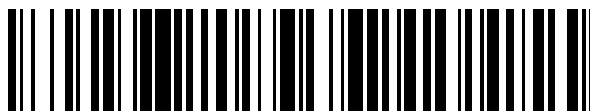


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 703**

51 Int. Cl.:

C07D 279/20 (2006.01)

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2011 PCT/GB2011/001221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12107706**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2011 E 11749476 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2673266**

54 Título: **Sales de fenotiazin diamonio y sus usos**

30 Prioridad:

11.02.2011 SG 201101060
13.05.2011 US 201161485880 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARSHALL, COLIN;
CLUNAS, SCOTT;
STOREY, JOHN, MERVYN, DAVID;
SINCLAIR, JAMES, PETER;
BADDELEY, THOMAS, CRAVEN;
ISHAQ, AHTSHAM;
SIMPSON, MICHAEL;
WILLIAMSON, CRAIG;
WOOD, BARRY, ALAN;
WISCHIK CLAUDE, MICHEL;
HARRINGTON, CHARLES, ROBERT;
RICKARD, JANET, ELIZABETH;
HORSLEY, DAVID;
LOH, YIN, SZE;
KHAN, KARRAR, AHMAD y
LARCH, CHRISTOPHER PAUL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 594 703 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

Sales de fenotiazin diamonio y sus usos

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere en general al campo de los compuestos de fenotiazina, en particular, ciertas sales fenotiazin diaminio, que incluyen usos y formulaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la invención se refiere a sales bis(ácido sulfónico) de los compuestos diaminofenotiazina, tales como N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina -3,7-diamina. Los compuestos de la invención son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de tauopatías, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD).

Antecedentes

15 Se citan en el presente documento una serie de patentes y publicaciones con el fin de describir más completamente y divulgar la invención y el estado de la técnica a la que pertenece la invención.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva, que incluyen las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Hay que señalar que, que como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un portador farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de tales portadores y similares.

Los intervalos se expresan a menudo en el presente documento como de "aproximadamente" un valor particular y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. Del mismo modo, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente" se entenderá que el valor particular forma otra realización

Cualquier subtítulo en el presente documento se incluye solo por conveniencia, y no se deben interpretar como limitantes de la descripción de ninguna manera.

35 Las afecciones de demencia se caracterizan frecuentemente por una acumulación progresiva de depósitos intracelulares y/o extracelulares de estructuras proteínicas tales como placas β -amiloideas y ovillos neurofibrilares (ONF) en los cerebros de los pacientes afectados. El aspecto de estas lesiones está ampliamente relacionado con la degeneración neurofibrilar patológica y atrofia cerebral, además de con deterioro cognitivo (véase, por ejemplo, Mukaetova-Ladinska, E.B. et al., 2000, Am. J. Patol., vol. 157, n.º 2, pág. 623–636).

40 En la enfermedad de Alzheimer, tanto las placas neuríticas como los ONF contienen filamentos helicoidales apareados (FHE) de los que un constituyente principal es la proteína asociada con los microtúbulos tau (véase, por ejemplo, Wischik et al., 1988, PNAS USA, Vol. 85, pág. 4506–4510). Las placas también contienen fibrillas de β -amiloide extracelulares derivadas del procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP) (véase, por ejemplo, Kang et al., 1987, Nature, Vol. 325, pág. 733). Un artículo de Wischik et al. (en 'Neurobiology of Alzheimer's Disease', 2ª Edición, 2000, Eds. Dawbarn, D. y Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford) analiza con detalle el posible papel de la proteína tau en la patogenia de las demencias neurodegenerativas. La pérdida de la forma normal de tau, la acumulación de FHE patológicos y la pérdida de sinapsis en la corteza medio-frontal se correlacionan con deterioro cognitivo asociado. Además, la pérdida de sinapsis y la pérdida de células piramidales se correlacionan tanto con las medidas morfológicas de la patología neurofibrilar reactiva con tau que es similar, a nivel molecular, a una redistribución casi total de la agrupación de la proteína tau desde una forma soluble a una forma polimerizada (es decir, FHE) en la enfermedad de Alzheimer.

55 Tau existe en isoformas de corte y empalme alternativos, que contienen tres o cuatro copias de una secuencia de repetición correspondiente al dominio de unión a microtúbulos (véase, por ejemplo, Goedert, M., et al., 1989, EMBO J., Vol. 8, pág. 393–399; Goedert, M., et al., 1989, Neuron, Vol. 3, pág. 519–526). La tau en las FHE se procesa proteolíticamente en un dominio central (véase, por ejemplo, Wischik, C.M., et al., 1988, PNAS USA, Vol. 85, pág. 4884–4888; Wischik et al., 1988, PNAS USA, Vol. 85, pág. 4506–4510; Novak, M., et al., 1993, EMBO J., Vol. 12, pág. 365–370) que está compuesto por una versión de fase desplazada del dominio de repetición; solo tres repeticiones están involucradas en la interacción estable tau-tau (véase, Jakes, R., et al., 1991, EMBO J., Vol. 10, pág. 2725–2729). Una vez formadas, los agregados de FHE-similar a tau actúan como semillas para la posterior captura y proporcionan una plantilla para el procesamiento proteolítico de la proteína tau de longitud completa (véase, por ejemplo, Wischik et al., 1996, PNAS USA, Vol. 93, pág. 11213–11218).

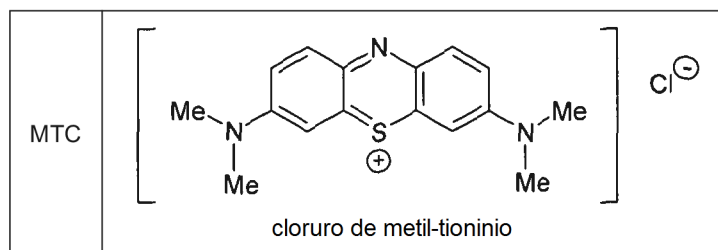
65 El desplazamiento de fase que se observa en el dominio de repetición de tau incorporado en los FHE sugiere que el dominio de repetición sufre un cambio conformacional inducido durante la incorporación en el filamento. Durante el

comienzo de la EA, se prevé que este cambio conformacional podría iniciarse mediante la unión de tau a un sustrato patológico, tal como proteínas de membrana dañadas o mutadas (véase, por ejemplo, Wischik, C.M., et al., 1997, en "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", Eds. Avila, J., Brandt, R. and Kosik, K. S. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam) pág.185–241).

En el curso de su formación y acumulación, los FHE primero se reúnen para formar agregados amorfos dentro del citoplasma, probablemente de oligómeros tau tempranos que se truncan antes del montaje de los FHE o durante el mismo (véase, por ejemplo, Mena, R., et al., 1995, Acta Neuropathol., Vol. 89, pág. 50–56; Mena, R., et al., 1996, Acta Neuropathol., Vol. 91, pág. 633–641). Estos filamentos pasan a formar ONF intracelulares clásicos. En este estado, los FHE consisten en un núcleo de tau truncada y una capa externa desordenada que contiene la tau de longitud completa (véase, por ejemplo, Wischik et al., 1996, PNAS USA, Vol. 93, pág. 11213–11218). El proceso de montaje es exponencial, consume la acumulación celular de tau funcional normal e induce nueva síntesis de tau para cubrir el déficit (véase, por ejemplo, Lai, R. Y. K., et al., 1995, Neurobiology of Ageing, Vol. 16, n.º 3, pág. 433–445). Finalmente, el deterioro funcional de la neurona avanza hasta el punto de la muerte celular, dejando atrás un ONF extracelular. La muerte celular se correlacionada altamente con el número de NTF extracelulares (véase, por ejemplo, Wischik et al., in 'Neurobiology of Alzheimer's Disease', 2ª edición, 2000, Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). Como los ovillos son extrusionados al espacio extracelular, hay una pérdida progresiva de la capa externa desordenada de la neurona con la correspondiente pérdida de inmunorreactividad de tau N-terminal, pero con conservación de la inmunorreactividad de tau asociada con el núcleo del FHE (véase, por ejemplo, Bondareff, W. et al., 1994, J. Neuropath. Exper. Neurol., Vol. 53, n.º 2, pág. 158–164).

Compuestos de diaminofenotiazina

Cloruro de metiltioninio (MTC) (también conocido como Metileno azul (MB); cloruro de metiltionina; cloruro de tetrametiltionina; cloruro de 3,7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-ilo; C.I. Azul básico 9; cloruro de tetrametiltionina; cloruro de 3,7-bis(dimetilamino)fenazationio; Azul Suiza; C.I. 52015; C.I. Azul disolvente 8; violeta anilina; y Urolene Blue®) es de peso molecular bajo (319,86), agua soluble, compuesto orgánico tricíclico de la siguiente fórmula:



El cloruro de metiltioninio (MTC) es un tinte de fenotiazina bien conocido y un indicador redox y también se ha usado como una sonda óptica de sistemas biofísicos, como intercalador en materiales nanoporosos, como un mediador redox y en formación de imágenes fotoelectrocrómicas.

El cloruro de metiltioninio (MTC) y otras diaminofenotiazinas se han descrito como inhibidores de la agregación de proteínas en enfermedades en las que las proteínas se agregan patológicamente.

En particular, se ha demostrado que las diaminofenotiazinas que incluyen MTC inhiben la agregación de proteínas tau y alteran la estructura de los FHE e invierten la estabilidad proteolítica del núcleo de FHE (véase, por ejemplo, el documento WO 96/30766, Hofmann–La Roche). Tales compuestos se divulgaron para su uso en el tratamiento o profilaxis de diversas enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

El documento WO2007/110630 (WisTa Laboratories Ltd) también divulga ciertos compuestos de diaminofenotiazina específicos relacionados con el MTC, incluyendo ETC, DEMTC, DMETC, DEETC, MTZ, ETZ, MTI, MTILHI, ETI, ETLHI, MTN y ETN, que son útiles como fármacos, por ejemplo en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Además, el documento WO 2005/030676 (The University Court of the University of Aberdeen) analiza las fenotiazinas radiomarcadas, y su uso en el diagnóstico y la terapia, por ejemplo, de tauopatías.

El cloruro de metiltioninio (MTC) también se ha divulgado para otros usos médicos. Por ejemplo, se usa actualmente para tratar la metahemoglobinemia (una afección que se produce cuando la sangre no puede administrar oxígeno cuando se necesita en el cuerpo). El MTC también se usa como colorante médico (por ejemplo, para teñir ciertas partes del cuerpo antes o durante la cirugía); un diagnóstico (por ejemplo, como colorante indicador para detectar ciertos compuestos presentes en la orina); un antiséptico urinario débil; un estimulante para las superficies mucosas; un tratamiento y preventivo para cálculos renales; y en el diagnóstico y el tratamiento de melanoma.

El MTC se ha usado para tratar malaria tanto individualmente (véase, por ejemplo, Guttman, P. y Ehrlich, P., 1891, "Über die wirkung des methylenblau bei malaria," Berl. Klin. Wochenschr., Vol. 28, pág. 953–956) como en combinación

con cloroquina (véanse, por ejemplo, Schirmer, H., et al., 2003, "Methylene blue as an antimalarial agent," Redox Report, Vol. 8, pág. 272–275; Rengelshausen, J., et al., 2004, "Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria," European Journal of Clinical Pharmacology, Vol. 60, pág. 709–715).

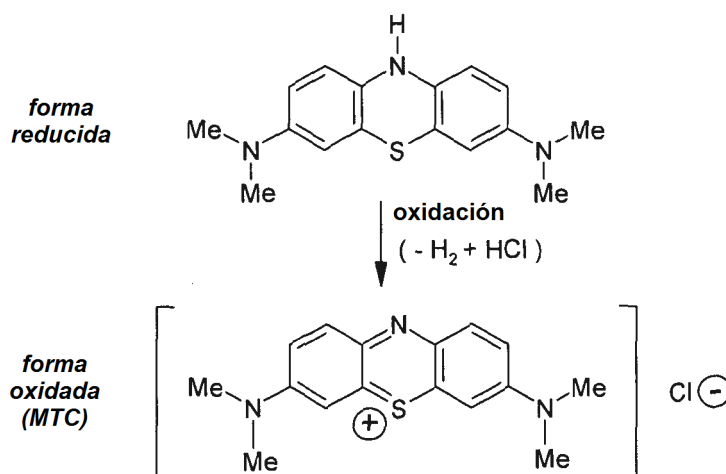
5 El MTC (con el nombre Virostat®, de Bioenvision Inc., Nueva York) también ha mostrado una potente actividad viricida in vitro. Específicamente, Virostat® es eficaz contra virus tales como VIH y el virus del Nilo Occidental en pruebas de laboratorio. Virostat® también está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de hepatitis C crónica, una infección vírica del hígado. El virus, VHC, es una causa principal de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica que incluye cirrosis y cáncer de hígado.

10 El MTC, cuando se combina con luz, puede prevenir también la replicación de ácido nucleico (ADN o ARN). El plasma, las plaquetas y los glóbulos rojos no contienen ADN o ARN nuclear. Cuando el MTC se introduce en los componentes sanguíneos, cruza las paredes de las células bacterianas o la membrana vírica, y se mueve hacia el interior de la estructura del ácido nucleico. Si se activa con luz, el compuesto se une entonces al ácido nucleico del patógeno vírico o bacteriano, previniendo la replicación del ADN o ARN. Debido a que el MTC puede inactivar patógenos, tiene el potencial de reducir el riesgo de transmisión de patógenos que quedarían sin detectar por las pruebas.

15 En Estados Unidos se dispone comercialmente de formulaciones orales y parenterales de MTC, normalmente como la marca Urolene Blue®.

20 Formas reducidas ('leuco')

El MTC, una sal fenotiazin-5-io, pueden considerarse una "forma oxidada" en relación al compuesto de 10H-fenotiazina, N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina correspondiente, que pueden considerarse una a "forma reducida":



30 La "forma reducida" (o "forma leuco") es conocida por ser inestable y puede ser fácil y rápidamente oxidada para dar la forma "oxidada" correspondiente.

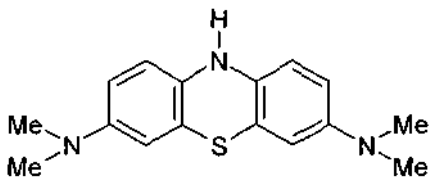
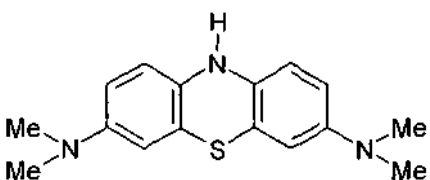
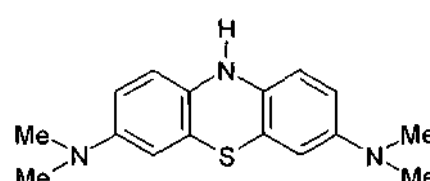
35 May et al. (Am J Physiol Cell Physiol, 2004, Vol. 286, pág. C1390–C1398) han demostrado que eritrocitos humanos reducen y absorben secuencialmente el MTC; que el propio MTC no es absorbido por las células; que es la forma reducida de MTC la que cruza las membranas celulares; que la tasa de absorción depende de enzimas; y que tanto el MTC como el MTC reducido se concentran en las células (el MTC reducido se reequilibra una vez dentro de la célula para formar MTC).

40 El MTC y fármacos similares son absorbidos en el intestino y entran en la circulación sanguínea. El fármaco sin absorber se filtra al tubo digestivo, al intestino distal. Un efecto secundario no deseado importante es el efecto del fármaco sin absorber en el intestino distal, por ejemplo, sensibilización del intestino distal y/o efectos antimicrobianos del fármaco sin absorber sobre la flora en el intestino distal, conduciendo ambos a diarrea. Por tanto, se desea minimizar la cantidad de fármaco que se filtra al intestino distal. Aumentando la absorción de fármaco en el intestino (es decir, aumentando la biodisponibilidad de fármaco), la dosificación puede reducirse, y pueden mejorar los efectos secundarios no deseados, tales como diarrea.

45 Como es la forma reducida de MTC la que es absorbida por las células, puede ser deseable administrar la forma reducida a los pacientes. Esto también reduciría la dependencia de la etapa limitante de la velocidad de la reducción enzimática.

El documento WO 02/055720 (The University Court of the University of Aberdeen) divulga el uso de formas reducidas de determinadas diaminofenotiazinas para el tratamiento de enfermedades de agregación de proteínas, principalmente tauopatías.

- 5 El documento WO2007/110627 (WisTa Laboratories Ltd) divulgó ciertas sales de 3,7-diamino-10H-fenotiazina, eficaces como fármacos o profármacos para el tratamiento de enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Estos compuestos también están en la forma "reducida" o "leuco" cuando se consideran con respecto a MTC. Estos incluyeron las siguientes sales:

	<p>HCl HCl</p>	<p>di(cloruro) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio), (LMT.2HCl)</p>
	<p>HBr HBr</p>	<p>di(bromuro) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio, (LMT.2HBr)</p>
	<p>HI HI</p>	<p>di(yoduro) N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio, (LMT.2HI)</p>

10 A pesar de que proporciona ciertas ventajas sobre el uso de la MTC, la síntesis de LMT.2HCl en ciertas condiciones puede dar como resultado en el CH₃Cl que esté atrapado dentro del cristal. Después, esto tiene que retirarse, ya que el CH₃Cl es tóxica y los niveles deben mantenerse por debajo de los niveles de seguridad.

15 Además el LMT.2HBr contiene iones bromuro. Esto es, en principio, menos deseable desde el bromuro es tóxico, ya sea en niveles altos o con la dosificación crónica y, a niveles más bajos, pueden causar efectos secundarios tales como la confusión en los pacientes.

20 El bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.2MsOH) se ha divulgado mediante Chemical Abstracts con el Número de Registro 1236208-20-0 en el año 2010.

25 Por lo tanto puede observarse la provisión de sales adicionales de compuestos de metiltioninio para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia, que tiene una o más propiedades deseables más de los ya conocidos, sería una contribución a la técnica.

Además, la provisión de nuevas formulaciones de compuestos de metiltioninio para su uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia que aumenta la estabilidad, absorción, y \ o de otra manera mejora su eficacia como agentes terapéuticos serían una contribución a la materia.

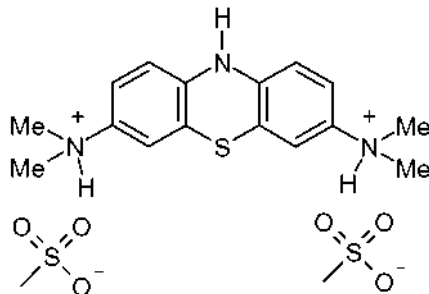
30 Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado una nueva clase de compuestos de fenotiazin diaminio para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia, que han mejorado las propiedades en comparación con los compuestos y sales de diaminofenotiazina descritos anteriormente usados como agentes farmacológicos.

35 Las propiedades de los compuestos se describen a continuación en el presente documento, con lo que puede verse que en las realizaciones preferidas la invención puede proporcionar una o más mejoras físicas, farmacocinéticas,

bioquímicas u otras propiedades benéficas.

En un aspecto la presente invención proporciona un compuesto que es de la siguiente fórmula:



5

o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia.

10 También se describen en el presente documento, procesos para sintetizar un compuesto como se ha descrito anteriormente.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15

También se describe en el presente documento un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar un compuesto como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 También se describe en el presente documento una composición farmacéutica en forma de dosificación sólida, que comprende un compuesto como se describe en el presente documento y que comprende además al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco y, opcionalmente, uno o más de otros excipientes.

25 También se describe en el presente documento un proceso para la fabricación de una composición farmacéutica por un método de compresión en seco, siendo dicha composición una forma de dosificación sólida que comprende un compuesto como se describe en el presente documento, al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco y, opcionalmente, uno o más de otros excipientes.

30 También se describe en el presente documento un polvo de flujo libre, cohesivo, que comprende un compuesto como se describe en el presente documento y al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco, y opcionalmente, uno o más de otros excipientes, siendo dicho polvo capaz de ser comprimido en una forma de dosificación sólida.

35 También se describe en el presente documento un método para invertir y/o inhibir la agregación de una proteína (por ejemplo, una proteína tau, una sinucleína, etc.), por ejemplo, la agregación de una proteína asociada a una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica, que comprende en contacto la proteína con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. Dicho método se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*.

40 También se describe en el presente documento un método de tratamiento o profilaxis de un estado de enfermedad en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un compuesto como se describe en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica, preferentemente una composición farmacéutica en forma de dosificación sólida, como se describe adicionalmente en el presente documento.

45 En el presente documento también se describe el uso de un compuesto o composición como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o profilaxis de un estado de enfermedad.

50 En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es una enfermedad de agregación de proteínas. En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es una tauopatía, por ejemplo, una tauopatía neurodegenerativa, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer u otra enfermedad descrita más adelante en el presente documento. En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es cáncer de piel, por ejemplo melanoma.

55 En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es un estado de enfermedad vírica, bacteriana o protozoica, por ejemplo, hepatitis C, VIH, virus del Nilo Occidental (VNO) o malaria.

En el presente documento también se describe un procedimiento de inactivar un patógeno en una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o de plasma) que comprende las etapas de introducir un compuesto o composición como se describe en el presente documento en la muestra y luego exponer la muestra a la luz.

- 5 En el presente documento también se describe un kit que comprende (a) un compuesto como se describe en el presente documento, preferentemente proporcionado como una composición farmacéutica y en un recipiente adecuado y/o con envase adecuado; y (b) instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones escritas sobre cómo administrar el compuesto o composición.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el espectro RMN ^1H de un compuesto a modo de ejemplo de la invención (LMT.2MsOH) en metanol deuterado (CD_3OD) a 600 MHz.

- 15 La Figura 2 muestra el espectro de RMN ^{13}C de LMT.2MsOH en CD_3OD a una frecuencia de 100,56 MHz.

La Figura 3 muestra el espectro DEPT-135 de LMT.2MsOH en CD_3OD a una frecuencia de 100,56 MHz.

- 20 La Figura 4 muestra el espectro HSQC de LMT.2MsOH en CD_3OD a una frecuencia de 100,56 MHz.

La Figura 5 muestra la sección expandida del espectro HSQC de LMT.2MsOH en CD_3OD a una frecuencia de 100,56 MHz.

- 25 La Figura 6 muestra el espectro infrarrojo (FT-IR) de LMT.2MsOH (KBr).

La Figura 7 muestra el espectro de masas del impacto de electrones (EI) de LMT.2MsOH.

La Figura 8 muestra el espectro de masas de la ionización por electronebulización (ESI) de LMT.2MsOH.

- 30 La Figura 9 muestra el espectro UV/vis de LMT.2MsOH en agua desionizada.

La Figura 10 muestra el rastro de HPLC para LMT.2MsOH.

La Figura 11 muestra un difractograma de rayos X de polvo para LMT.2MsOH, medido con radiación $\text{Cu K}\alpha$.

- 35 La Figura 12 muestra el espectro FT-Raman para LMT.2MsOH cristalino. Las señales más intensas se encontraron a 1615 cm^{-1} , 1588 cm^{-1} , 1258 cm^{-1} y 1042 cm^{-1} .

- 40 La Figura 13 muestra el perfil termogravimétrico para LMT.2MsOH cristalino. Se detectó un peso constante mediante TG y TG-FTIR hasta el comienzo de la descomposición a 240-270 °C.

La Figura 14 muestra el análisis calorimétrico de barrido diferencial para LMT.2MsOH cristalino. Un p.f. agudo a 271 °C ($\Delta\text{H} = 87\text{ J/g}$) se siguió de descomposición inmediatamente.

- 45 Las Figuras 15a y 15b muestran la curva de sorción de vapor dinámica (DVS) para LMT.2MsOH cristalino medido a 25 °C con velocidad de exploración 5 %/h. Las líneas discontinuas horizontales indican las etapas de absorción de agua de un equivalente. Un peso estable de la muestra (menos del 0,5 % de cambio de peso) se observó en la humedad relativa (h.r.) oscilar entre el 0 % y el 70 %. Por encima de este R. H., la absorción de agua aumentó rápidamente, y la muestra en última instancia delicada. Después del secado, el contenido de agua se redujo de nuevo a aproximadamente 4 equiv. a un 50 % de humedad relativa. La curva de DVS de la sal diclorhidrato cristalino (LMT.2HCl) se muestra para la comparación como una línea discontinua, la curva de DVS de la sal dibromhidrato (LMT.2HBr) como una línea punteada.

- 50 La Figura 15c muestra las curvas de sorción de vapor dinámicas (DVS) para LMT.2MsOH cristalino como una función del tiempo. También se indica la humedad relativa (eje derecho). Las líneas discontinuas horizontales indican las etapas de un equivalente de absorción de agua.

- 55 La Figura 16 muestra imágenes de microscopía polarizantes de la LMT.2MsOH (izquierda) y LMT.2MsOH recristalizado (derecha). Los cristales de hasta 100 μm de tamaño se obtuvieron por recristalización en 2-PrOH/agua. Los cristales son de forma irregular.

Las Figuras 17a-c muestran las estructuras de cristal de rayos X de LMTEsOH, LMT.EDSA. y LMT.2MsOH

- 60 La Figura 18 muestra una comparación de la concentración de plasma en el cerdo del resto de MT con el tiempo, después de la dosificación de LMT.2HBr, LMT.2HCl y LMT.2MsOH.

