documento (por ejemplo, donde cada uno de HX¹ y HX² son HI), que comprende las etapas de:

- (ii) reducción y formación de la sal de yoduro (RISF).

En una realización, el método comprende las etapas de:

- (i) intercambio de yoduro (IE); y
- (ii) reducción y formación de la sal de yoduro (RISF).

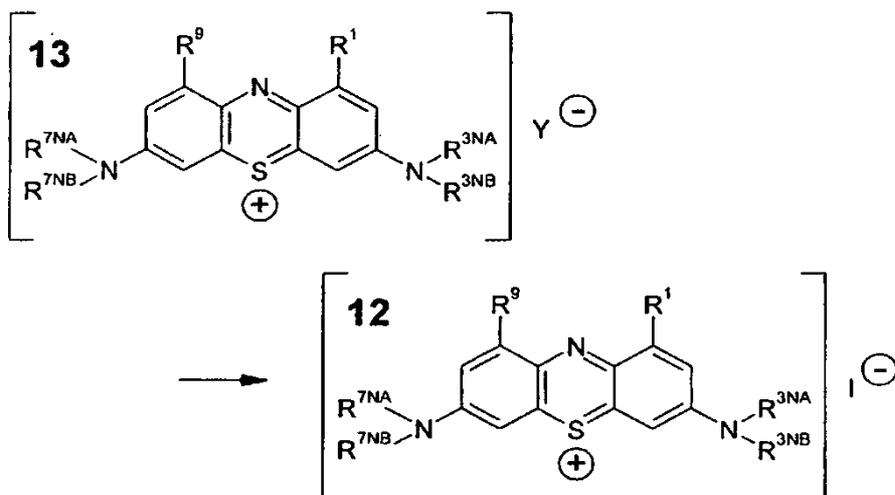
5

En una realización, las etapas se realizan en el orden citado (es decir, cualquier etapa de la lista se realiza a la vez que, o posterior a, la etapa anterior de la lista).

En una realización, la etapa de intercambio de yoduro (IE) es:

10

- (i) intercambio de yoduro (IE), en la que una sal 3,7-di(amino disustituido)-tioninio se convierte en el correspondiente yoduro de 3,7- di(amino disustituido)-tioninio, por ejemplo (donde Y⁻ es un contraión aniónico, por ejemplo, haluro, por ejemplo, cloruro o bromuro):



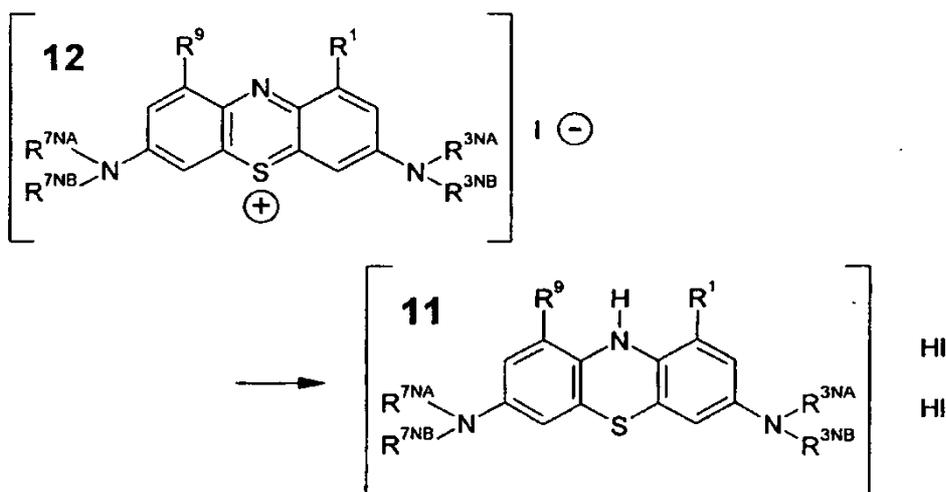
15

En una realización, el intercambio de yoduro (IE) se consigue por reacción con yoduro de potasio, por ejemplo, una disolución acuosa de yoduro de potasio.

20

En una realización, la etapa de reducción y formación de la sal de yoduro (RISF) es:

- (ii) reducción y formación de la sal de yoduro (RISF), en la que un yoduro de 3,7-di(amino disustituido)-tioninio se reduce y se convierte en el correspondiente compuesto de yoduro de 3,7-diamino-10 H-fenotiazina, por ejemplo:



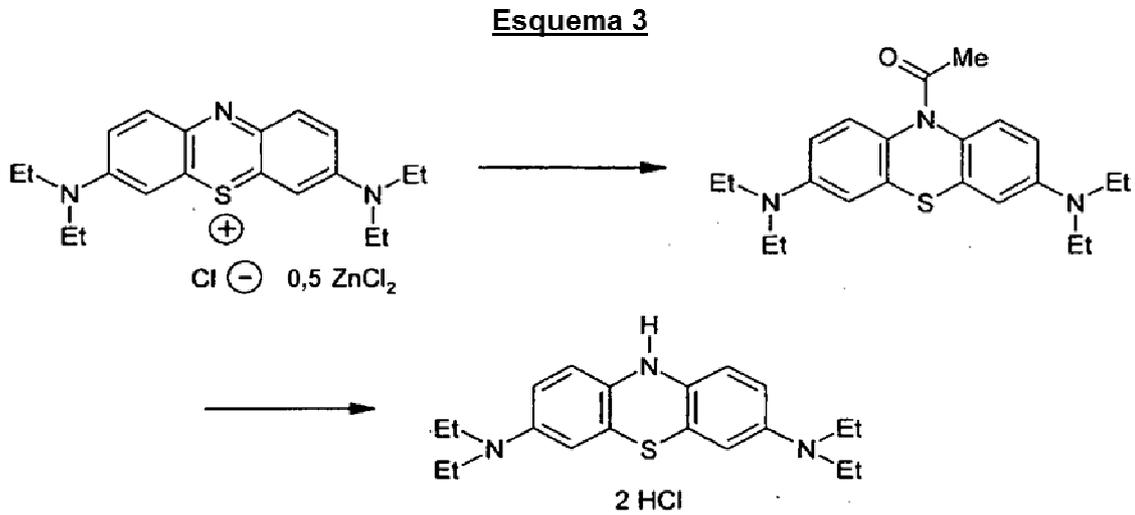
25

En una realización, la reducción y la formación de la sal de yoduro (RISF) se consigue mediante reacción con yoduro de etilo, por ejemplo, yoduro de etilo y etanol.

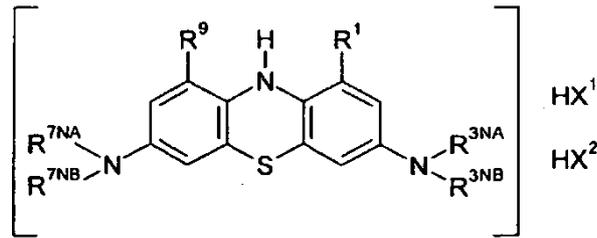
30

En otro enfoque, una sal de tioninio adecuada, por ejemplo, semicloruro de cinc etil tioninio, se reduce simultáneamente y se protege el grupo amino del anillo, por ejemplo, por reacción con fenilhidrazina, etanol, anhídrido acético y piridina. Después se puede preparar la sal correspondiente, por ejemplo, usando una disolución

acuosa concentrada de ácido clorhídrico, por ejemplo, al mismo tiempo que se realiza la desprotección. Un ejemplo de dicho método se ilustra en el siguiente esquema.



5 De esta manera, otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar un compuesto de 3,7-diamino-10 H-fenotiazina (DAPTZ) de la siguiente fórmula:



10 en la que R¹, R⁹, R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA}, R^{7NB}, HX¹ y HX² son como se han definido en el presente documento (por ejemplo, donde cada uno de HX¹ y HX² son HI), que comprende las etapas de:

que comprende las etapas de:

15 (iv) formación de la sal (SF).

En una realización, el método comprende las etapas de

20 (iii) desprotección del amino del anillo (DP), y
(iv) formación de la sal (SF).

En una realización, el método comprende las etapas de

25 (ii) protección del amino del anillo (AP),
(iii) desprotección del amino del anillo (DP), y
(iv) formación de la sal (SF).

En una realización, el método comprende las etapas de

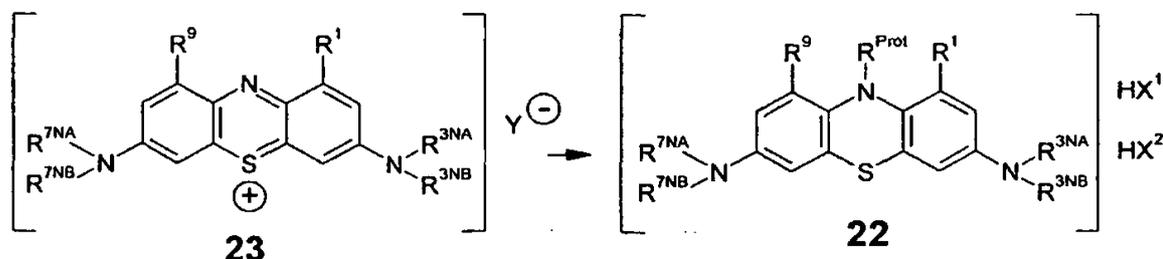
30 (i) reducción (RED)
(ii) protección del amino del anillo (AP),
(iii) desprotección del amino del anillo (DP), y
(iv) formación de la sal (SF).

35 En una realización, las etapas se realizan en el orden citado (es decir, cualquier etapa de la lista se realiza a la vez que, o posterior a, la etapa anterior de la lista).

40 En una realización, la etapa (i) de reducción (RED) y la etapa (ii) protección del amino del anillo (AP) se realizan simultáneamente (es decir, en una etapa).

Por ejemplo, en una realización, la etapa combinada de reducción (RED) y protección del amino del anillo (AP) es:

- 5 (i) reducción (RED) y protección del amino del anillo (AP), en la que una sal 3,7-di(amino disustituido)-tioninio se reduce para dar el correspondiente yoduro de 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina, y el grupo amino del anillo (-NH-) de la 3,7-di(amino disustituido)-10 H-fenotiazina se convierte en un grupo amino del anillo protegido (-R^{Prot}) para dar la correspondiente 3,7-di(amino disustituido)-10 H-fenotiazina protegida, por ejemplo:



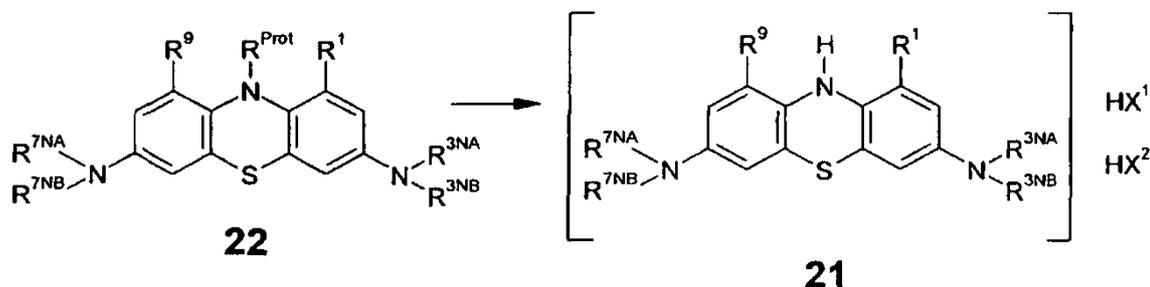
- 10 En una realización, Y representa Cl⁻.

En una realización, la etapa combinada de reducción (RED) y protección del amino del anillo (AP) se consigue usando fenilhidrazina y anhídrido acético, por ejemplo, fenilhidrazina, etanol, anhídrido acético, y piridina.

- 15 En una realización, la etapa de (iii) desprotección del amino del anillo (AP) y la etapa de (iv) formación de la sal (SF) se realizan simultáneamente (es decir, en una etapa).

Por ejemplo, en una realización, la etapa combinada de desprotección del amino del anillo (DP) y la etapa de formación de la sal (SF) son:

- 20 (ii) desprotección del amino del anillo (DP) y formación de la sal (SF), en el que el grupo protector de 3,7-di(amino disustituido)-10 H-fenotiazina protegida se elimina para obtener una 3,7-di(amino disustituido)-10 H-fenotiazina, y se forma la correspondiente sal, por ejemplo:



- 25 En una realización, la etapa combinada de desprotección del amino del anillo (DP) y la etapa de formación de la sal (SF) se puede realizar usando ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, por ejemplo, disolución acuosa concentrada de ácido clorhídrico.

- 30 En un enfoque similar, un cloruro de tioninio adecuado (por ejemplo, cloruro de metiltioninio, cloruro de etiltioninio) se reduce primero y se acetila para obtener la correspondiente 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanon, por ejemplo, por reacción con hidrazina (NH₂NH₂), metilhidrazina (MeNHNH₂), o borohidruro de sodio (NaBH₄); y anhídrido acético ((H₃CCO)₂O); por ejemplo, en presencia de una base adecuada, por ejemplo, piridina (C₅H₅N) o base de Hunig (diisopropiletilamina, C₈H₁₉N), por ejemplo, en un disolvente adecuado, por ejemplo, etanol o acetonitrilo. El compuesto acetilado reducido se desprotege a continuación (eliminando el grupo acetilo), por ejemplo, mediante reacción con un ácido hálido adecuado, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, en un disolvente adecuado, por ejemplo, etanol, y opcionalmente con la adición de un éter adecuado, por ejemplo, éter dietílico,

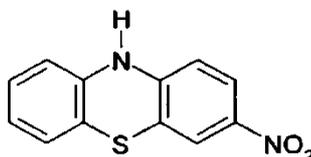
40

Los ejemplos específicos son los siguientes:

Síntesis químicas

5 Síntesis 1

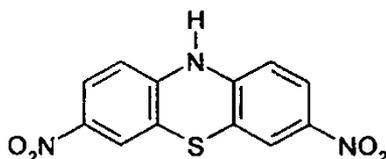
3-Nitro-10 H-fenotiazina



- 10 Nitrito de sodio (20,00 g, 210 mmol) se añadió a una mezcla de 10H-fenotiazina (20,00 g, 50 mmol), cloroformo (100 cm³), y ácido acético (20 cm³), y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadió ácido acético (20 cm³) y la mezcla se agitó durante 18 horas más. La suspensión se filtró y se lavó con ácido acético, etanol, agua, y finalmente se añadió etanol para obtener un sólido de color púrpura/marrón. El residuo se disolvió en DMF caliente y se dejó enfriar antes de filtrar el dinitrocompuesto como un sólido de color púrpura.
- 15 concentración de la solución de DMF y el lavado del precipitado con agua y metanol proporcionó el mononitrocompuesto del título (15 g, ~50 %) en forma de un sólido de color marrón; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3328 (NH), 3278 (NH), 3229 (NH), 3119 (CH), 3049 (CH), 1557 (NO₂), 1531 (NC₂); δ_{H} (250 MHz; DMSO): 6,64 (5H, m, ArH), 7,68 (1H, d, $J = 2,5$, ArH), 7,79-7,84 (1H, dd, $J = 2,75$, 6,5, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; DMSO): 113,3 (ArC), 115,3 (ArC), 116,9 (ArC), 121,8 (ArC), 123,6 (ArC), 123,7 (ArC), 124,6 (ArC), 126,4 (ArC), 128,1 (ArC), 138,8 (ArC), 141,0 (ArC),
- 20 147,8 (ArC).

Síntesis 2

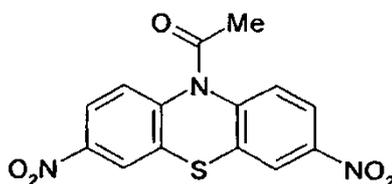
25 3,11-Dinitro-10 H-fenotiazina



- 30 Se siguió el procedimiento para la síntesis de 3-nitro-10 H-fenotiazina usando 3-nitro-10 H-fenotiazina (10,00 g, 41 mmol), cloroformo (40 cm³), ácido acético (2 x 10 cm³), y nitrito de sodio (11,86 g, 173 mmol). El residuo obtenido se recrystalizó en DMF para dar el dinitrocompuesto del título (6,60 g, 56 %) en forma de agujas de color púrpura; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3331 (NH), 3294 (NH), 3229 (NH), 3101 (CH), 3067 (CH), 1602 (NO₂), 1558 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; DMSO): 6,73-6,76 (2H, d, $J = 9$, ArH), 7,78 (2H, s, ArH), 7,89-7,85 (2H, d, $J = 9$, ArH).

35 Síntesis 3

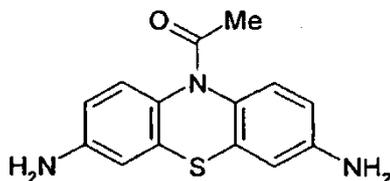
1-(3,7-Dinitro-fenotiazin-10-il)-etanona



- 40 Una solución de 3,11-dinitro-10 H-fenotiazina (3,00 g, 10,37 mmol), anhídrido acético (15,88 g, 155,50 mmol), y piridina (30 cm³) se agitó a temperatura de reflujo durante 18 horas. La solución caliente se vertió después cuidadosamente sobre una mezcla de hielo y agua. Se formó un precipitado, que se filtró, se disolvió en diclorometano, se secó con sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró para dar un sólido de color naranja/marrón, que se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo : éter de petróleo, 2:3, se cargó en forma
- 45 de una solución de diclorometano) para obtener el compuesto del título (2,46 g, 71 %) en forma de un sólido de color amarillo que se puede recrystalizar en acetona para obtener agujas de color amarillo claro; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3091 (CH), 3063 (CH), 1680 (C=O), 1575 (NO₂), 1510 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,28 (3H, s, CH₃), 7,65-7,69 (2H, d, $J = 9$, ArH), 8,22-8,26 (2H, dd, $J = 2,75$, 8,75, ArH), 8,33-8,32 (2H, d, $J = 2,5$, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃): 168,2 (C=O), 146,3 (ArC), 143,3 (ArC), 133,6 (ArC), 127,8 (ArC), 123,4 (ArC), 122,9 (ArC), 23,1 (CH₃); m/z (ES) 331,0
- 50 (80 %, [M]⁺).

Síntesis 4

1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona



5

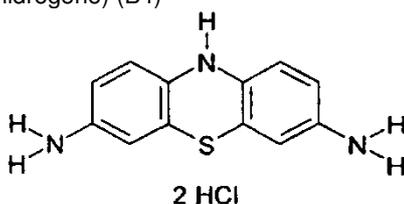
Una mezcla de 1-(3,7-dinitro-fenotiazin-10-il)-etanona (2 g, 6,04 mmol), cloruro de estaño(II) dihidrato (14,17 g, 62,8 mmol), y etanol (50 cm³) se calentó a temperatura de reflujo y se agitó a esta temperatura durante 5 horas. La mezcla después se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre una mezcla de agua con hielo. El pH se ajustó a 7 con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 5 % antes de extraer el producto con acetato de etilo (3 x 50 cm³). Los extractos se lavaron con salmuera y se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para obtener el compuesto del título (1,64 g, 100 %) en forma de un sólido de color azul púrpura. v_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3445 (NH), 3424 (NH), 3368 (NH), 3322 (NH), 3203 (NH), 3054 (CH), 2995 (CH), 1706 (C=O), 1650 (NO₂), 1590 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,01 (3H, s, CH₃), 5,09-5,43 (4H, s a, NH), 6,47-6,51 (2H, dd, $J = 1,5, 8,25$, ArH), 6,61 (2H, s, ArH), 7,11-7,15 (2H, d, $J 8$, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃): 169,1 (C=O), 147,2 (ArC), 128,1 (ArC), 127,6 (ArC), 127,3 (ArC), 112,3 (ArC), 111,5 (ArC), 22,6 (CH₃); m/z (ES) 293,9 (95 %, [M + H, Na]⁺), 272,0 (20 %, [M + H]⁺), 227,9 (100 %, [M + H, - Ac]⁺).

15

Síntesis 5

20

3,7-Diamino-fenotiazina bis(cloruro de hidrógeno) (B4)



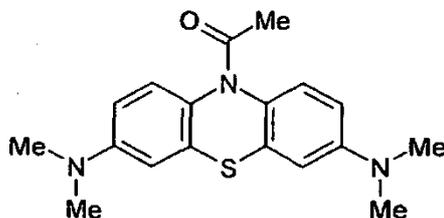
25

1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,25 g, 0,921 mmol) se disolvió en una disolución acuosa de ácido clorhídrico (5 N, 10 cm³) y la solución se calentó a temperatura de reflujo y se agitó durante 30 minutos. La concentración de la mezcla de reacción proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color azul claro. δ_{H} (250 MHz; D₂O): 6,60 (2H, d a, ArH), 7,07 (4H, s a, ArH).