La Figura 19 es un diagrama de un aparato usado en los estudios de disolución (véase el Ejemplo de Formulación 12).

Descripción detallada de la invención

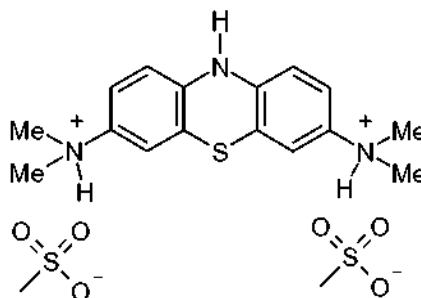
5 Los presentes inventores han identificado una nueva clase de compuestos de fenotiazin diaminio que tienen propiedades físicas u otras deseables y/o sorprendentemente una actividad mejorada en comparación a los compuestos y sales de diaminofenotiazina previamente divulgados.

10 En otros aspectos que han proporcionado adicionalmente nuevas formulaciones de compuestos de fenotiazin diaminio, que incluyen (pero sin limitarse a) la clase anterior.

Los compuestos

15 En términos generales, a menos que el contexto exija otra cosa, los compuestos descritos en el presente documento pueden describirse como sales bis(sulfonato) (o sales de ácido bis(sulfónico)) de compuestos de 3,7-diamino-10H-fenotiazina. En otras palabras, los compuestos son sales de los compuestos de 3,7-diamino-10H-fenotiazina correspondientes con ácidos sulfónicos orgánicos.

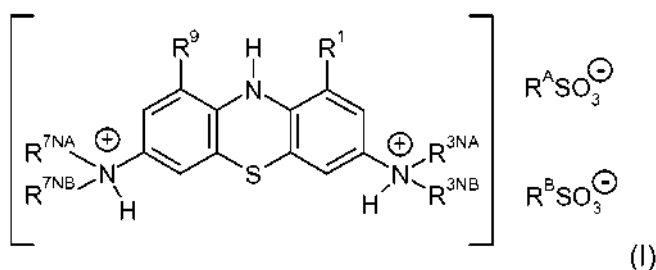
20 Más específicamente, un compuesto de la invención es una sal bis(sulfonato) de un compuesto de la siguiente fórmula:



25 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden considerarse productos obtenibles a partir de la reacción de un compuesto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina, por ejemplo como se ha mostrado anteriormente, con dos restos de ácido sulfónico orgánicos.

30 Se describen en el presente documento compuestos de fórmula general (I):



35 en la que:

- cada R¹ y R⁹ se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄ y alquilo C₁₋₄ halogenado;
- cada R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄ y alquilo C₁₋₄ halogenado;
- cada R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H, alquilo C₁₋₄, alqueno C₂₋₄ alquilo C₁₋₄ halogenado;

40 y en la que:

cada R^A y R^B se selecciona independientemente entre:

45 alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ halogenado y arilo C₆₋₁₀;

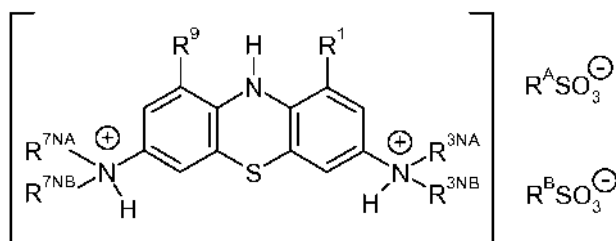
o
 R^A y R^B se vinculan para formar un grupo R^{AB}, en el que R^{AB} se selecciona entre:

alquileo C₁₋₆ y arileno C₆₋₁₀;

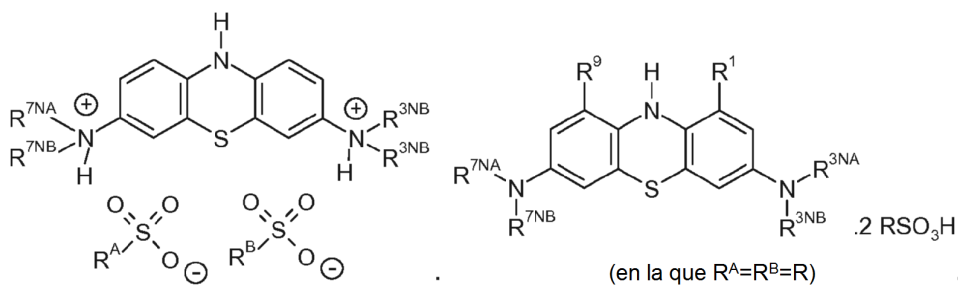
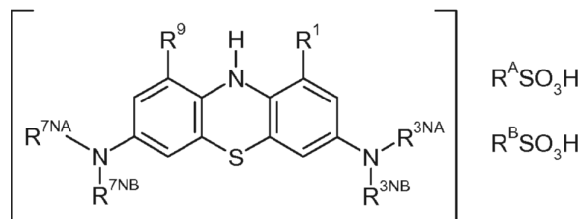
y sales, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos descritos en el presente documento, se representan en el presente documento mediante una fórmula general que muestra la estructura del compuesto de 3,7- diamino-10H-fenotiazina, con los grupos 3,7-diamino que están en forma protonada.

Las especies cargadas positivamente doblemente resultantes se asocian con dos restos de contraión sulfonato (que pueden presentarse opcionalmente en la misma molécula, es decir en la que se vinculan R^A y R^B):



Sin embargo, como se entenderá por un experto en la materia, la misma sal podría, igualmente representarse de otros modos, tales como, por ejemplo:



etc.

Sales y solvatos

Aunque los compuestos descritos en el presente documento son sales de ellos mismos, también pueden proporcionarse en forma de una sal mezclada (es decir, el compuesto de la invención junto con otra sal). Se pretenden abarcar tales sales mezcladas mediante la expresión "y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos". A menos que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular también incluye sales de los mismos.

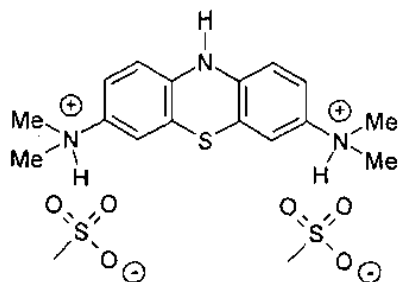
Los compuestos de la invención también pueden proporcionarse en forma de un solvato o hidrato. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional se refiere a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto, sal de compuesto) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convencionalmente como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc. A menos que se especifique otra cosa, cualquier referencia a un compuesto también incluye formas de solvato e hidrato de los mismos.

De manera natural, también se abarcan los solvatos o hidratos de sales de los compuestos mediante la presente invención.

Variación isotópica

- 5 En algunas realizaciones, uno o más átomos de carbono del compuesto es ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C .
- En algunas realizaciones, uno o más átomos de carbono del compuesto es ^{11}C .
- 10 En algunas realizaciones, uno o más átomos de carbono del compuesto es ^{13}C .
- En algunas realizaciones, uno o más átomos de carbono del compuesto es ^{14}C .
- 15 En algunas realizaciones, uno o más átomos de nitrógeno del compuesto es ^{15}N .
- En algunas realizaciones, uno o más o todos los átomos de carbono de uno o más o todos los grupos $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, R^1 , R^9 , R^{A} y R^{B} es ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C .
- 20 En algunas realizaciones, uno o más o todos los átomos de carbono de uno o más o todos los grupos $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$ y $\text{R}^{7\text{NB}}$ es ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C .

La invención se refiere un compuesto 1 para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia:



25 bis(metanosulfonato) de *N,N,N',N'*-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio.

Este compuesto también puede denominarse como:

- 30 bis(hidrometanosulfonato) de *N,N,N',N'*-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina
 bis(hidrometanosulfonato) de metiltioninio Leuco
 bis(mesilato) de metiltioninio Leuco
 LMTM
 35 LMT.2MsOH

Pureza

- 40 Los compuestos de la presente invención pueden describirse convencionalmente como que están en una "forma reducida estabilizada". Los compuestos se oxidan (por ejemplo, autooxidan) para dar las formas oxidadas correspondientes. Por lo tanto, es probable, si no inevitable, que las composiciones que comprenden los compuestos de la presente invención contendrán, como una impureza, por lo menos algunos de los compuestos oxidados correspondientes.
- 45 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos como se describe en el presente documento, en forma sustancialmente purificada y/o en una forma sustancialmente libre de contaminantes (por ejemplo, el compuesto oxidado correspondiente, otros contaminantes).
- 50 En algunas realizaciones, la forma sustancialmente purificada es al menos el 50 % en peso puro, por ejemplo, al menos el 60 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 70 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 80 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 90 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 95 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 97 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 98 % en peso puro, por ejemplo, al menos al 99 % en peso puro.
- 55 En algunas realizaciones, los contaminantes representan no más del 50 % en peso, por ejemplo, no más del 40 % en peso, por ejemplo, no más del 30 % en peso, 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.

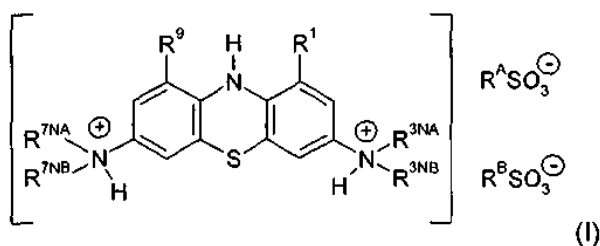
Procesos derivados del producto

En algunas realizaciones, el compuesto es uno que se obtiene mediante o es obtenible mediante, un método como se describe en el presente documento.

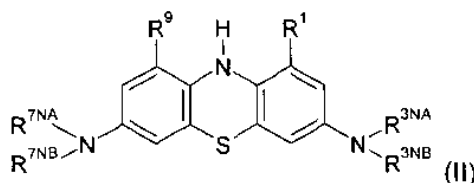
Síntesis química

Los métodos para la síntesis química de los compuestos de la presente invención se describen en el presente documento. Estos y/o otros métodos bien conocidos pueden modificarse y/o adaptarse de maneras conocidas con el fin de facilitar la síntesis de compuestos adicionales dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de fórmula (I):

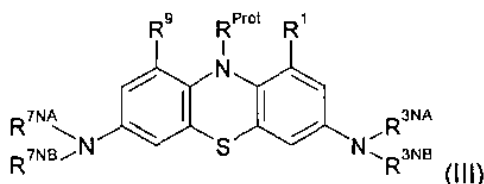


pueden prepararse a partir de los compuestos de fórmula (II):



en la que R¹, R⁹, R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido anteriormente.

Los compuestos de fórmula (II) pueden prepararse, por ejemplo a partir de los compuestos de fórmula (III):



en la que R^{Prot} es un grupo amina protector y R¹, R⁹, R^{3NA}, R^{3NB}, R^{7NA}, R^{7NB}, R^A y R^B son como se han definido anteriormente.

A modo de ejemplo no limitante, R^{Prot} puede ser un grupo acilo, por ejemplo un grupo acetilo (-C(=O)Me) o un benzoilo (-C(=O)Ph).

Los compuestos de fórmula (II) pueden prepararse, por ejemplo mediante la desprotección de los compuestos de fórmula (III) o mediante otros métodos conocidos. De manera inversa, los compuestos de fórmula (II) pueden producirse mediante la protección de compuestos de fórmula (III).

Se conocen los compuestos de fórmulas (II) y (III), y pueden prepararse a partir de materiales de partida conocidos y/o disponibles en el mercado, por ejemplo a partir de los compuestos de fenotiazina correspondientes, usando métodos conocidos.

Por ejemplo, se usaron los intermedios de fórmula (II) y (III) en los métodos para la síntesis de sales de clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato de 3,7-diamino-10H-fenotiazina, divulgados en el documento WO2007/110627.

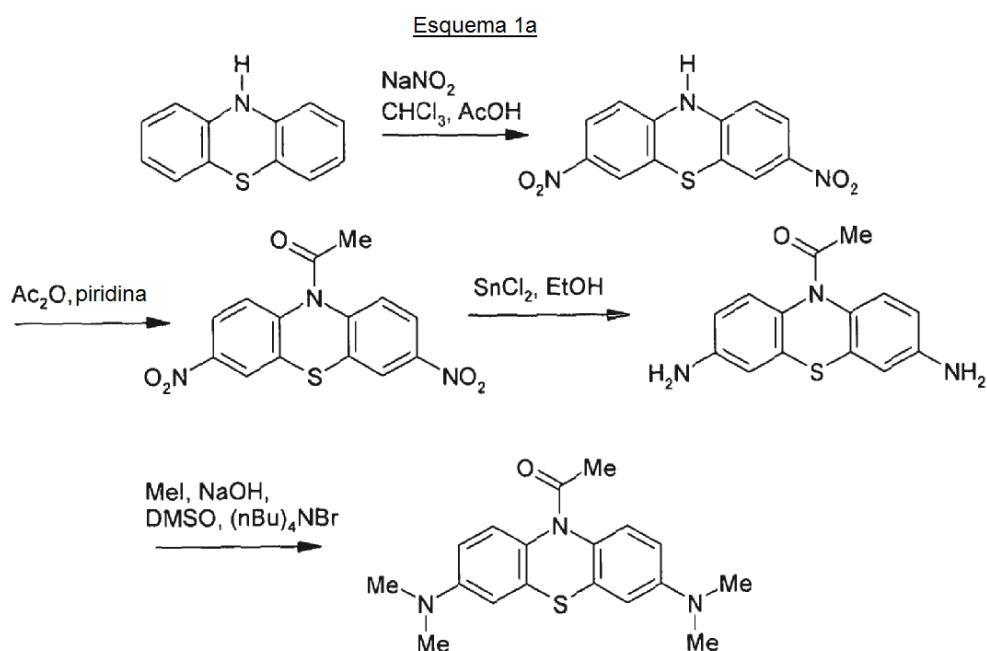
Como se divulga en ese documento, una fenotiazina adecuada puede convertirse a la 3,7-dinitrofenotiazina correspondiente, por ejemplo usando nitrito sódico con ácido acético y cloroformo.

Después, el grupo amino del anillo puede protegerse, por ejemplo como el acetato, por ejemplo usando anhídrido acético y piridina.

Después, los grupos nitro pueden reducirse a grupos amino, por ejemplo usando cloruro de estaño (II) con etanol.

Después, los grupos amino pueden sustituirse, por ejemplo disustituirse, por ejemplo metil disustituídos, por ejemplo usando yoduro de metilo, hidróxido sódico, DMSO y bromuro de tetra-n-butil amonio, para proporcionar una 3,7-dialquilamino-10H-fenotiazina protegida con N-acetilo.

Los ejemplos de tal método se ilustran en los Esquemas 1a y 1b. El uso de uno cualquiera o más de los reactivos descritos en el presente documento en los procesos, están, por supuesto, abarcados por la presente invención:



10

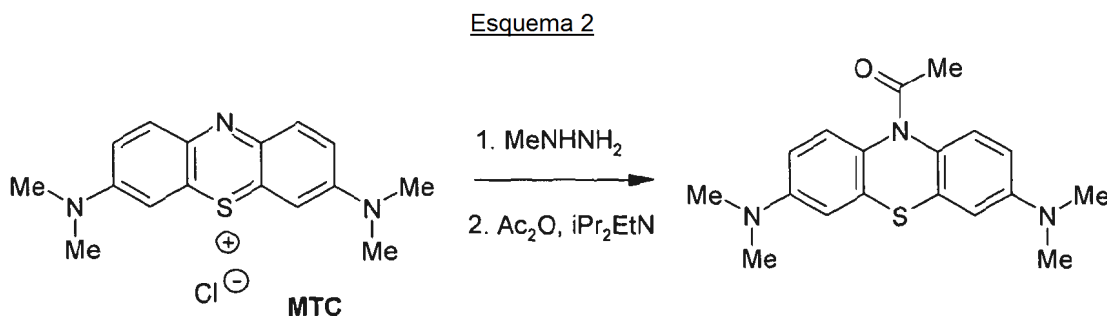
Después, el grupo amino de este intermedio N-acetilo puede desprotegerse, es decir el grupo N-acetilo puede retirarse, por ejemplo usando un ácido acuoso.

15 Los compuestos de fórmulas (II) y (III) también pueden prepararse usando los métodos descritos en el documento WO2008/007074. Este documento da a conocer compuestos de fórmula (III) y compuestos de fórmula (II) en la que R^{Prot} es un grupo acilo, por ejemplo un grupo acetilo.

En un enfoque, primero, puede reducirse un cloruro de tioninio apropiado (por ejemplo, cloruro de metil tioninio cloruro, cloruro de etil tioninio, etc.) y acilarse para dar el correspondiente 1-(3,7-bis-dimetilamino-fenotiazin-10-il)-etanona, por ejemplo, por reacción con hidrazina (NH₂NH₂), metil hidrazina (MeNHNH₂) o borohidruro sódico (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 reducido y acetilado (de fórmula (III)) puede entonces desprotegerse (retirando el grupo acetilo), por ejemplo por reacción con un ácido adecuado, para dar un compuesto de fórmula (II) o puede usarse directamente. Ventajosamente, esta reacción puede producir un producto con un alto grado de pureza.

5

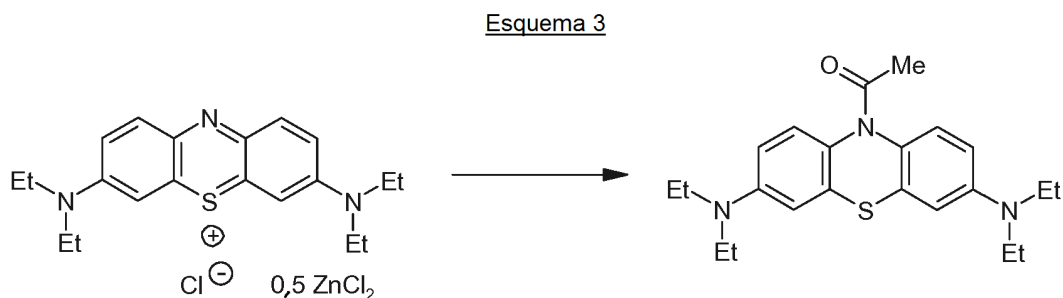
10 Se muestra un ejemplo en el siguiente esquema.



En otro enfoque, una sal de tioninio apropiada, por ejemplo, semi cloruro de etil tionio de cinc, puede reducirse y el grupo amino protegerse, por ejemplo, por reacción con un agente reductor fenilhidrazina, etanol, anhídrido acético y piridina.

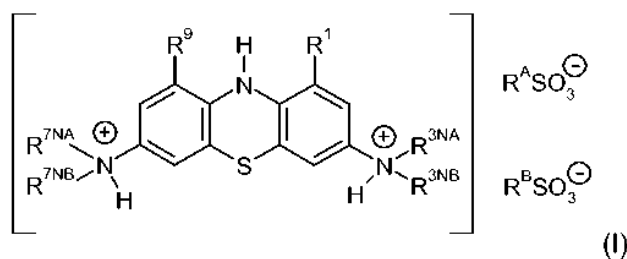
15

Se muestra un ejemplo en el siguiente esquema:



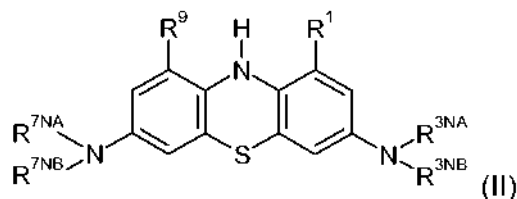
20

La divulgación en el presente documento, por lo tanto proporciona un método para preparar un compuesto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina de fórmula (I):



25

a partir de un compuesto de fórmula (II):



en la que R^A , R^B , R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido anteriormente.

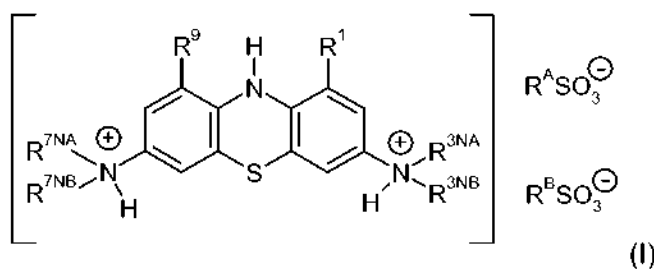
5 En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de:

formación de sal (SF).

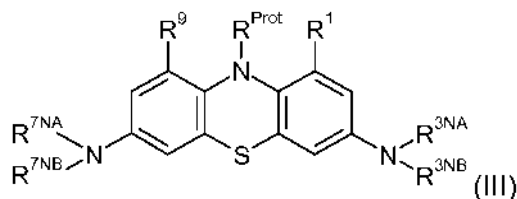
10 En algunas realizaciones, la formación de sal (SF) comprende el tratamiento de un compuesto de fórmula (II) con un ácido sulfónico apropiado.

En algunas realizaciones, la formación de sal comprende el tratamiento de una solución de un compuesto de fórmula (II) con un ácido sulfónico apropiado, en un disolvente orgánico.

15 La divulgación en el presente documento proporciona un método para preparar un compuesto de 3,7-diamino-10H-fenotiazina de fórmula (I):



20 a partir de un compuesto de fórmula (III):



25 en la que R^A , R^B , R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido anteriormente y en la que R^{Prot} es un grupo amina protector.

Una amplia variedad de grupos protectores amina, se usan ampliamente y son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green and P. Wuts; 4ª Edición; John Wiley and Sons, 2006).

30 En algunas realizaciones, el grupo protector amina es un grupo protector escindible por ácido.

En algunas realizaciones, el grupo protector amina es un grupo acilo, tal como un grupo acetilo.

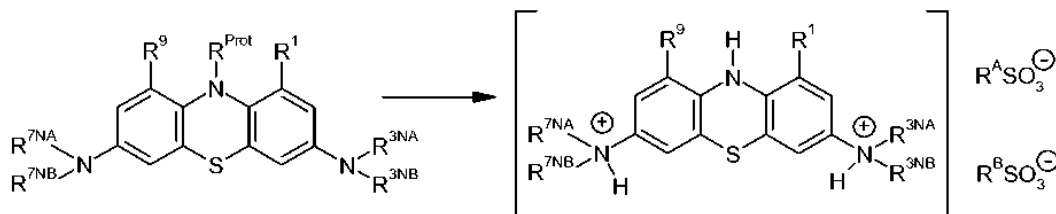
En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de:

35 desprotección del anillo amino (DP); y
formación de sal (SF).

40 La desprotección del anillo amino (DP) comprende la retirada del grupo protector para convertir el grupo de anillo amina *N*-protegido ($-NR^{Prot}$) a un grupo de anillo amina libre ($-NH$). La desprotección de un compuesto de fórmula (III) produce el compuesto correspondiente de fórmula (II).

Los métodos para la retirada de los grupos protectores amina son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green and P. Wuts; 4ª Edición; John Wiley and Sons, 2006).

5 En algunas realizaciones, la etapa de de desprotección del anillo amino (DP) y la etapa de formación de sal (SF) se realizaron simultáneamente (es decir, en una etapa). Por ejemplo:



10 En algunas realizaciones, la desprotección del anillo amino (DP) y la formación de sal (SF) simultáneamente comprende el tratamiento del compuesto de fórmula (III) con un ácido sulfónico apropiado, para producir una sal bis(sulfonato) de fórmula (I).

15 En algunas realizaciones, la desprotección del anillo amino y la formación de sal simultánea puede comprender el tratamiento de una solución de un compuesto de fórmula (III) en un disolvente orgánico con el ácido sulfónico y agua.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es tolueno.

20 En los métodos descritos en el presente documento, el ácido sulfónico puede seleccionarse a partir de ácidos alquilsulfónico y ácidos arilsulfónicos. Puede ser un ácido sulfónico de fórmula $R^A SO_3H$ o $R^B SO_3H$, en la que R^A y R^B son como se definen en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, el ácido sulfónico puede ser un ácido disulfónico, es decir un compuesto que contiene dos restos de ácido sulfónico por molécula. Estos restos de ácido sulfónico pueden enlazarse, mediante por ejemplo un grupo alquilenos o arileno.

En algunas realizaciones el ácido sulfónico puede seleccionarse a partir de: ácido metanosulfónico (MsOH), ácido etanosulfónico (EsOH), ácido bencenosulfónico (BSA), ácido naftalenosulfónico (NSA), ácido p-toluenosulfónico (TsOH), ácido etanodisulfónico (EDSA), ácido propanodisulfónico (PDSA) y ácido naftaleno-1,5-disulfónico (NDSA).

30 En algunas realizaciones, el material de partida de fenotiazina (es decir el compuesto de fórmula (III)) se calentó primero en dicho disolvente orgánico hasta que se disolvió completamente y la solución resultante se filtró antes de la adición de los reactivos (es decir el ácido sulfónico y agua).

35 En algunas realizaciones, el compuesto se calentó en dicho disolvente orgánico a una temperatura de aproximadamente 60-80 °C, por ejemplo a una temperatura de aproximadamente 70 °C.

40 En algunas realizaciones, se añadió el ácido sulfónico en una cantidad de al menos 2 equivalentes molares, por ejemplo aproximadamente 2,2 equivalentes molares, con respecto al material de partida de fenotiazina. Si se usa un ácido disulfónico, se entenderá que la cantidad molar del ácido será al menos 1 equivalente molar, por ejemplo aproximadamente 1,1 equivalentes molares, así como conseguir el mismo número de restos de ácido sulfónico por molécula de material de partida de fenotiazina.

45 Puede ser deseable añadir lentamente el ácido sulfónico para prevenir un incremento de temperatura (exotérmico). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ácido sulfónico se añade gradualmente. En algunas realizaciones, el ácido sulfónico se añade a una temperatura de aproximadamente 15-25 °C.

En algunas realizaciones, después de la adición del ácido sulfónico y agua, la reacción se calienta a una temperatura de aproximadamente 80-90 °C.

50 En algunas realizaciones, la reacción se mantiene a esta temperatura hasta que se consideró completada, mediante por ejemplo análisis cristalográfico.

En algunas realizaciones, después de la reacción, la solución se trata con un contra disolvente para precipitar el producto. En algunas realizaciones, el disolvente contador es un alcohol, por ejemplo etanol.

55 Puede ser deseable 'sembrar' la mezcla de reacción con una pequeña cantidad, por ejemplo, aproximadamente 1 mg por gramo de material de partida (compuesto de fórmula (II)), del producto de bis(sulfonato) deseado. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la adición de la semilla asegura precipitación temprana y eficiente del producto deseado, reduciendo la oportunidad de posibles reacciones secundarias y la formación de subproductos. La semilla

también se cree que es de uso en el control del tamaño de partícula del producto precipitado.

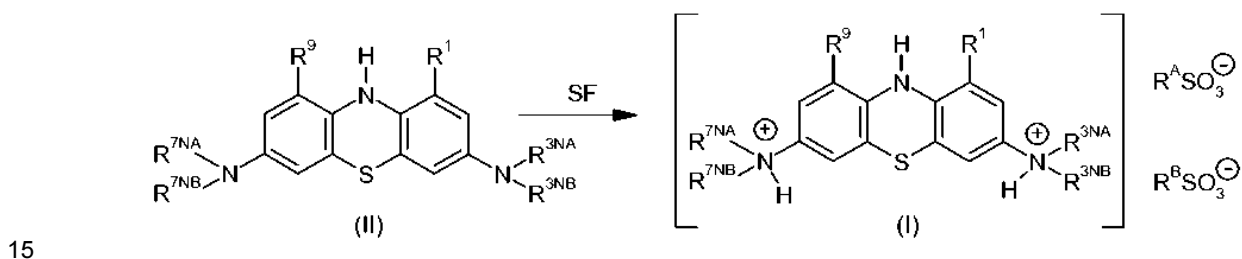
Por lo tanto en algunas realizaciones, después de la reacción, la mezcla resultante se siembra con una pequeña cantidad de la sal bis(sulfonato) deseada.

- 5 En algunas realizaciones, las semillas comprende partículas de la sal bis(sulfonato) deseada que ha sido molida.
 En algunas realizaciones, las semillas comprende partículas de la sal bis(sulfonato) deseada que ha sido molida a un tamaño de menos de aproximadamente 100 μm .

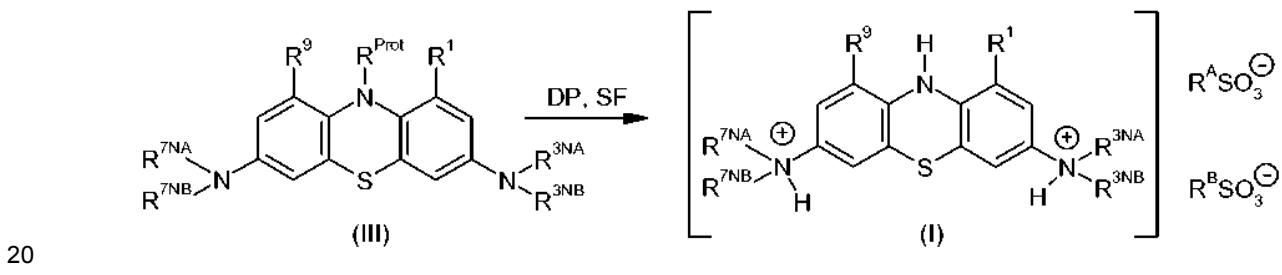
En algunas realizaciones, el producto precipitado se aísla por filtración.

- 10 En algunas realizaciones, después de la filtración, el producto se lava con un disolvente orgánico, por ejemplo etanol o acetonitrilo.

La formación de sal (SF) produce la sal bis(sulfonato) de fórmula (I) a partir del compuesto de fórmula (II):



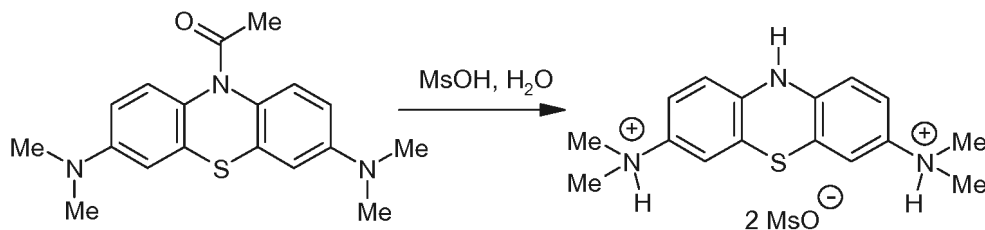
Como se ha explicado anteriormente, la sal bis(sulfonato) también puede prepararse directamente a partir de un compuesto protegido con amino correspondiente (por ejemplo, N-acetilo) de fórmula (III).



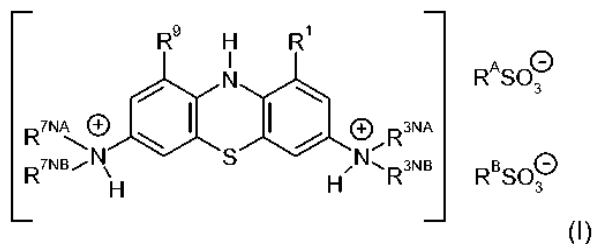
En este caso, la formación de sal puede realizarse al mismo tiempo que la desprotección, por ejemplo usando el ácido sulfónico apropiado, por ejemplo ácido metanosulfónico, para la etapa de desprotección. Se ilustra un ejemplo en el siguiente esquema:

25

Esquema 4



Se describe en el presente documento un método para preparar un compuesto de fórmula (I):



5 en la que R^A , R^B , R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido previamente, que comprende el método:

preparar un compuesto de fórmula (II) o (III) como se ha definido en el presente documento, seguido de formación de sal (SF) y/o desprotección del anillo amina (DP).

10 Las etapas de la formación de sal (SF) y la desprotección del anillo amina (DP) son como se han descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, la preparación de dicho compuesto de fórmula (II) o (III) comprende un método como el divulgado en el documento WO2007/110627.

15 En algunas realizaciones, la preparación de dicho compuesto de fórmula (II) o (III) comprende un método como el divulgado en el documento WO2008/007074.

En algunas realizaciones, la preparación de un compuesto de fórmula (II) comprende la desprotección del anillo amina (DP) de un compuesto de fórmula (III), como se ha mostrado anteriormente.

En algunas realizaciones, la preparación de un compuesto de fórmula (III) comprende una o más etapas seleccionadas entre:

25 nitración (NO),
protección anillo amino (AP),
reducción nitro (NR),
sustitución amina (AS).

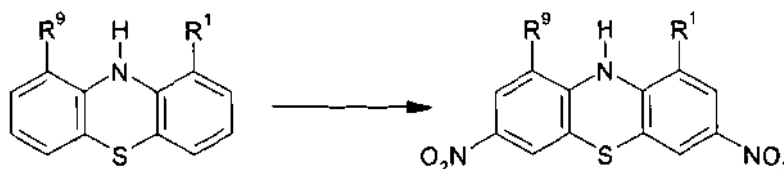
30 En algunas realizaciones, la preparación de un compuesto de fórmula (III) comprende las etapas de

reducción (RED), y
protección anillo amino (AP).

35 Las etapas pueden realizarse en cualquier orden lógico. En algunas realizaciones, las etapas se realizan en el orden enumerado (es decir, cualquier etapa en la lista se realiza al mismo tiempo que, o posterior a, la etapa precedente en la lista).

En algunas realizaciones, la nitración (NO) comprende:

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

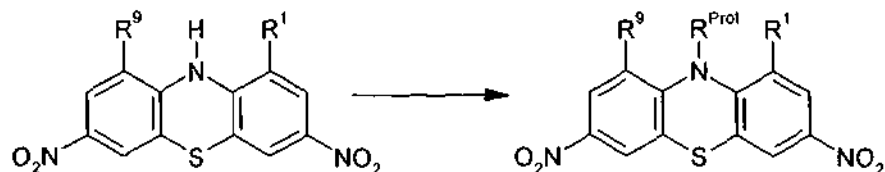


45 En algunas realizaciones, la nitración se realiza usando un a nitrito, por ejemplo, nitrito sódico, por ejemplo, nitrito sódico con ácido acético, y un disolvente tal como dimetilsulfóxido, dimetil formamida, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetoxietano, acetona, diclorometano o cloroformo.

En algunas realizaciones, la protección del anillo amino (AP) comprende:

50

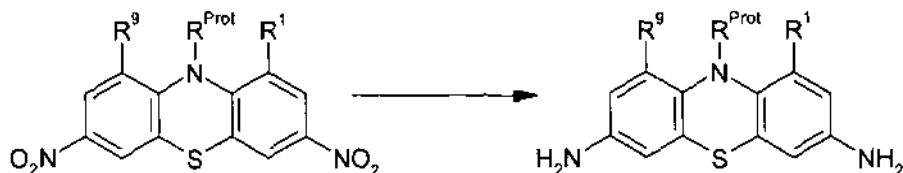
protección del anillo amino (AP), en la que el grupo de anillo amino (-NH-) una sal de 3,7-dinitro-10H-fenotiazina se convierte a un grupo del anillo amino protegido (-NR^{Prot}), por ejemplo:



5 En algunas realizaciones, la protección del anillo amino se consigue como un acetato, por ejemplo, usando anhídrido acético, por ejemplo, usando anhídrido acético y una base tal como una amina base, por ejemplo trietilamina o piridina.

10 En algunas realizaciones, la etapa de reducción nitro (NR) comprende:

reducción nitro (NR), en el que cada uno de los grupos nitro (-NO₂) de un 3,7-dinitro-10H-fenotiazina protegido se convierte a un grupo amino (-NH₂), por ejemplo:



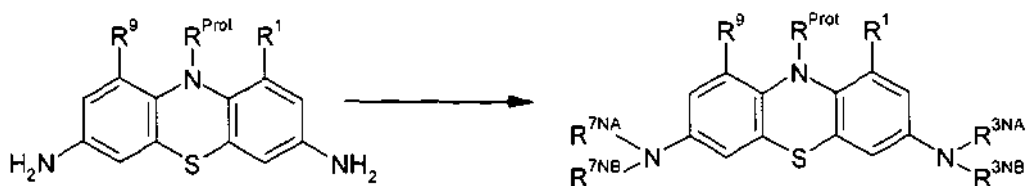
15 En algunas realizaciones, la reducción nitro puede realizarse usando, por ejemplo, cloruro de estaño (II), por ejemplo, cloruro de estaño (II) con etanol.

En algunas realizaciones, la reducción nitro puede realizarse usando, por ejemplo, paladio sobre carbono (Pd/C) e hidrógeno en, por ejemplo, 2-metil-tetrahidrofurano.

20 En algunas realizaciones, la reducción nitro puede realizarse usando, por ejemplo, cinc y cloruro de amonio acuoso de amonio en metanol y THF

En algunas realizaciones, la etapa de sustitución amina (AS) comprende:

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



30 En algunas realizaciones, la sustitución se realiza usando un haluro de alquilo, por ejemplo, un yoduro de alquilo, por ejemplo, yoduro de metilo, por ejemplo, yoduro de metilo con hidróxido sódico, DMSO, tolueno y bromuro de tetra-n-butil amonio.

35 En algunas realizaciones, la sustitución amina comprende el tratamiento con formaldehído (por ejemplo, paraformaldehído, formalina) en condiciones de reducción. Por ejemplo, el tratamiento con formalina y gas hidrógeno, en presencia de un catalizador de a Pd/C; o el tratamiento con paraformaldehído en presencia de un agente reductor, tal como cianoborohidruro sódico y ácido acético.

En algunas realizaciones, la etapa de reducción (RED) es:

40 reducción (RED), en la que una sal 3,7-di(amino disustituída)-tioninio se reduce para dar la 3,7-di(amino disustituído)-10H-fenotiazina correspondiente, por ejemplo por tratamiento con un agente reductor, tal como hidrazina (NH₂NH₂), metil hidrazina (MeNHNH₂), o borohidruro sódico y una base, tal como piridina, trietilamina o base de Hunig (diisopropiletilamina).

45 En algunas realizaciones, la etapa de protección del anillo amino (AP) es:

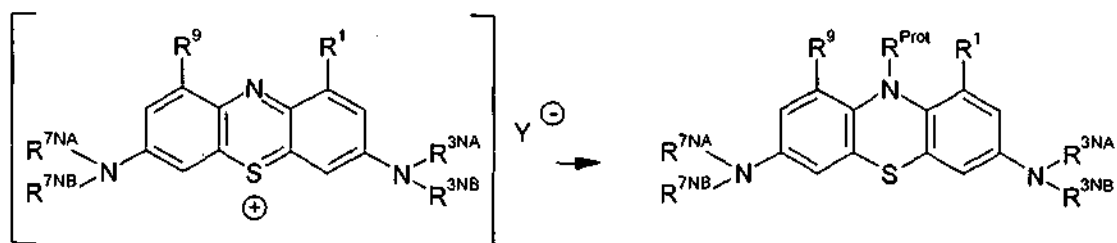
protección del anillo amino (AP), en el que una 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina está protegido, por ejemplo por tratamiento con anhídrido acético, para dar la 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina protegida correspondiente, por ejemplo la N-acetil 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina correspondiente .

5 En algunas realizaciones, las etapas se realizan en el orden enumerado (es decir, cualquier etapa en la lista se realiza al mismo tiempo que, o posteriormente a, la etapa precedente en la lista).

En algunas realizaciones, la etapa de reducción (RED) y la etapa de protección del anillo amino (AP) se realizan simultáneamente (es decir, como una etapa).

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

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



20 en la que Y es un contraión. En algunas realizaciones, Y representa Cl⁻.

En algunas realizaciones, la sal 3,7-di(amino disustituido)-tioninio es cloruro de metiltioninio (MTC).

25 En algunas realizaciones, la etapa de reducción (RED) y la etapa de protección del anillo amino (AP) combinada se consigue usando una hidrazina, tal como fenilhidrazina, MeNHNH₂, o NH₂NH₂.H₂O y anhídrido acético.

En algunas realizaciones, la etapa se realiza en una atmósfera de nitrógeno.

30 En algunas realizaciones la etapa de reducción (RED) y la etapa de protección del anillo amino (AP) combinada se realiza usando, por ejemplo, fenilhidrazina, etanol, anhídrido acético y piridina.

35 En algunas realizaciones, la etapa de reducción (RED) y la etapa de protección del anillo amino (AP) combinada se realiza usando, por ejemplo, hidrato de hidrazina, acetonitrilo, anhídrido acético y trietilamina, en una atmósfera de nitrógeno.

En algunas realizaciones, la 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina protegida, por ejemplo la N-acetil 3,7-di(amino disustituido)-10H-fenotiazina, se somete a una etapa de purificación.

40 En algunas realizaciones, la purificación comprende la adición de un disolvente orgánico, por ejemplo tolueno, y un ácido, por ejemplo ácido acético, para disolver el compuesto, seguido de una etapa de lavado.

En algunas realizaciones, el lavado comprende la adición de agua y/o ácido acético acuoso a la solución del compuesto; agitación y/o calentamiento; y separación de la fase orgánica.

En algunas realizaciones, el lavado se repite, por ejemplo hasta tres veces.

En algunas realizaciones, el lavado se sigue de aislamiento del producto purificado.

45 En algunas realizaciones, el aislamiento del producto purificado comprende enfriamiento, precipitación y filtración del producto.

Formas cristalinas

50 En algunas realizaciones, se proporciona en forma cristalina, el compuesto para su uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia de la invención.

En algunas realizaciones, la forma cristalina es 'Forma A' como se describe en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, la forma cristalina tiene la estructura representada en Figura 17 y/o se caracteriza por los datos cristalinos mostrados en el Anexo de la Tabla 1 y/o las coordenadas atómicas mostradas en un Anexo de la Tabla 2 y/o las longitudes de los enlaces y los ángulos mostrados en un Anexo de la Tabla 3 y/o los parámetros de

desplazamiento anisotrópico mostrados en un Anexo de la Tabla 4 y/o las coordenadas de hidrógeno y los parámetros de desplazamiento isotrópico mostrados en un Anexo de la Tabla 5.

Inversión y/o inhibición de la agregación de una proteína

5 En el presente documento se describe el uso de un compuesto o composición como se describe en el presente documento para regular (por ejemplo, para invertir y/o inhibir) la agregación de una proteína, por ejemplo, la agregación de una proteína asociada a una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica. La agregación puede ser *in vitro* o *in vivo* y se puede asociar con un estado de enfermedad como se trata en el presente documento.

10 En el presente documento se describe un método para regular (por ejemplo, invertir y/o inhibir) la agregación de una proteína, por ejemplo, la agregación de una proteína asociada a una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica, que comprende poner en contacto la proteína con una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. El procedimiento puede realizarse *in vitro* o *in vivo*.

15 En el presente documento se describe un procedimiento para regular (por ejemplo, invertir y/o inhibir) la agregación de una proteína en el cerebro de un mamífero, la agregación que está asociada a un estado de enfermedad como se describe en el presente documento, comprendiendo el tratamiento la etapa de administrar a dicho mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento que es un inhibidor de dicha agregación.

Métodos de tratamiento

25 En el presente documento se describe un método de tratamiento que comprende administrar a un paciente en necesidad de tratamiento una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un compuesto, como se describe en el presente documento, preferentemente en forma de una composición farmacéutica.

Uso en métodos de terapia

30 La presente invención se refiere a un compuesto o composición tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento (por ejemplo, de un estado de enfermedad) del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Uso en la fabricación de medicamentos

35 En el presente documento se describe el uso de un compuesto o composición como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento (por ejemplo, de un estado de enfermedad).

Estados de enfermedad tratados - Enfermedades de agregación de proteínas

40 Los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles en el tratamiento o profilaxis de enfermedades de agregación de proteínas.

45 Por tanto, en algunas realizaciones, el estado de enfermedad es una enfermedad de agregación de proteínas y, por ejemplo, el tratamiento es con una cantidad de un compuesto o composición como se describe en el presente documento suficiente para inhibir la agregación de la proteína asociada a dicho estado de enfermedad.

50 En general, la agregación de proteínas es la que se produce a partir de una interacción de polimerización conformacional inducida, es decir, una en la que un cambio conformacional de la proteína, o en un fragmento de la misma, da lugar a la unión y agregación en plantilla de otras moléculas de proteína (precursoras) en un modo autopropagante. Una vez que se inicia la nucleación, puede seguirle una cascada de agregación que implica la polimerización conformacional inducida de más moléculas de proteína, conduciendo a la formación de fragmentos de productos tóxicos en agregados que son sustancialmente resistentes a la posterior proteólisis. Se cree que los agregados de proteínas formados de este modo son una causa proximal de estados de enfermedad manifestados como neurodegeneración, demencia clínica y otros síntomas patológicos.

60 La siguiente tabla proporciona una lista de diversas proteínas de agregación asociadas a enfermedades y las enfermedades correspondientes de la agregación de proteínas. El uso de los compuestos y composiciones de la invención en relación con estas proteínas o enfermedades está abarcado por la presente invención.

Enfermedades por agregación de proteínas				
Proteína	Enfermedad	Dominio de agregación y/o mutaciones	Tamaño de la subunidad de fibrilla (kDa)	Referencia
<i>Trastornos neurodegenerativos</i>				
Proteína priónica	Enfermedades de priones	Formas heredadas y esporádicas	27	Prusiner (1998)
	(CJD, nvCJD, insomnio familiar fatal, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru)	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 postencefalítico, enfermedad de Pick, complejo parkinsonismo-demencia de Guam	Formas heredadas y esporádicas	10-12	Wischnik et al. (1988)
		Tau truncada (dominio de unión a tubulina) 297-391	10-12	Wischnik et al. (1988)
		Mutaciones en tau en FTDP17.		Hutton et al. (1998) Hutton et al. (1998)
		Muchas mutaciones en proteínas presenilina.		Czech et al. (2000)
β -proteína amiloide	Enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down	Formas heredadas y esporádicas	4	Glenner y Wong, (1984)
		β -proteína amiloide; 1-42(3).	4	Glenner & Wong, (1984)
		Las mutaciones en APP en familias son raras.		Goate et al. (1991)
Huntingtina	Enfermedad de Huntington,	Extremo N de proteína con repeticiones de glutamina expandidas.	40	DiFiglia et al. (1997)
Ataxinas (1,2,3,7)	Ataxias espinocerebelosas (SCA1, 2, 3, 7)	Proteínas con repeticiones de glutamina expandidas.		Paulson et al. (1999)
Atrofina	Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (ADRPL)	Proteínas con repeticiones de glutamina expandidas.		Paulson et al. (1999)
Receptor de andrógenos	Atrofia muscular espinal y bulbar	Proteínas con repeticiones de glutamina expandidas.		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 Lewy, atrofia de múltiples sistemas	Formas heredadas y esporádicas	19	Spillantini et al. (1998) también PCT/GB2007/001105
		A53T, A30P en familias PD autosómicas dominantes raras.		Polymeropoulos et al. (1997)

TDP-43	DLFT-TDP	Varias mutaciones TDP-43	10-43	Mackenzie et al. (2010)
	Esclerosis lateral amiotrófica	Varias mutaciones TDP-43	10-43	Mackenzie et al. (2010)
Cistatina C	Angiopatía cerebral hereditaria (islandesa)	Cistatina C menos de 10 residuos; L68Q.	12-13	Abrahamson et al. (1992)
Superóxido dismutasa 1	Esclerosis lateral amiotrófica	Mutaciones SOD1.	16	Shibata et al. (1996)
Trastornos no neurodegenerativos				
Hemoglobina	Anemia de células falciformes	Cadena beta de hemoglobina (S).		Carrell y Gooptu (1998)
	Hemólisis de cuerpos de inclusión	Muchas mutaciones.		
Serpinas	Deficiencia de α 1antitripsina (enfisema, cirrosis)	Mutaciones		Lomas et al. (1992)
	Deficiencia de antitrombina (enfermedad tromboembólica)	Mutaciones		Carrell & Gooptu (1998)
	Deficiencia de inhibidor de C1 (angioedema)	Mutaciones		Carrell & Gooptu (1998)
Cadena ligera de inmunoglobulina	Discrasias de células plasmáticas (amiloidosis primaria sistémica AL)	Cadena ligera o fragmentos.	0,5-25	Westermarck et al. (1985)
Amiloide sérico A	Amiloidosis reactiva, secundaria, sistémica AA	Fragmento de 76 residuos (residuos críticos 2-12).	4,5-7,5	Westermarck et al. (1985)
	Enfermedad inflamatoria crónica			
Transtiretina	Polineuropatía amiloide familiar (sistémica; FAP I)	Tetramero disociado a variante monomérica conformacional.	10-14	Gustavsson et al. (1991)
		Muchas mutaciones (algunas no están asociadas a amiloide; varios tipos diferentes de enfermedad).		
	Amiloidosis cardíaca senil	Transtiretina normal	10-14	Gustavsson et al. (1991)
Gelsolina	Amiloidosis familiar tipo finlandesa (FAP IV)	D187Q conduce a 173225/243 truncado (residuos críticos 182192).	9,5	Maury y Baumann (1990)
β 2-Microglobulina	Amiloidosis asociada a hemodiálisis	β 2-Microglobulina	12-25	Gorevic et al. (1985)
	Amiloide prostático			
Apolipoproteína A1	Polineuropatía amiloide familiar (sistémica; FAP III)	Extremo N 8393 residuos; G26R, W50R, L60R	9	Booth et al. (1997)
Lisozima	Amiloidosis visceral familiar	Lisozima o fragmentos (con o sin I56T, D67H)	14	Pepys et al. (1993)
Amilina (polipéptido amiloide del islote)	Diabetes de tipo II (NIDDM)	Fragmentos (núcleo crítico de 20-29)	3,9	Westermarck (1990)
Cadena α de fibrinógeno	Amiloidosis renal hereditaria	Fragmentos de fibrinógeno	7-10	Uemichi et al. (1992)
Procalcitonina	Carcinoma medular de la tiroides	Fragmentos de calcitonina	3,4	Sletten et al. (1976)
Factor natriurético atrial	Amiloidosis cardíaca	ANF, sin mutantes	3,5	Johansson et al. (1987)
Insulina	Amiloidosis localizada por inyección	Insulina	Dische	Dische et al. (1988)
Muchas proteína	Miositis por cuerpos de inclusión	β -amiloide, tau, ubiquitina, ApoE, y presenilina-1		Askenas et al (2009)

Otras proteínas que forman amiloide	(<i>in vitro</i>)	Otras proteínas		Chiti et al. (1999)
-------------------------------------	---------------------	-----------------	--	---------------------

Como se describe en los documentos WO 02/055720, WO2007/110630, and WO2007/110627, las diaminofenotiazinas tienen utilidad en la inhibición de tales enfermedades de agregación de proteínas.