Síntesis 6

30

1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



35

1-(3,7-Diamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,25 g 0,92 mmol) se disolvió en DMSO (3 cm³). Se añadió tolueno (10 cm³), yodometano (1,96 g, 13,8 mmol), bromuro de tetra-butilamonio (50 mg), y finalmente una solución acuosa de hidróxido de sodio (50 %, 1,25 cm³). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió más cantidad de disolución acuosa de hidróxido de sodio (50 %, 1,25 cm³) y yodometano (1,96 g, 13,8 mmol) a continuación. La mezcla se dejó en agitación durante 3 horas más a temperatura ambiente antes de añadir una tercera alícuota de disolución acuosa de hidróxido de sodio (50 %, 1,25 cm³) y yodometano (1,96 g, 13,8 mmol) y la mezcla se agitó durante 18 horas más. La suspensión espesa se lavó con agua (3 x 75 cm³) y se recogió el extracto de tolueno. El agua se extrajo con diclorometano (3 x 50 cm³) y los extractos se combinaron con el tolueno, y se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para obtener un sólido de color púrpura intenso. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo : éter de petróleo, 2:3, cargado en forma de una solución de diclorometano) para obtener el producto del compuesto del título (0,12 g, 40 %) en forma de un sólido de color púrpura claro. v_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃): 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, $J = 8,5$,

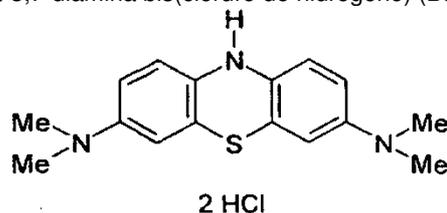
45

ArH), 6,69-6,71 (2H, d, $J = 2,75$, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_c (62,9 MHz; $CDCl_3$): 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃).

Síntesis 7

5

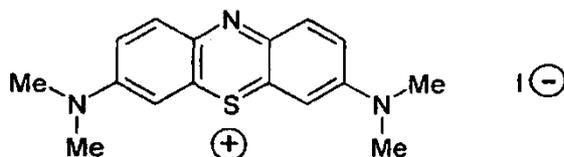
N,N,N',N'-Tetrametil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloruro de hidrógeno) (B3)



10 1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,84 mmol) se disolvió en una disolución acuosa de ácido clorhídrico (5 N, 15 cm³), y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo y se agitó durante 30 minutos. La concentración de la mezcla de reacción proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color verde/azul; δ_H (250 MHz; D₂O): 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,67 (2H, d, $J = 8,5$, ArH), 7,16 (4H, s a, ArH); δ_c (62,9 MHz; D₂O): 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃).

15 Síntesis 8

Yoduro de metiltioninio

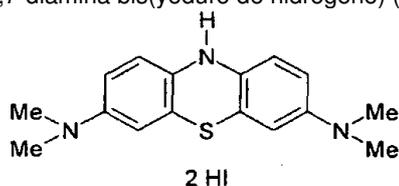


20 A un matraz de fondo redondo se añadió cloruro de metiltioninio (MTC, azul de metileno) (2 g, 6,25 mmol) y agua (50 cm³) y la mezcla se agitó durante 10 minutos o hasta que el sólido se disolvió. A continuación se añadió yoduro de potasio (1,56 g, 9,4 mmol) a la mezcla, y se formó una suspensión de color negro verdoso. La reacción se calentó a ebullición, y se dejó enfriar naturalmente proporcionar el compuesto del título (2,03 g, 79 %) en forma de agujas de color verde brillante. Anal. cal. para C₁₆H₁₈N₃SI: C, 46,72; H, 4,41; N, 10,22; S, 7,80; I, 30,85. Encontrado: C, 46,30; H, 4,21; N, 10,14; S, 7,86; I, 29,34.

25

Síntesis 9

N,N,N',N'-Tetrametil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(yoduro de hidrógeno) (B6)



30

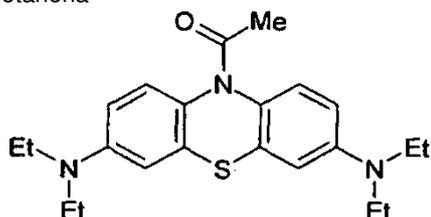
A un matraz de fondo redondo se añadió yoduro de metiltioninio (2 g, 4,86 mmol), etanol (100 cm³) y yoduro de etilo (75,8 g, 486 mmol) y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 18 horas, momento en el que cambió de color desde verde/azul a un precipitado amarillo. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la mezcla se filtró y se lavó con éter dietílico (20 cm³) para obtener el compuesto del título (1,99 g, 76 %) en forma de un sólido de color verde claro. δ_H (250 MHz; D₂O): 3,20 (12H, s, NCH₃), 6,76 (2H, d, $J = 8,5$, ArH), 7,22 (2H, s a, ArH); δ_c (62,9 MHz; D₂O): 145,0 (ArC), 139,3 (ArC), 122,6 (ArC), 121,1 (ArC), 120,9 (ArC), 117,9 (ArC), 48,9 (NCH₃).

35

Síntesis 10

40

1-(3,7-Bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



A un matraz de fondo redondo seco de 25 cm³ se añadió cloruro de cinc etilitionio (0,5 g, 1,13 mmol) y etanol (10 cm³). A continuación se añadió fenilhidrazina (0,134 g, 1,24 mmol) gota a gota bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 25 ml durante 1 hora y se concentró al alto vacío. Se añadieron piridina (50 cm³) y anhídrido acético, y la mezcla se agitó durante 18 horas a 60 ml. La solución se abrió a una mezcla de agua con hielo (250 cm³) y la capa orgánica se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 cm³). Los extractos se lavaron con una solución saturada de sulfato de cobre y se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para obtener el producto bruto en forma de un aceite de color marrón, que se purificó usando cromatografía ultrarrápida en columna con un eluyente de 40 % de acetato de etilo : 60 % de espíritu de petróleo 40-60 ml y sílice 40-6,3 μ 60λ para obtener el compuesto del título (0,18 g, 41 %) en forma de un sólido vítreo de color verde. δ_H (250 MHz; CDCl₃): 7,0-7,5 (2H, s a, ArH), 6,64 (2H, s, ArH), 6,52 (2H, d, ArH), 3,35 (8H, c, 7, NCH₂), 2,18 (3H, s, CH₃), 1,16 (12H, t, 7, CH₃); δ_C (62,9 MHz; CDCl₃): 12,5 (CH₃), 22,9 (CH₃), 44,6 (NCH₂), 110,1 (ArC), 127,4 (ArC), 146,5 (ArC), 170,2 (C=O).

Síntesis 11

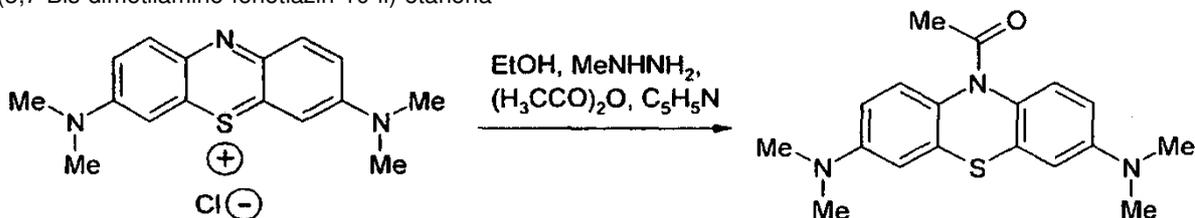
15 N,N,N',N'-Tetraetil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloruro de hidrógeno)



A un matraz de fondo redondo de 25 cm³ se añadió 3,7-dietilamino-10 -acetil-fenotiazina (0,125 g, 0,33 mmol) y una disolución acuosa de ácido clorhídrico (5 M, 5 cm³). La mezcla se calentó a 100 ml durante 2 horas antes de enfriar a temperatura ambiente y se concentró para proporcionar el compuesto del título (0,11 g, 81 %) en forma de un sólido vítreo de color amarillo. δ_H (250 MHz; CD₃OD) 7,07 (4H, a, ArH), 6,65 (2H, a, ArH), 3,35 (8H, a, NCH₂), 0,97 (12H, a, CH₃); δ_C (62,9 MHz; CD₃OD): 10,8 (CH₃), 55,1 (NCH₂), 116,6 (ArC), 120,4 (ArC), 121,5 (ArC), 123,6 (ArC), 132,6 (ArC), 144,5 (ArC).

Síntesis 12

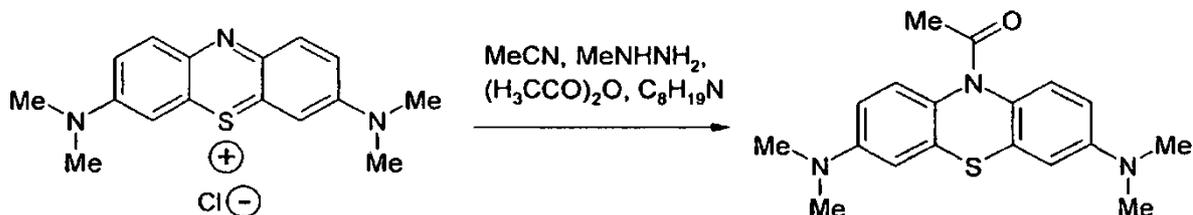
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



30 Síntesis usando metilhidrazina/piridina en dos recipientes. A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ colocado bajo atmósfera de argón se añadió cloruro de metilitionio trihidrato (26,74 mmol, 10 g), etanol (100 cm³) y metil-hidrazina (58,83 mmol, 2,71 g). La mezcla se calentó a 40 ml y se agitó durante 2 horas. La suspensión de color amarillo/verde se enfrió a 5 ml y se filtró bajo atmósfera de argón, se lavó con etanol (20 cm³) y se secó para obtener leuco-azul de metileno en forma de un sólido de color verde claro. Al leucoproducto se añadió anhídrido acético (40 cm³) y piridina (10 cm³) y la solución se calentó a 100 ml durante 18 horas. La mezcla enfriada se vertió cuidadosamente sobre una mezcla de agua con hielo con agitación para proporcionar un precipitado, que se filtró, se lavó con agua, y se secó a 60 ml durante 2 horas para dar el compuesto del título (5,82 g, 66 %) en forma de un sólido de color pardo claro. Pf 137 ml; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_H (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_C (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

Síntesis 13

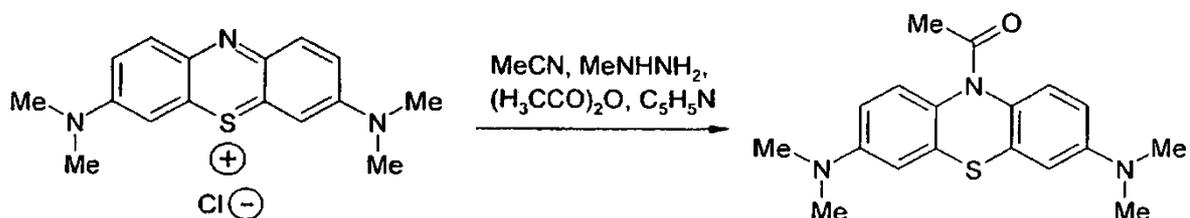
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



10 Síntesis usando metilhidrazina/base de Hunig en un recipiente. A un recipiente de reacción de 5000 cm³ colocado bajo atmósfera de argón se añadió cloruro de metiltioninio trihidrato (0,54 mol, 200 g) y acetonitrilo (1000 cm³). Se añadió metil hidrazina (1,07 mol, 49,36 g) gota a gota a 1,5 ml por minuto. La temperatura de la mezcla aumentó a 32 ml y se agitó durante 20 minutos. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (5,35 mol, 541 g) y después base de Hunig (diisopropiletilamina) (1,55 mol, (200 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (2000 cm³) en diez porciones de 200 cm³ con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 45 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 250 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (2750 cm³) para proporcionar el compuesto del título (112,1 g, 64 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

Síntesis 14

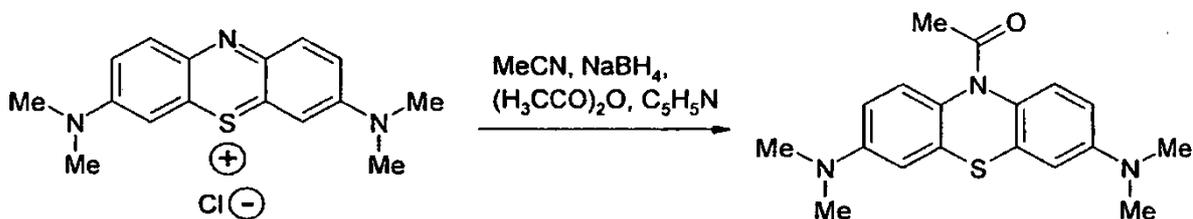
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



30 Síntesis usando metilhidrazina/piridina en un recipiente. A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de metiltioninio trihidrato (26,74 mmol, 10 g) y acetonitrilo (50 cm³). Se añadió metilhidrazina (53,5 mmol, 2,46 g) en cuatro partes iguales durante un periodo de tiempo de 30 minutos. La temperatura de la mezcla se mantuvo a 35 ml con un baño de agua fría y se agitó durante 30 minutos. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (267 mmol, 27,3 g) y piridina (80,2 mmol, (6,35 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (200 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 50 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (120 cm³) para proporcionar el compuesto del título (5,97 g, 68 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH). 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

Síntesis 15

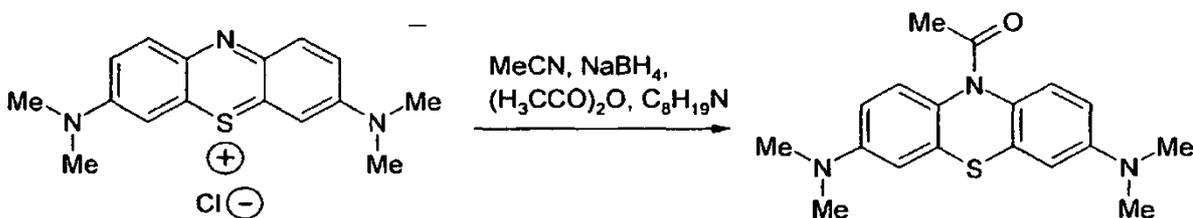
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



10 Síntesis usando borohidruro de sodio/piridina en un recipiente. A un matraz de fondo redondo de 500 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de metiltioninio trihidrato (0,134 mol, 50 g) y acetonitrilo (250 cm³). Se añadió borohidruro de sodio (0,174 mol, 6,6 g) en cuatro partes iguales durante un periodo de tiempo de 30 minutos. La temperatura de la mezcla se mantuvo a 35 ml con un baño de agua fría y se agitó durante 30 minutos. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (0,535 mol, 55 g) y piridina (0,174 mol, 13,76 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (250 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 50 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (500 cm³) para proporcionar el compuesto del título (26,7 g, 61 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

Síntesis 16

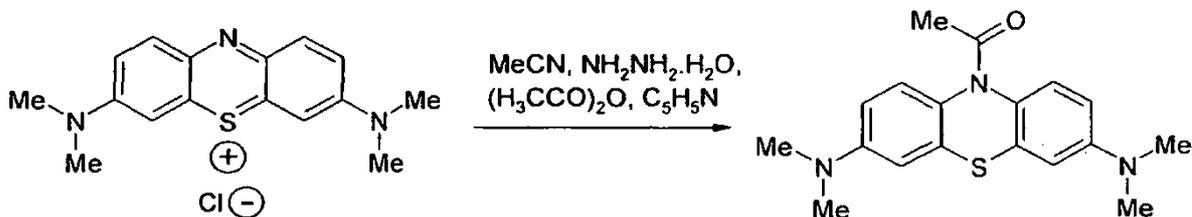
1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



30 Síntesis usando borohidruro de sodio/base de Hunig en un recipiente. A un matraz de fondo redondo de 500 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de metiltioninio trihidrato (80,2 mmol, 30 g) y acetonitrilo (150 cm³). Se añadió borohidruro de sodio (104 mmol, 3,94 g) en cuatro partes iguales durante un periodo de tiempo de 30 minutos. La temperatura de la mezcla se mantuvo a 35 ml con un baño de agua fría y se agitó durante 30 minutos. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (321 mmol, 32,75 g) y base de Hunig (diisopropiletilamina) (120 mmol, 15,55 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (200 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 50 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (300 cm³) para proporcionar el compuesto del título (13,55 g, 52 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

Síntesis 17

1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



5

Síntesis usando monohidrato de hidrazina/piridina en un recipiente. A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de metilitionio trihidrato (26,74 mmol, 10 g) y acetonitrilo (50 cm³). Se añadió monohidrato de hidrazina (58,8 mmol, 2,95 g) y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo y se agitó durante 10 minutos antes de enfriarse a 25 ml. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (424 mmol, 43,3 g) y piridina (124 mmol, 9,78 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (100 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 50 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (100 cm³) para proporcionar el compuesto del título (4,87 g, 56 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

10

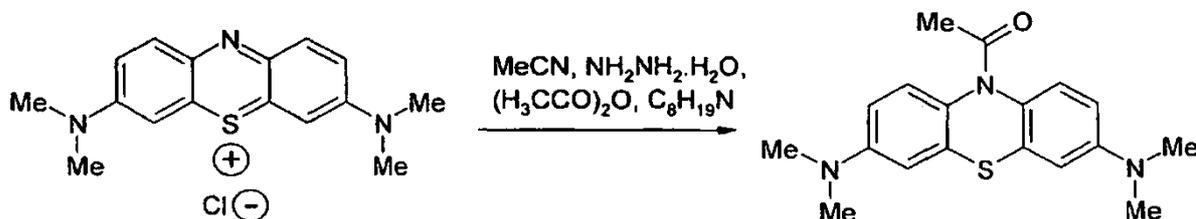
15

20

Síntesis 18

1-(3,7-Bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona

25



Síntesis usando monohidrato de hidrazina/base de Hunig en un recipiente. A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de metilitionio trihidrato (80,2 mmol, 30 g) y acetonitrilo (150 cm³). Se añadió monohidrato de hidrazina (176,5 mmol, 8,84 g) y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo y se agitó durante 10 minutos antes de enfriarse a 25 ml. A la suspensión de color amarillo/verde se añadieron anhídrido acético (794 mmol, 81,2 g) y base de Hunig (diisopropiletilamina) (232 mmol, 29,97 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (400 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 100 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (400 cm³) para proporcionar el compuesto del título (17,15 g, 65 %) en forma de un sólido de color gris claro. Pf 137 ml; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2910 (CH), 2876 (CH), 2856 (CH), 2799 (CH), 1659 (C=O), 1596 (NO₂), 1502 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 2,16 (3H, s, CH₃), 2,93 (12H, s, NCH₃), 6,59-6,62 (2H, d, J = 8,5, ArH), 6,69-6,71 (2H, d, J = 2,75, ArH), 7,08-7,47 (2H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 170,3 (C=O), 148,9 (ArC), 127,2 (ArC), 127,1 (ArC), 127,0 (ArC), 110,9 (ArC), 110,7 (ArC), 40,7 (NCH₃), 22,9 (CH₃); m/z (ES) 284,2 (100 %, [M - OAc]⁺), 328,1 (15 %, [M + H]⁺), 350,1 (41 %, [M + Na]⁺).

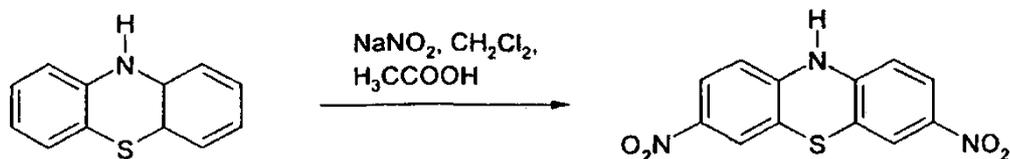
30

35

40

Síntesis 19

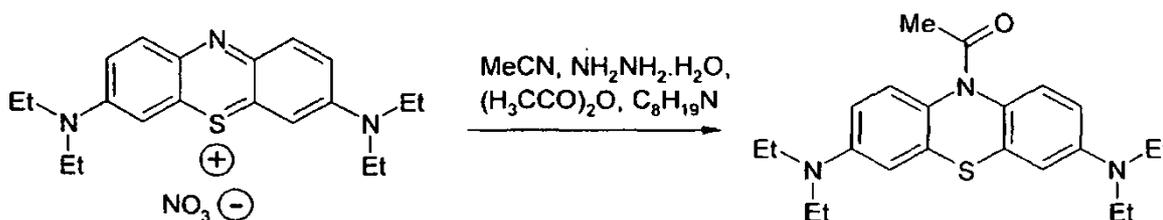
45 3,11-Dinitro-10 H-fenotiazina



5 A 10H-fenotiazina (20,00 g, 100 mmol), diclorometano (100 cm³) y ácido acético (40 cm³) se añadió nitrito (20,07 g, 300 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió más cantidad de ácido acético (40 cm³), diclorometano (100 cm³) y nitrito de sodio (20,07 g, 300 mmol) a continuación. Se añadió una cantidad adicional de 120 cm³ de ácido acético y se desmenuzó la mezcla de reacción espesa. La mezcla se agitó durante 3 horas. La suspensión se filtró y se lavó con 100 cm³ de cada uno de etanol, agua, y finalmente se añadió etanol para obtener un sólido de color púrpura/marrón. El residuo se agitó en DMF caliente y se dejó enfriar antes de filtrar el dinitroproducto, que se lavó con etanol (150 cm³) y se secó para dar el compuesto del título (24,88 g, 86 %) en forma de un sólido de color marrón; v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3331 (NH), 3294 (NH), 3229 (NH), 3101 (CH), 3067 (CH), 1602 (NO₂), 1558 (NO₂); δ_{H} (250 MHz; DMSO) 6,73-6,76 (2H, d, $J = 9$, ArH), 7,78 (2H, s, ArH), 7,89-7,85 (2H, d, $J = 9$, ArH).