- 5 Por tanto, se apreciará que, excepto cuando el contexto lo requiera de otro modo, la descripción de realizaciones con respecto a proteína tau o proteínas similares a tau (por ejemplo, MAP2, véase más adelante) debe considerarse que se aplica igualmente a las otras proteínas tratadas en el presente documento (por ejemplo, β -amiloide, sinucleína, prión, etc.) u otras proteínas que pueden iniciar o someterse a agregación patológica similar en virtud de un cambio conformacional en un dominio crítico para la propagación de la agregación, o que confiere estabilidad proteolítica al agregado formado de este modo (véase, por ejemplo, el artículo de Wischik et al. in "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2ª edición, 2000, Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford). Todas aquellas proteínas pueden denominarse en lo sucesivo en el presente documento "proteínas de enfermedades de agregación".
- 10
- 15 Asimismo, cuando se hace mención a "agregación de tau-tau" o similares esto también puede considerarse que va aplicarse a otra "agregación de proteínas de agregación" tales como agregación de β -amiloides, agregación de priones, agregación de sinucleínas, etc. Lo mismo aplica para la "degradación proteolítica de tau", etc.

20 *Proteínas de enfermedades de agregación preferidas*

Las realizaciones preferidas de la invención se basan en la proteína tau. término "proteína tau" como se usa en el presente documento se refiere generalmente a cualquier proteína de la familia de las proteínas tau. Las proteínas tau se caracterizan por ser una de entre un gran número de familias de proteínas que se copurifican con microtúbulos durante ciclos repetidos de ensamblaje y desensamblaje (véase, por Shelanski et al., 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, Vol. 70, pág. 765–768), y se conocen como proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). Los miembros de la familia tau comparten las características comunes de tener un segmento del extremo N característico, secuencias de aproximadamente 50 aminoácidos insertadas en el segmento del extremo N, que están reguladas evolutivamente en el cerebro, una región de repetición en tándem característica constituida por 3 o 4 repeticiones en tándem de 31-32 aminoácidos, y una cola del extremo C.

30 MAP2 es la proteína asociada a microtúbulos predominante en el compartimento somatodendrítico (véase, por ejemplo, Matus, A., en "Microtubules" [Hyams y Lloyd, Eds.] pág. 155–166, John Wiley and Sons, Nueva York, Estados Unidos). Las isoformas de MAP2 son casi idénticas a la proteína tau en la región de repetición en tándem, pero se diferencian sustancialmente tanto en la secuencia como en la extensión del dominio del extremo N (véase, por ejemplo, Kindler y Garner, 1994, Mol. Brain Res., Vol. 26, pág. 218–224). Sin embargo, la agregación en la región de repetición en tándem no es selectiva para el dominio de repetición de tau. Por tanto, se apreciará que cualquier discusión en el presente documento en relación con la proteína tau o la agregación de tau-tau deberá considerarse que también se refiere a la agregación de tau-MAP2, agregación de MAP2-MAP2, etc.

40 En algunas realizaciones, la peroxidasa es proteína tau.

En algunas realizaciones, la proteína es una sinucleína, por ejemplo, α -o β -sinucleína.

45 En algunas realizaciones, la proteína es TDP-43.

La proteína de unión a ADN TAR 43 (TDP-43) es una proteína de 414 aminoácidos codificada por *TARDBP* en el cromosoma 1p36.2. La proteína está altamente conservada, se expresa ampliamente y está predominantemente localizada en el núcleo, pero puede desplazarse entre el núcleo y el citoplasma (Mackenzie *et al* 2010). Está implicada en la regulación de la transcripción y el corte y empalme y puede tener funciones en otros procesos, tales como: procesamiento de microARN, apoptosis, división celular, estabilización del ARN mensajero, regulación de la plasticidad neuronal y mantenimiento de la integridad dendrítica. Por otra parte, desde el año 2006 se ha acumulado una gran cantidad de evidencia en apoyo de la ganancia tóxica de TDP-43 de la hipótesis de la función en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). TDP-43 es una proteína que tiende a la agregación de forma inherente y los agregados formados *in vitro* son similares ultraestructuralmente a los depósitos de TDP-43 observados en las neuronas en degeneración en los pacientes con ELA (Johnson et al 2009). Johnson et al (2008) demostró que cuando TDP-43 se sobreexpresa en un modelo de levadura, solo la forma agregada es tóxica. En varios estudios *in vitro* se ha demostrado también que fragmentos C-terminales de la TDP-43 son más propensos que la TDP-43 de longitud completa a formar agregados citoplasmáticos insolubles que ubiquitina y son tóxicos para las células (Arai et al 2010; Igaz et al 2009; Nonaka et al 2009; Zhang et al 2009). Aunque Nonaka et al (2009) sugirió que estos agregados citoplasmáticos se unen a la proteína de longitud completa endógena agotándola en el núcleo, Zhang et al (2009) encontraron retención de la expresión nuclear normal, lo que sugiere un efecto puramente tóxico para los agregados. Yang et al (2010) han descrito la captura de la TDP-43 de longitud completa dentro de los agregados de fragmentos de los extremos C y N de TDP-43 en neuronas motoras NSC34 en cultivo. El sobrecrecimiento de neuritas, deteriorado

como resultado de la presencia de dichos fragmentos truncados, podría ser rescatado por la sobreexpresión de la proteína de longitud completa. Aunque no se ha establecido el papel del sobrecrecimiento de las neuritas in vivo, este modelo apoyaría la sugerencia hecha por Nonaka y colegas de una función de la agregación de TDP-43 en la patología del ELA.

La expresión de TDP-43 mutante en cultivos celulares se ha indicado en repetidas ocasiones se da lugar a una mayor generación de fragmentos C-terminales con aún mayor agregación citoplasmática y efectos tóxicos que la proteína de tipo salvaje (Kabashi et al 2008; Sreedharan et al 2008; Johnson et otros, 2009; Nonaka et al 2009; Arai et al 2010; Barmada et al 2010; Kabashi et al 2010).

Cuando la proteína es proteína tau, en algunas realizaciones, la práctica de la presente invención proporciona un método de inhibición de la producción de agregados de proteínas (por ejemplo, en forma de filamentos helicoidales pareados (FHE), opcionalmente en ovillos neurofibrilares (ONF) en el cerebro de un mamífero, siendo el tratamiento como se ha descrito anteriormente.

Indicaciones preferidas - Enfermedades de agregación de proteínas

Notablemente, no es solo en la enfermedad de Alzheimer (EA) en la que la proteína tau (y la función o el procesamiento anómalo de la misma) puede desempeñar una función. La patología de los trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva (PSP), parece correlacionarse con una acumulación de agregados patológicos de tau truncada en el giro dentado y las células piramidales estrelladas de la neocorteza, respectivamente. Otras demencias incluyen la demencia frontotemporal (DFT); DFT con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (DFTP-17); el complejo desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (CDDPA); la degeneración palidopontónica (DPPN), el síndrome de Guam-ALS; la degeneración palidonigroluisiana (DPNL); la degeneración córtico-basal (DCB) y otras (véase, por ejemplo, el artículo de Wischik, et al. en "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2ª Edición, 2000, Eds. Dawbarn, D. and Allen, S.J., The Molecular and Cellular Neurobiology Series, Bios Scientific Publishers, Oxford; especialmente la tabla 5.1). Todas estas enfermedades, que se caracterizan principalmente o parcialmente por una agregación anormal de tau, se denominan en el presente documento "tauopatías".

Por tanto, en algunas realizaciones, el estado de enfermedad es una tauopatía.
En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es una tauopatía neurodegenerativa.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad se selecciona de enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT), DFT con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (DFTP-17), síndromes de degeneración lobular frontotemporal (DLFT), complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC), degeneración palidopontónica (DPPN), síndrome de Guam-ELA, degeneración palidonigroluisiana (DPNL), degeneración corticobasal (DCB), demencia con granos argirófilos (DAG), demencia del púgil (DP) o encefalopatía traumática crónica (ETC), síndrome de Down (SD), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), MCI, enfermedad de Niemann-Pick, de tipo C (NPC), síndrome de Sanfilippo de tipo B (mucopolisacaridosis III B) o distrofias miotónicas (DM), DM1 o DM2, o encefalopatía traumática crónica (ETC).

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es un trastorno de almacenamiento lisosomal con patología tau. La NPC está causada por mutaciones en el gen *NPC1*, que afecta al metabolismo del colesterol (Love et al 1995) y el síndrome de Sanfilippo de tipo B está causado por una mutación en el gen *NAGLU*, en el que hay una acumulación lisosomal de sulfato de heparina (Ohmi et al. 2009). En estos trastornos de almacenamiento lisosomal, se observa la patología tau y su tratamiento puede disminuir la progresión de la enfermedad. Otros trastornos de almacenamiento lisosomal se pueden caracterizar también por la acumulación de tau.

El uso de sales de diaminofenotiazina en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y MCI se describe con más detalle en los documentos PCT/GB2007/001105 y PCT/GB2008/002066.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es la enfermedad de Parkinson, MCI, o la enfermedad de Alzheimer.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es la enfermedad de Huntington o cualquier otro trastorno de poliglutamina tales como atrofia bulbar muscular espinal (o enfermedad de Kennedy) y atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y varias ataxias espinocerebelosas.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es un síndrome de DLFT (que puede ser, por ejemplo, una tauopatía o una proteinopatía de TDP-43, véase más adelante).
En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es PSP o ELA.

En algunas realizaciones, el tratamiento (por ejemplo, tratamiento de una tauopatía neurodegenerativa, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) puede ser opcionalmente en combinación con uno o varios agentes, por ejemplo, uno o más inhibidores de la colinesterasa (tales como donepezilo (también conocido como Aricept™), rivastigmina (también

conocida como Exelon™), galantamina (también conocida como Reminil™), antagonistas de receptores de NMDA (tales como memantina (también conocida como Ebixa™, Namenda™), antagonistas de los receptores muscarínicos y/o inhibidores del procesamiento de las proteínas precursoras amiloides que conducen a una generación potenciada de beta-amiloide.

5 Las proteinopatías de TDP-43 incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ELA; ELA-TDP) y degeneración lobular frontotemporal (DLFT-TDP).

10 El papel de la TDP-43 en la neurodegeneración en la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas se ha revisado en varias publicaciones recientes (Chen-Plotkin *et al* 2010; Gendron *et al* 2010; Geser *et al* 2010; Mackenzie *et al* 2010).

15 La ELA es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por una parálisis progresiva y pérdida de masa muscular, como consecuencia de la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores en la corteza motora primaria, el tronco cerebral y la médula espinal. A veces se conoce como enfermedad de la motoneurona (EMN) pero hay otras enfermedades distintas de la ELA que afectan a las neuronas motoras o bien superiores o inferiores. Un diagnóstico definitivo requiere signos de las neuronas motoras tanto superiores como inferiores en la musculatura bulbar, de los brazos y de las piernas con una clara evidencia de progresión clínica que no puede explicarse por ningún otro proceso de enfermedad Wijesekera y Leigh 2009).

20 Aunque la mayoría de los casos son ELA-TDP, hay otros casos en los que la proteína patológica se diferencia de TDP-43. La SOD1 mal plegada es la proteína patológica en las inclusiones positivas para ubiquitina en la ELA con mutaciones SOD1 (Seetharaman *et al* 2009)) y en un subconjunto muy pequeño (aproximadamente 3-4 %) de la ELA familiar, debido a mutaciones en FUS (fusiones en la proteína del sarcoma), la proteína patológica ubiquitinada es FUS (Vance *et al* 2009; Blair *et al* 2010). La FUS, como la TDP-43, parece ser importante en el transporte núcleo-citoplasma, aunque las formas en las que el daño a la importación nuclear de FUS siguen estando poco claras. Una nueva clasificación molecular de la ELA, adaptada de Mackenzie *et al* (2010), refleja los mecanismos patológicos subyacentes distintos en los diferentes subtipos (véase la tabla más adelante).

30 Nueva clasificación molecular de la ELA (modificado de Mackenzie *et al* 2010). En la mayoría de los casos, la TDP-43 es la proteína ubiquitinada patológica que se encuentra en la ELA.

Inclusiones positivas para ubiquitina en la ELA			
Proteína de la enfermedad ubiquitinada	TDP-43	FUS	SOD1
Subtipo clínico-patológico	ELA-TDP	ELA-FUS	ELA-SOD1
Genotipo asociado	TARDBP	FUS	SOD1
Frecuencia de los casos de ELA	Frecuente	Rara	Rara

35 La esclerosis lateral amiotrófica ha sido reconocida como una entidad nosológica durante casi un siglo y medio y se reconoce en la CIE-10 clasificada como un subtipo de ENM en la CIE 10 (G12.2) Existen diagnósticos clínicos fiables disponibles para la ELA, que difieren muy poco de la descripción original de Charcot, y también se han acordado criterios neuropatológicos, que reflejan la patología molecular subyacente.

40 Aunque la ELA se clasifica patológicamente en tres subgrupos, ELA-TDP, ELA-SOD1 y ELA-FUS, las dos últimas afecciones son raras. El mayor estudio hasta la fecha mostró que todos los casos de ELA esporádica tienen patología TDP-43 (Mackenzie *et al* 2007). Sólo aproximadamente el 5 % de la ELA es familiar (Byrne *et al* 2010) y las mutaciones en SOD1, las mutaciones más frecuentes que se encuentran en la ELAD, representan entre el 12-23 % de los casos (Andersen *et al* 2006). SOD1 también puede estar implicado en el 2-7% los casos de ELAE. Las mutaciones en FUS parecen ser mucho menos frecuentes, y representan solo aproximadamente el 3-4 % de los casos de ELAF (Blair *et al* 2010). Por lo que puede predecirse con fiabilidad que un caso clínico de ELAE tendrá una patología basada en TDP-43. Del mismo modo esto se puede predecir de forma fiable en la ELAF debido a mutaciones en TDP-43, que representan aproximadamente el 4% de los casos (Mackenzie *et al* 2010). ELA con mutaciones en: VCP, que representa el 1-2% de ELAF (Johnson *et al* 2010), ANG (Seilhean *et al* 2009) y CHMP2B (Cox *et al* 2010) también se ha informado de que están asociadas con patología positiva para TDP-43. Aunque no se ha encontrado que las mutaciones en SOD1, FUS and ATXN2 estén asociadas con agregados positivos para TDP-43, no obstante se ha informado de que TDP-43 está implicada en los procesos patológicos que surgen supuestamente de estas mutaciones (Higashi *et al* 2010; Ling *et al* 2010; Elden *et al* 2010).

55 Por tanto, se ha establecido que TDP-43 tiene un importante, y potencialmente crucial, papel en la patogenia de la gran mayoría de los casos de ELAE y puede estar implicado en la patogenia de una proporción significativa de ELAF. La ELA ahora está ampliamente considerada como una proteinopatía TDP-43 (Neumann *et al* 2009) y numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* proporcionan apoyo a la hipótesis de que el aumento de la función tóxica, debido a la agregación de TDP-43 es responsable de al menos parte de la neurotoxicidad en la enfermedad.

60 Los síndromes de DLFT son afecciones neurodegenerativas de inicio insidioso y progresión inexorable con un pico de inicio en la edad madura. A menudo hay un historial familiar positivo de trastornos similares en un familiar de primer

grado.

La variante del comportamiento de la DFT se caracteriza por el cambio prominente temprano en la función social e interpersonal, a menudo acompañada de comportamientos repetitivos y cambios en el patrón de alimentación. En la demencia semántica, hay importantes problemas para encontrar palabras, a pesar del discurso por otro lado fluido, con conocimiento de los objetos degradados y alteración de la comprensión de una sola palabra sobre la evaluación cognitiva. Afasia no fluida progresiva se presenta con una combinación de problemas motores del habla y defectos gramaticales. Las características de diagnóstico clínico básicas para estos tres síndromes de DLFT se muestran en la tabla siguiente y todos los criterios completos en Neary *et al* (1998).

Perfil clínico y características diagnósticas básicas de los síndromes de DLFT

Síndrome de DLFT- Perfil clínico	Características diagnósticas básicas
Demencia frontotemporal Cambio de carácter y la conducta social desordenada son las características dominantes inicialmente y durante todo el curso de la enfermedad. Funciones instrumentales de la percepción, habilidades espaciales, la praxis y la memoria están intactas o relativamente bien conservadas.	1. inicio insidioso y progresión gradual 2. Declive precoz de la conducta social interpersonal 3. Deterioro temprano en la regulación de la conducta personal 4. Embotamiento emocional temprano 5. Pérdida temprana del entendimiento
Demencia semántica El trastorno semántico (alteraciones de la comprensión del significado de las palabras y/o identidad del objeto) es la característica dominante inicialmente y durante todo el curso de la enfermedad. Otros aspectos de la cognición, incluyendo la memoria autobiográfica, están intactos o relativamente bien conservados,	A) Inicio insidioso y progresión gradual B) Trastorno del lenguaje caracterizado por 1. Habla vacía fluida progresiva 2. Pérdida manifiesta del significado de las palabras por deterioro de los nombres y la comprensión 3. Parafasias semánticas y/o 4. Trastorno de la percepción caracterizado por 1. Prosopagnosia: alteración de reconocimiento de la identidad de caras conocidas y/o 2. Agnosia asociativa: Deterioro del reconocimiento de la identidad del objeto C) Juego de percepción y reproducción de dibujos conservados D) Repetición de una sola palabra conservada E) Conservación de la capacidad para leer en voz alta y escribir al dictado palabras regulares ortográficamente
Afasia no fluida progresiva El trastorno del lenguaje expresivo es la característica dominante inicialmente y durante todo el curso de la enfermedad. Otros aspectos de la cognición están intactos o relativamente bien conservados,	A) Inicio insidioso y progresión gradual B) Habla espontánea no fluida con al menos uno de los siguientes: agramatismo, parafasias fonémicas o anomia

Al descubrimiento de que las inclusiones positivas para TDP-43 caracterizan la ELA y la DLFT-TDP (Neumann et al 2006) le siguió rápidamente la identificación de mutaciones de sentido erróneo en el gen *TARDBP* en los casos tanto familiares como esporádicos de ELA. Hasta ahora se han notificado 38 mutaciones diferentes de *TARDBP* en 79 familias no relacionadas genealógicamente de todo el mundo (Mackenzie et al 2010). Las mutaciones en *TARDBP* representan aproximadamente el 4% de todos los casos de ELA familiar y aproximadamente el 1,5% de los casos de ELA esporádica.

A fecha de diciembre de 2010 se han identificado mutaciones en trece genes que están asociadas con ELA familiar y esporádica. La vinculación de ELA con otros cinco loci cromosómicos se ha demostrado, pero hasta el momento no se han identificado las mutaciones específicas.

Metiltioninio (MP) en las proteinopatías de TDP-43

MT tiene un modo de acción dirigido, y puede reducirla, a la agregación de la proteína TDP-43 en las células, que es una característica patológica de la inmensa mayoría de ELA tanto familiar como esporádica y también es característica de la DLFT-P.

Además, los datos de laboratorio muestran que el metiltioninio inhibe la formación de agregados de TDP-43 en las células SH-SY5Y. Tras el tratamiento con MT 0,05 µM, el número de agregados de TDP-43 se redujo en un 50 %. Estos resultados fueron confirmados por análisis de inmunotransferencia (Yamashita et al 2009).

Los compuestos y composiciones de la invención pueden, por lo tanto, ser útiles para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la degeneración lobular frontotemporal (DLFT).

Metiltioninio (MT) en la enfermedad de Huntington y trastornos de poliglutamina

El MT puede reducir la agregación de proteínas de poliglutamina en las células, que es una característica patológica de la enfermedad de Huntington. La enfermedad de Huntington está causada por la expansión de una repetición CAG traducida situada en el N-terminal de la huntingtina. Los cromosomas de tipo silvestre contienen 6-34 repeticiones mientras que, en la enfermedad de Huntington, los cromosomas contienen 36-121 repeticiones. La edad de aparición de la enfermedad se correlaciona inversamente con la longitud de los tramos de CAG que codifican repeticiones de poliglutamina dentro de la proteína.

Los datos de laboratorio muestran que el metiltioninio inhibe la formación de agregados de un derivado de la huntingtina que contienen un tramo de poliglutamina de 102 residuos en el pez cebra (van Bebber et al. 2010). El MT, cuando se analiza a 0, 10 y 100 mM, evitó la formación de tales agregados en el pez cebra de una forma dependiente de la dosis.

Los compuestos y composiciones de la invención pueden, por lo tanto ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington y otros trastornos de poliglutamina, tal como la atrofia muscular bulbar espinal (o enfermedad de Kennedy) y atrofia dentado-rubro-pálido-luisiana y varias ataxias espinocerebelosas (Orr y Zoghbi, 2007).

Enfermedades mitocondriales y enfermedad de Lafora

El órgano más frecuentemente afectado en los trastornos mitocondriales, en particular enfermedades de la cadena respiratoria (ECR), además del músculo esquelético, es el sistema nervioso central (SNC). Las manifestaciones del SNC de las ECR comprenden episodios de tipo ictus, epilepsia, migraña, ataxia, espasticidad, trastornos del movimiento, trastornos psiquiátricos, deterioro cognitivo, o incluso demencia (demencia mitocondrial). Hasta ahora la demencia mitocondrial se ha informado en MELAS, MERRF, NOHL, OECP, KSS, MNGIE, NARP, síndrome de Leigh y la enfermedad de Alpers-Huttenlocher (Finsterer, 2009). Hay cuatro complejos en la cadena de la respiración mitocondrial, que implican una serie de transferencias de electrones. La función anormal de cualquiera de estos complejos puede dar lugar a enfermedades mitocondriales secundarias a una cadena de transporte de electrones anormal y a la posterior respiración mitocondrial anormal. El complejo III de la cadena de respiración mitocondrial actúa transfiriendo electrones al citocromo c.

Los compuestos y composiciones de la invención también pueden usarse para tratar enfermedades mitocondriales que están asociadas con una función deficiente y/o alterada del complejo III de la cadena respiratoria. Los compuestos tienen la capacidad de actuar como vehículo y/o transferencia de electrones eficaz, dado que el resto de tioninio tiene un potencial redox bajo de conversión entre la forma oxidada y la reducida. En el caso de una función alterada y/o deficiente del Complejo III que conduce a enfermedades mitocondriales, los compuestos de la invención también son capaces de realizar la función de transporte y transferencia de electrones del complejo III, debido a la capacidad del resto de tioninio para desplazarse entre la forma oxidada y la forma reducida, de modo que actúan transportador de electrones en lugar del complejo III en funcionamiento subóptimo, transfiriendo los electrones al citocromo c.

Los compuestos y composiciones de la invención también tienen la capacidad de generar un resto de tioninio activo que tiene la capacidad de desviar los monómeros/oligómeros de aminoácidos/proteínas mal plegadas lejos de las vías de acumulación de la proteína asociada a Hsp70 ADP y/o replegamiento y, en su lugar, recanalizar estos monómeros/oligómeros de proteínas plegadas anormales a la vía que conduce directamente al sistema de proteasoma-ubiquitina dependiente de Hsp70 ATP (UPS), una vía que elimina estos monómeros/oligómeros de aminoácidos/proteínas mal plegadas a través de la vía directa (Jinwal et al. 2009).

La enfermedad de Lafora (EL) es una epilepsia fatal autosómica recesiva de aparición al final de la adolescencia asociada con una acumulación gradual de glucógeno insoluble y mal ramificado, denominado poliglucosano, en muchos tejidos. En el cerebro, los cuerpos de poliglucosano, o cuerpos de Lafora, se forman en las neuronas. La inhibición de la Hsp70 ATPasa por MT (Jinwal et al., 2009) puede regular por aumento la eliminación de las proteínas mal plegadas. La enfermedad de Lafora se debe principalmente a un defecto del sistema de proteasoma-ubiquitina lisosomal (UPS) debido a una mutación en los genes de laforina o malina, ambos ubicados en el cromosoma 6, que

dan lugar a inclusiones que pueden acelerar la agregación de la proteína tau mal plegada. Los daños mitocondriales secundarios del UPS alterado puede dar lugar a más de una actividad mitocondrial suprimida y alteración de la cadena transportadora de electrones, que conduce a una lipofuscina adicional e inicia las convulsiones que son características de la enfermedad de Lafora.

El resto de MT puede desagregar agregados de tau existentes, reducir más acumulación de tau y mejora la eficiencia lisosomal mediante la inhibición de Hsp70 ATPasa. El MT puede conducir a una reducción en de los ovillos de mediante la potenciación de la eliminación por el sistema de proteasoma ubiquitina de los monómeros/oligómeros de tau a través de su acción inhibidora sobre la Hsp70 ATPasa.

Por tanto, los compuestos y composiciones de la presente invención pueden tener utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Lafora.

Estados de enfermedad tratados- Otros estados de enfermedad

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es cáncer de piel.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es melanoma.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad es un estado de enfermedad vírica, bacteriana o protozoaria.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad (protozoica) es malaria. El tratamiento puede ser en combinación con uno o más agentes antimicrobianos, por ejemplo, cloroquina y/o atovacuona.

En algunas realizaciones, el estado de enfermedad (vírica) está producido por hepatitis C, VIH o virus del Nilo Occidental (VNO).

Tratamiento

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratamiento de una afección, se refiere, en general, a tratamiento y terapia, sea de un ser humano o de un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en las que se consigue algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo la inhibición de la progresión de la afección, e incluye reducción de la velocidad de la progresión, detención en la velocidad de la progresión, regresión de la afección, mejora de la afección y cura de la afección. También se incluye el tratamiento como una medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención o material, composición o forma de dosificación que comprende dicho compuesto que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una proporción beneficios/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen terapéutico deseado.

De forma similar, la expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención o material, composición o forma de dosificación que comprende dicho compuesto que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, acorde con una proporción beneficios/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen terapéutico deseado.

Profilaxis" en el contexto de la presente memoria descriptiva no debe entenderse que se circunscribe al éxito completo, es decir protección completa o prevención completa. En su lugar, profilaxis en el presente contexto se refiere a una medida que se administra antes de la detección de una afección sintomática con el objetivo de preservar la salud, ayudando a retrasar, reducir o evitar dicha afección en particular.

El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, en los que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de forma secuencial o simultánea. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, por ejemplo, fármacos, anticuerpos (por ejemplo, como en la inmunoterapia), profármacos (por ejemplo, como en la terapia fotodinámica, GDEPT, ADEPT, etc.); cirugía; radioterapia y terapia génica.

Por ejemplo, puede ser beneficioso combinar el tratamiento con un compuesto como se describe en el presente documento con uno o varios (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) agentes o terapias.

La combinación concreta sería según el criterio del médico, que seleccionaría las dosis usando sus conocimientos generales comunes y los regímenes de dosificación conocidos por un practicante experto.

Los agentes (es decir, un compuesto como se describe en el presente documento, más uno o más agentes adicionales) se pueden administrar de forma simultánea o secuencial y se pueden administrar en programas de dosis variables individualmente y por vías diferentes. Por ejemplo, cuando se administran secuencialmente, los agentes pueden administrarse a intervalos estrechamente espaciados (por ejemplo, durante un período de 5-10 minutos) o a intervalos más largos (por ejemplo, separados por 1, 2, 3, 4 o más horas, o incluso separados por períodos más prolongados cuando sea necesario), siendo el régimen de dosificación proporcional a las propiedades del o los

agentes terapéuticos.

Los agentes (es decir, un compuesto como se describe en el presente documento, más uno o más agentes adicionales) se pueden formular juntos en una forma de dosificación única o, como alternativa, los agentes individuales se pueden formular por separado y presentar juntos en forma de un kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.

Vías de administración

El compuesto de la invención o composición farmacéutica que lo comprende puede administrarse a un sujeto/paciente por cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémicamente/periféricamente o tópicamente (es decir, en el sitio de acción deseada).

Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, oral (por ejemplo, por ingestión); bucal; sublingual; transdérmica (incluyendo, por ejemplo, mediante un parche, apósito etc.); transmucosa (incluyendo, por ejemplo, mediante un parche, apósito etc.); intranasal (por ejemplo, mediante pulverizador nasal); ocular (por ejemplo, mediante gotas para los ojos); pulmonar (por ejemplo, por inhalación o terapia de insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz); rectal (por ejemplo, mediante supositorio o enema); vaginal (por ejemplo, mediante pesario); parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal (incluyendo, por ejemplo, inyección intracatéter en el cerebro); mediante implante de un depósito o reservorio, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

Las composiciones preferidas son composiciones orales, formuladas como se describe con más detalle más adelante en el presente documento.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un animal, un mamífero, un mamífero con placenta, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), un ave (por ejemplo, un pájaro), un canino (por ejemplo, un perro), un felino (por ejemplo, un gato), un equino (por ejemplo, un caballo), un porcino (por ejemplo, un cerdo), un ovino (por ejemplo, una oveja), un bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o gorila), un mono (por ejemplo, un tití, babuino), un monotrema (por ejemplo, ornitorrinco), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo un feto.

En algunas realizaciones, el sujeto/paciente es un ser humano.

Composiciones/formulaciones

Aunque es posible usar (por ejemplo, administrar) el compuesto de la invención solo, a menudo es preferible presentarlo como una composición o formulación.

También se describe en el presente documento una composición que comprende un compuesto como se describe en el presente documento y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación, preparación, medicamento) que comprende un compuesto, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto, como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, entre otros, vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes de enmascaramiento, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, la composición comprende además otros agentes activos, por ejemplo otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Los vehículos, diluyentes, excipientes etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales. Véase, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª Edición (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, Estados Unidos), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

También se describen en el presente documento una composición farmacéutica que comprende mezclar al menos un

compuesto radiomarcado con [¹⁴C], como se define en el presente documento, junto con uno o varios de otros ingredientes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formula como unidades pequeñas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación etc., que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, seres humanos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una razonable proporción de beneficios/riesgos. Cada vehículo, diluyente, excipiente etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de llevar el compuesto en asociación con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha el compuesto con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido etc.) y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

La formulación puede prepararse para proporcionar liberación lenta; liberación inmediata, retardada, programada o sostenida; o una combinación de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección) incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, apirógenos, estériles (por ejemplo, soluciones, suspensiones) en los que el compuesto se disuelve, suspende o, por el contrario, proporciona (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Dichos líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre (u otros fluido corporal relevante) del receptor objetivo. Los ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Los ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para usar en dichas formulaciones incluyen cloruro sódico, inyección, solución de Ringer o inyección de Ringer lactato. Normalmente, la concentración del compuesto en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del transportador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Ejemplos de algunas formulaciones preferidas

La divulgación proporciona una unidad de dosificación (por ejemplo, un comprimido o cápsula farmacéutica) que comprende de 20 a 300 mg de un compuesto como se describe en el presente documento (por ejemplo, obtenido por, u obtenible por, un procedimiento como se describe en el presente documento; que tiene una pureza como se describe en el presente documento; etc.), y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la unidad de dosificación es un comprimido.
En algunas realizaciones, la unidad de dosificación es una cápsula.

En algunas realizaciones, dichas cápsulas son cápsulas de gelatina.
En algunas realizaciones, dichas cápsulas son cápsulas de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa).

En algunas realizaciones, la cantidad es de 30 a 200 mg.
En algunas realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 30 mg.
En algunas realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 60 mg.
En algunas realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 100 mg.
En algunas realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 150 mg.
En algunas realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 200 mg.

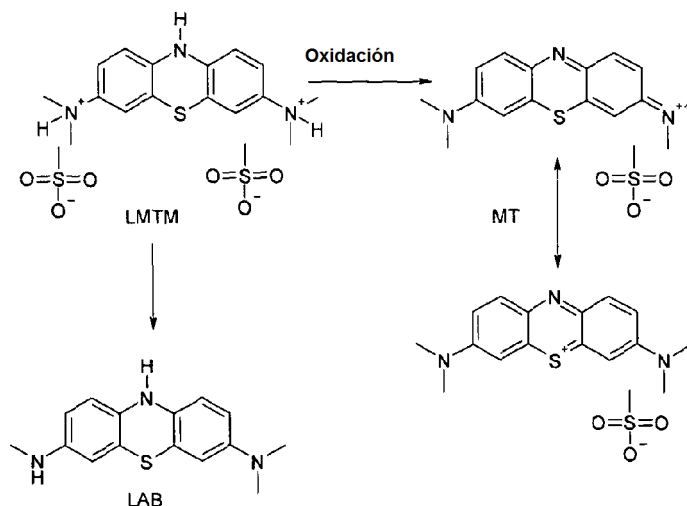
A lo largo de la presente memoria descriptiva, las cantidades de dosificación, por ejemplo, como se ha expuesto anteriormente, puede hacer referencia a la cantidad del compuesto en sí o puede hacer referencia a la cantidad de base libre equivalente (es decir, la cantidad de resto de LMT) contenida en la unidad de dosificación. Ambas alternativas se divulgan expresamente en la presente invención.

En algunas realizaciones, el vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable es o comprende uno o ambos de un glicérido (por ejemplo, Gelucire 44/14 ®; glicéridos de lauroil macrogol-32 PhEur, USP) y dióxido de silicio coloidal (por ejemplo, 2 % Aerosil 200 ®; dióxido de silicio coloidal PhEur, USP).

Nuevas formulaciones – Formas de dosificación sólidas

Los procesos utilizados generalmente para la formulación de comprimidos y recubrimiento con película a menudo requieren el uso de calor acompañado de humedad baja durante el proceso de secado.

5 El LMTM y las otras sales de leuco-metiltionio son potencialmente propensos a la oxidación en un resto de metiltionio (MT) y a la degradación, por ejemplo, a L Azure B (LAB) (véase el esquema, a continuación):



10 Para un material tal como, por ejemplo LMTM, que es propenso a la oxidación (como se ha explicado anteriormente), los procesos de formulación convencionales pueden, por tanto, conducir a la degradación y, por consiguiente, potencialmente, a la inestabilidad en el rendimiento del producto.

15 Por consiguiente, el principio detrás de las formulaciones de la presente invención es la provisión de un método de fabricación de formulaciones farmacéuticas comprimidas y cápsulas que contienen sales de leuco-metiltionio, por ejemplo, bis(metanosulfonato) (LMTM) como la sustancia activa, mediante tecnología de compresión directa de comprimidos o mediante otras técnicas de formación de comprimidos únicas, y mediante encapsulación, en la que la sustancia activa existe sustancialmente en forma estable.

20 El método más utilizado para la preparación de formas de dosificación sólidas es la granulación en húmedo (también denominada granulación húmeda). Esto implica la adición de un fluido de granulación a un polvo. El fluido de granulación puede ser agua o algún otro disolvente que es suficientemente volátil como para que posteriormente pueda ser eliminado por secado. El fluido de granulación también puede incluir un aglutinante. Una vez que el disolvente se ha eliminado, se muele la masa resultante.

25 La granulación en húmedo se prefiere a menudo sobre la compresión directa debido a que es más probable que la granulación en húmedo supere cualquier problema asociado con las características físicas de varios ingredientes en la formulación. La granulación húmeda proporciona material que tiene el flujo requerido y las propiedades de cohesión necesarias para obtener una forma de dosificación sólida aceptable. La uniformidad de contenido de la forma de dosificación sólida mejora generalmente con la granulación en húmedo debido a que todos los gránulos generalmente contienen la misma cantidad de fármaco. La segregación del fármaco desde los excipientes también se evita.

30 En la compresión directa, los componentes individuales de la composición que se va a comprimir se mezclan sin granulación previa y después se comprimen directamente. Aunque esto parece ser un proceso simple y elegante, puede ser difícil de obtener con él comprimidos comercialmente utilizables que tengan suficiente resistencia pero que también se disgreguen lo suficientemente rápido después de la administración. Además, muchas sustancias activas no pueden procesarse mediante compresión directa, ya que no se pueden comprimir sin una etapa de granulación.

35 Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son estables en una forma de dosificación sólida comprimida seca, tal como un comprimido, durante la fabricación y almacenamiento, y que la cantidad de productos de degradación, tales como L Azure B (LAB) y metiltionio (MT), formada puede controlarse dentro de las especificaciones (por ejemplo, LAB menos de 2 % y MT menos de 12 %).

45 Esto contrasta con el comportamiento de, por ejemplo, el LMTM, cuando se procesa mediante procesos de granulación en húmedo convencionales. Sin desear estar limitado por la teoría, en los procesos de granulación en húmedo convencionales, el LMTM, por ejemplo, puede ser muy inestable y se puede formar una cantidad sustancial de LAB y MT.

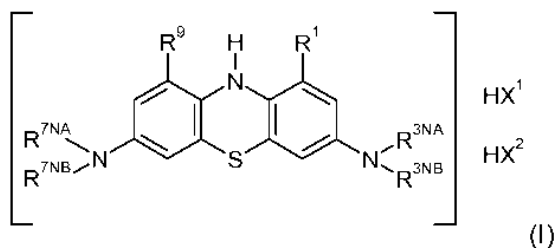
En consecuencia, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, en forma de dosificación sólida. La composición preferentemente comprende, además, al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco. La composición farmacéutica se caracteriza por que el compuesto existe en una forma sustancialmente estable.

5 La presente divulgación también proporciona un polvo de flujo libre, cohesivo, que comprende un compuesto de la invención y al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco, y opcionalmente, uno o más de otros excipientes, siendo dicho polvo capaz de ser comprimido en una forma de dosificación sólida.

10 Estas composiciones y formulaciones se describen inicialmente en el presente documento con respecto a las sales bis(sulfonato) de la presente invención, en particular LMTM. Sin embargo, las ventajas de los presentes métodos de formulación son igualmente aplicables a otros miembros de la familia de sales de leuco-metiltionio.

15 Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento también son aplicables a las sales 3,7-diamino-10H-fenotiazinio divulgadas en el documento WO2007/110627 (WisTa Laboratories Ltd), que se discutieron anteriormente de manera breve. Estas incluyen bis(hidrobromuro) de leuco-metiltionio (LMT.2HBr, LMTB) y bis(clorhidrato) de leuco-metiltionio (LMT.2HCl, LMTC).

20 Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la siguiente fórmula I:

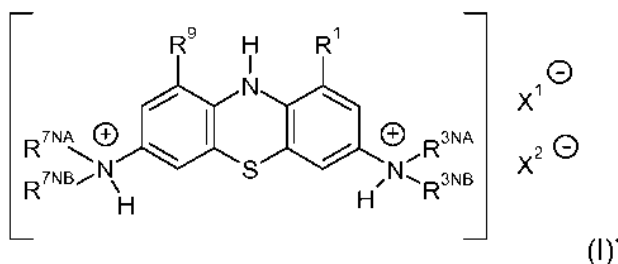


en la que:

25 R^1 , R^9 , R^{3NA} , R^{3NB} , R^{7NA} y R^{7NB} son como se han definido anteriormente; y en la que cada uno de HX^1 y HX^2 es independientemente un ácido prótico;

30 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo; en una forma de dosificación sólida como se ha descrito en el presente documento.

Para completar, se observa que, como se entendería por un experto en la materia, la fórmula anterior podría igualmente escribirse como:



35 en la que X^1 y X^2 son los contraiones correspondientes.

40 Preferentemente X^1 y X^2 son independientemente sulfonato (tal como alquilsulfonato o arilsulfonato, por ejemplo $R^A SO_3^-$ o $R^B SO_3^-$ como se ha definido anteriormente) o haluro (Cl^- , Br^- , I^-). En otras palabras, HX^1 y HX^2 son preferentemente, ácidos sulfónicos ($R^A SO_3H$, $R^B SO_3H$) o hidroháluros (HCl , HBr , HI) independientemente.

45 Como se usa en lo sucesivo en la presente, la expresión 'principio activo' se refiere a la sal leuco(metiltionio) pertinente. En otras palabras, se refiere a un compuesto de fórmula (I), tal como un compuesto de la invención, por ejemplo LMTM.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la fabricación de dichas composiciones farmacéuticas,

por un método de compresión en seco. El proceso comprende, preferentemente, la compresión en seco de una mezcla íntima en polvo del compuesto activo con al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco, y, opcionalmente, uno o más de otros excipientes.

5 En algunas realizaciones, el proceso comprende la compresión directa.

En algunas realizaciones, el proceso comprende la compresión directa simple.

En algunas realizaciones, el proceso comprende la granulación en seco.

10 En algunas realizaciones, el proceso comprende la granulación húmeda de excipientes, seguida de la adición del ingrediente activo extragranular.

15 Las formas de dosificación sólidas de acuerdo con la invención presentan, ventajosamente, una estabilidad química y física a largo plazo del ingrediente activo (compuesto de la invención, por ejemplo, LMTM). Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también tienen velocidades de disolución rápidas, incluso después de almacenamiento a largo plazo.

20 Una forma "sustancialmente estable" del ingrediente activo significa, en el presente contexto, una forma que no reacciona para formar impurezas, tales como impurezas oxidantes u otros productos de degradación en ninguna medida significativa durante el proceso de formulación, o en el almacenamiento del producto formulado.

25 Por lo tanto, en el presente contexto, puede hacer referencia a un material que contiene, por ejemplo, menos de 20 % p/p, a menos de 15 % p/p, o menos de 10 % p/p de impurezas oxidantes u otros productos de degradación. En otras palabras, el material contiene al menos 80 % p/p, al menos 85 % p/p, o al menos 90 % p/p del ingrediente activo puro, en su forma original (sin reaccionar).

30 En algunas realizaciones, el material que contiene el ingrediente activo puede contener, por ejemplo, menos de 20 % en p/p, menos de 15 % en p/p, menos de 12 % en p/p, o menos de 10 % en p/p de MT. En algunas realizaciones, el material puede contener, por ejemplo, menos de 5 % en p/p, menos de 3 % en p/p o menos de 2 % en p/p de LAB.

35 Un comprimido "estable" es, en el contexto de la presente divulgación, un comprimido que permanece sustancialmente estable después de almacenamiento prolongado en condiciones controladas de temperatura y humedad. Las pruebas de estabilidad pueden llevarse a cabo con las formas de dosificación sólidas directamente expuestas a las condiciones ambientales elegidas, o con las formas de dosificación sólidas contenidas dentro de un envase.

35 *Contenido de ingrediente activo*

40 La cantidad del ingrediente activo en la composición sin recubrimiento es, en general, más de aproximadamente 10 % en p/p, pero puede contener más de 20 %, o más de 30 % en p/p. La cantidad del ingrediente activo es, generalmente, menos de aproximadamente 70 % en p/p, y, por lo general, menos de 60 % o menos de 50 % en p/p en una formulación de comprimido. Normalmente, la cantidad del ingrediente activo en la composición del núcleo del comprimido no recubierto es, por lo tanto, de aproximadamente 10 % en p/p (o 20 % o 30 %) a aproximadamente 70 % en p/p (o 60 % o 50 %). Cuando se aplica un recubrimiento a la composición, como se describe a continuación, el peso total de la composición se incrementa y, por lo tanto, el porcentaje del ingrediente activo en la composición total se reduce un poco.

45 *Diluyentes*

50 El ingrediente activo puede no ser inherentemente compresible y, por lo tanto, puede requerir la adición de diluyentes adecuados para ayudar a la compresión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden, por lo tanto, habitualmente al menos 15 % en p/p, más habitualmente al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 % o al menos 50 % en p/p de diluyente o diluyentes.

55 Los diluyentes que pueden usarse incluyen uno o más de celulosa microcristalina, lactosa, manitol, sales de calcio, tales como, fosfato dibásico de calcio, sulfato de calcio y carbonato de calcio, y azúcares tales como lactosa, sacarosa, dextrosa y maltodextrina.

60 Los diluyentes preferidos son celulosa microcristalina, lactosa y manitol. Las formas secadas por pulverización de lactosa y manitol son formas particularmente adecuadas de los compuestos para técnicas de compresión directa o de granulación en seco.

65 Inesperadamente, se ha encontrado que cuando un ingrediente activo como se describe en el presente documento, por ejemplo, un compuesto de la presente invención, tal como LMTM, se formula con diluyentes por compresión en seco, tales como uno o más de celulosa microcristalina, lactosa secada por pulverización, lactosa anhidra y manitol, las formas de dosificación sólidas resultantes son estables en el sentido de que el ingrediente activo permanece químicamente estable, incluso después de un almacenamiento prolongado.

Por tanto, la divulgación proporciona un método para preparar comprimidos de dosis baja, media o alta, por ejemplo,

comprimidos de LMTM de dosis baja, media o alta, que son estables y tienen buenos perfiles de disolución, grados aceptables de dureza y resistencia al astillado, así como un tiempo de disgregación corto.

Disolución de las composiciones de la invención

5 Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que las formas de dosificación sólida únicas descritas en el presente documento proporcionan una velocidad de disolución muy rápida.

10 Como se ha explicado anteriormente en el presente documento y sin desear estar ligado por la teoría, se cree que el resto de metiltioninio (MT) activo puede absorberse, preferentemente, desde el estómago y/o el tracto GI superior. Por lo tanto, una formulación de disgregación rápida y de disolución rápida de las sales de leuco(metiltioninio) sería ventajosa, ya que esta liberaría la mayor cantidad posible de medicamento en el punto de absorción deseado.

15 La velocidad de disolución rápida de las formas de dosificación sólidas descritas en el presente documento significa que son capaces de disolverse rápidamente en el estómago y/o tracto GI superior y, por lo tanto, presentar el ingrediente activo de manera eficaz, para una rápida absorción.

20 En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención, cuando se evalúan utilizando un método estándar de la Farmacopea, proporcionan al menos 80 % de disolución en 30 minutos, preferentemente al menos 80 % de disolución en 15 minutos, más preferentemente al menos 80 % de disolución en 10 minutos.

25 En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención, cuando se evalúan utilizando un método estándar de la Farmacopea, proporcionan al menos 90 % de disolución en 30 minutos, preferentemente al menos 90 % de disolución en 15 minutos, más preferentemente al menos 90 % de disolución en 10 minutos.

En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención, cuando se evalúan utilizando un método estándar de la Farmacopea, proporcionan al menos 95 % de disolución en 30 minutos, preferentemente al menos 95 % de disolución en 15 minutos, más preferentemente al menos 95 % de disolución en 10 minutos.

30 Las velocidades de disolución se pueden medir por métodos estándar de la farmacopea como se describe en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) Capítulo General <711>. La USP actual es la USP 34 (2011). Por ejemplo, las velocidades de disolución para las formulaciones de la invención se pueden medir usando un aparato de acuerdo con el aparato de disolución de la USP (paletas).

35 En algunas realizaciones, las velocidades de disolución anteriores se evalúan en ácido clorhídrico 0,1M a una concentración de trabajo de ~ 5 µg/ml de LMT, con agitación a 50 rpm de velocidad de la paleta. En algunas realizaciones, las velocidades de disolución se evalúan mediante análisis espectrofotométrico. En algunas formas de realización, el análisis comprende espectrofotometría de UV/vis (λ_{\max} LMT = 255 nm).

40 Como consecuencia de su velocidad de disolución sorprendentemente alta, los métodos de formulación descritos en el presente documento pueden proporcionar el compuesto activo con un alto grado de biodisponibilidad.

45 La velocidad de disolución rápida se mantiene después de un almacenamiento prolongado, incluso en condiciones de "tensión" (es decir, aumento de la temperatura y la humedad). La velocidad de disolución rápida y, por tanto, la buena biodisponibilidad, de las composiciones formuladas de acuerdo con los procesos de la presente invención también es muy tolerante con las variaciones en la formulación en sí.

Otros ingredientes

50 La composición farmacéutica generalmente también incluirá un lubricante. Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato sódico, ácido esteárico, glicerilbehaptato, polietilenglicol, polímeros de óxido de etileno (por ejemplo, los disponibles bajo la marca registrada Carbowax de Union Carbide, Inc., Danbury, CT), lauril sulfato sódico, lauril estearato de magnesio, mezclas de estearato de magnesio con lauril sulfato de sodio, y aceite vegetal hidrogenado. Los lubricantes preferidos incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio y estearil fumarato de sodio. El más preferido como el lubricante es estearato de magnesio. Los lubricantes generalmente comprenden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0 % del peso total del comprimido (no recubierto). La cantidad de lubricante empleada es, generalmente, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 %, preferentemente de 0,5 a 2,0 % en p/p.

60 Además del diluyente o diluyentes y el lubricante o lubricantes, otros excipientes convencionales también pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención. Tales excipientes adicionales incluyen disgregantes, aglutinantes, agentes aromatizantes, colorantes y deslizantes. Algunos excipientes pueden servir para múltiples funciones, por ejemplo como aglutinante y disgregante de comprimidos.

65 Un disgregante de comprimidos puede estar presente en una cantidad necesaria para lograr una disolución rápida. Los disgregantes son excipientes que se oponen a las fuerzas físicas de unión de partículas en un comprimido o cápsula,

cuando la forma de dosificación se coloca en un ambiente acuoso. Ejemplos de disgregantes incluyen polivinilpirrolidona reticulada (crospovidona), glicolato de almidón de sodio, carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa de sodio) y almidón pregelatinizado. Generalmente, la cantidad de disgregante puede ser de 0 a aproximadamente 25 % en p/p, más habitualmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 % en p/p, y por lo general menos de 10 % o menos de 5 % en p/p, de la composición.

Los aglutinantes son excipientes que contribuyen a la adhesión de las partículas en una formulación sólida. Entre los ejemplos de aglutinantes se incluyen derivados de celulosa (carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina) y azúcares tales como lactosa, sacarosa, dextrosa, glucosa, maltodextrina, y manitol, xilitol, polimetacrilatos, polivinilpirrolidona, sorbitol, almidón pregelatinizado, ácidos alginico, y sales de los mismos, tales como alginato de sodio, silicato de magnesio y aluminio, polietilenglicol, carragenina y similares. Generalmente, la cantidad de aglutinante puede variar ampliamente, por ejemplo, de 0 % a 95 % en p/p de la composición. Como se señaló anteriormente, los excipientes pueden servir para múltiples funciones. Por ejemplo, el diluyente de comprimidos también puede servir como un aglutinante.