Síntesis 20

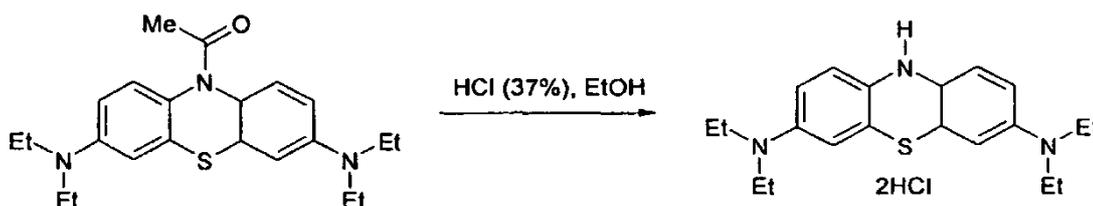
15 1-(3,7-Bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona



20 A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ bajo atmósfera de nitrógeno se añadió nitrato de etilitionio monohidrato (7,13 mmol, 3 g) y acetonitrilo (20 cm³). Se añadió monohidrato de hidrazina (16,4 mmol, 0,82 g) y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo y se agitó durante 10 minutos antes de enfriarse a 25 ml. A la suspensión de color marrón se añadieron anhídrido acético (114 mmol, 11,65 g) y base de Hunig (diisopropiletilamina) (21,4 mmol, (2,77 g). La mezcla se calentó a 90 ml durante 2 horas. La mezcla enfriada se vertió después cuidadosamente en una mezcla de agua con hielo (40 cm³) en diez porciones iguales con agitación para proporcionar un precipitado. El precipitado se agitó durante 30 minutos antes de filtrarse, se lavó con agua (3 x 25 cm³), y se secó al aire durante 30 minutos. El material bruto se cristalizó en etanol caliente (50 cm³) para proporcionar el compuesto del título (1,73 g, 63 %) en forma de un sólido de color gris claro. δ_{H} (250 MHz; CDCl₃) 7,0-7,5 (2H, s a, ArH), 6,64 (2H, s, ArH), 6,52 (2H, d, ArH), 3,35 (8H, c, 7, NCH₂), 2,18 (3H, s, CH₃), 1,16 (12H, t, 7, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl₃) 12,5 (CH₃), 22,9 (CH₃), 44,6 (NCH₂), 110,1 (ArC), 127,4 (ArC), 146,5 (ArC), 170,2 (C=O).

Síntesis 21

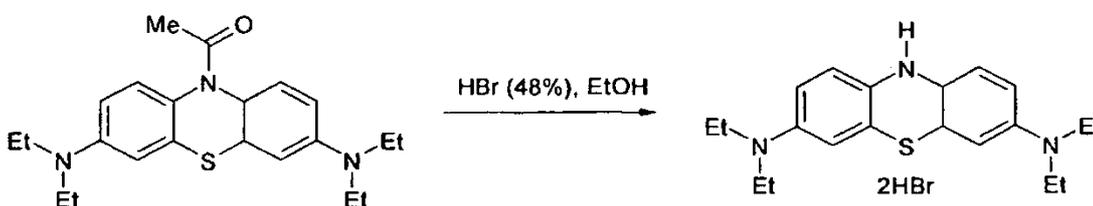
30 N,N,N',N'-Tetraetil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloruro de hidrógeno)



35 A un matraz de fondo redondo se añadió 1-(3,7-bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,30 mmol), etanol (5 cm³), y ácido clorhídrico (37 %, 1,3 cm³) y la solución se calentó a 80 ml durante 1 hora. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró para dar el compuesto del título (0,54 g, 100 %) en forma de un cristal de color verde claro. δ_{H} (250 MHz; CD₃OD) 7,07 (4H, a, ArH), 6,65 (2H, a, ArH), 3,35 (8H, a, NCH₂), 0,97 (12H, a, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; CD₃OD) 10,8 (CH₃), 55,1 (NCH₂), 116,6 (ArC), 120,4 (ArC), 121,5 (ArC), 123,6 (ArC), 132,6 (ArC), 144,5 (ArC).

Síntesis 22

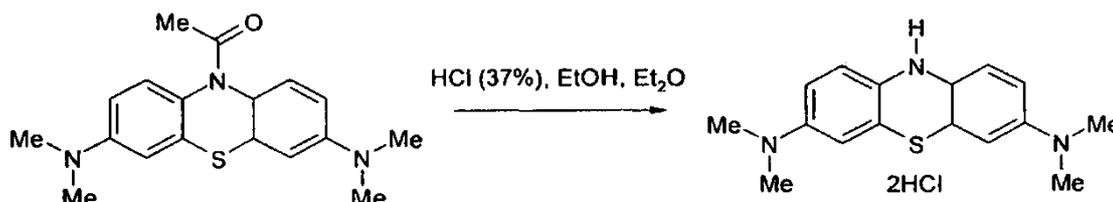
45 N,N,N',N'-Tetraetil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(bromuro de hidrógeno)



A un matraz de fondo redondo se añadió 1-(3,7-bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (0,5 g, 1,30 mmol), etanol (5 cm³), y ácido bromhídrico (48 %, 0,75 cm³) y la solución se calentó a 80 ml durante 1 hora. Una vez enfriada a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró para dar el compuesto del título (0,65 g, 100 %) en forma de un cristal de color amarillo claro. δ_{H} (250 MHz; D₂O) 7,05 (4H, a, ArH), 6,79 (2H, d a, ArH), 3,43 (8H, a, NCH₂), 1,05 (12H, t a, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; D₂O) 12,3 (CH₃), 56,2 (NCH₂), 117,9 (ArC), 121,4 (ArC), 122,4 (ArC), 124,5 (ArC), 133,5 (ArC), 145,1 (ArC).

Síntesis 23

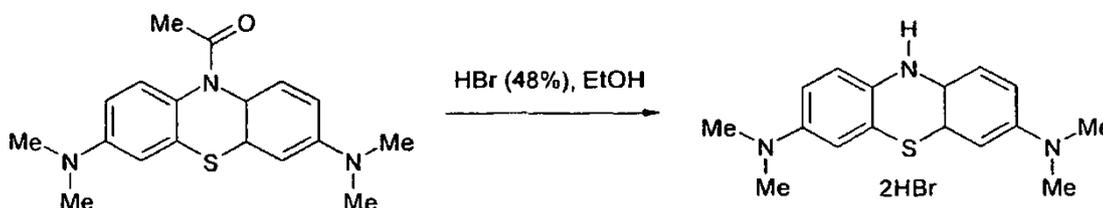
10 N,N,N',N'-Tetrametil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(cloruro de hidrógeno)



15 A un matraz de fondo redondo se añadió 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1 g, 3,05 mmol), etanol (10 cm³), y ácido clorhídrico (37 %, 3 cm³) y la solución se calentó a 80 ml durante 1 hora. Una vez enfriada a temperatura ambiente, se añadió dietil éter con agitación hasta obtener una solución de turbidez constante. Transcurrido el tiempo, se formó un precipitado, que se filtró y se lavó con dietil éter (10 cm³) proporcionando el compuesto del título (0,98 g, 90 %) en forma de un sólido de color verde claro. PF (des) 230 ml; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3500-3229 (NH), 3061 (CH), 3021 (CH), 2948 (CH), 2879 (CH), 2679 (CH), 2601 (CH), 1604 (CH), 1483 (CH), 1318 (CH); δ_{H} (250 MHz; D₂O) 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,67 (2H, d, J = 8,5, ArH), 7,16 (4H, s a, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; D₂O) 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃); m/z (ES) 286,1 (100 %, [M - H, 2Cl]⁺), 285,1 (40 %), 284,1 (41 %, [M - 3H, 2Cl]⁺).

Síntesis 24

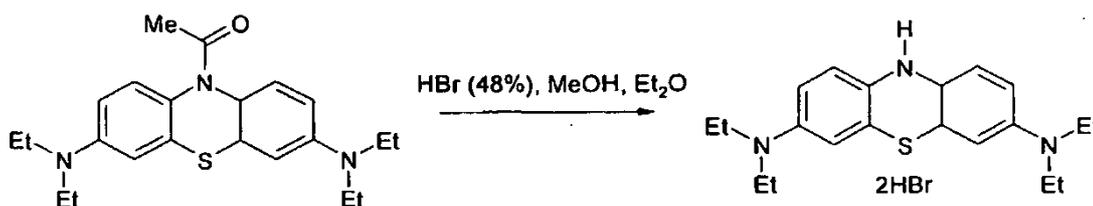
25 N,N,N',N'-Tetrametil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(bromuro de hidrógeno)



30 A un matraz de fondo redondo se añadió 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1 g, 3,05 mmol), etanol (10 cm³), y ácido bromhídrico (48 %, 4 cm³) y la solución se calentó a 80 ml durante 1 hora. Una vez enfriada a temperatura ambiente, se formó un precipitado, que se filtró y se lavó con dietil éter (10 cm³) proporcionando el producto del título (1,22 g, 89 %) en forma de un sólido de color mostaza claro. PF (des) 230 ml; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3500-3229 (NH), 3061 (CH), 3021 (CH), 2948 (CH), 2879 (CH), 2679 (CH), 2601 (CH), 1604 (CH), 1483 (CH), 1318 (CH); δ_{H} (250 MHz; D₂O) 3,18 (12H, s, NCH₃), 6,66 (2H, d, J = 8,75, ArH), 7,15 (4H, s, ArH); δ_{C} (62,9 MHz; D₂O) 144,3 (ArC), 138,9 (ArC), 122,4 (ArC), 120,8 (ArC), 120,7 (ArC), 117,6 (ArC), 48,9 (NCH₃).

Síntesis 25

40 N,N,N',N'-Tetraetil-10 H-fenotiazina-3,7-diamina bis(bromuro de hidrógeno)



45 A un matraz de fondo redondo se añadió 1-(3,7-bis-dietilamino-fenotiazin-10-il)-etanona (1,0 g, 2,60 mmol), metanol (10 cm³), y ácido bromhídrico (48 %, 2,94 cm³) y la solución se calentó a 80 ml durante 1 hora. Después de enfriar a 5 ml, se añadió a la mezcla éter dietílico, proporcionando una solución turbia. La solución se agitó durante 30 minutos y proporcionar el compuesto del título (0,83 g, 63 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. δ_{H}

(250 MHz; D₂O) 7,05 (4H, a, ArH), 6,79 (2H, d a, ArH), 3,43 (8H, a, NCH₂), 1,05 (12H, t a, CH₃); δ_c (62,9 MHz; D₂O) 12,3 (CH₃), 56,2 (NCH₂), 117,9 (ArC), 121,4 (ArC), 122,4 (ArC), 124,5 (ArC), 133,5 (ArC), 145,1 (ArC).

Ejemplo 10 - otros trastornos cognitivos o del SNC

5 Los métodos de tratamiento, profilaxia, diagnóstico o pronóstico de la presente invención, que utilizan los compuestos de DAPTZ en forma oxidada o reducida pueden en muchos aspectos aplicarse a uno cualquiera o más de las siguientes enfermedades.

Enfermedades de agregación de proteínas				
Proteína	Enfermedad	Dominio o mutaciones de agregación	Tamaño subunidad fibrilla (kDa)	Referencias
<i>Trastornos neurodegenerativos</i>				
Proteína priónica	Enfermedades priónicas (CJD, nvCJD, insomnio familiar fatal, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru)	<i>Formas heredadas y esporádicas</i> PrP-27-30; muchas mutaciones.	27	Prusiner (1998)
		Dominios fibrillogénicos: 113-120, 178:-191.202-218.		Gasset et al. (1992)
Proteína tau	enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, FTDP-17, CBD, parkinsonismo postencefálico, enfermedad de Pick, demencia compleja de Guam de tipo Parkinson,	<i>Formas heredadas y esporádicas</i>	10-12	Wischik et al. (1988)
		Tau truncada (dominio de unión a tubulina) 297-391.		
		Mutaciones en tau en FTDP-17.		Hutton et al. (1998)
		Muchas mutaciones en las proteínas de presenilina.		Czech et al. (2000)
Proteína β-amiloide	enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down	<i>Formas heredadas y esporádicas</i> Proteína β-amiloide; 1-42 (3). 11 mutaciones en APP en algunas familias.	4	Glennner & Wong, (1984) Goate et al. (1991)
Huntingtina	enfermedad de Huntington	Extremo N de la proteína con repeticiones ampliadas de glutamina.	40	DiFiglia et al. (1997)
Ataxinas (1,2, 3, 7)	Ataxias espinocerebelares (SCA1,2, 3, 7)	Proteína con repeticiones ampliadas de glutamina.		Paulson et al. (1999)
Atrofina	Atrofia dentarrubropalidolusiana (DRPLA)	Proteína con repeticiones ampliadas de glutamina.		Paulson et al. (1999)
Andrógeno receptor	Atrofia espinal y bulbar	Proteína con repeticiones ampliadas de glutamina.		Paulson et al. (1999)

Neuroserpina	Encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión neuronales (FENIB)	Neuroserpina; S49P, S52R.	57	Davis et al. (1999)
α-Sinucleína	enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewis, atrofia multisistémica	<i>Formas heredadas y esporádicas</i> A53T, A30P en algunas familias de PD autómicamente dominante rara.	19	Spillantini et al. (1998) Polymeropoulos et al. (1997)
Cistatina C	Angiopatia cerebral hereditaria (islandesa)	Cistatina C menos 10 restos; L68Q.	12-13	Abrahamson et al. (1992)
Superóxido dismutasa 1	Esclerosis lateral amiotrófica	Mutaciones SOD1.		Shibata et al. (1996)

Referencias del Ejemplo 10

5 Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction based analysis. *Human Genetics* 89, 377-380.

Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60, 363-384.

10 Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby, M.S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell, R.W. & Lomas, D.A. (1999) Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.

15 Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D.H., Gabriel, J.-M., Holtzman, D.M., Cohen, F.E., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992) Predicted α-helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10940-10 944.

Glennner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterisation of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885-890.

20 Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J.Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

30 Paulson, H.L. (1999) Human genetics '99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.

35 Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.

Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, 481-490.

40 Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 6469-6 473.

45 Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4506-4510.

Ejemplo 11 - Ensayo de disolución normalizado

Título: Fluido intestinal simulado para cápsulas que contienen DAPTZ.

- 5 **Realizado por:** Encap Drug Delivery, Unidades 4, 5 y 6, Oakbank Park Way, Livingston, West Lothian, EH53 0TH, Escocia, R.U.

1. Objetivo

- 10 Este método es adecuado para uso como Método de ensayo de disolución para proporcionar datos para la determinación del % de disolución en función del tiempo de formas farmacéuticas que contienen DAPTZ en fluido intestinal simulado (SIF), como se describe en la USP (<http://www.usp.org>) como medio de disolución.

- 15 El método se ilustra con cápsulas de 30 mg, 60 mg y 100 mg de MTC formuladas en Gelucire 44/14 y emplea el Equipo 2 de Disolución de la norma USP<711> (paleta y platina). Cuando es relevante en lo sucesivo,, el MTC se puede sustituir con un compuesto DAPTZ alternativo a la carga adecuada y.

2. CONDICIONES DEL MÉTODO**20 2.1 Reactivos**

- Agua - Calidad Lab. o equivalente
 Dihidrogenoortofosfato de potasio - Calidad Lab. o equivalente
 Hidróxido de sodio - Calidad Lab. o equivalente
 25 Pancreatina - Calidad USP
 Ácido clorhídrico - Calidad Lab. o equivalente

2.2 Seguridad

- 30 Los reactivos son pos. irritantes y pos. perjudiciales.

2.3 Condiciones de disolución

- Equipo de disolución
 35 Equipo- Equipo 2 de Disolución de la norma USP<711>(paleta y platina)
 Muestra- 1 cápsula colocada en una platina
 Velocidad de rotación- 75 rpm
 Temperatura - 37 ml ± 0,5 ml
 40 Medio de disolución - 1000 ml de fluido intestinal simulado
 Tiempos de Muestreo - 15, 30, 45, 60 minutos
 Duración del ensayo - 60 minutos
 Tamaño de la muestra - 5 ml (sin sustituir) (No filtrar)
 Condiciones del espectrofotómetro de UV
 45 Longitud de onda de determinación - 665 nm
 Referencia - SIF diluido
 Longitud de la Trayectoria - 10 mm
 Ancho de Banda - 2,0 nm

50 2.4 Preparación de fluido intestinal simulado (SIF)

- Para cada litro requerido, disolver 6,8 g de dihidrogenoortofosfato de potasio en 250 ml de agua, mezclar y añadir 77 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y 500 ml de agua. Añadir 10,0 g de mezcla de pancreatina, USP, y ajustar la solución resultante bien con hidróxido de sodio 0,2 N o ácido clorhídrico 0,2 N a un pH de 6,8 ± 0,1. Diluir con agua a 55 1000 ml. Esta solución debe prepararse nueva cada día.

2.5 Soluciones de patrón (preparar por duplicado)

- 60 Pesar con precisión aproximadamente 100 mg de MTC en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 80 ml de etanol-agua 50/50 con 15 min de sonicación y a continuación completar el volumen con etanol-agua 50/50 y mezclar bien (1000 µg/ml). Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen del matraz con SIF y mezclar bien (50 µg/ml). Transferir 4,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen del matraz con agua y mezclar bien (2,0 µg/ml). Esta es la solución de patrón.

65

2.6 Procedimiento de disolución

5 Añadir 1000 ml de fluido intestinal simulado a cada uno de los seis recipientes de disolución. Insertar las paletas a la velocidad de rotación correcta y dejar equilibrar a $37 \text{ ml} \pm 0,5 \text{ ml}$. Colocar seis cápsulas individuales en platinas de acero inoxidable y añadir una a cada recipiente apuntando el tiempo.

En cada uno de los tiempos especificados extraer una muestra de 5 ml.

2.7 Preparación de la referencia del fondo

10 Transferir 4,0 ml de SIF a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con agua y mezclar bien. Esta solución se va a usar como referencia de fondo en el espectrofotómetro de UV.

2.8 Preparación de la muestra

15 Para las cápsulas de 30 mg, transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar el volumen con agua y mezclar bien ($1,8 \mu\text{g/ml}$).

20 Para las cápsulas de 60 mg, transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar el volumen con agua y mezclar bien ($1,8 \mu\text{g/ml}$).

Para las cápsulas de 100 mg, transferir 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar el volumen con agua y mezclar bien ($2,0 \mu\text{g/ml}$). Estas son las soluciones de muestra.

2.9 Procedimiento

Determinar las soluciones de patrón y las soluciones de muestra en un espectrofotómetro de UV que se ha encendido y se ha dejado calentar a la temperatura de funcionamiento.

2.10 Verificación del patrón

30 Verificar los factores de respuesta promedio de dos soluciones de patrón.. El patrón 2 debe verificar que es el 98 - 102 % del patrón 1.

2.11 Cálculos

Llevar a cabo todos los cálculos con 2 cifras decimales

40 Determinar el % de liberación de MTC de cada muestra con respecto al patrón de referencia utilizando la ecuación adecuada:

$$\begin{aligned} \% \text{ liberación por cápsula de 100 mg} &= \text{Asam/Astd} \times \text{Wstd (100 mg)} \times \text{P} \times 100 \\ \% \text{ liberación por cápsula de 60 mg} &= \text{Asam/Astd} \times \text{Wstd (60 mg)} \times 2/3 \times \text{P} \times 100 \\ \% \text{ liberación por cápsula de 30 mg} &= \text{Asam/Astd} \times \text{Wstd (30 mg)} \times 1/3 \times \text{P} \times 100 \end{aligned}$$

45 *Asam* es la Absorbancia de MTC para la muestra individual a 665 nm
Astd es la Absorbancia de MTC promedio de dos patrones a 665 nm
Wstd es el peso promedio de los patrones MTC utilizados (mg)
 P es la Pureza del patrón de referencia utilizado, en forma decimal (por ejemplo 0,999)
 50 (Cuando el material inicial se utiliza como patrón, se aplica a P un factor de corrección de 1)

Represente el % de liberación de MTC frente al tiempo de disolución en una gráfica en la que los recipientes individuales se representan por separado.

55 Represente el % de liberación promedio de MTC, para los seis recipientes, frente al tiempo de disolución en una gráfica.

De esta manera, se puede usar generalmente la siguiente ecuación.

$$60 \quad \% \text{ de liberación para } x \text{ mg por cápsula} = \text{Asam/Astd} \times \text{Wstd}/(x) \times d \times \text{P} \times 100$$

Los expertos en la materia apreciarán que 'd' es la corrección, si es necesario, para dilución en la preparación de muestra como en la etapa 2.8 anterior.

2.12 Ensayo normalizado para fluido gástrico simulado (SGF)

65

Este ensayo normalizado se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente pero utilizando SGF en lugar de SIF. El SGF se preparó de acuerdo con USP29 como sigue:

5 Fluido Gástrico, Simulado, TS-Disolver 2,0 g de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina purificada, que se deriva de mucosa de estómago de porcino, con una actividad de 800 a 2500 unidades por mg de proteína, en 7,0 ml de ácido clorhídrico y agua suficiente para preparar 1000 ml. [Se describe la actividad de la pepsina en las especificaciones del Food Chemicals Codex en *General Tests and Assays*]. Esta solución de ensayo tiene un pH de aproximadamente 1,2.

10 Ejemplo 12 - Modelos cuantitativos de la progresión y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

El proceso químico que subyace en la enfermedad de Alzheimer es la agregación y el truncamiento de las proteínas tau. En este ejemplo, los inventores han utilizado modelos cinéticos de la ruta de reacción de tau para describir la progresión de la enfermedad y el efecto del tratamiento, y comparar la eficacia de los tratamientos que se dirigen a diferentes partes de la ruta.

1 Formulación de un modelo de equilibrio

20 La Figura 37A muestra la unión de una proteína tau a un agregado de proteínas tau truncadas, seguido por el truncamiento de la proteína tau para formar un agregado más grande. En la célula, esta reacción se incluye en una ruta más grande, con rutas para la creación de nuevas proteínas tau y para la eliminación de agregados.

25 La Figura 37B muestra un modelo natural. Aquí, S denota la cantidad de proteína tau soluble, y A la cantidad de tau truncada agregada. Para producir un modelo cinético, se deben especificar velocidades. Se sabe que la velocidad de agregación de tau aumenta con la disponibilidad de S y la disponibilidad de A [Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y.K., Roth, M. & Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like agregación de Tau by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 11213-11218]. Es natural suponer que existe un mecanismo de retroalimentación implicado en la creación de S y, de esta manera, la velocidad de producción de S depende de la cantidad de S [Lai, R.Y.K., Gertz, H.-J., Wischik, D.J., Xuereb, J.H., Mukaetova-Ladinska, E.B., Harrington, C.R., Edwards, P.C., Mena, R., Paykel, E.S., Brayne, C., Huppert, F.A., Roth, M. & Wischik, C.M. (1995) Examination of phosphorylated tau protein as a PHF-precursor at early stage Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 16, 433-445.]. Para otras rutas que se muestran, se hará la suposición cinética habitual de que la velocidad de una reacción es proporcional a la cantidad de reactivo.

35 Esto da lugar al modelo cinético que se muestra en la Figura 37C. En esta imagen, los inventores entienden, por ejemplo, que si $S(t)$ es la cantidad de proteína tau soluble en el tiempo t entonces

$$d/dt S(t) = \lambda(S(t)) - k_{so} S(t) - k A(t) S(t) \text{ [ecuación 1]}$$

40 Escalas temporales de progresión y cinética de la enfermedad

45 Un aspecto crucial de este modelo es la escala temporal en la cual progresa la enfermedad de Alzheimer, y su relación en la escala temporal en la que funcionan ecuaciones de tipo *ecuación 1*. Es opinión de los inventores que la dinámica de las ecuaciones cinéticas se produce en unas horas o días, y que la progresión de la enfermedad se debe al lento cambio de parámetros de tipo k_{AO} en una escala temporal de años. Wischik et al (1995) adoptaron una posición contraria, concretamente que la escala temporal se mida en años, y que la progresión de la enfermedad refleje el aumento gradual de $A(t)$ según se ha modelado por la cinética.

50 Existen dos pruebas principales de evidencia para la separación de escalas temporales. En primer lugar, experimentos *in vitro* [documento WO96/30766], en los que tau soluble se incubaba con tau truncada en fase sólida, que muestran que la mayoría de tau soluble se ha unido en cuestión de horas. La segunda prueba de evidencia proviene de experimentos con ratones transgénicos que expresan la proteína tau truncada humana [documento WO 02/059150]. Estos ratones desarrollan lentamente la patología tau de la enfermedad de Alzheimer durante periodos de meses, tal como se ha medido por pruebas cognitivas y por examen neuropatológico [Zabke, C., Dietze, S., Stamer, K., Rickard, J.E., Harrington, C.R., Theuring, F., Seng, K.M. & Wischik, C.W. (2008) Early and advanced stages of tau aggregation in transgenic mouse models. *International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, 26-31 Julio 2008, P1-054*]. Cuando se trata con dosis orales diarias de MTC en un periodo de 17 días, la patología de la enfermedad de Alzheimer se redujo [Harrington, C., Rickard, J.E., Horsley, D., Harrington, K.A., Hindley, K.P., Riedel, G., Theuring, F., Seng, K.M. & Wischik, C.M. (2008) Methylthioninium chloride (MTC) acts as tau aggregation inhibitor (TAI) in a cellular model and reverses tau pathology in transgenic mice models of Alzheimer's disease. *International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, 26-31 de julio de 2008, 01-06-04*]. Por tanto, la escala temporal de la cinética es del orden de días, aunque la escala temporal de la progresión de la enfermedad es mucho más larga, medida en meses para estos ratones.

65 La técnica matemática de los inventores debe por tanto ser esta: se supone que cualquier paciente tiene constantes de velocidad que dependen de cuánto tiempo ha padecido la enfermedad, es decir $k_{AO}(a)$ etc. donde a es el número

de años desde el inicio; y se supone que los niveles resultantes de S y A son los valores de equilibrio del sistema dinámico. Para concretar, los inventores necesitan resolver ecuaciones similares a esta forma modificada de la ecuación 1:

5
$$\lambda(S) - k_{S0} S - k A S = 0. \quad [\text{ecuación 2}]$$

Los inventores han omitido t, ya que no están interesados en la dinámica del sistema sino solo en el comportamiento del equilibrio. Escribirán algunas veces **S(a)** etc. para resaltar la dependencia de los valores de las constantes de velocidad.

10 **Contabilización para la creación de nuevos agregados**

La reacción de agregación (Figura 37A) comienza con una molécula de agregado y acaba con una molécula de agregado, de tal manera que describe el *crecimiento* de los agregados existentes y no la *creación* de los nuevos agregados. Igualmente en el sistema cinético (Figura 37C), si los inventores no modelan la creación de agregados, entonces el combinado de A disminuirá sostenidamente, lo que significa que la solución de equilibrio es $A = 0$

La manera más sencilla de tener en cuenta la creación de nuevos agregados es mediante la alteración de la estequiometría de la reacción de agregación. Específicamente, los inventores supondrán el esquema que se muestra en la Figura 37D (aunque los valores reales de n_1 y n_2 son desconocidos).

Por ejemplo, si $n_1 = 2,3$ y $n_2 = 1,87$ entonces, a partir de 230 moléculas tau y 100 moléculas de agregados existen 87 nuevas moléculas de agregados producidas.

25 **Sumario del modelo**

Los inventores han propuesto el modelo de sistema dinámico que se muestra en la Figura 37E.

Las ecuaciones del estado de equilibrio de este sistema son:

30
$$\lambda(S) = k_{S0}S + n_1 k AS \quad [\text{ecuación 3}]$$

$$n_2 k AS = k AS + k_{A0}(\alpha) A \quad [\text{ecuación 4}]$$

En el resto de este Ejemplo se describirán algunos experimentos que permiten cuantificar las constantes de velocidad y de esta manera predecir el efecto del tratamiento.

35 **2 Cuantificación de la progresión de la enfermedad**

Lai et al. (1995) estudiaron numerosos pacientes de Alzheimer con posterioridad a su defunción y encontraron una relación entre A y S:

40
$$S = f(A) = \alpha/A^\beta - 1 \quad [\text{ecuación 2}]$$

donde $\alpha = 2450$ y $\beta = 0,3459$.

Mukaetova-Ladinska et al. (Mukaetova-Ladinska, E.B., Garcia-Siera, F., Hurt, J., Gertz, H.J., Xuereb, J.H., Hills, R., Brayne, C., Huppert, F.A., Paykel, E.S., McGee, M., Jakes, R., Honer, W.G., Harrington, C.R. & Wischik, C.M. (2000) Staging of cytoskeletal and β -amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. American Journal of Pathology 157, 623-6 36) estudiaron numerosos pacientes de Alzheimer con anterioridad y posterioridad a la defunción, y encontraron una relación entre los niveles de PHF y la etapa de Braak del paciente **B**:

45
$$\text{PHF} = g(B) = \text{Exp}(\gamma B/(\delta - B)) - 1 \quad [\text{ecuación 1}]$$

50 donde $\gamma = 4,8383$ y $\delta = 9,8156$.

Es razonable suponer que los niveles de PHF son proporcionales a los niveles de los agregados de tau:

$$A = \epsilon \text{ PHF} \quad \text{[ecuación 2]}$$

aunque ϵ sea desconocido.

5 Ohm et al. [Ohm, T.G., Muller, H., Braak, H. & Bohl, J. (1995) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the rate of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neuroscience 64, 209-217] estudiaron la distribución de las etapas de Braak en una población, y en el **apéndice**, los inventores describen cómo, a partir de estos datos, se puede obtener una relación entre una etapa de Braak promedio **B** y el tiempo hasta el inicio de la demencia, en años:

10

$$B = h(a) = \text{***} \quad \text{[ecuación 8]}$$

Usando estas tres relaciones, se puede reescribir las ecuaciones 3-4 de equilibrio para obtener:

$$\lambda(S) = k_{S0} S + n_1 k f^{-1}(S) S \quad \text{[ecuación 9]}$$

$$k_{A0}(a) = (n_2 - 1) k f(\epsilon g(h(a))) \quad \text{[ecuación 10]}$$

3. Cuantificación del efecto de un fármaco

15

El documento WO 02/055720 describe un modelo celular de la enfermedad de Alzheimer, y las medidas que demuestran el efecto de MTC sobre los niveles de **A**. Las células se habían modificado genéticamente para producir tau S soluble a una velocidad constante. Por sí mismas, estas no forman agregados espontáneamente, y de esta manera, las células han de modificarse adicionalmente para producir tau **T** truncada a una velocidad constante. Los inventores suponen que las células tienen un mecanismo normal para destruir **T**, y que el efecto del fármaco es abrir una ruta por la cual **A** se disuelve y se convierte en **T**. Por simplicidad, se supone que aquí S se usa solo en la ruta del Alzheimer. Los inventores tienen, por tanto, el modelo cinético que se muestra en la Figura 37F.

20

Los inventores han escrito $k_{AT}(d)$ para resaltar que esta constante de velocidad depende del nivel de dosis **d**, y suponen que $k_{AT}(0) = 0$. Los inventores deben escribir estrictamente $k_{A0}(a_{cel})$, donde a_{cel} es el tiempo en años desde el inicio de la enfermedad en estas células, aunque los inventores lo suprimen en sus ecuaciones.

25

Las ecuaciones de equilibrio para este sistema son:

$$\lambda = k A S n_1 \quad \text{[ecuación 10]}$$

$$\mu + k_{AT}(d) A = T (k_{T0} + k_{TA}) \quad \text{[ecuación 11]}$$

$$k_{TA} T + n_2 k A S = k A S + A (k_{AT}(d) + k_{A0}) \quad \text{[ecuación 12]}$$

30

Utilizando las ecuaciones 11 y 12, los inventores pueden eliminar S y T de la ecuación 12 para obtener:

$$A = [(n_2 - 1) / n_1 \lambda + k_{TA} / (k_{T0} + k_{TA}) \mu] / [k_{A0} + k_{AT}(d) k_{T0} / (k_{T0} + k_{TA})]$$

35 Escribiendo **A(0)** para el valor inicial de tau agregado, en ausencia de cualquier fármaco, entonces:

$$A(0) = [(n_2 - 1) / n_1 \lambda + k_{TA} / (k_{T0} + k_{TA}) \mu] / k_{A0}$$

40

Estas dos ecuaciones se cancelan convenientemente, y nos dicen que:

$$k_{AT}(d) / k_{A0} = (1 + k_{TA} / k_{T0}) (A(0) / A(d) - 1)$$

(Los inventores han escrito aquí para resaltar que el nivel observado de agregados A es función de la dosis d).

45

El documento WO 02/055720 informa que:

$$A(d)/A(0) = g(d) = \zeta d^\theta / (\eta^\theta + d^\theta) + 1 \quad [\text{ecuación 12}]$$

donde $\zeta = -1,0665$, $\eta = 51,735$ y $\theta = 1,3328$.

5

4. Cuantificación del efecto combinado

Los inventores pueden preguntar ahora: ¿cómo esperamos que el fármaco altere la progresión de la enfermedad? Ahora, el modelo cinético de los inventores es el que se muestra en la Figura 37G, con las ecuaciones de equilibrio:

10

$$\lambda(S) = k_{SD}S + n_1 k AS, \quad [\text{ecuación 15}]$$

$$k_{AT}(d) A = T (k_{TD} + k_{TA}) \quad [\text{ecuación 16}]$$

$$k_{TA} T + n_2 k A S = k A S + A (k_{AT}(d) + k_{AO}(a)) \quad [\text{ecuación 17}]$$

Los inventores desean resolver estas ecuaciones resolver estas ecuaciones para $A = A(a, d)$. Para conseguirlo, es más conveniente usar la ecuación 16 para expresar T en función de A :

15

$$T = A k_{AT}(d) / (k_{TD} + k_{TA})$$

y a continuación sustituir en 17 para encontrar una expresión para $S = S(a, d)$

$$(n_2 - 1) k S(a, d) = k_{AO}(a) + k_{AT}(d) k_{TD} / (k_{TD} + k_{TA})$$

20

y finalmente usar las ecuaciones 15 y 9 para convertirlo en una expresión para $A(a, d)$.

$$A(a, d) = f^{-1}(S(a, d)) \quad [\text{ecuación 18}]$$

25

La expresión para $S(a, d)$ puede tener más utilidad si se escribe como una relación que implica $S(a_0, 0)$ donde a_0 es el tiempo desde el inicio de la enfermedad cuyo tratamiento se ha comenzado. Los inventores deben sustituir también en las expresiones que han obtenido para $k_{AO}(a)$ y $k_{AT}(d)$ y obtener:

$$S(a, d) / S(a_0, 0) = k_{AO}(a) / k_{AO}(a_0) + k_{AO}(a_{cell}) / k_{AO}(a_0) (1/g(d) - 1) \quad [\text{ecuación 19}]$$

30

La fórmula de $g(d)$ se ha proporcionado anteriormente en la ecuación 14, la fórmula de f se ha proporcionado en la ecuación 8, y la fórmula de $k_{AO}(a)$ se proporciona en la ecuación 9.

Interpretación del resultado.

35

Si dejamos $d = 0$ la ecuación 19 da:

$$S(a, 0) / S(a_0, 0) = k_{AO}(a) / k_{AO}(a_0)$$

40

A medida que aumenta, la ruta por la cual los agregados se aclaran degenera, y $k_{AO}(a)$ disminuye hacia 0; de esta manera $S(a, 0)$ disminuye hacia 0 y, de acuerdo con la ecuación 18, A aumenta hasta infinito. Mediante el tratamiento con el fármaco a una dosis fija, los inventores evitan que S disminuya por debajo de un determinado umbral:

$$S_{\text{thresh}} = k_{AO}(a_{cell}) / k_{AO}(a_0) (1/g(d) - 1)$$

45

lo que significa que evitan que A aumente por encima de un determinado umbral $f^{-1}(S_{\text{thresh}})$. En otras palabras, este tratamiento no retarda meramente la progresión de la enfermedad, la detiene.

5. Un modelo de tratamiento alternativo

Se ha sugerido que se puede tratar la enfermedad de Alzheimer inhibiendo la reacción de unión tau-tau (Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y.K., Roth, M. & Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer diseaselike tau aggregation by phenothiazines. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 11213-11218). ¿Qué efecto podría esto tener sobre la progresión de la enfermedad? Si se considera el modelo cinético que se muestra en la Figura 37H donde $k(d)$ es el valor de la constante de velocidad, una vez que la reacción se ha inhibido por este presunto fármaco a la dosis d . Las ecuaciones de equilibrio son:

$$\lambda(S) = k_{S0}S + n_1 k(d) AS$$

$$n_2 k(d) A S = k(d) A S + A k_{A0}(a)$$

Resolviendo estas, y sustituyendo en la ecuación 8, se obtiene:

$$S(a,d)/S(a_0,0) = [k_{A0}(a)/k_{A0}(a_0)] / [k(d)/k(0)]$$

$$A(a,d) = f^{-1}(S(a,d)) / [k(d)/k(0)]$$

Se puede observar que el nivel de $S(a,d)$ disminuye a 0 a medida que el tiempo aumenta, para cualquier dosis fija d . Por tanto, el nivel de A aumenta hasta el infinito. En otras palabras, un tratamiento basado únicamente en la inhibición de la reacción de la unión tau-tau retardaría la progresión de la enfermedad, pero no la detendría.

6. Resultados numéricos

La Figura 37I ilustra estos resultados numéricamente. La representación de la izquierda muestra el efecto de un fármaco que crea una nueva ruta $A \rightarrow T$, como se describe en la Sección 3; la representación de la izquierda muestra el efecto de un fármaco que inhibe la ruta $S+A \rightarrow A$, como se describe en la Sección **Error! Reference source not found!**. En lugar de representar gráficamente el nivel de los agregados de tau A , los inventores han representado MMSE, utilizando la relación entre MMSE y la etapa de Braak B derivada de los datos de Ohm et al. (1995).

$$MMSE = \sigma(\tau-B)/(\rho-B)$$

donde $\sigma = 56,2204$, $t = 6,5969$ y $p = 11,599$, junto con las relaciones en las ecuaciones 6 y 7, y ajustando $\epsilon = 1$. Los inventores han representado esto como una función del número de años desde el comienzo del tratamiento, para un paciente que comenzó el tratamiento a $MMSE = 15$. La línea punteada muestra el deterioro de MMSE sin tratamiento; las otras líneas muestran el efecto del tratamiento a varios niveles de dosis. Los niveles de dosis de los inventores que se ilustran aquí son (para la representación de la izquierda) $d = 25, 50$ y 90 ; y (para la representación de la derecha) $k(d)/k(0) = 45 \%, 20 \%, 7 \%$.

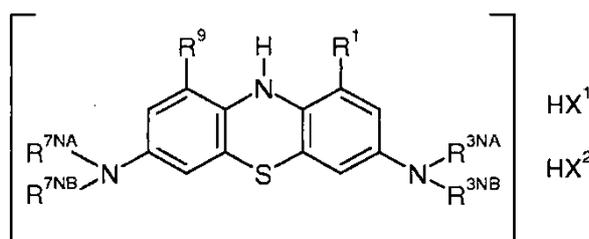
7. Implicaciones para la eliminación de los agregados de tau en la progresión de la enfermedad

Estas figuras (Figura 37I) ilustran lo que los inventores han explicado ya algebraicamente, concretamente que la inhibición de la agregación tau-tau solo puede retrasar la progresión de la enfermedad, mientras que se puede detener abriendo una nueva ruta para la disolución de los agregados. Esto se puede representar esquemáticamente en la Figura 39. Se puede evitar la agregación de Tau interviniendo en dos sitios: en primer lugar inhibiendo la entrada de tau en el ciclo de agregación y en segundo lugar, potenciando la eliminación de los agregados procedentes del ciclo de agregación (Figura 39). El nivel de agregados de tau o de filamentos helicoidales emparejados progresa estacionariamente con el avance de la edad. Si se evita la entrada de tau, entonces, el nivel de los PHF disminuirá hasta un determinado nivel, previsto por la estadificación de Braak, después de lo cual, la velocidad de progresión continuará como antes. Solo cuando la eliminación de los agregados de tau se potencia, los niveles de tau comenzarán a disminuir en el tiempo (Figura 39). En dichas circunstancias, se diría que un fármaco que tuviera dicho efecto sería un modificador de la enfermedad. Wischik et al. (Wischik, C.M., Lai, R.Y.K. & Harrington, C.R. (1997) Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. En Microtubule-Associated Proteins: Modifications in Disease. (Eds. J. Avila, R. Brandt, y K. S. Kosik) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 185-241) analizaron que se puede iniciar la agregación de tau mediante la siembra de proteínas que proceden de la renovación mitocondrial relacionada con la edad (por ejemplo, proteína nuclear 2 del complejo III, porina y subunidad 9 de la ATP sintasa). Estos agregados de tau pueden ensamblarse en los PHF y/o penetrar en la ruta de eliminación endosómica-lisosómica, sumándose a la congestión de esta ruta con

la edad avanzada (Figura 40). La eliminación potenciada de los agregados de tau procedentes de esta ruta disminuirá la carga metabólica en las neuronas. Este Ejemplo demuestra cómo esto podría detener la progresión de la enfermedad en lugar de solo retrasar solo su progreso.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ) en una forma reducida cristalina estable para su uso en un método de tratamiento o de profilaxis de un trastorno cognitivo o del SNC en un paciente, en donde dicho trastorno es uno que sea susceptible al tratamiento mediante dicho compuesto de DAPTZ, método que comprende administrar por vía oral a dicho paciente una dosis unitaria que contiene dicho compuesto de DAPTZ como principio activo, en donde el paciente es alguien al que se ha evaluado que padece un trastorno hematológico, los efectos de dicho trastorno hematológico se pueden agravar, por otra parte, debido al compuesto de DAPTZ.
2. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis unitaria es una formulación de liberación retardada del compuesto de DAPTZ reducido a una concentración entre 100-1000 mg.
3. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la formulación de liberación retardada libera menos de <50 % en 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas u 8 horas.
4. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la formulación comprende como máximo un 5 % en peso de compuesto de DAPTZ oxidado.
5. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trastorno cognitivo o del SNC es una tauopatía.
6. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno cognitivo o del SNC se selecciona entre:
- (i) enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia, degeneración palido-ponto-nigral, síndrome de Guam-ALS; degeneración palido-nigro-luisiana, degeneración corticobasal, o
 - (ii) es un deterioro cognitivo leve, o
 - (iii) es una sinucleopatía, que es opcionalmente la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewis, atrofia multisistémica, parkinsonismo inducido por fármacos o fallo autónomo puro (PAF).
7. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se sabe que el paciente padece una hemoglobinopatía que es opcionalmente anemia falciforme, talasemia, metahemoglobinemia; una anemia que es opcionalmente una anemia hemolítica; una neoplasia hematológica que es opcionalmente linfoma, mieloma, plasmacitoma o leucemia, una coagulopatía que es opcionalmente hemofilia.
8. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el paciente tiene más de 70 años de edad y está sometido a una dolencia anémica relacionada con la edad que es opcionalmente displasia mieloide.
9. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho compuesto de DAPTZ se selecciona entre compuestos de las siguientes fórmulas y sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos:



en la que:

- 55 cada uno de R^1 y R^9 se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} y alquilo C_{1-4} halogenado;
 cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} y alquilo C_{1-4} halogenado;

cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} y alquilo C_{1-4} halogenado;
 cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido prótico.