Los deslizantes son sustancias que se añaden a un polvo para mejorar su fluidez. Los ejemplos de deslizantes incluyen estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal (tal como las calidades vendidas como Aerosil), almidón y talco. Los deslizantes pueden estar presentes en la composición farmacéutica a un nivel de 0 a aproximadamente 5 % en p/p. Una vez más, sin embargo, hay que señalar que los excipientes pueden servir para múltiples funciones. El lubricante, por ejemplo estearato de magnesio, también puede funcionar como deslizante.

Los ejemplos de colorantes que se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen dióxido de titanio y/o colorantes adecuados para alimentos tales como los conocidos como colorantes FD & C y agentes colorantes naturales. Es poco probable usar un agente colorante en la mezcla de polvo que se comprime de acuerdo con los aspectos de la invención tratada anteriormente, pero puede formar parte de un recubrimiento aplicado a la composición, como se describe a continuación, en cuyo caso el agente colorante puede estar presente en el recubrimiento de película en una cantidad de hasta aproximadamente 2,0 % en p/p.

El comprimido está deseablemente recubierto con un recubrimiento de película convencional que imparte tenacidad, facilidad de deglución y un aspecto elegante al producto final. Muchos materiales de recubrimiento de película poliméricos se conocen en la técnica. Un material de recubrimiento de película preferido es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o alcohol de polivinilo hidrolizado en parte (PVA). El HPMC y el PVA se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Colorcon, en formulaciones de recubrimiento que contienen excipientes que sirven como adyuvantes de recubrimiento, como la marca registrada Opadry. Las formulaciones Opadry pueden contener también talco, polidextrosa, triacetina, polietilenglicol, polisorbato 80, dióxido de titanio y uno o más colorantes o lacas. También se pueden usar otros polímeros formadores de película adecuados, incluyendo hidroxipropilcelulosa, copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona y acetato de polivinilo, y copolímeros de acrilato-metacrilato. El uso de un recubrimiento de película es beneficioso para facilidad de manipulación y porque un núcleo sin recubrimiento de color azul puede teñir el interior de la boca durante la deglución. El recubrimiento también mejora la estabilidad a la luz de la forma de dosificación.

El recubrimiento de los comprimidos puede llevarse a cabo convenientemente usando una cuba de recubrimiento convencional. En realizaciones preferidas del proceso, la cuba de recubrimiento se precalienta mediante aire de entrada caliente hasta que la temperatura de escape llega a 35 °-55 °C, más preferentemente 40-50 °C. Esto puede, normalmente, requerir la aplicación de aire de entrada caliente a una temperatura de entrada de 45-75 °C, preferentemente 50-65 °C, durante 10-15 minutos. Los núcleos de los comprimidos que contienen el ingrediente activo (por ejemplo, LMTM) se añaden después a la cuba de recubrimiento y se aplica la capa de película acuosa. La velocidad de pulverización se controla de tal manera que la temperatura del lecho se mantiene a 38-48 °C, más preferentemente 42-44 °C, hasta que se ha alcanzado la ganancia de peso deseada (peso del recubrimiento).

Métodos de compresión en seco

"Compresión en seco", como se usa en el presente documento, se refiere a técnicas de compresión que no implican el uso de calor o humedad. La compresión en seco puede comprender la compresión directa del ingrediente activo con diluyentes adecuados o puede comprender granulación en seco (por ejemplo método de precompresión/ doble compresión o compactación con rodillo).

La compresión directa puede comprender compresión directa sencilla del ingrediente activo con diluyentes adecuados para la compresión directa. De forma alternativa, puede comprender granulación, por ejemplo granulación en húmedo, de los excipientes para producir una mezcla de excipiente granular seco, que luego se puede comprimir directamente con el ingrediente activo seco (y opcionalmente otros excipientes secos). Esto puede denominarse "incorporación extragranular" del ingrediente activo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, las formas de dosificación sólidas de la invención pueden producirse en un proceso de fabricación que comprende la compresión directa simple. En esta realización, los ingredientes del comprimido, es decir, el ingrediente activo (por ejemplo, LMTM), diluyente o diluyentes y otros excipientes opcionales,

se mezclan juntos en forma de partículas sólidas para crear una mezcla íntima, por ejemplo, en un mezclador de tambor, y se comprimen después usando una máquina de comprimidos.

En otras realizaciones, la composición se prepara mediante un proceso de granulación en seco. La granulación en seco se refiere al proceso de granulación sin el uso de fluidos de granulación. Con el fin de granular en seco un material, al menos uno de sus constituyentes, bien el ingrediente activo o un diluyente, debe tener propiedades cohesivas. La granulación en seco se puede realizar mediante un proceso conocido como "precompresión". En la "precompresión", el material que se va a granular se hace primero en una masa comprimida grande o "lingote", normalmente usando una prensa de comprimidos con gran utillaje de cara plana (un ejemplo de una prensa lineal se ilustra en el documento US 4.880.373). Se puede formar un lingote bastante denso, al permitir tiempo suficiente para que el aire escape del material a compactar. Los lingotes comprimidos se muelen después a través de un tamiz de malla deseada manualmente o automáticamente como, por ejemplo, por medio de un molino de trituración. La formación de gránulos por "precompresión" también se conoce como precompresión. Cuando los comprimidos se fabrican a partir del material precomprimido granulado, el proceso se denomina "método de doble compresión".

La granulación en seco también se puede realizar usando una "compactador de rodillos". En un compactador de rodillos, las partículas de material se consolidan y se densifican pasando el material entre dos rodillos de alta presión. El material densificado de un compactador de rodillos se reduce después a un tamaño uniforme de gránulos mediante molturación. A continuación, los gránulos uniformes pueden mezclarse con otras sustancias, tales como un lubricante, para comprimir el material (como, por ejemplo, por medio de una máquina de formación de comprimidos rotatoria). Además de su uso farmacéutico, la compactación con rodillo se utiliza en otras industrias, tales como la industria alimentaria, la industria de alimentación animal y la industria de los fertilizantes.

Hoy en día, por granulación en seco se entiende generalmente que significa compactación con rodillos o precompresión, y es bien conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (Lieberman, Lachman, y Schwartz (Eds); Marcel Dekker, Inc, 2ª Edición, 1989) y *Remington's Pharmaceutical Sciences* (A. R. Gennaro (Ed); Mack Publishing Co, Easton, PA, 18ª edición, 1990)).

En otras realizaciones de la divulgación, los comprimidos se preparan por granulación en húmedo de excipientes y la incorporación del ingrediente activo (por ejemplo, LMTM) extragranular. Normalmente, un proceso de este tipo implica diluyentes de amasado en húmedo, tales como lactosa y/o celulosa microcristalina con agua, opcionalmente con la adición de un aglutinante tal como polivinilpirrolidona. La masa húmeda se seca, a continuación, se pasa a través de una malla, para formar gránulos. El ingrediente activo y cualquiera de los excipientes restantes, tal como un lubricante, se mezclan después con los gránulos secos y se comprimen para formar comprimidos.

Uso de ácidos en las composiciones de la invención

Las composiciones que contienen compuestos de leuco(metiltioninio), incluyendo los compuestos de la invención, tales como LMTM, pueden, en algunas realizaciones, estabilizarse mediante la adición de una cantidad apropiada de ciertos ácidos a la sustancia a granel antes de la formulación. Estos ácidos se pueden usar para prevenir la formación de más MT, tanto durante la formulación y durante toda la vida del producto, proporcionando de este modo una composición farmacéutica estable a los efectos de obtener la aprobación reglamentaria con ahorro de costes asociados en los envases.

Por lo tanto, en la presente divulgación se divulga una composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable, caracterizado por que dicha formulación comprende adicionalmente un ácido en una cantidad suficiente para evitar la formación de MT. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que se prefieren los ácidos que tienen un pK1 mayor que 1,5. En algunas formas de realización, el ácido está presente en una cantidad de 5 % a 25 % en p/p.

Preferentemente, la composición se prepara por un método de compresión en seco como se ha descrito anteriormente.

Los ácidos preferidos para estos fines son ácido maleico (pK1 1,9), ácido fosfórico (pK1 2,12), ácido ascórbico (pK1 4,17), ácido sórbico (pK1 4,76), ácido aspártico y ácido siálico. El efecto de estabilización del ácido añadido se puede mejorar mediante la selección de un vehículo apropiado. El vehículo es, preferentemente, manitol, un material celulósico, o un almidón, o mezclas de los mismos. El vehículo está presente, normalmente, en una cantidad de al menos 40 % p/p de la formulación.

Tamaño de partícula

También se ha encontrado que una reducción significativa en la formación de MT también se puede lograr mediante la selección de un intervalo de tamaño de partícula apropiado para la mezcla de polvo seco, normalmente en el que más de 10 % de las partículas tienen un tamaño mayor que 10 micras. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable, además, caracterizada por que dicha composición comprende

partículas de las cuales más del 10 % tienen un tamaño mayor que 10 micras.

Vehículos

5 Se ha encontrado que una reducción significativa en la formación de MT también se puede lograr mediante la elección de un vehículo apropiado, particularmente uno que tenga una forma de partícula que sea reacia a la entrada de agua. ElcemaTM, por ejemplo, que tiene partículas lamelares largas que tienen una forma lisa y plana con una superficie no porosa, parece reducir la formación de MT al limitar el acceso de agua. Etilcelulosa, manitol y almidón 1500 TM y celulosa microcristalina también son particularmente adecuados para este propósito.

10 Por lo tanto la presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de leuco(metilitionio), por ejemplo un compuesto de la invención, tal como LMTM, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, caracterizada por que dicho vehículo es ElcemaTM, etilcelulosa, manitol o almidón 1500 TM.

15 *Encapsulación*

Las mezclas estabilizadas de polvo seco como se describe en el presente documento pueden formularse, por ejemplo, mediante la compresión en comprimidos o rellenando en cápsulas (con o sin conversión previa en un polvo granulado por medios tales como se describe en los Ejemplos de Formulación 1 a 4), para dar composiciones farmacéuticas que tienen una vida útil excelente.

Las cápsulas, como se describe en el presente documento, son normalmente de gelatina o HPMC. Los excipientes preferidos incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche y polietilenglicoles de alto PM.

25 *Conclusiones*

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones preparadas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente son más estables, inmediatamente después de la finalización de la fabricación, que las formulaciones producidas mediante granulación acuosa convencional. Además, pueden presentar una estabilidad mejorada en el almacenamiento.

30 Por ejemplo, una formulación farmacéutica preparada de este modo, con un contenido de 10 a 50 % en peso de LMTM, preferentemente de 15 % a 40 % en peso de LMTM, hace que sea posible que en los ensayos de estabilidad estándar, por ejemplo en las pruebas de estabilidad acelerada a largo plazo, a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 60 ± 5 % del contenido de L Azure B no aumenta en más de un 2 %, en relación con el área del pico de LMTM, en un plazo de 24 meses.

40 Durante el procesamiento y el almacenamiento de compuestos de leuco(metilitionio), tales como LMTM, también pueden oxidarse para producir una pequeña cantidad de MT (véase el Esquema, anterior).

La presencia de concentraciones relativamente pequeñas (por ejemplo, menos del 12 %) de MT en las leuco-formulaciones de la presente invención, aunque no deseable, no se considera que tenga importancia clínica adversa *per se*, ya que incluso si el cuerpo se presentó con MT en su forma cargada o oxidada de LMTM y las diversas otras sales leuco, esto, se puede reducir a la forma de MT sin carga (reducido) antes de la absorción. Además de la pequeña cantidad de MT formada durante el procesamiento, tal como mezcla y formación de comprimidos, las sales de leuco-metilitionio de la presente invención pueden reaccionar con oxígeno absorbido en los excipientes y presentarse dentro del comprimido para dar más del MT en particular en presencia de humedad.

50 Una ventaja de las formulaciones de la presente invención es reducir al mínimo la cantidad de MT formado en los comprimidos, por ejemplo, a menos del 12 % en 2 años cuando se almacena a 25 °C a una humedad relativa de 60 %. Esto se refiere a la cantidad acumulada de MT formada durante tanto el procesamiento como el almacenamiento de los comprimidos: en general, los métodos de formulación descritos en el presente documento dan lugar a la formación de menos del 5 % de MT durante el procesamiento; un máximo de aproximadamente 5-7% de MT se forma a continuación, durante el almacenamiento del envase acabado. Esto proporciona una vida útil de al menos 24 meses.

55 Esto se demuestra en los Ejemplos de formulación, a continuación.

Dosificación

60 El experto en la técnica apreciará que las dosificaciones adecuadas del compuesto y las composiciones que comprenden el compuesto pueden variar de un paciente a otro. En general, la determinación de la dosificación óptima implicará el equilibrio del nivel del beneficio terapéutico contra cualquier riesgo o efecto secundario perjudicial. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores incluyendo, entre otros, la actividad del compuesto concreto, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección y la especie, el sexo, la edad, el peso, la afección, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente. La

cantidad del compuesto y la vía de administración serán, en última instancia, a criterio del médico, veterinario o clínico, aunque, en general, la dosis se seleccionará para obtener concentraciones locales en el sitio de acción que ejerzan el efecto deseado sin producir muchos daños o efectos secundarios perjudiciales.

5 La administración se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos adecuados) a lo largo del ciclo de tratamiento. Los procedimientos de determinar el medio y la dosis de administración más eficaces son bien conocidos para los expertos en la técnica y variará con la formulación usada para terapia, el objetivo de la terapia, la(s) célula(s) diana que se estén tratando y el sujeto que se esté tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples siendo los niveles y el patrón de dosis seleccionados por el
10 médico, veterinario o clínico encargado del tratamiento.

En general, una dosis adecuada del compuesto 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 al día.

15 En algunas realizaciones, el compuesto se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 100 mg, 3 veces al día.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 150 mg, 2 veces al día.

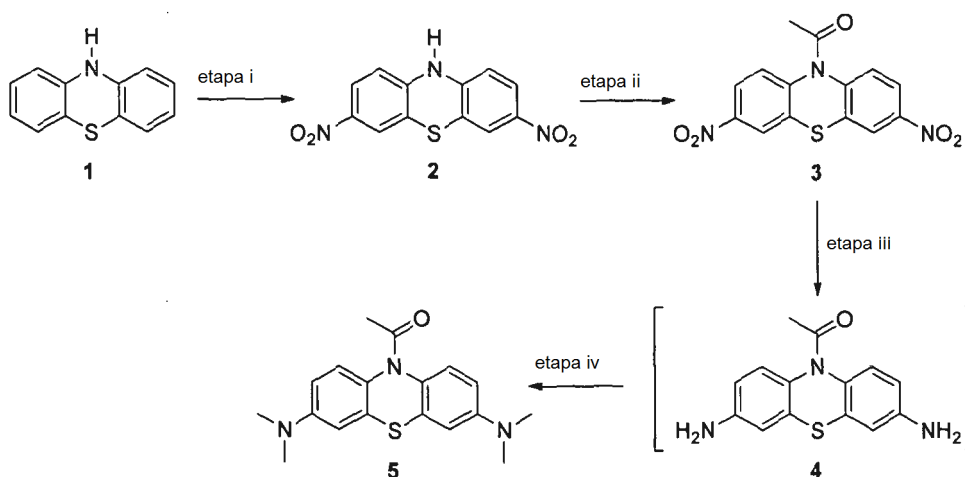
En algunas realizaciones, el compuesto se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 200 mg, 2 veces al día.

25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar su alcance.

30 Ejemplo 1 – Síntesis y caracterización

Síntesis de laboratorio de 10-Acetil-N,N,N',N'-tetrametilfenotiazin-3,7-diamina



35 etapa i; NaNO₂, DMSO, CH₃COOH, etapa ii; (H₃CCO)₂O, Et₃N, DMF, etapa iii; Pd/C, 2-MeTHF, H₂ etapa iv; H₂CO, H₂ o etapa iii; Zn, (ac.) NH₄Cl, MeOH, THF etapa iv; H₂CO, NaGNBH₃, CH₃COOH

Síntesis de 3,7-dinitro-10H-fenotiazina (2)

40 A un matraz de 1 litro de fondo redondo de tres bocas (RBF) equipado con un termómetro, un embudo de goteo y un condensador se le añadió fenotiazina (PM 199,28 g/mol, 25,00 g, 125,5 mmol) y dimetilsulfóxido (250 ml), la mezcla se agitó durante 2 minutos o hasta que se disolvió fenotiazina. Después, el condensador se conectó a una botella Dreschel medio llena con agua. Después se añadió nitrato sódico (PM 69,00 g/mol, 51,94 g, 752,7 mmol) al RBF y se
45 añadió ácido acético (150 ml) al embudo de goteo. Después, se añadió el ácido acético al en un modo gota a gota durante un periodo de 20 minutos. La suspensión de color amarillo claro se volvió de color rojo y se retiró por precipitación un sólido de la precipitación. Tras la finalización de la adición de de ácido acético, la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (36-20 °C) antes de incrementar la temperatura a 95 °C y se agitó durante 17

horas. Después de este tiempo la mezcla se enfrió a 50 °C y se añadió metanol (100 ml) y la mezcla se enfrió adicionalmente a 22 °C. Después, la mezcla enfriada se filtró y la torta se lavó con metanol (3 x 25 ml). La torta de lavado se dejó en el filtro con el vacío aplicado durante 30 minutos antes de secarse durante 15 horas a 50 °C para dar el producto en forma de un sólido de color pardo (PM 289,27 g/mol, 29,45 g, 81 %).

5

Notas

1. La adición de ácido acético produjo gases NO_x, que se convirtió en ácido nítrico dejando el gas burbujeará en un botella Dreschel medio llena con agua.
2. La adición de ácido acético es exotérmica y la mezcla alcanza de 22 °C a 36 °C.
3. Se añadió metanol para ayudar a disolver cualquier acetato sódico y como un anti-disolvente para maximizar el rendimiento del producto.
4. La síntesis también se realizó con éxito usando dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (MeCN), tetrahidrofurano (THF), acetona o dimetoxietano (DME) como el disolvente de reacción.

10

15

RMN: El producto (5 mg) se disolvió en DMSO-d₆ (1,5 ml) y puede requerir calentarse para disolver completamente el sólido.

δ_H (400 MHz; DMSO-d₆): 6,72 (2H, d, J 8,8, ArH), 7,77 (2H, d, J 2,8, ArH), 7,87 (2H, dd, J 2,8, 8,8, ArH)

20

Síntesis de 3,7-dinitro-10-acetilfenotiazina (3)

A un matraz de 500 ml de fondo redondo de 3 bocas equipado con un termómetro y un condensador se le añadió 3,7-dinitro-10H-fenotiazina (PM 289,27 g/mol, 29,00 g, 100 mmol), dimetilformamida (58 ml), anhídrido acético (PM 102,09 g/mol, 102,09 g, 1000 mmol) y trietilamina (PM 101,19 g/mol, 40,88 g, 401 mmol). La mezcla se calentó a 105 °C y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente (21 °C) antes de enfriarse a 5 °C con lo que se agitó durante 1 hora. El producto se aisló por filtración y se lavó con metanol (3 x 30 ml) para dar un sólido cristalino de color amarillo claro, que se secó a 50 °C durante 15 horas (PM 331,31 g/mol, 26,94 g, 81 %).

25

30

Notas

1. Los cristales del producto se formaron durante la reacción, después de ~ 1 hora a 105 °C.
2. Después de la refrigeración la mayoría del producto precipitó a ~ 70 °C.
3. El producto era de color naranja, antes se lavó con metanol.

35

RMN: El producto (10 mg) se disolvió en DMSO-d₆ (1,5 ml).

δ_H (400 MHz; DMSO-d₆): 2,25 (3H, s, CH₃), 7,92 (2H, d, J 8,8, ArH), 8,28 (2H, dd, J 8,8, 2, ArH), 8,47 (2H, d, J 2, ArH)

40

Síntesis de 10-Acetil-N,N,N'-tetrametilfenotiazina-3,7-diamina (5)

A un matraz de 100 ml de fondo redondo de 3 bocas equipado con un termómetro y un condensador se le añadió 3,7-dinitro-10-acetilfenotiazina (PM 331,31 g/mol, 5 g, 15,09 mmol), paladio sobre carbono (10 %, seco, 0,5 g) y 2-metiltetrahydrofurano (25 ml). El matraz se evacuó y se purgó con hidrógeno 5 veces, antes la mezcla se calentó a 56 °C. Después de 17 horas, se consideró que la reducción había alcanzado la finalización (véase condiciones tic) que dio el compuesto 4 y se añadió formalina (PM 30,03 g/mol, 14,7 g, 181,1 mmol). De nuevo, se evacuó el matraz una vez y se purgó 5 veces con hidrógeno. Después de 71 horas de la adición de formalina (tiempo total de 88 horas) a 56 °C, la tetrametilación se consideró finalizada por tic. La mezcla se filtró a 50 °C, el catalizador de color gris se lavó con 2-metiltetrahydrofurano (3 x 5 ml) y el filtrado y los lavados se combinaron. A esta solución se le añadió metanol (5 ml) para homogenizar la mezcla. El enfriamiento a 5 °C dio como resultado un sólido incoloro que precipitó a partir de la solución. Se añadieron adicionalmente dos volúmenes de metanol (10 ml) y la suspensión se agitó durante 50 minutos a 5 °C. El producto en bruto se aisló por filtración para dar un sólido incoloro, que se lavó con metanol (3 x 5 ml) y se secó a 50 °C durante 16 horas (PM 327,45 g/mol, 2,26 g, 46 %). El filtrado a partir del proceso de aislamiento tenía agua añadida (50 ml), que dio un sólido adicional. La suspensión se agitó a 5 °C durante 2 horas antes de recogerse por filtración, se lavó con metanol (3 x 5 ml) y se secó a 50 °C durante 13 horas. (PM 327,45 g/mol, 0,83 g, 17 %). El rendimiento total del producto fue (3,09 g, 63 %).

50

55

Notas

1. Condiciones tic de fase normal, eluyente acetato de etilo al 75 %, éter de petróleo al 25 % (40-60 °C) y lámpara de UV a 254 nm.
2. El factor de retención del material de partida es dinitro 0,68 como una mancha de color amarillo, el factor de retención del producto de hidrogenación es de 0,25 como una mancha de color azul y el factor de retención del producto de metilación es 0,67 como una mancha de color azul claro.
3. El método para el análisis tlc de la etapa de hidrogenación etapa se manchó directamente mientras que el análisis del producto de metilación tenía agua añadida a una alícuota de la reacción que se extrajo con acetato de etilo y después se manchó.

60

65

4. Después de 17 horas el tic mostró dos manchas, la mancha principal era el producto de reducción, la mancha menor se desconoce.

5. Después de 88 horas el tic garrapata muestra principalmente el producto tetrametilado como la mancha principal.

5 6. Normalmente la reducción y la metilación se completaría dentro de 72 horas.

7. La espectroscopía de RMN ^1H de las dos muestras dio idéntico espectro, se detectaron trazas de 2-metiltetrahidrofurano junto con una señal desconocida a 5 ppm.

RMN: El producto (10 mg) se disolvió en CDCl_3 (1,5 ml).

10 δ_{H} (400 MHz; CDCl_3): 2,09 (3H, s, CH_3), 2,86 (12H, s, NCH_3), 6,54 (2H, d, J 8, ArH), 6,64 (2H, s, ArH), 7,19 (2H, d a s, ArH)

Síntesis alternativa de 10-Acetil-N,N,N',N'-tetrametilfenotiazina-3,7-diamina (5)

15 A un matraz de 50 ml de fondo redondo se le añadió 3,7-dinitro-10-acetilfenotiazina (PM 331,31 g/mol, 1 g, 3,02 mmol), polvo de cinc (PM 65,39 g/mol, 1,38 g, 21,13 mmol), metanol (6 ml) y tetrahidrofurano (2 ml). La mezcla se calentó a 50 °C después de que una solución caliente (45-50 °C) de cloruro de amonio acuoso (PM 53,49 g/mol, 2,26 g, 42,26 mmol disuelto en 6 ml de agua) se añadiera lentamente para mantener un reflujo moderado. Después, la mezcla se calentó a 70 °C y se agitó a esta temperatura durante dos horas después de que se enfriara a temperatura ambiente (23 °C). La mezcla enfriada se filtró para retirar las sales de cinc y el filtrado que contenía el compuesto 4 se trató con paraformaldehído (PM 30,03 g/mol, 1,09 g, 36,22 mmol), cianoborohidruro sódico (PM 62,84 g/mol, 1,14 g, 18,11 mmol) y ácido acético (2 ml). La mezcla se calentó a 50 °C y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente (23 °C), se añadió agua (2 x 10 ml) y la suspensión incolora se agitó durante 16 horas. Después, el sólido se recogió por filtración y se lavó con metanol (3 x 2 ml) para dar el compuesto del título (PM 327,45 g/mol, 0,91 g, 92 %) en forma de un sólido de color blanquecino.