- 5 10. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde cada uno de R^1 y R^9 es independientemente H.
- 10 11. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde cada R^{3NA} y R^{3NB} y R^{7NA} y R^{7NB} es independientemente -Me, -Et, -nPr, -nBu, -CH₂-CH=CH₂ o -CF₃.
12. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde cada uno de los grupos -N(R^{3NA})(R^{3NB}) y -N(R^{7NA})(R^{7NB}) es: -NMe₂.
- 15 13. Uso de un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la preparación de una dosis unitaria de un medicamento para su uso en el método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 20 14. Un compuesto de 3,7-diaminofenotiazina (DAPTZ) en una forma reducida cristalina estable para su uso en un método para marcar una proteína agregada relacionada con enfermedad asociada a un trastorno neurodegenerativo en el cerebro de un paciente, tal como para pronosticar o diagnosticar dicho trastorno, en donde dicha proteína agregada relacionada con enfermedad es una que es susceptible al marcaje mediante dicho compuesto de DAPTZ, método que comprende administrar por vía oral a dicho paciente una unidad de dosificación que contiene dicho compuesto de DAPTZ como principio marcado activo,
- 25 en donde el paciente es alguien al que se ha evaluado que padece un trastorno hematológico, los efectos de dicho trastorno hematológico se pueden agravar, por otra parte, debido al compuesto de DAPTZ.
- 30 15. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el compuesto de DAPTZ es como se ha definido en una reivindicación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.
- 35 16. Un compuesto de DAPTZ en una forma reducida cristalina estable para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el compuesto de DAPTZ incorpora, está conjugado con, está quelado con, o está asociado de cualquier otra forma con una o más etiquetas detectables opcionalmente seleccionados entre: isótopos, radioisótopos, átomos emisores de positrones, etiquetas de resonancia magnética, colorantes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos o restos terapéuticos.

Fig. 1

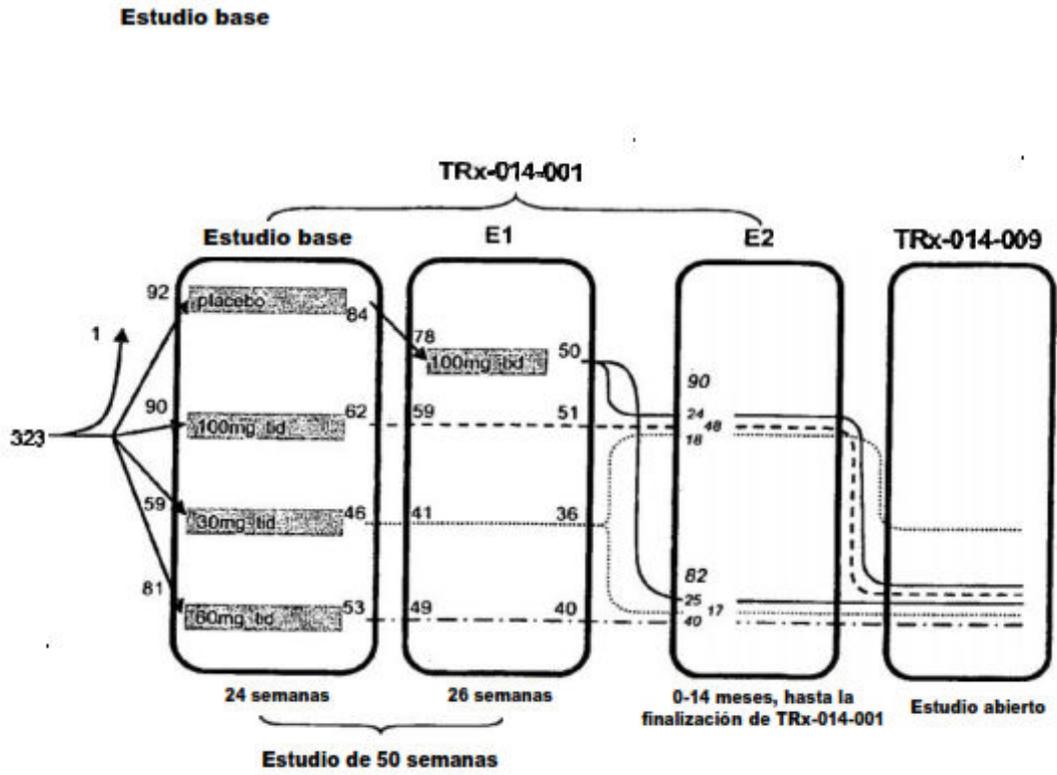


Fig. 2.

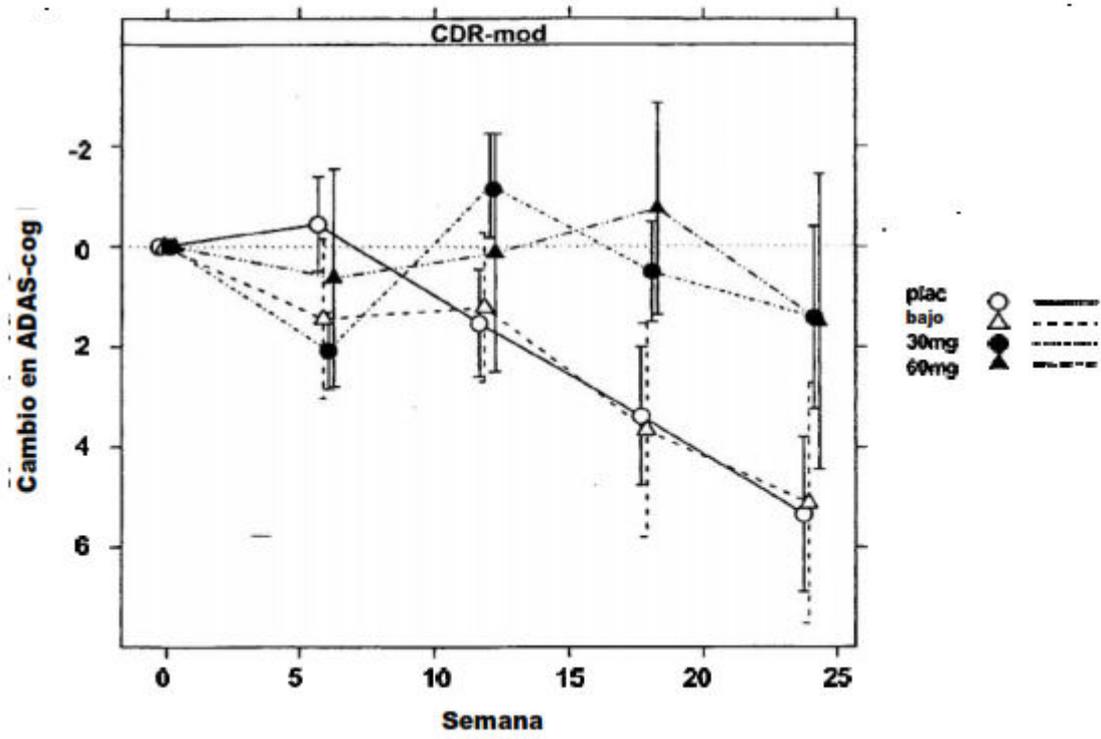


Fig. 3.

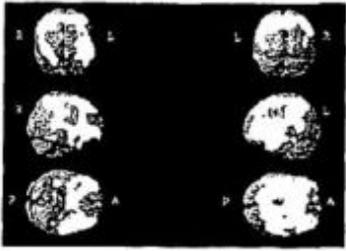
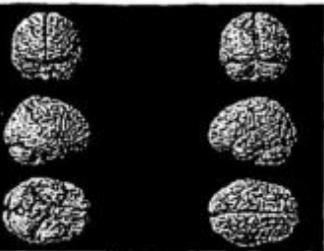
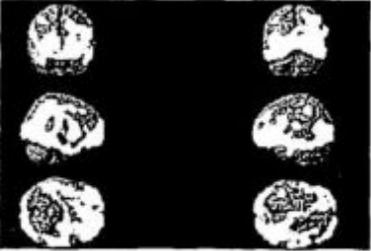
Regiones con declive funcional significativo entre el inicio y la visita 4 (Semana 18)		Regiones con diferencia significativa entre el placebo y rember™ 30/60 mg
Todos los sujetos tratados con placebo ⁽¹⁾	Todos los sujetos tratados con rember™ 30/60 mg ⁽²⁾	Sujetos con CDR leve ⁽³⁾
		

Fig. 4

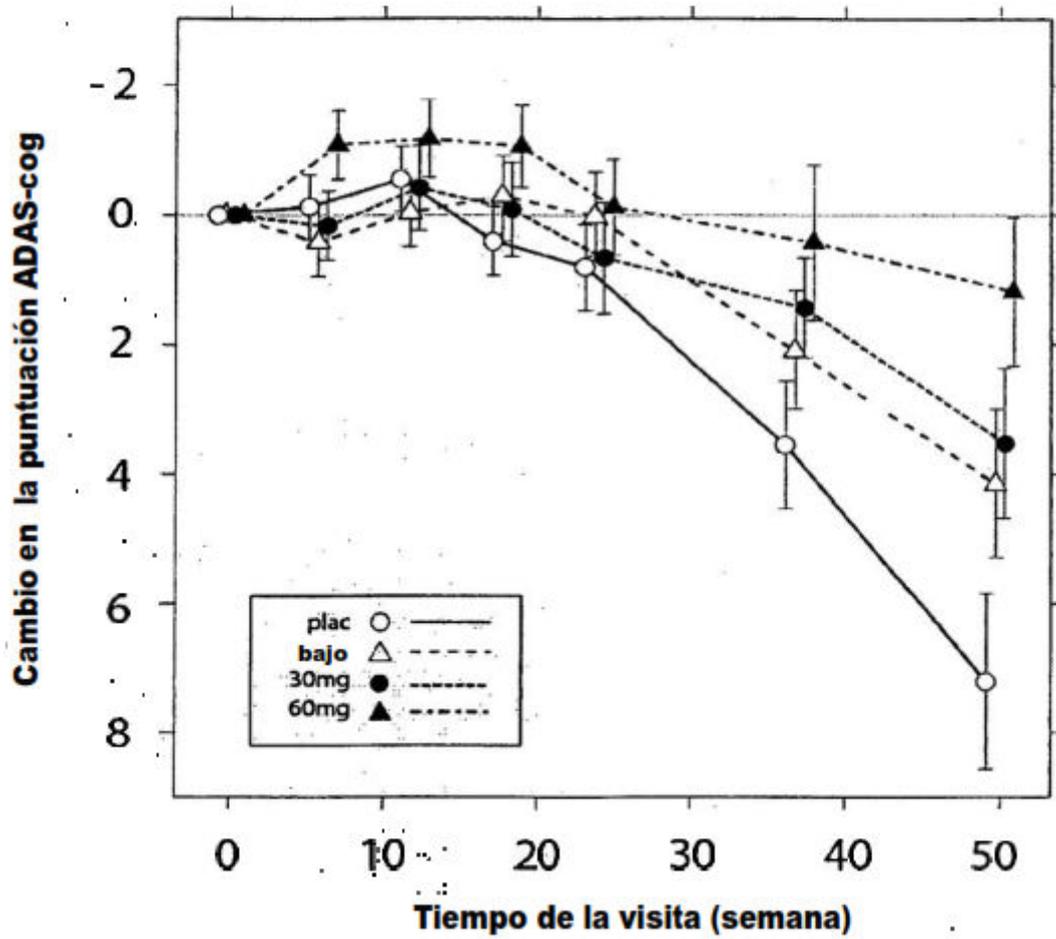


Fig. 5.

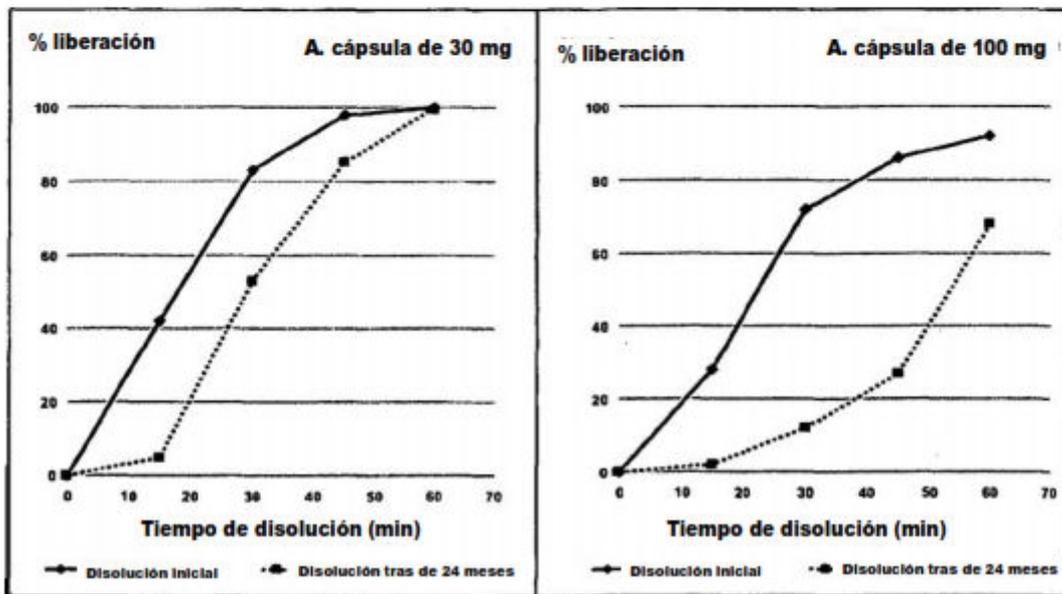


Fig. 6A.

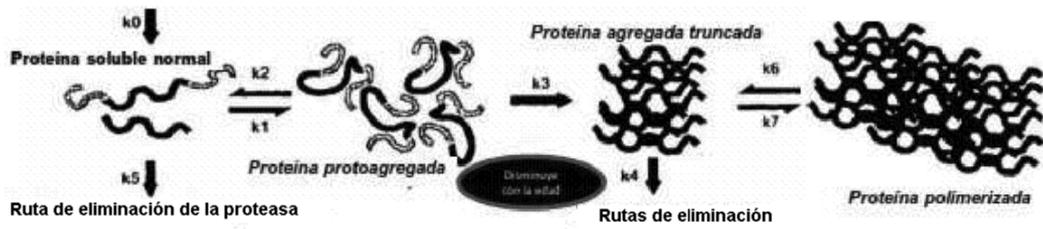


Fig. 6B.

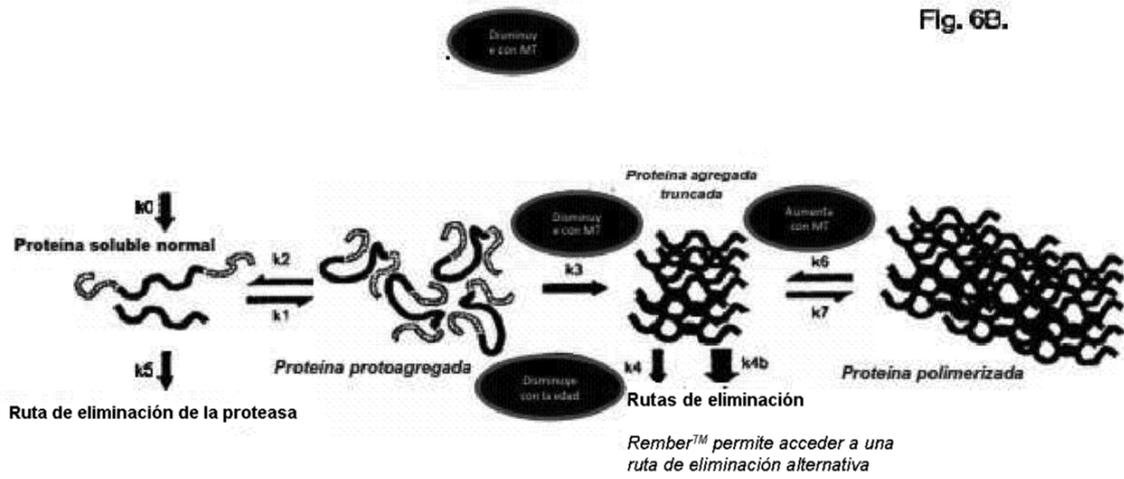


Fig. 7

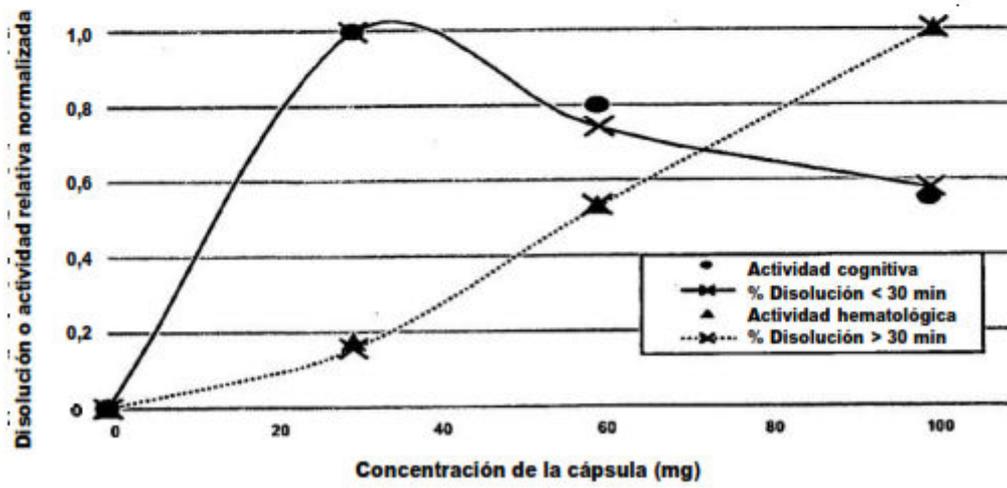


Fig. 8.

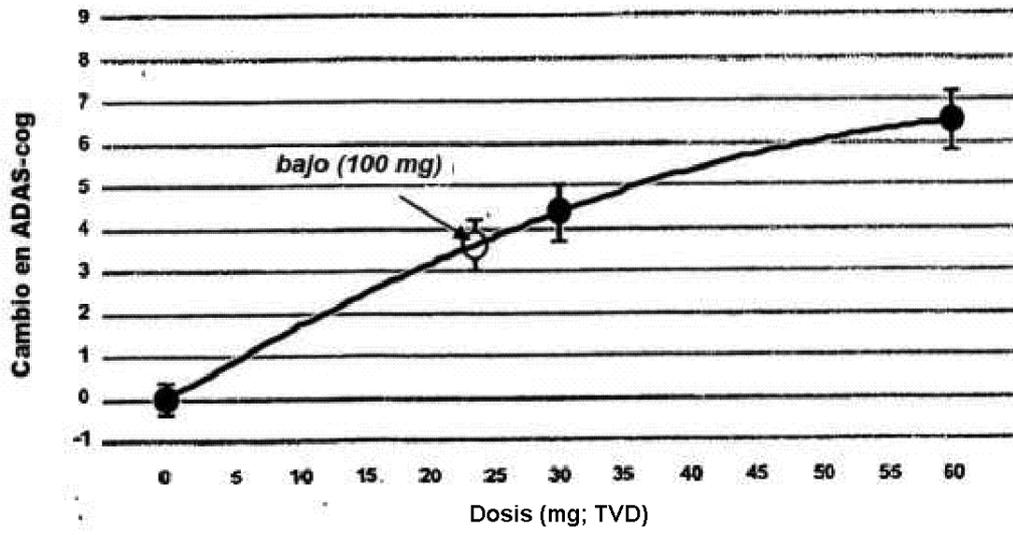


Fig. 9.

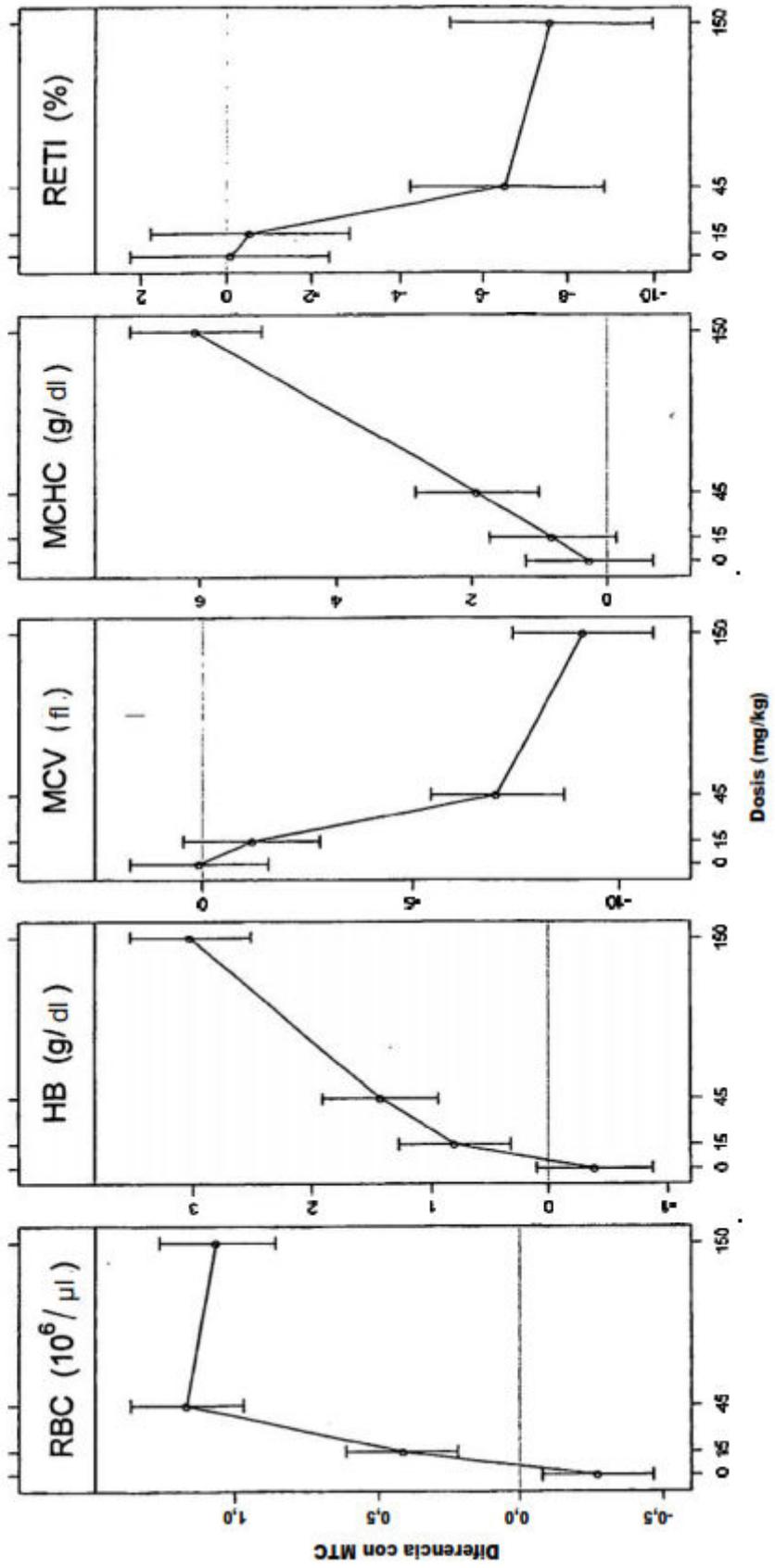


Fig. 10.

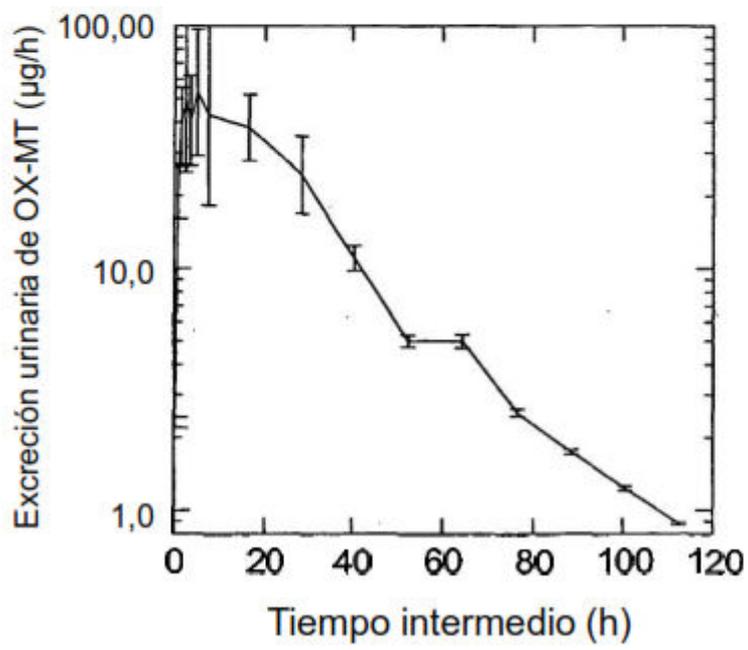


Fig. 11.

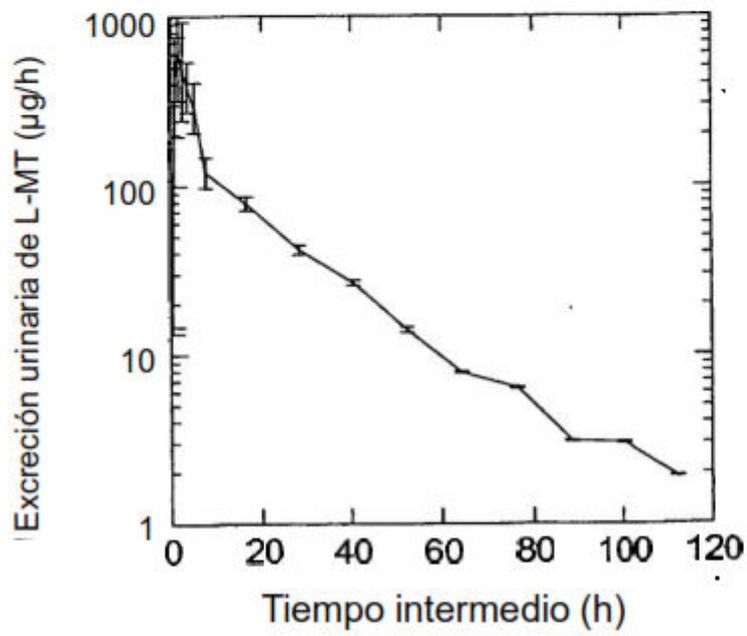


Fig. 12

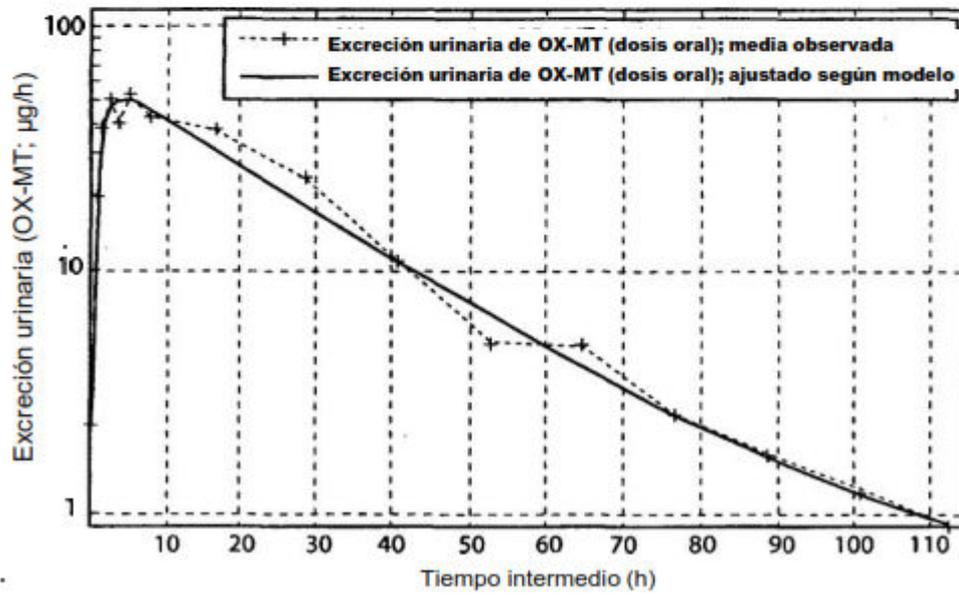


Fig.13

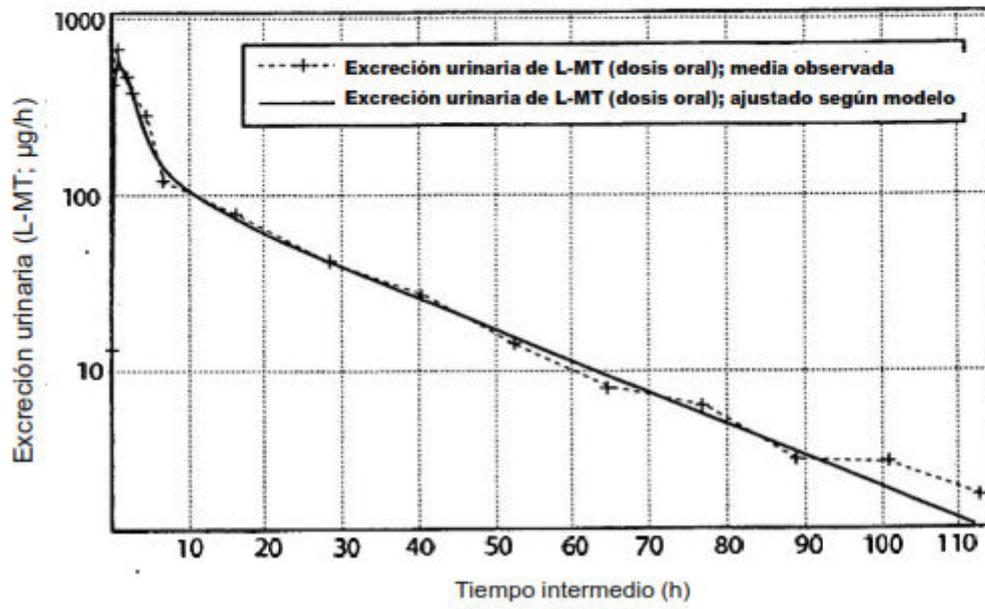


Fig. 14.

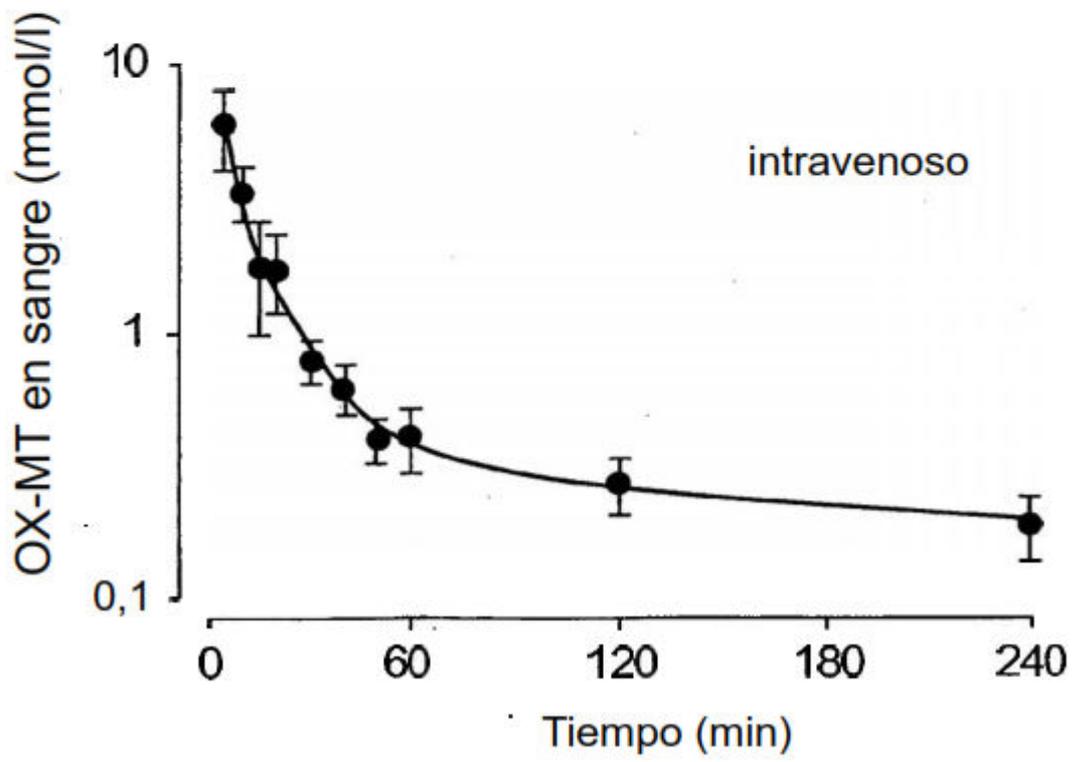


Fig. 15.

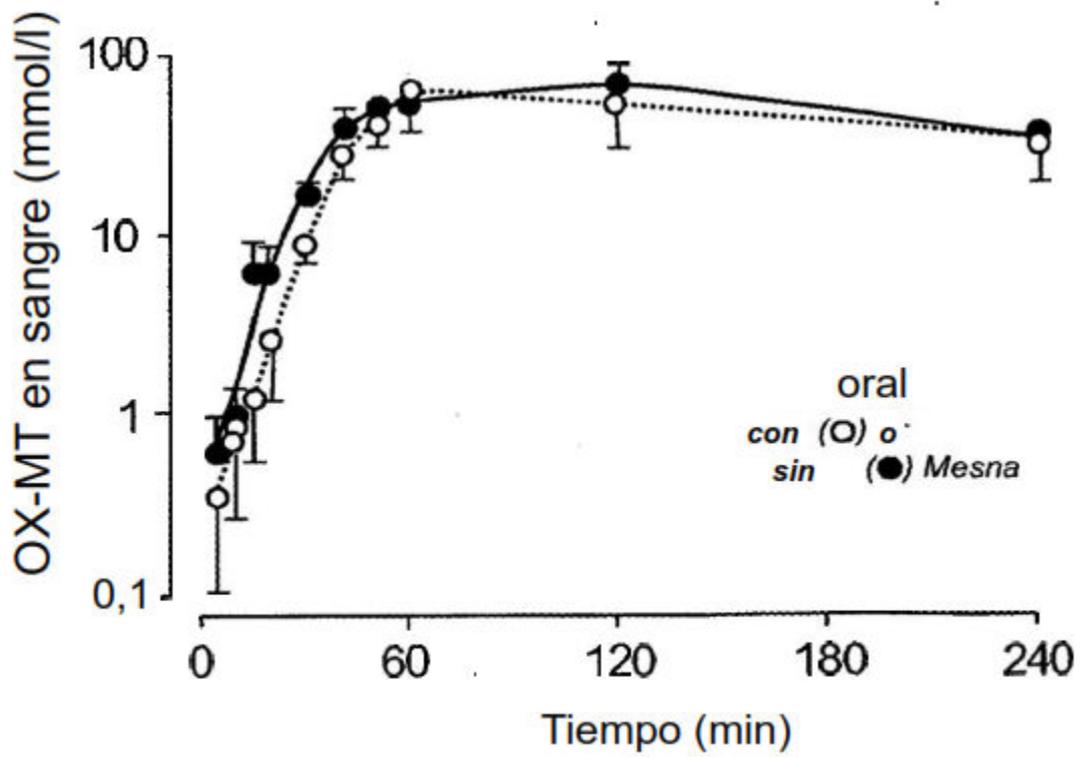


Fig. 16.

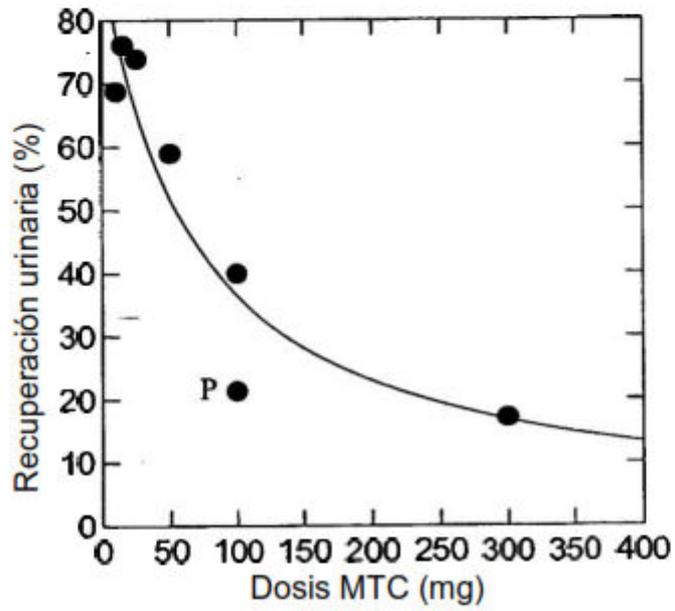


Fig. 17.

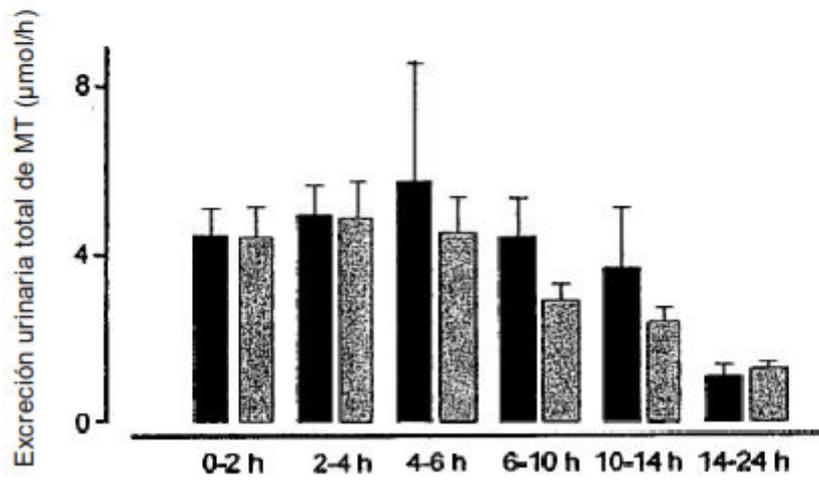


Fig. 18.