Notas

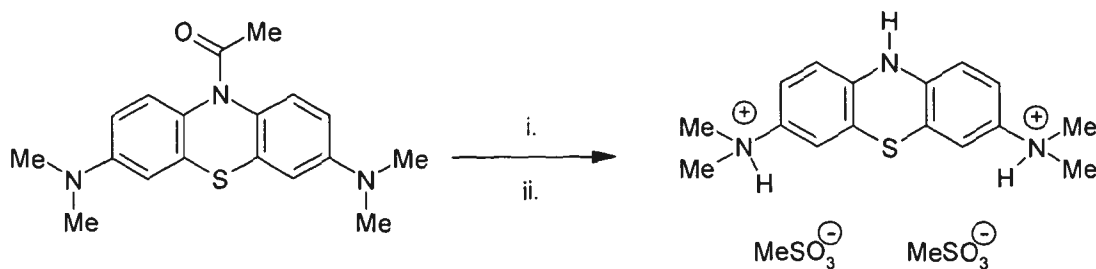
30 1. La reacción de reducción usando cinc y cloruro de amonio acuoso fue rápida y limpia teniendo solo 2 horas para alcanzar la finalización sin ningún punto registrado por el análisis tlc.

2. La metilación reductora usando cianoborohidruro sódico, paraformaldehído y ácido acético fue rápida y limpia, teniendo solo 3 horas para alcanzar la finalización.

RMN: El producto (10 mg) se disolvió en CDCl_3 (1,5 ml).

35 δ_{H} (400 MHz; CDCl_3): 2,17 (3H, s, CH_3), 2,94 (12H, s, NCH_3), 6,61 (2H, d, J 8, ArH), 6,71 (2H, s, ArH), 7,26 (2H, d a s, ArH)

Síntesis 1: Síntesis de bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.2MsOH)



i. MSA, H_2O , tolueno, 85 °C
ii. EtOH

40 Se añadió 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (AcMT) (150 g) a un matraz de fondo redondo de 3 bocas. Se añadió tolueno (1,8 l) y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 min. La solución se dejó enfriar a 70 °C antes de pasarse a través de un filtro de 5 μ en línea a un recipiente con camisa equipado con un aparato de destilación. ¹Se añadió tolueno (150 ml) al matraz de fondo redondo. Esto se usó para enjuagar la línea de transferencia y el filtro. Aproximadamente se retiró por destilación 1,4 l de tolueno a presión reducida. ²La temperatura se bajó a 18 °C, antes se añadió agua (42 ml). ³Se siguió de la adición de ácido metanosulfónico (MSA) (65,5 ml, 99 %, 2,2 equiv.) durante un periodo de 5 min. ⁴Se añadió una segunda porción de agua (18 ml). La mezcla se calentó a 85 °C durante 3 h momento en el cual la reacción se consideró finalizada por el análisis de tlc. La solución bifásica se dejó enfriar a 50 °C, antes se añadió EtOH absoluto (150 ml) durante 20 min. ⁵La mezcla se pipeteó usando 150 mg de bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-di-amonio. ⁶⁻⁸Se añadió una segunda porción de EtOH (600 ml) durante 90 min. ⁹y la reacción se dejó enfriar a 20 °C durante 1 h. ¹⁰Se agitó a esta temperatura durante 1 h. Antes el sólido se recogió por filtración. La torta se lavó con 3 x 300 ml de MeCN, ¹¹se secó por succión 5 min y se colocó al vacío durante una noche para dar el producto en forma de un sólido cristalino de color amarillo (rendimiento

del 85-90 %).

ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} ; 3430 (NH), 3014 (=CH), 2649 (C-H), 1614 (C=C), 1487 (C-C), 1318 (S=O), 1199 (SO₂-O), 1059 (S=O), 823 (ArC=H)

5 δ_{H} (600 MHz; CD₃OD); 2,71 (6H, s, SCH₃), 3,21 (12H, s, NCH₃), 6,75 (2H, d, J 8,8 Hz, ArH), 7,22 (4H, d J 2,9 Hz, ArH), 7,24 (4H, dd J 2,9, 8,8 Hz, ArH),

δ_{C} (100 MHz; CD₃OD); 38,2 (SCH₃), 45,9 (NCH₃), 115,0 (CH), 118,2 (CH), 118,7 (QC), 119,9 (QH), 137,1 (CH), 142,8 (QC)

PF: 271 °C

10 m/z (EI+): Calculado 285,129970; Observado 285,131292 (100 %, [M-2MSA]⁺).

m/z (ES-): Calculado 95; Observado 95 (100 %, [M-LMT]⁻).

% de análisis elemental % (C₁₈H₂₇N₃O₆S₃): Calculado C (45,26), N (8,80), S (20,14), H (5,70); Observado C (45,19), N (8,76), S (19,84), H (5,53)

15 Notas

1. El calentamiento a reflujo asegura la completa disolución de AcMT para la transferencia de un filtro de 5 μ . El tolueno es un buen disolvente y un objetivo de 70 °C es un compromiso entre la garantía de las estancias materiales en solución y minimizando el daño potencial a las mangueras de transferencia de plástico y filtro.

20 2. 500 ml de tolueno restante aseguran que el volumen de reacción reúna una profundidad de agitación mínima del reactor.

3. El volumen de agua se controla para asegurar que el producto cristaliza como un precipitado de flujo libre. La siembra de la reacción reduce el impacto de pequeñas variaciones en el volumen de agua.

25 4. Se utilizan 2,2 equivalentes de MSA para efectuar la hidrólisis y formar la sal dejando una cantidad suficiente de ácido en exceso (0,2 equiv.) para asegurar la estabilidad del producto en solución. La adición de MSA produce una ligera reacción exotérmica, por consiguiente, el tiempo de adición de 5 minutos.

5. Se usa EtOH como contra disolvente para precipitar el producto. Se añade una porción antes de la semilla para asegurar que la semilla no se disuelva. Un tiempo de adición extendido asegura la cristalización controlada del producto (véase las notas 7 y 8).

30 6. Es posible llevar a cabo la reacción sin el uso de una semilla, sin embargo, su incorporación asegura la precipitación precoz de LMT.2MsOH que a su vez evita la formación de subproductos (tales como el éster de alcohol EMS subproducto genotóxico potencial - no detectado en el proceso de síntesis) y la encapsulación de EtOH.

35 7. La semilla también es útil como un medio de controlar el tamaño de partícula del producto. Cuando se utilizó el material de siembra que se había molido en un mortero y maja hasta <100 μm se observó una reducción significativa en el tamaño medio de partícula del producto. Cuando se usaron semillas <100 μ que no habían sido molidas, no se observó tal efecto. Por lo tanto, sin desear estar ligado por la teoría, parece que la capacidad de la semilla para controlar el tamaño de partícula no es una función del tamaño de partícula de la semilla, está vinculada a la proporción de superficies de cristal internas o "nuevas" que la trituración de la semilla ha expuesto.

40 8. Finalmente, cuando el material de siembra era relativamente grande y sin triturar, una cantidad considerable de producto (piel) se puede adherir a un lado de la vasija del reactor durante la adición de EtOH. Esto puede ser reducido mediante la introducción de un ciclo de calor/frío en el proceso después de la adición de EtOH. Sin embargo, una ventaja inesperada de la utilización de la semilla triturada era que el nivel de material desollado presente después de la adición de EtOH se redujo en -90 %. Por lo tanto, ya no era necesario llevar a cabo el ciclo de calor/frío. Parece que esto está relacionado con el tamaño pequeño de las semillas en lugar de con las nuevas superficies porque cuando la reacción se llevó a cabo utilizando semillas sin triturar <100 μ se observó la misma reducción de desollado.

45 9. La tasa de adición de EtOH tiene un efecto sobre el tamaño de partícula y la inclusión de EtOH. Una adición rápida (<1 h) reduce el tamaño de partícula pero sin embargo la inclusión de EtOH aumenta. Una adición lenta (2 h) tiene el efecto contrario y por lo tanto debe alcanzarse un equilibrio.

50 10. La tasa de enfriamiento tiene un efecto similar, aunque reducido. Un enfriamiento rápido (<1 h) conduce a la reducción del tamaño de partícula con un aumento concomitante en los niveles de EtOH. Un enfriamiento lento tiene el efecto contrario.

55 11. El EtOH es igual de eficaz como el MeCN en la eliminación de las sustancias relacionadas, sin embargo, su utilización está acompañada de un ligero aumento en el nivel de EtOH retenido.

Caracterización de bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.2MsOH)

Análisis elemental (Microanálisis)

60 El análisis tiene una buena correlación entre los valores teóricos y los valores de análisis de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre.

Resultados del análisis elemental:

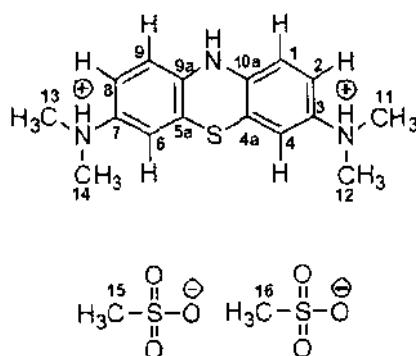
65

Molecular Fórmula	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₆ S ₃	
Elemento	% Teórico	% Encontrado
C	45,26	45,19
H	5,70	5,53
N	8,80	8,76
S	20,14	19,84

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear - ¹H (RMN)

5 El espectro de RMN ¹H se obtuvo en metanol deuterado CD₃OD, en un instrumento Varian de 600 MHz y se muestra en la Figura 1.

La asignación del espectro de RMN ¹H es la siguiente:



10

Asignación	Desplazamiento químico (ppm)	Protones	Grupo
15/16	2,71	6H, s	2 x CH ₃
11/12/13/14	3,21	12H, s	2 x N(CH ₃) ₂
1/9	6,75	2H, d, 8,8 Hz	2 x C-H (Aromático)
4/6	7,22	2H, d, 2,9 Hz	2 x C-H (Aromático)
2/8	7,24	2H, dd, 8,8 y 2,9 Hz	2 x C-H (Aromático)

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear - ¹³C (RMN)

15 El espectro de RMN ¹³C se obtuvo en un instrumento Varian de 400 MHz RMN a una frecuencia de 100,56 MHz en metanol deuterado CD₃OD y se muestra en la Figura 2.

20 La asignación inicial del espectro de RMN ¹³C se basa en la correlación con los gráficos de los desplazamientos químicos conocidos, (Bibliografía de referencia: Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data, Pretsch E., et al., Springer, Londres, p 122).

25 Otras asignaciones utilizan los experimentos DEPT-135, HSQC y HMBC para confirmar de forma inequívoca las asignaciones. Se obtuvieron espectros DEPT-135 (sin distorsión de mejora por transferencia de polarización), HSQC (Coherencia cuántica única heteronuclear) y HMBC (Correlación de enlace múltiple heteronuclear) en un instrumento Varian 400 MHz RMN a una frecuencia de 100,56 MHz (véase Figuras 3-5).

Asignación	Desplazamiento químico (PPM)	Región RMN	DEPT-135
15 / 16	38,2	Alquilo	CH ₃
11 / 12 / 13 / 14	45,9	Alquilo	CH ₃
1 / 9	115,0	Aromático - C	CH
4 / 6	118,2	Aromático - C	CH
4a / 5a	118,7	Aromático - C	C
2 / 8	119,9	Aromático - C	C
3 / 7	137,1	Aromático - C	CH
9a / 10a	142,8	Aromático - C	C

Espectroscopia Infrarroja (IR)

Una muestra se mezcló y se molió en un mortero con 200 mg de KBr anhidro. Después, esta mezcla se prensó en un disco, usando un troquel a una presión de 10,34 Mpa (1500 psi). Después, se obtuvo el espectro IR en un espectrómetro Nicolet Avatar 320 FT-IR. El espectro se muestra en la Figura 6.

5

Asignación del espectro infrarrojo:

Número de onda del pico (cm ⁻¹)	Tipo de pico	Asignación
~ 3430	amplio	tramo N-H
3014	medio	tramo =C-H
2649	medio	tramo C-H
1614	medio	tramo C=C
1487	fuerte	tramo C-C
1318	fuerte	tramo S=O
1199	fuerte	tramo SO ₂ -O
1059	fuerte	tramo S=O
823	fuerte	tramo C-H aromático

Espectroscopia de Masas (EM)

10 El análisis espectroscópico de masas se realizó usando un espectrómetro de masas LCT Premier XE de Waters. Se adoptó un caudal de 1 ml/h. La fuente usada para el análisis del componente activo fue de electrones de ionización de impacto en el modo positivo. La fuente usada para el análisis de la contraíon metanosulfonato fue ionización por electronebulización en el modo positivo.

15 Usando electrones de ionización de impacto se observó un pico principal a 285 (véase la Figura 7). Esta corresponde con el ión molécula ion C₁₆H₁₉N₃S. Se proporciona a continuación una comparación de la masa exacta medida y el calor teórico:

Teórico	Pico m/z	Abundancia (%)	Asignación
285,129970	285,131292	100	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ S

20 La masa exacta medida está en buena concordancia con la masa calculada para C₁₆H₁₉N₃S.

Usando ionización por electronebulización se observó un pico principal a 95 (véase Figura 8). Este corresponde al ión molecular del contraíon CH₃O₃S:

Pico m/z	Abundancia (%)	Asignación
95	100	CH ₃ O ₃ S

25 *Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)*

Una muestra de 5 mg se disolvió en agua desionizada y se preparó hasta 100 ml en un matraz volumétrico. El análisis se realizó usando cubetas de cuarzo en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. El espectro UV-Vis se muestra en la Figura 9.

30

Asignación del espectro UV-Vis:

λ _{máx.} (nm)	Absorbancia
226	1,7615
255	3,5860
332	0,7527
664	0,1845

El coeficiente de extinción ε para la lambda máx. a 255 nm fue 34254,64. Esta se calculó de acuerdo con la Ley Beer-Lambert:

35

$$\epsilon = \frac{A}{C \times l}$$

en la que A = Absorbancia Log (I₀/I) 3,5860; C = Concentración mol/l; l = longitud del lecho 1 cm

40 *Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)*

Una muestra de 100 mg se sometió a análisis de HPLC. El análisis se realizó en un Agilent 1200 series con VWD

Detector o PDA para la identidad, de acuerdo con el método resumido en la tabla a continuación.

Método HPLC:

Parámetros	Condiciones		
Columna	Zorbax SB-CN, 50 x 4,6 mm, 3,5 µm.		
Temperatura de la columna	9,83 °C (283 K)		
Fase móvil	A: ácido fórmico al 0,1 % v/v en agua B: acetonitrilo al 100 %		
Caudal	1 ml/min		
Volumen de inyección	5 µl		
Tiempo de parada	22 min.		
Longitud de onda	UV a 255 nm de ancho de banda a 4 nm. Se muestra la longitud de onda de referencia. El barrido PDA de 190 nm a 800 nm (solo identidad)		
Temperatura de la auto muestra	4,85 °C (278 K).Protegido de la luz.		
Gradiente de fase móvil	Tiempo (min.)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
	0,0	100	0
	10,0	90	10
	17,0	50	50
	18,0	50	50
	18,1	100	0
	22,0	100	0

- 5 El rastro de HPLC se muestra en la Figura 10. Se encontró que la pureza orgánica era al 99,45 % p/p.

Análisis HPLC (% Pureza) que incluye tiempos de retención		
LMT	MT ⁺	Leuco Azure B
6,39 min.	14,38 min.	5,77 min.
99,45	0,55	<0,05

Forma cristalina

- 10 En el método descrito anteriormente, se produjo LMT.2MsOH en forma cristalina. La forma cristalina de LMT.2MsOH se ilustra mediante el espectro de difracción de polvo de rayos X mostrado en la Figura 11. El XRPD exhibe señales nítidas, indicativo de un alto grado de orden cristalino. Las variaciones en la intensidad relativa del pico pueden observarse, que son atribuibles a efectos de orientación en combinación con diferencias en el tamaño de partícula. Se observan solo ligeras variaciones en la intensidad pico relativa (menos de 50%) como una función del espesor de la muestra (0,1 mm frente a 1,0 mm).

La forma cristalina se caracteriza además por FT-Raman, termogravimétrico (TG), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis dinámico sorción de vapor (DVS) y de microscopía (Figuras 12-16). Esta forma puede convenientemente denominarse 'modelo A'.

Se obtuvieron cristales para el análisis de rayos X de cristal único a partir de etanol, ácido metanosulfónico y agua. Véase la Figura 17c.

Detalles instrumentales

- 25 Difracción de polvo de rayos X: Bruker 08 Advance, radiación Cu Ka ($\lambda = 1,54180 \text{ \AA}$), 40 kV/40 mA, detector LynxEye, tamaño de etapa 0,02° en 2 θ , 37 s por etapa, 2,5°-50° 29 intervalo de barrido. Las muestras se prepararon en soportes de muestra de un solo cristal de silicio con 0,1 o 1,0 mm de profundidad sin ningún tratamiento especial distinto de la aplicación de una ligera presión para conseguir una superficie plana. Todas las muestras se hicieron girar durante la medición.

Calorimetría de barrido diferencial: Perkin Elmer DSC 7. Los crisoles dorados se cerraron en N₂, velocidad de calentamiento 20 °C/min, barrido de -50 °C a 280 °C.

5 Sorción de vapor dinámico: Projekt Messtechnik SPS 11-100n analizador de sorción de vapor de agua. Las muestras se colocan en crisoles de aluminio en la parte superior de una microbalanza y se equilibraron a 25 °C y 50 % de h.r. antes de comenzar un programa de la humedad predefinida a 25 °C (50-0-95-50 % h.r., barrido con $\Delta h.r. = 5 \% h^{-1}$ y con periodos de equilibración 'isohumid' en los valores extremos).

10 Espectroscopía FT-Raman: Bruker RFS100. Nd:YAG 1064 nm excitación, potencia del láser de 50 mW, Ge-detector, 128 barridos, intervalo 50-3500 cm⁻¹, resolución 2 cm⁻¹. Soporte de muestra de aluminio.

Microscopio de luz polarizada: microscopio Leitz Orthoplan con cámara Leica OFC280 CCO.

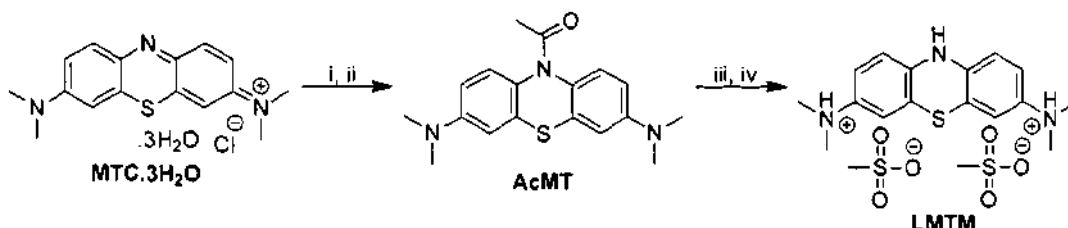
15 TG: TA Instruments TGA Q5000. Crisol de aluminio abierto, atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento 10 °C min⁻¹, intervalo 25-300 °C.

TG-FTIR: Netzsch Thermo-Microbalance TG 209 con Bruker FT-IR Spectrometer Vector 22. Crisol de aluminio con micro agujero, atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento 10 °C min⁻¹, intervalo 25-250 °C.

20 Sin desear estar limitado por la teoría, se sugiere que esta forma representa la única forma polimórfica estable de LMT.2MsOH. Los estudios de polimorfismo han demostrado que la forma A se reproduce en casi todos los sistemas de cristalización (estudios se realizaron usando disolventes desgasificados, bajo una atmósfera inerte).

25 Puede prepararse LMT.2MsOH amorfo por evaporación de una solución acuosa de LMT.2MsOH, sin embargo, el material amorfo se recristaliza a la Forma A cuando se haya secado adicional.

Síntesis a escala industrial de AcMT y LMT.2MsOH



30 i; N₂H₄·H₂O, Et₃N, MeCN, N₂, 65 °C, 1 h, ii; Ac₂O, N₂, 95 °C, 2 h, iii; MSA, H₂O, Tolueno, N₂, 85 °C, iv; EtOH.

Síntesis a gran escala de 10-acetil-N,N,N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (AcMT)

35 Se añadió acetonitrilo (MeCN) (300 l) al reactor 1 (R1) y se enfrió a -5-0 °C. Se añadió trihidrato de cloruro de metiltioninio (MTC.3H₂O) (150 kg) y la temperatura se incrementó a 15-25 °C. Se añadió trietilamina (Et₃N) (100 l) añadió seguido de aclarado con MeCN (20 l). Se añadió hidrato de hidrazina (N₂H₄·H₂O) (12 l) durante 30 min. La temperatura de la reacción se incrementó a 60-70 °C durante 1 h y después se mantuvo a esta temperatura durante 1 h antes de reducirse a 40-50 °C. Se añadió anhídrido acético (Ac₂O) (240 l) durante 1 h seguido de aclarado con MeCN (20 l). La temperatura del baño se incrementó a 90-100 °C durante 2 h: la temperatura se redujo a 55-65 °C y se añadió agua (340 l) durante 2 h mientras que se mantenía la temperatura. Después, la temperatura del baño se redujo a -5-5 °C durante 2 h. y se mantuvo así durante 6 h. El sólido se recogió por filtración. La torta se había deshidratado completamente antes de añadir agua (400 l) a R1. La temperatura en R1 se dejó elevarse a 15-25 °C antes de usar el agua en porciones para lavar la torta de filtro. El producto se secó en una corriente de nitrógeno durante 6 h. antes de descargarse (Rendimiento: 90-110 kg).

45

Purificación a gran escala de 10-acetil-N,N,N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (AcMT)

50 Se añadió agua (300 l) a R1, seguido de 10-Acetil-N,N,N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (AcMT) (100 kg). Se añadieron tolueno (400 l) y ácido acético acuoso al 80 % (40 l), seguido de un enjuague con agua (50 l). La temperatura del baño se incrementó a 75-85 °C durante 1 h. El agitador se detuvo y se dejaron sedimentar las fases durante 30 min. La fase acuosa inferior se retiró y después se añadieron agua fresca (300 l), ácido acético acuoso al 80 % (40 l) seguido de aclarado con agua (50 l). La mezcla se agitó a 75-85 °C durante 1 h antes de que el agitador se detuviera y las fases se dejaron sedimentar durante 30 min. La fase acuosa inferior se retiró y después se añadieron agua fresca (300 l), ácido acético acuoso al 80 % (40 l) seguido de enjuague con agua (50 l). La mezcla se agitó a 75-85 °C durante 1 h antes de que el agitador se detuviera. Las fases se dejaron sedimentar durante 30 min antes de retirarse la fase inferior y se añadió agua (390 l) y la mezcla se agitó durante 1 h. El agitador se detuvo y las fases se sedimentaron durante 30 min. La fase acuosa inferior se retiró y la temperatura se redujo a -5-5 °C. La temperatura de la camisa se incrementó a 80 °C y después, cuando alcanzó 60 °C, la temperatura se redujo a -10-0 °C durante 2 h. La

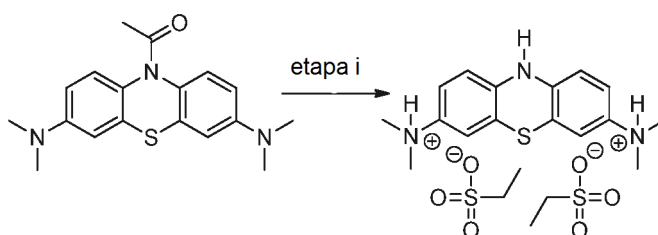
55

mezcla se agitó durante 4 h, antes se transfirió al filtro. La torta se había deshidratado completamente antes de añadir tolueno (150 l) a R1. El tolueno se agitó en R1 durante 30 min. antes de usar en porciones para lavar la torta de filtro. El producto se secó en el filtro en una corriente de nitrógeno durante 48 h hasta la pérdida por desecación fue <1 % antes de descargarse (Rendimiento: 75-90 kg).

5 *Síntesis a gran escala de bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3J-diaminio (LMT.2MsOH)*

Se añadió AcMT (18-22 kg) a R1. Se añadió tolueno (volumen (l) = 16 x AcMT peso) y la mezcla se calentó a 90-100 °C durante 30 min. La solución se dejó enfriar a 60-80 °C antes de pasarse a través de un filtro en línea de 5 µ al reactor 2 (R2). Se añadió tolueno (50 l) al reactor 1 (hasta ~70 °C) y se agitó durante 30 min. Este se usó para enjuagar la línea de transferencia y el filtro. El proceso anterior se repitió una vez más. Después comenzó el proceso de retirada del tolueno en exceso a partir de R2 por destilación a presión reducida. La capacidad de R2 permite, transferirse dos porciones más de AcMT (18-22 kg cada una) a partir de R1 a R2 siguiendo el método descrito anteriormente. La destilación se completó cuando el volumen del lote en R2 se redujo a ~ 340 l. La temperatura se incrementó a 95-105 °C durante 15 - 30 min. antes de enfriarse a 15-25 °C. Se añadió agua (20 l) a R2. Esto se siguió de la adición de ácido metanosulfónico (MSA) (33 l, 99 %, 2,2 equiv.) mientras que se mantenía la temperatura del lote a 15-30 °C. Se añadió una segunda porción de agua (10 l) y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 2 h. La mezcla se calentó a 80-90 °C durante 3-4 h. La solución bifásica se dejó enfriar a 48-58 °C antes de añadir EtOH absoluto (75 l) durante 15-30 min. La agitación se detuvo y la mezcla se pipeteó usando 150 g de (<100 µ) bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio crujiente. Se añadió una segunda porción de EtOH (300 l) durante 80-110 min. La temperatura de la camisa se ajustó a 10 °C y cuando la temperatura alcanzó 25 °C la temperatura de camisa se restableció a 20 °C. Se agitó a 15-25 °C durante 2 h, antes el sólido se recogió por filtración. La torta se deshidrató minuciosamente. Se añadió MeCN (300 l) a R2 y se agitó durante 15 min antes de usarse en porciones para lavar la torta de filtro. Se añadieron unos segundos 300 l de MeCN a R2 y se repitió el proceso de lavado. El producto se secó en el filtro hasta la pérdida por desecación de <0,2 % antes de descargarse (rendimiento 80-90 %).