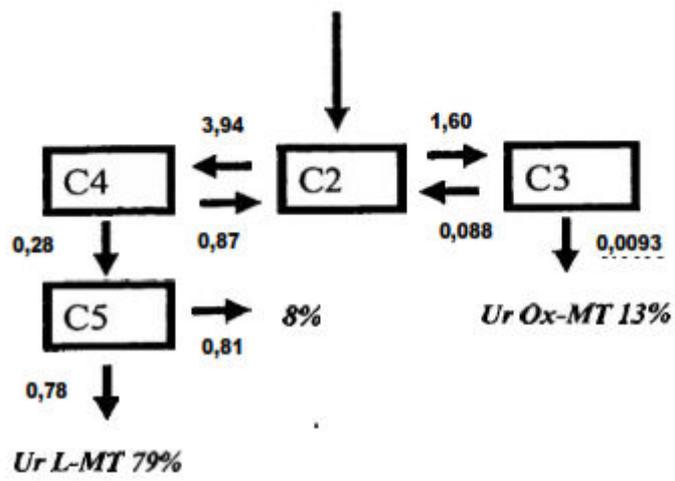


Fig. 19

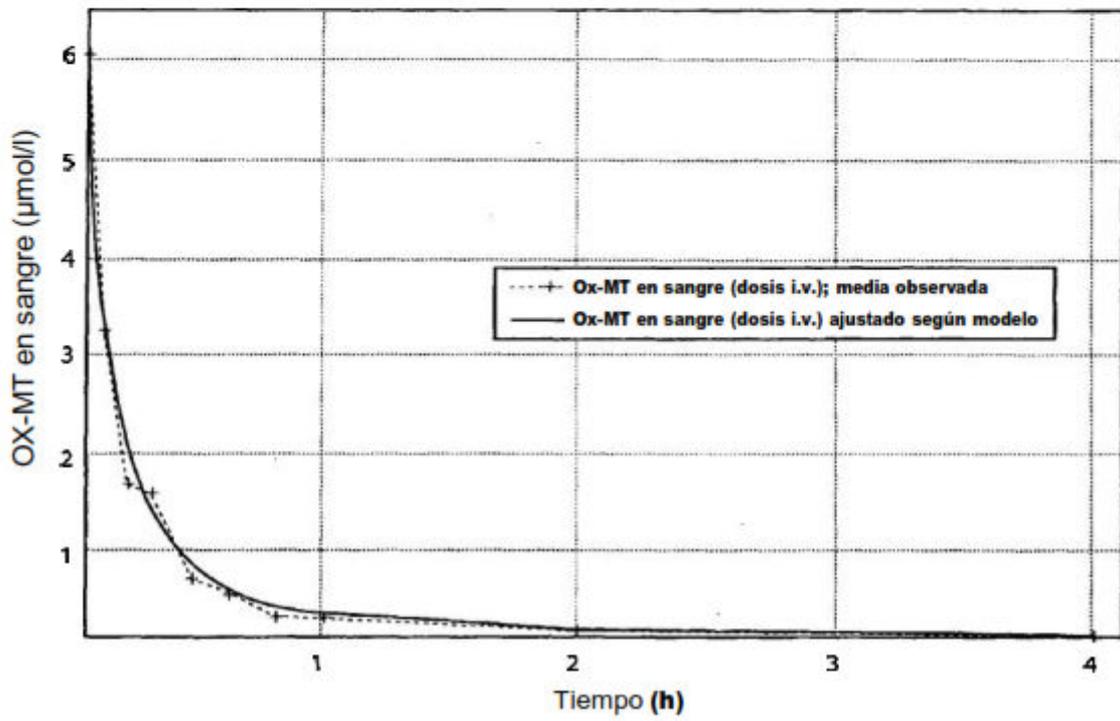


Fig.20

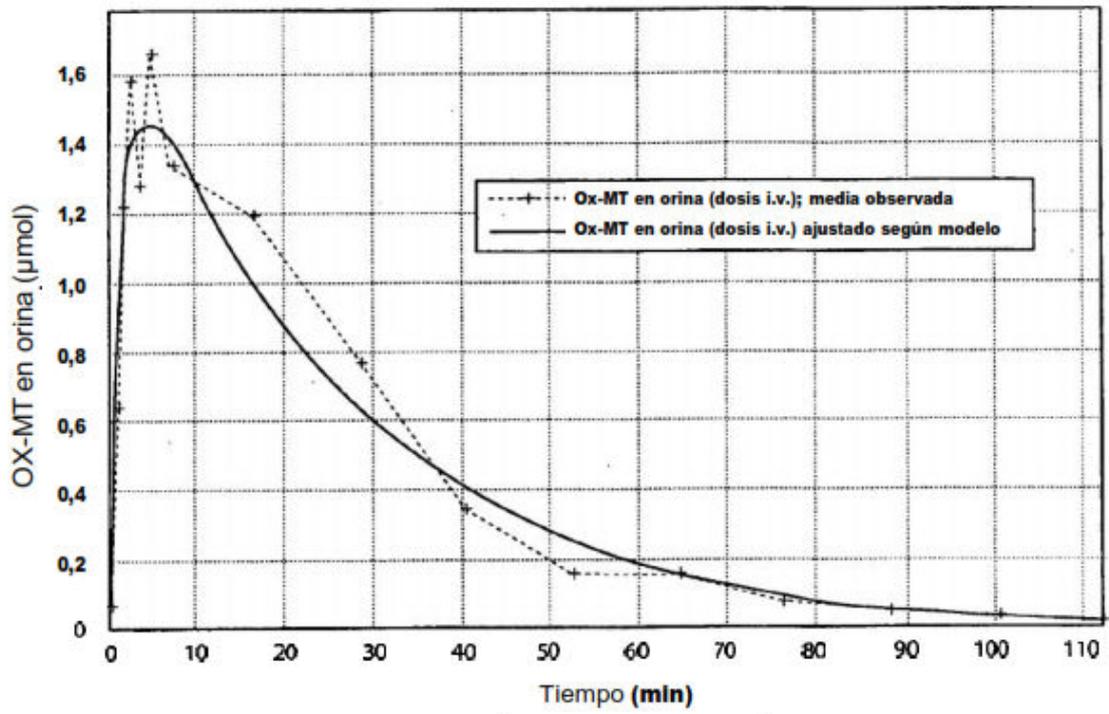


Fig. 21

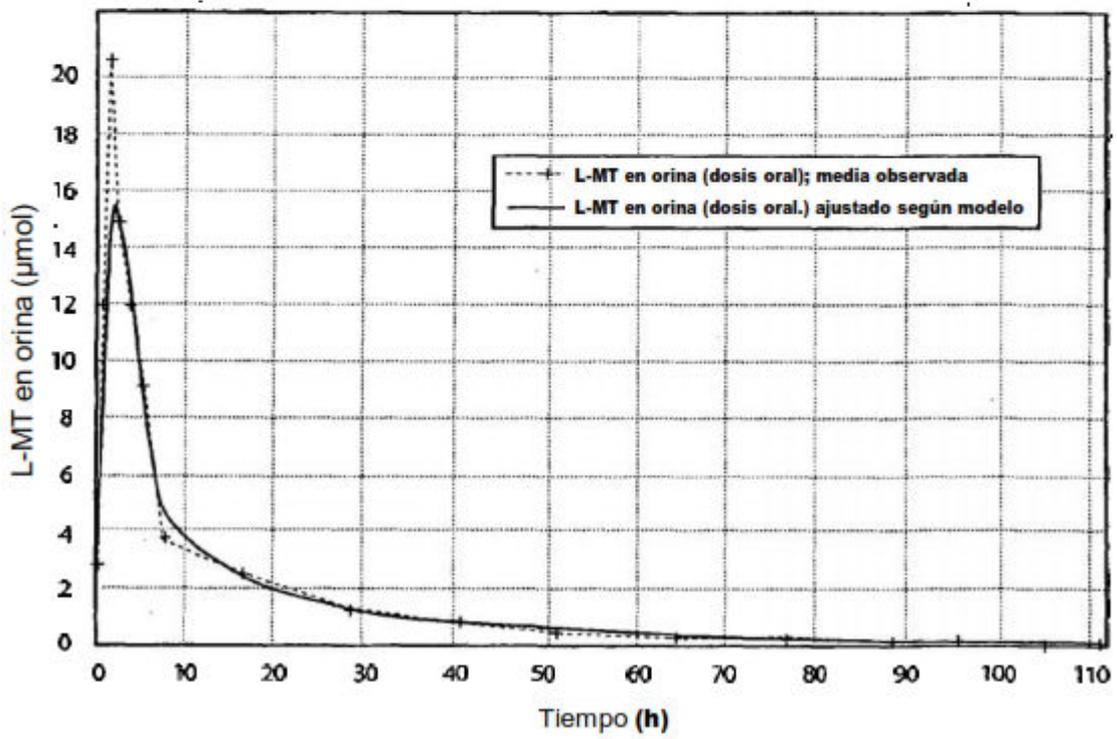


Fig. 22.

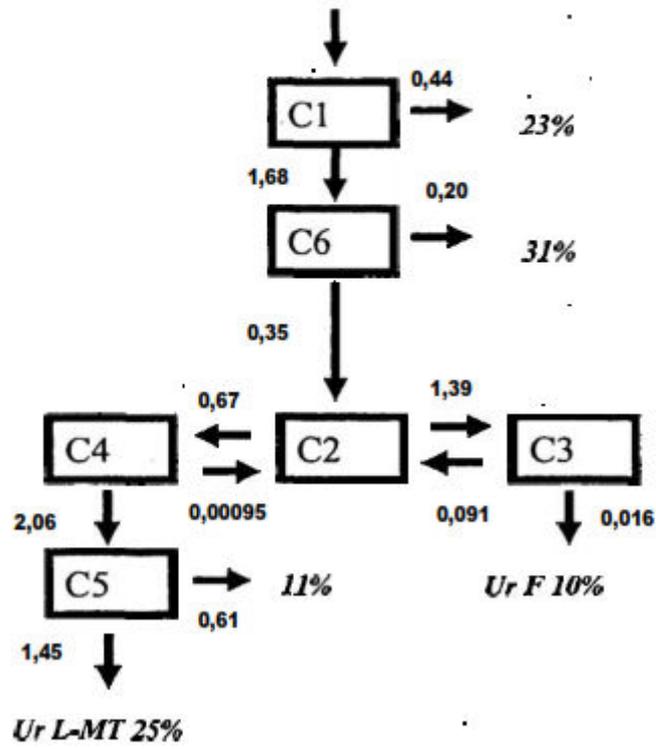


Fig. 23

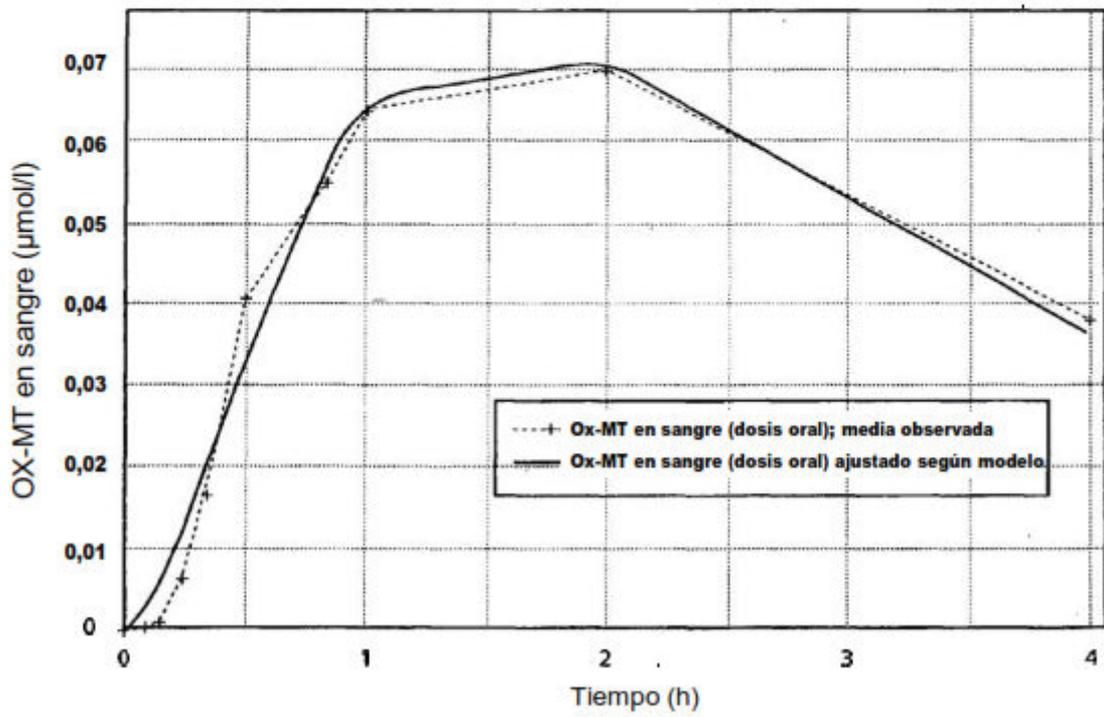


Fig. 24

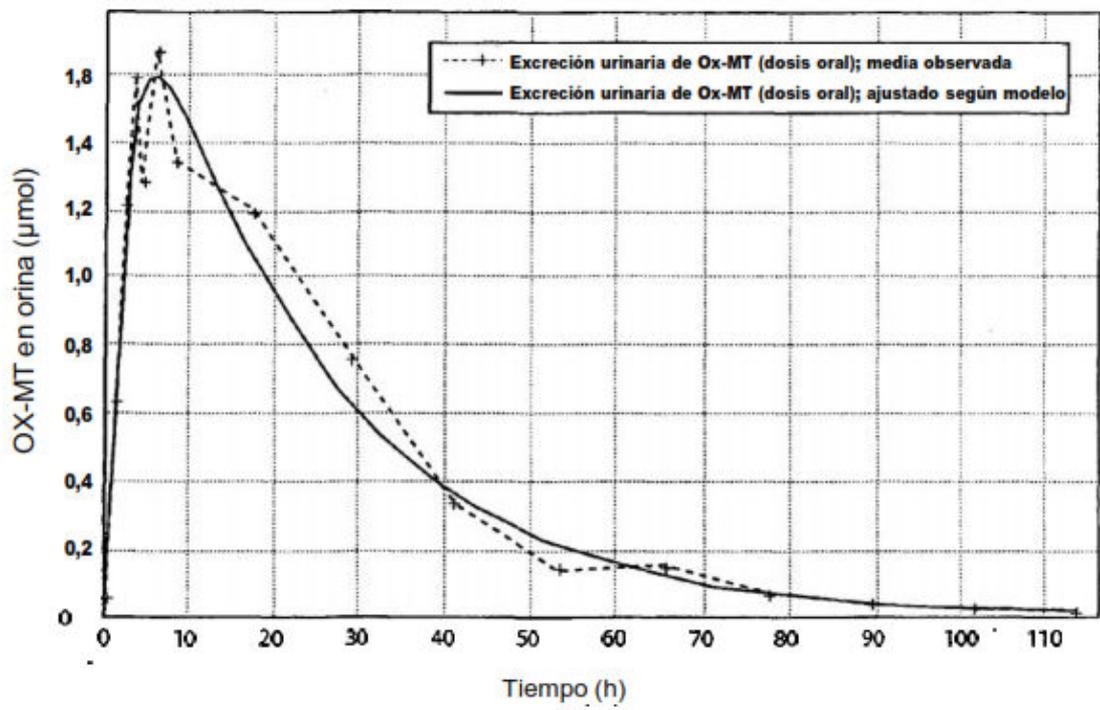


Fig. 25

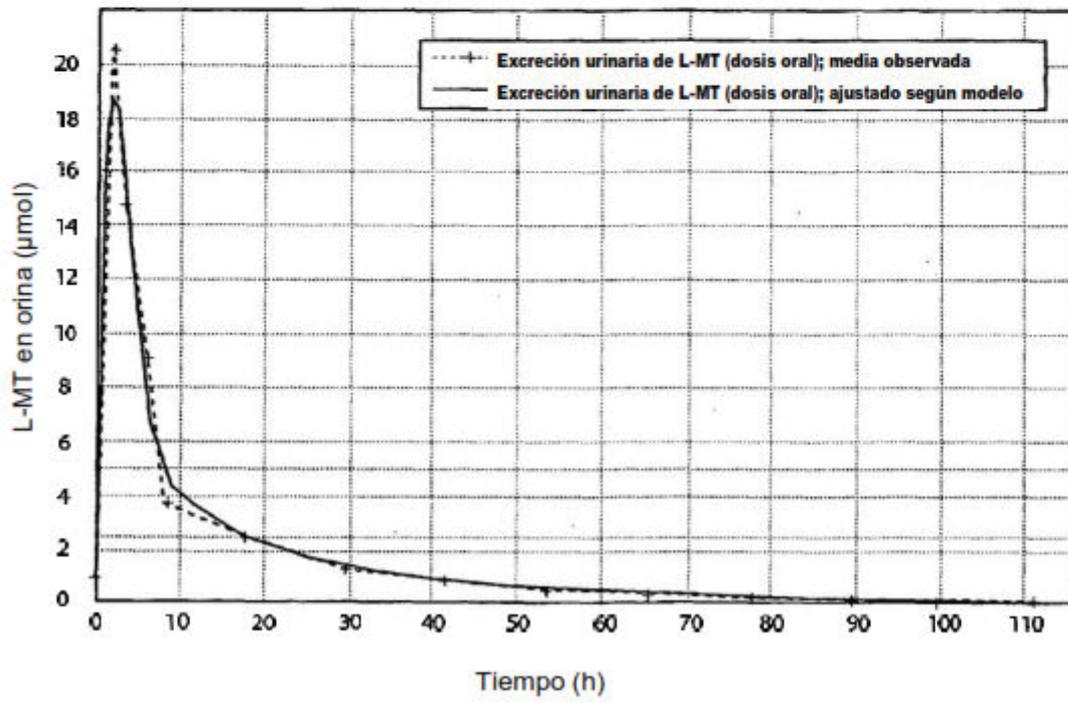
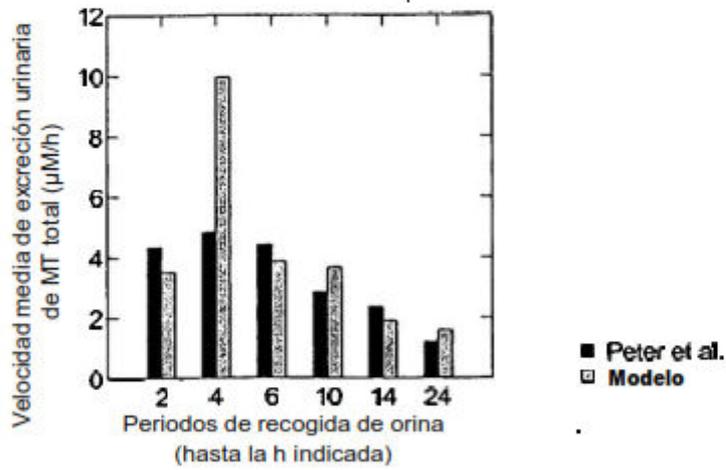


Fig. 26.



	Peter et al.	Modelo
% de dosis excretada en orina a 24 horas	18,6	23,3

Fig. 27.

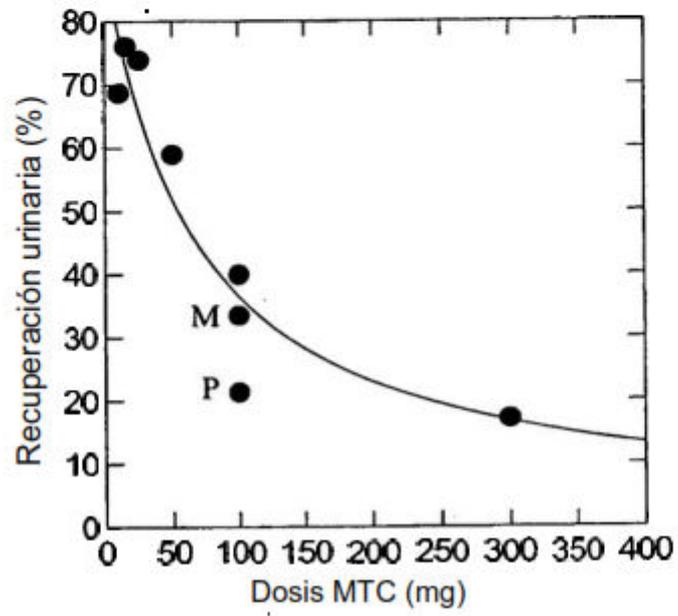


Fig.28

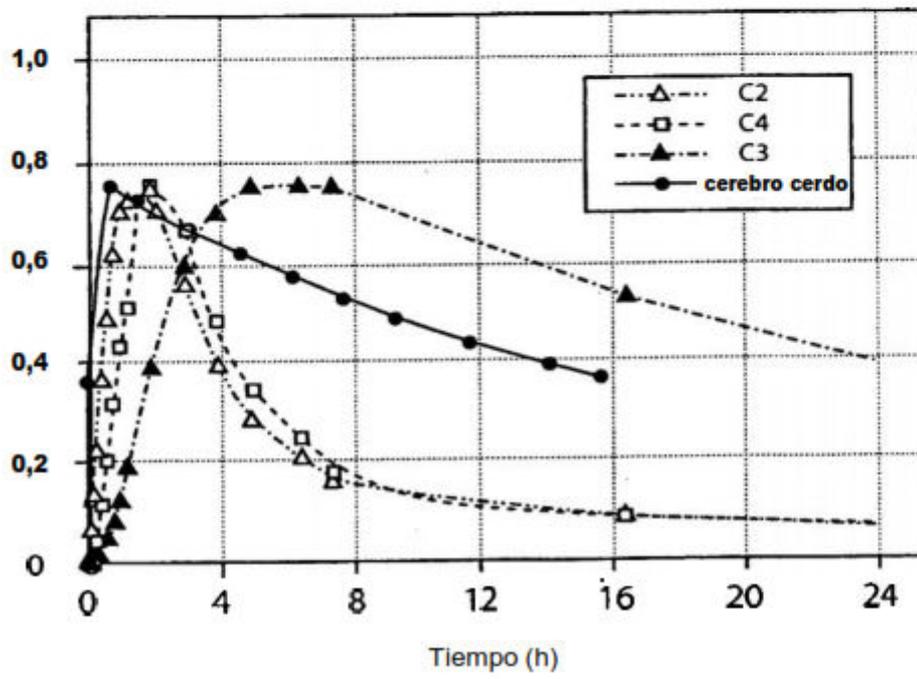


Fig. 29

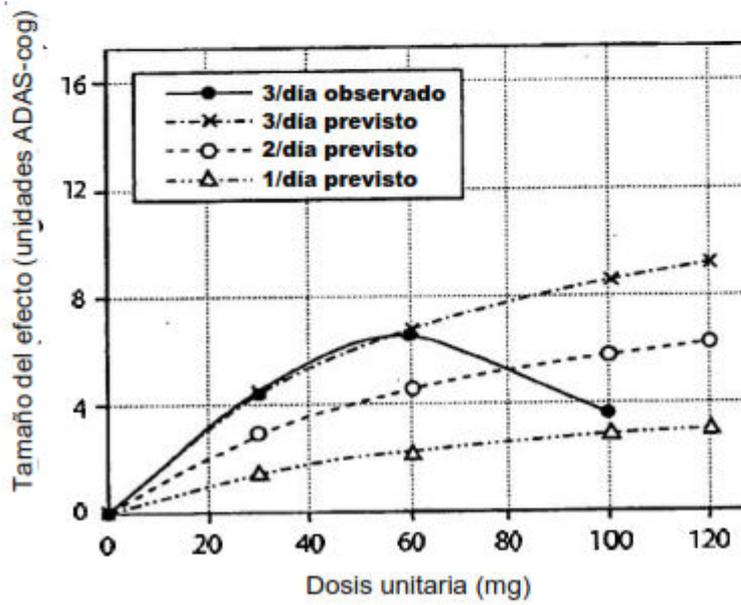


Fig. 30

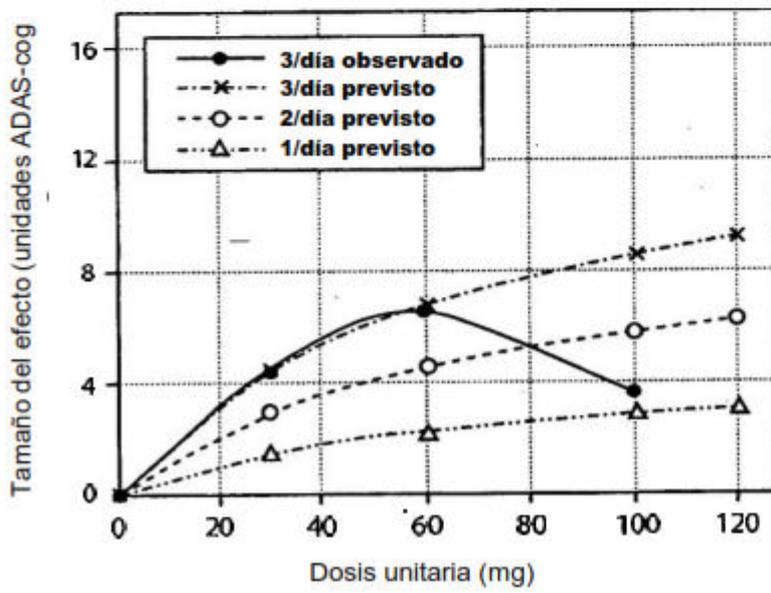


Fig.31A

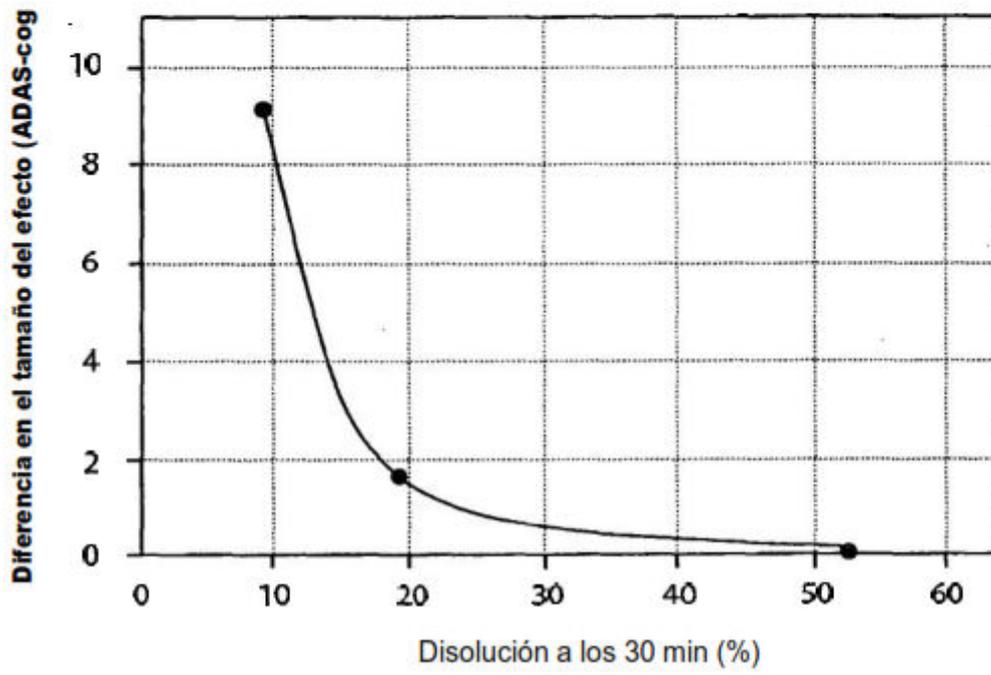


Fig.31B

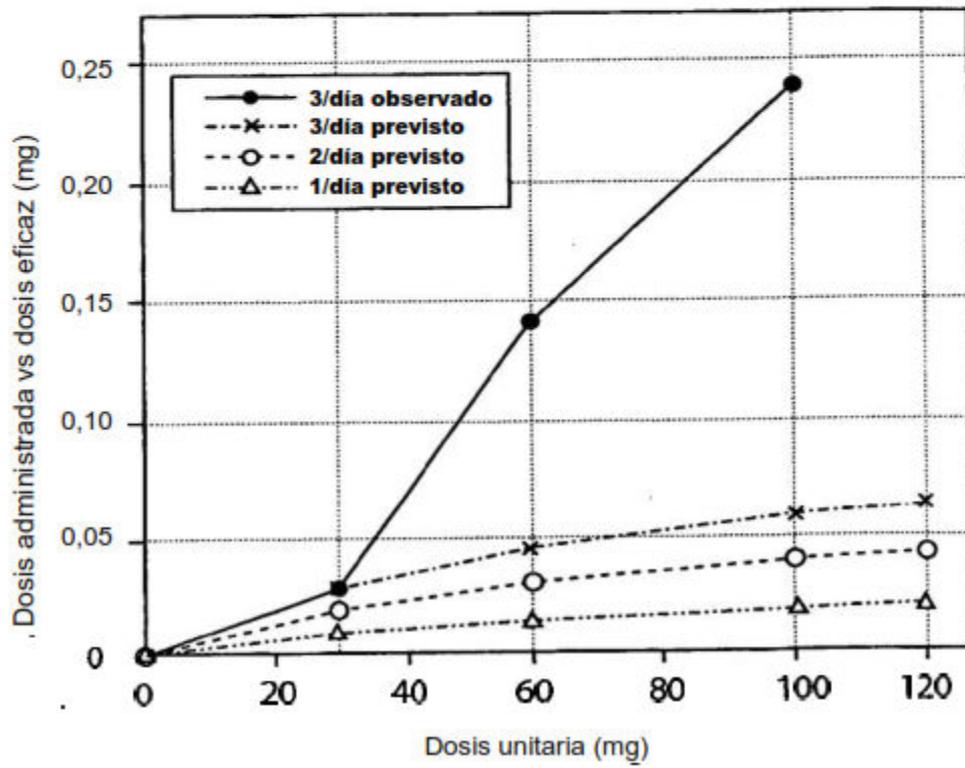


Fig.32

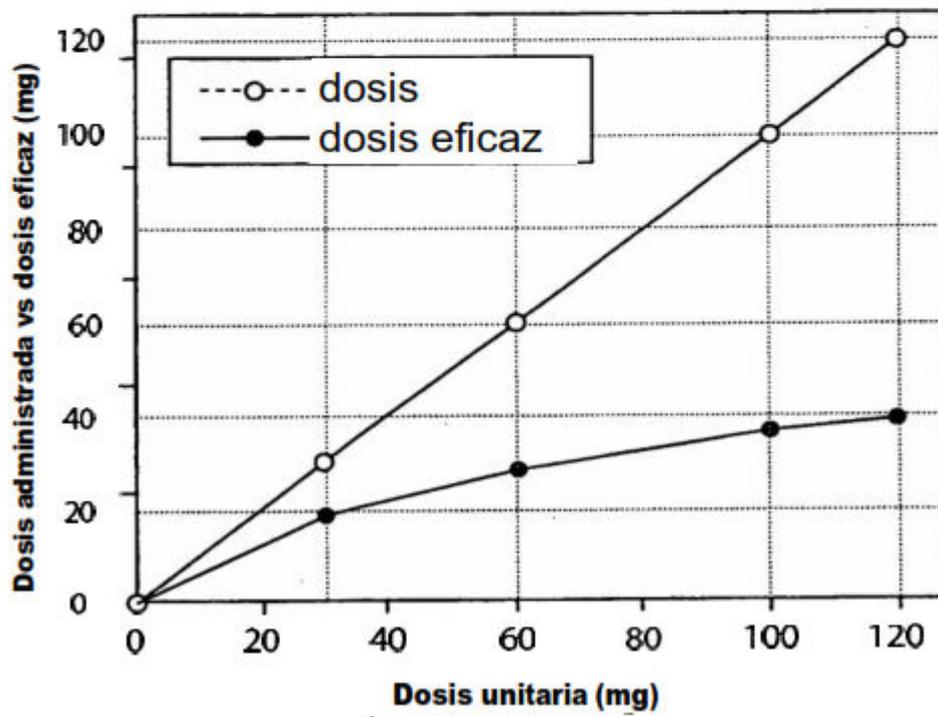


Fig.33

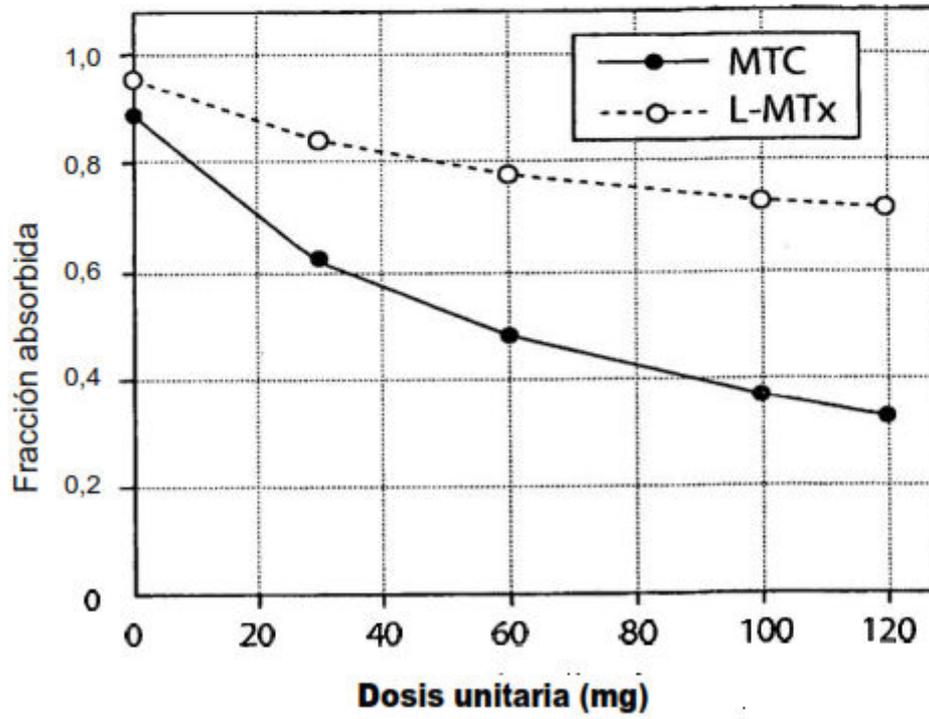


Fig. 34

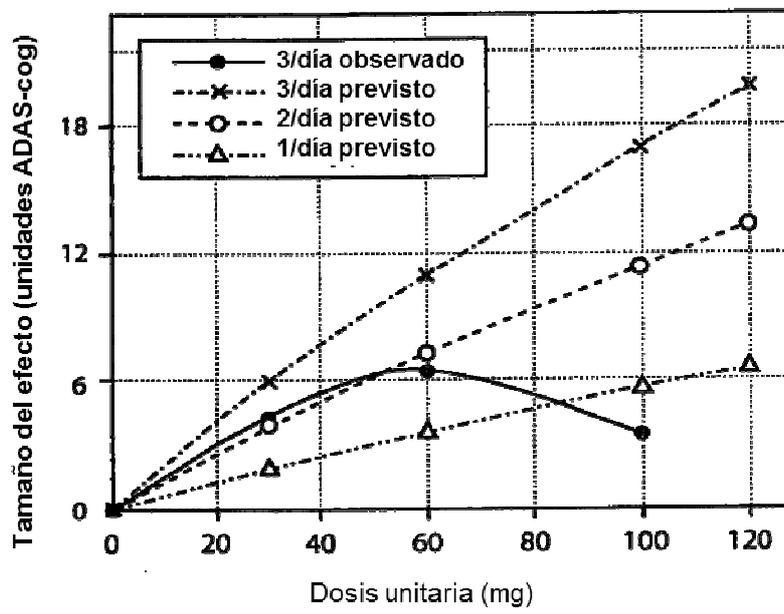


Fig.35

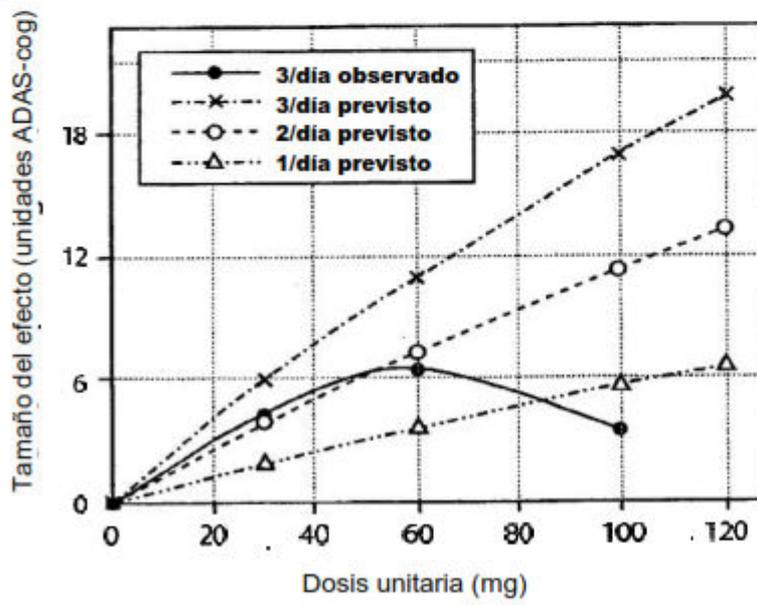


Fig. 36

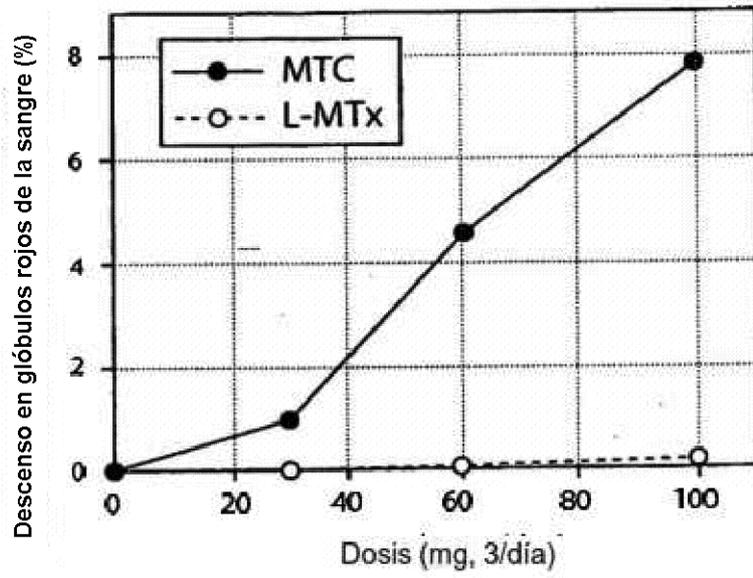
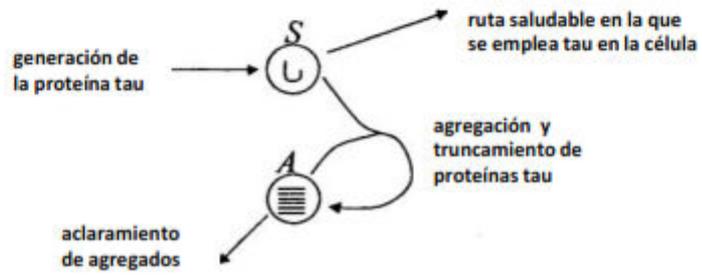


Fig. 37

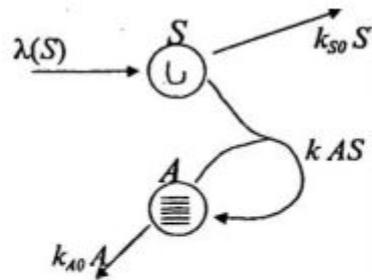
37A



37B



37C

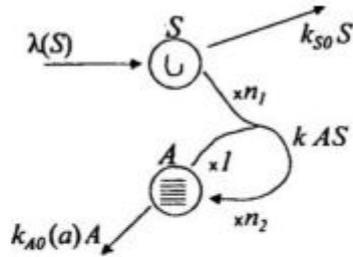


37D

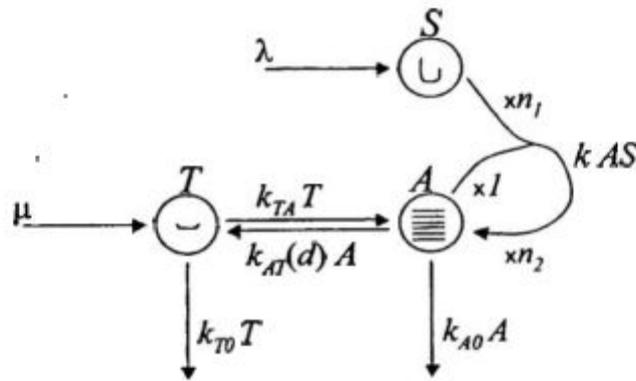


Fig. 37 (continuación)

37E



37F



37G

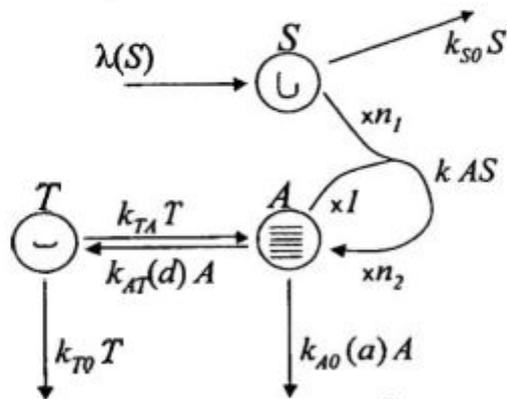
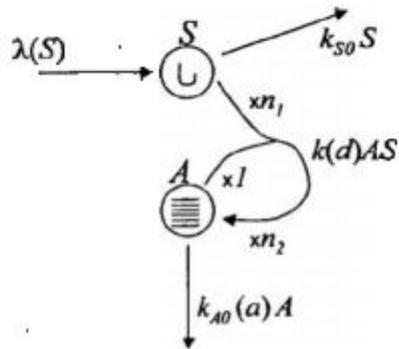


Fig. 37 (continuación)

37H



37I

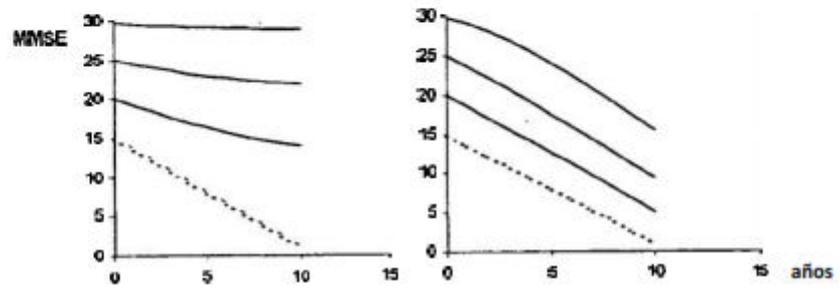


Fig. 38

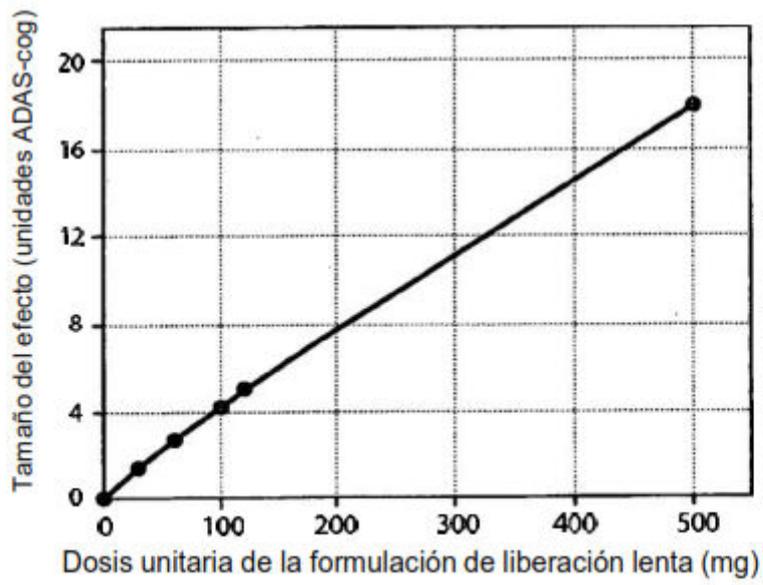


Fig. 39

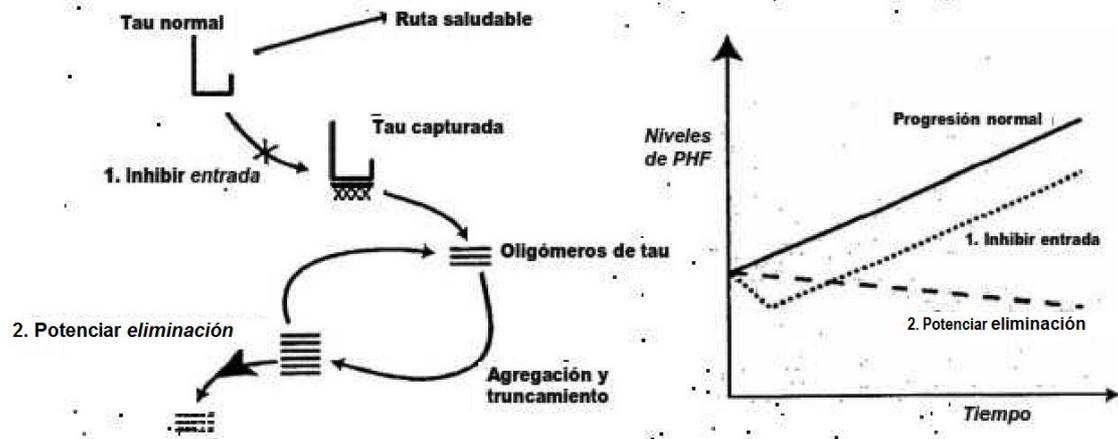


Fig. 40