30 *Síntesis comparativa 2: Síntesis y análisis de bis(etanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT. 2EsOH)*



etapa i; H₂O, MeOH, EsOH, IPA, Acetona

35 *Método de síntesis para LMT.2EsOH*

La síntesis de LMT.2EsOH se llevó a cabo mediante hidrólisis ácida de 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10Hfenotiazin-3,7-diamina. El ácido usado fue ácido etanosulfónico y la combinación disolvente fue metanol acuoso.

40 *Detalles experimentales*

A un matraz de 100 ml de fondo redondo se le añadió 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazin-3,7-diamina (5 g, 15,27 mmol, PM 327,45 g/mol), (70 %, ac.) ácido etanosulfónico (7,21 g, 45,81 mmol, PM 110,13 g/mol) y metanol (25 ml). La mezcla se calentó a 75 °C y se agitó a esta temperatura 4 horas, antes la mezcla se enfrió sobre agua enfriada con hielo. No se formaron sólidos y el metanol se retiró al vacío para dar un aceite de color verde viscoso. A este aceite se le añadió isopropanol (25 ml) y la mezcla se calentó a reflujo para asegurar una solución homogénea. Se añadió una vez acetona enfriada hasta que se formó un precipitado. La suspensión se enfrió sobre agua enfriada con hielo durante 1 hora antes de filtrarse para dar el producto en bruto en forma de un sólido de color amarillo, que cambió a color verde tras la exposición al aire. El producto en bruto se lavó con acetona (3 x 5 ml) y se secó al aire durante 3 días para dar el producto en bruto (3,35 g, 43 %, PM 505,68 g/mol) en forma de un sólido de color verde claro.

50 ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3448 (NH), 3263 (=CH), 3030 (=CH), 2987 (CH), 2938 (CH), 2582 (SO₃H), 2452 (SO₃H), 1487 (C-C), 1211 (O=S=O), 1188 (O=S=O), 1145 (O=S=O), 1026. δ_{H} (400 MHz; D₂O): 1,07 (6H, t, J 7,6, CH₃), 2,72 (4H, c, J 7,6, SCH₂), 3,02 (12H, s, N CH₃), 6,54 (2H, d, J 9,2, ArH), 7,02 (4H, d a s, ArH); δ_{C} (100 MHz; D₂O): 142,3 (QC), 136,6 (QC), 119,9 (CH), 118,4 (QC), 118,2 (CH), 115,2 (CH), 46,2 (NCH₃), 45,3 (SCH₂), 8,3 (CH₃).

55 PF: 208-210 °C (IPA/Acetona)

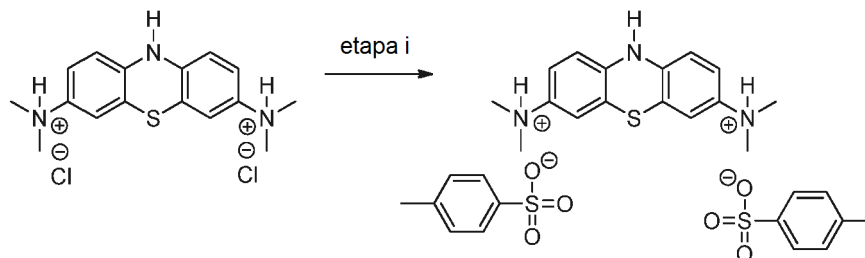
m/z (EI+): Masa calculada 285,129970; Observado 285,129761 (100 %, [M-2EsOH]⁺).

m/z (ES-): Masa calculada 109; Observada 109 (100 %, [M-LMT]⁻).

Cristalografía

Una muestra de 1 g de LMT.2EsOH se disolvió en ácido acético (~0,1 g) y el acetato de etilo se dispuso en capas en la parte superior y se dejó difundir lentamente durante 3 días en la oscuridad. Los cristales se desarrollaron y se recogieron y se analizaron mediante difracción de rayos X y se confirmó el producto en forma de bis(etanosulfonato). Véase la Figura 17a.

10 Síntesis comparativa 3: Síntesis y análisis de bis(p-toluenosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.2TsOH)



etapa i; H₂O, Na₂CO₃, THF, Et₂O, p-TsOH

15

Método de síntesis para LMT.2TsOH

La síntesis de LMT.2TsOH se realizó mediante la neutralización de dicloruro de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio con carbonato sódico y extraer las especies neutrales en disolvente orgánico. El extracto se trató con ácido p-toluenosulfónico y la mezcla se concentró a sequedad.

20

Detalles experimentales

A un vaso de precipitados de 50 ml se le añadieron carbonato sódico (0,59 g, 5,58 mmol, PM 105,99 g/mol) y agua (10 ml), la mezcla se agitó hasta que el sólido se había disuelto. A un embudo de separación de 100 ml se le añadió dicloruro de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (1 g, 2,79 mmol, PM 358,33 g/mol), tetrahidrofurano (35 ml) y éter dietílico (5 ml), después la solución acuosa de carbonato sódico. Las especies neutrales se extrajeron en la fase de disolvente orgánico y se separaron de la fase acuosa. Al extracto orgánico se le añadió monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (1,06 g, 5,58 mmol, PM 190,20 g/mol) predisoluelto en tetrahidrofurano (5 ml) y la mezcla se concentró a sequedad para dar el producto (PM 629,8216 g/mol) en forma de una espuma de color verde crujiente.

30

ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹; 3440 (NH), 3270 (=CH), 3032 (=CH), 2628 (SO₃H), 1484 (C-C), 1194 (O=S=O), 1122 (O=S=O), 1032.

35

δ_{H} (400 MHz; D₂O); 2,24 (6H, s, CH₃), 3,09 (12H, s, NCH₃), 6,62 (2H, d, J 8,4, ArH), 7,10 (4H, s, ArH), 7,13 (4H, d, J 8,4, Ts-H), 7,61 (4H, d, J 8,4, Ts-H)

δ_{C} (100 MHz; D₂O); 19,9 (CH₃), 45,9 (NCH₃), 115,0 (CH), 118,2 (CH), 118,6 (QC), 119,9 (CH), 125,5 (CH), 128,5 (CH), 137,0 (QC), 140,5 (QC), 141,9 (QC), 142,8 (QC).

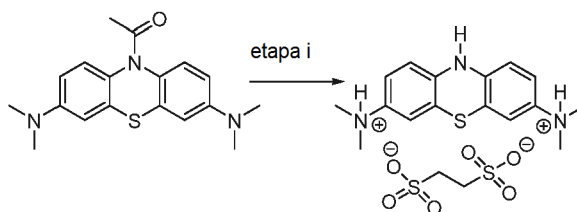
Pf: 108 °C (THF/Et₂O)

40

m/z (EI+): Masa calculada 285,129970; Observada 285,129398 (100 %, [M-2TsOH]+).

m/z (ES-): Masa calculada 171,0116; Observada 171,0121 (100 %, [M-LMT]).

Síntesis comparativa 4: Síntesis y análisis de etanodisulfonato de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.EDSA)



45

etapa i; H₂O, EtOH, EDSA

La síntesis de LMT.EDSA se realizó mediante la hidrólisis ácida de 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina. El ácido usado fue ácido 1,2-etanodisulfónico y la combinación de disolvente fue etanol

acuoso.

Detalles experimentales

5 A un matraz de 25 ml de fondo redondo se le añadieron 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (1 g, 3,05 mmol, PM 327,45 g/mol), monohidrato del ácido 1,2-etanodisulfónico (0,95 g, 4,58 mmol, PM 208,21 g/mol), agua (1 ml) y etanol (5 ml). La mezcla se calentó a 85 °C y se agitó a esta temperatura durante 2,5 horas en la que un sólido de color amarillo verdoso precipitó a partir de la solución. La suspensión se enfrió sobre agua enfriada con hielo durante 30 min antes de filtrarse para dar el producto en bruto en forma de un sólido de color verde amarillento. El material en bruto se lavó con etanol (3 x 3 ml) y se secó al aire durante 15 min. de secarse en un horno durante 3,5 horas a 70 °C para dar el producto en bruto (1,33 g, 91 %, PM 475,61 g/mol) en forma de un sólido de color amarillo.

Purificación de LMT.EDSA

15 A un matraz de 50 ml cónico se le añadieron LMT.EDSA en bruto (1 g, 2,10 mmol, PM 475,61 g/mol) y agua (10 ml). La suspensión se calentó a 95 °C y se agitó a esta temperatura hasta que el sólido se disolvió. Después, la solución se dejó enfriar a en la que se formó un sólido cristalino de color verde claro. Después, la suspensión se enfrió sobre agua enfriada con hielo durante 30 min antes de filtrarse. El sólido recogido se lavó con metanol (3 x 3 ml) y se secó al aire durante 18 horas para dar el producto purificado (0,88 g, 88 %, PM 475,61 g/mol) en forma de un sólido de color verde claro cristalino.

ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} ; 3408 (NH), 3280 (=CH), 3221 (C-H), 3036 (=CH), 2574 (SO_3H), 2480 (SO_3H), 1484 (C-C), 1226 (O=S=O)

δ_{H} (400 MHz; D_2O); 2,98 (12H, s, NCH_3), 3,06 (4H, s, SCH_2), 6,45 (2H, d, J 6, ArH), 6,95 (4H, d J 4, ArH)

25 δ_{C} (100 MHz; D_2O); 46,2 (NCH_3), 46,4 (SCH_2), 115,1 (CH), 118,1 (CH), 118,4 (QC), 119,8 (CH), 136,5 (QC), 142,1 (QC)

PF: se descompone a 268 °C (H_2O)

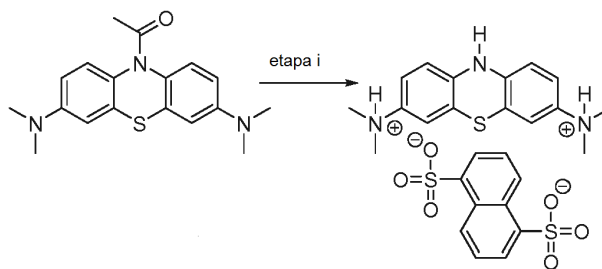
m/z (EI+): Calculado 285,129970; Observado 285,130948 (100 %, [M-EDSA]⁺). m/z (ES-):

Calculado 188,9528; Observado 188,9535 (100 %, [M-LMT]).

Cristalografía

Una muestra de 40 mg de LMT.EDSA se disolvió en agua deuterada caliente (~1 ml) y se dejó enfriar lentamente en la oscuridad. Los cristales desarrollados que se recogieron y se analizaron mediante difracción de rayos X y se confirmó el producto como el monohidrato del 1:1 LMT a aducto EDSA. Véase la Figura 17b.

Síntesis comparativa 5: Síntesis y análisis de naftalendisulfonato de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT.NDSA)



40 etapa i; H_2O , EtOH, NDSA

Método de síntesis para LMT.NDSA

45 La síntesis de LMT.NDSA se realizó mediante la hidrólisis ácida de 10-acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina. El ácido usado fue ácido 1,5-naftalenodisulfónico y la combinación de disolvente fue etanol acuoso.

Destalles experimentales

50 A un matraz de 25 ml de fondo redondo se le añadieron 10-Acetil-N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diamina (1 g, 3,05 mmol, PM 327,45 g/mol), tetrahidrato de ácido 1,5-naftalenodisulfónico (1,65 g, 4,58 mmol, PM 360,36 g/mol), agua (1 ml) y etanol (5 ml). La mezcla se calentó a 85 °C y se agitó a esta temperatura durante 30 minutos en la que la mezcla todavía era insoluble. A la mezcla caliente se le añadió agua (4 ml) y la reacción se calentó a 95 °C y se agitó a esta temperatura durante 8 horas. La suspensión se enfrió sobre agua enfriada con hielo durante 10 minutos antes de filtrarse para dar el producto en bruto en forma de un sólido de color verde claro. El material en bruto se lavó con etanol (3 x 5 ml) y se secó al aire durante 3 días para dar el producto en bruto (1,75 g, 100 %, PM

573,71 g/mol) en forma de un sólido de color azul verdoso claro.

ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} ; 3382 (NH), 3302 (=CH), 3040 (=CH), 2525 (SO_3H), 1478 (C-C), 1238 (O=S=O), 1219 (O=S=O), 1179, 1158, 1030.

5 δ_{H} (400 MHz; D_2O); 3,06 (12H, s, NCH_3), 6,70 (2H, d a, ArH), 7,14 (4H, d a, ArH), 7,43 (2H, t, J 8,0, 7,6, Naph-H), 7,94 (2H, d, J 7,2, Naph-H), 8,87 (2H, d, J 78,4, Naph-H), 9,10 (1H, s, NH)

δ_{C} (100 MHz; D_2O); 46,0 (NCH_3), 115,3 (CH), 117,5 (QC), 118,7 (CH), 120,4 (CH), 124,6 (CH), 124,7 (CH), 129,6 (CH), 129,9 (QC), 138,3 (QC), 141,7 (QC), 143,8 (QC).

PF; se descompone a 256 °C (MeCN)

10 m/z (EI+): Masa calculada 285,129970; Observada 285,130367 (100 %, [M-NDSA]⁺).

m/z (ES-): Masa calculada 286,9684; Observada 286,9697 (100 %, [M-LMT]⁻).

Ejemplo 2 – Estudios de solubilidad

15 i) Solubilidad de sales dibromuro, dicloruro y bis(metanosulfonato) de N,N,N',N'-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMT. 2HBr, LMT.2HCl y LMT.2MsOH)

Se prepararon dos soluciones acuosas (pH 2,00 y 3,01 a 21,4 °C) mediante la adición cuidadosa de HCl (5 M) a agua desionizada.

20 En cada experimento una alícuota de 5 ml de una de las soluciones anteriormente mencionadas se calentó a 37 °C. Se añadió una porción de la sal apropiada (LMT.2MsOH, LMT.2HCl o LMT.2HBr) y la mezcla se agitó durante unos pocos momentos para permitir por completo la disolución del sólido. Esta etapa se repitió hasta que la disolución no tuvo lugar.

25 Los resultados se muestran en la Tabla:

Sal	pH (21,4 °C)	g/5 ml* (37 °C)
LMT.2HBr	3,01	4,726-5,236
LMT.2HBr	2,00	4,822-5,096
LMT.2HCl	3,01	4,978-6,029
LMT.2HCl	2,00	4,404-4,961
LMT.2MsOH	2,00	8,825-9,943

*El límite inferior del intervalo corresponde al peso total a la que se observó la disolución completa. El límite superior es el peso total añadido antes de conseguirse la saturación

30 Como puede verse LMT.2MsOH tiene una buena solubilidad acuoso.

ii) dependencia del pH de la sal LMT.2MsOH

En experimentos relacionados se prepararon tres soluciones madre tamponadas (pH 2, pH 3, y pH 7) como sigue a continuación:

35 solución acuosa tamponada a pH 2

Se preparó inicialmente una solución de (0,2 M) cloruro de potasio (KCl) (0,745 g en 50 ml de agua desionizada). A partir de esta solución, se tomaron 50 ml y se diluyeron con aproximadamente 80 ml de agua desionizada. Una solución (0,2 M) de ácido clorhídrico (HCl) se usó después para ajustar el pH a 2, antes de la dilución adicional con agua desionizada para preparar 200 ml. Se registró un pH final de 2,00 a 21,6 °C.

solución acuosa tamponada a pH 3

45 Se preparó inicialmente una solución de (0,1 M) ftalato de hidrógeno y potasio (2,042 g en 100 ml de agua desionizada). A partir de esta solución, se tomaron 100 ml y se diluyeron con aproximadamente 50 ml de agua desionizada. Después, se usó una solución 0,2 M de HCl para ajustar el pH a 3, antes de la dilución adicional con agua desionizada para completar hasta 200 ml. Se registró un pH final de 2,99 a 21,7 °C.

50 solución acuosa tamponada a pH 7

Se preparó inicialmente una solución de (0,1 M) fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (1,370 g en 100 ml de agua desionizada). A partir de esta solución, se tomaron 100 ml y se diluyeron con aproximadamente 80 ml de agua desionizada. Después se usó una solución 0,5 M de hidróxido sódico (NaOH) para ajustar el pH a 7, antes de la dilución adicional con agua desionizada para completarse hasta 200 ml. Se registró un pH final de 7,07 a 22 °C.

55 Método

Una alícuota de 5 ml de una solución tamponada acuosa se añadió a un vial que contenía una micro barra agitadora. Este vial se puso en un baño de agua ajustado a 25 °C. A la solución se le añadió LMT.2MsOH en porciones de 1 - 1,5 g. Después de cada adición, se dejó un tiempo de agitación de 10 minutos para asegurar la oportunidad máxima para la disolución. La homogeneidad de la mezcla se juzgó a simple vista. Si todavía estaba presente un sólido, después del tiempo de agitación, como se juzga por inspección visual, se consideraba que se había alcanzado el punto de saturación.

Resultados

La viscosidad de las mezclas resultantes impidió el aislamiento adecuado del exceso de sólidos, por lo tanto no fue posible determinar los valores de solubilidad exactos. En consecuencia cada uno de los resultados se presentan como un intervalo en la que la masa total de LMT.2MsOH añadida antes del punto de saturación constituye el límite inferior y la masa total de LMT.2MsOH añadida, después del punto de saturación, establece el límite superior.

Los resultados de cada uno de los tres experimentos se muestran a continuación:

pH	Solubilidad (g/ml)
2,00	1,600 - 1,773
2,99	1,981 - 2,092
7,07	2,033 - 2,114

Como puede verse, la solubilidad se redujo ligeramente como se redujo el pH, sin embargo LMT.2MsOH se realizó bien en cada uno de los tres sistemas acuosos.

En conclusión LMT.2MsOH tiene mejor solubilidad acuosa que el MTC (no mostrado) y solubilidad mejorada en comparación con el correspondiente cloruro y sales de bromuro. Esto sugiere un aumento de la utilidad en relación con el tratamiento y usos descritos en el presente documento.

Ejemplo 3 – Inhibición de la agregación y la toxicidad

Métodos: Ensayo en fase sólida para la agregación de tau

El ensayo de agregación tau-tau utiliza fragmentos de tau recombinante purificada en un inmunoensayo en fase sólida. Los métodos se describen en detalle en, por ejemplo, el documento WO 96/30766. Brevemente, el ensayo mide la unión de tau truncada (aminoácidos 297-391) en solución a la tau truncada unida a la fase sólida (residuos 297-390). La unión de la primera se detecta con el anticuerpo mAb 423, que reconoce específicamente los péptidos que contienen un residuo de Glu-391 C-terminal. El complejo Tau formado in vitro es similar al complejo agregado que se forma en la enfermedad de Alzheimer, como consecuencia de la estabilidad de la interacción de unión patológica Tau-Tau a través de un dominio de repetición de 94/95 aminoácidos (residuos 297-390), que se encuentran en el núcleo proteolíticamente estable del filamento helicoidal pareado.

El valor B₅₀ (expresado como media ± SE) se determina como la concentración de compuesto a la que la unión tau-tau se reduce en un 50 %.

Métodos: Ensayo de agregación de tau a base de células

El ensayo se basa en células de ratón 3t6 que se han diseñado por ingeniería para expresar la proteína tau humana de longitud completa (htau40) bajo el control de un promotor inducible (pOPRSVI), y para expresar bajos niveles de tau truncada (295 - 390, dGA) bajo el control de un promotor constitutivo (pcDNA3.1). La expresión de grandes cantidades de htau40 se induce por la adición de IPTG (10-50 μM), que a su vez conduce a la producción de tau truncada adicional por un proceso en el que la agregación y el procesamiento de la tau de longitud completa se produce en presencia de dGA tau que actúa como plantilla. La adición de inhibidores de la agregación tau-tau al ensayo bloquea este proceso. Los métodos se describen con más detalle en el documento WO 02/055720.

Los resultados se expresan como la concentración a la que hay una inhibición del 50 % de la generación del fragmento de 12 kDa. Esto se conoce como valor de CE₅₀.

Las células (4A y clones de los mismos) se cultivan hasta ~ 80 % de confluencia en una placa de 10 cm, antes de la división a dos placas de 24 pocillos y se dejan crecer durante 24 hrs. Se añade el artículo de ensayo a varias concentraciones y, al cabo de 24 horas, se añade IPTG. Después de la incubación durante la noche, se elimina el medio, los pocillos se lavan con PBS y las células se recogen mediante la adición de tampón Laemmli. Las muestras se almacenaron a -20 °C para la posterior electroforesis en gel, transferencia de Western y marcaje de anticuerpos. Las muestras se separan mediante SDS PAGE, se transfieren a membrana de PVDF y la tau marcada con anticuerpo 7/51 se detectó con ECL en una estación de imágenes Kodak. Compuesto se analizó normalmente a cuatro concentraciones por triplicado en un intervalo de concentraciones con todas las muestras pasadas en un gel. La relación de las intensidades de las bandas dGA a htau40, normalizada para el control de muestras en las que no había

fármaco, se representó frente a la concentración del fármaco y el valor de CE_{50} se determinó gráficamente a partir de la concentración a la que la relación cae a 0,5.

El método se resume en la Tabla 1 inmediatamente a continuación. MTC (TR x 0014,047) se llevó a cabo como control en todos los experimentos y el valor de CE_{50} se normalizó a MTC tiene una $CE_{50} = 0,59 \mu\text{M}$.

Tabla 1: Resumen del procedimiento de ensayo para medir la CE_{50}

Cronología	Medida
Día 1	Dividir las células en placas de 24 pocillos
Día 2	Añadir fármaco a diversas concentraciones
Día 3	Por la tarde, añadir IPTG
Día 4	Por la mañana, se acumulan en tampón de Laemmli, almacenar a -20°C antes de su posterior procesamiento
Día de procesamiento	Pasar las muestras en geles SDS PAGE, transferir a una membrana de PVDF, marcar con anticuerpo 7/51 anti-tau. Las manchas se cuantificaron utilizando el software Kodak 1D y los datos se transfieren al paquete estadístico Systat para la representación gráfica.

Métodos: Ensayo de toxicidad celular

Las células (fibroblastos de ratón 3T6) se cultivan hasta ~ 80 % de confluencia en una placa de 10 cm, antes de la división en placas de 96 pocillos, 10 % de la placa de 10 cm por placa de 96 pocillos, 50 μl por pocillo. Una columna de 8 pocillos se deja vacía (para que sea un blanco de reactivos en el ensayo). Se dejó que las células crecieran durante la noche antes de añadir el fármaco a cuatro pocillos a la concentración de partida (normalmente, 200 μM para MTC o LMT.2HBr) y en los pocillos posteriores utilizando una dilución en serie de 1:2, usándose los últimos cuatro pocillos de células como control sin fármaco. Esto permite analizar dos medicamentos por placa de 96 pocillos. Las células se dejaron en presencia de fármaco durante 48 horas, después de lo cual se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS. El número de células se determinó utilizando un kit Cytotox de 96 pocillos (Promega) que se basa en el ensayo con lactato deshidrogenasa (LDH). El ensayo mide cuantitativamente la LDH, una enzima citosólica publicada estable que se libera en la lisis celular. La LDH liberada se mide con un ensayo enzimático que se traduce en la conversión de una sal de tetrazolio en un producto de formazán rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas.

Brevemente, las células se lisan una vez con 50 % μl /pocillo del tampón de lisis durante 45-60 minutos, seguido de 50 μl /pocillo de reactivo de ensayo LDH durante 30 minutos y la reacción se detuvo con 50 μl /pocillo de tampón de parada. La absorbancia se lee a 490 nm. La absorbancia relativa a los pocillos no tratados (células no tratadas = 1,0) se representó frente a la concentración de fármaco. La DL_{50} se determinó gráficamente a partir de la concentración a la que la absorbancia se reduce en un 50 %. El MTC (TR x 0014,047) se pasó como control en todos los experimentos al analizar LMT.2HBr y el valor de la DL_{50} se corrigió con MTC con una $DL_{50} = 65 \mu\text{M}$.

Resultados:

Se analizaron varios sales de bis(sulfonato) y se compararon con las sales de bis(haluro) dicloruro de *N,N,N',N'*-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio (LMTc, LMT.2HCl) y di(bromuro) de *N,N,N',N'*-tetrametil-10H-fenotiazina-3,7-diaminio LMT.2HBr y con cloruro de metiltioninio (MTCO).

Los datos *In vitro* para las diferentes formas de sales de metiltioninio se resumen en la Tabla 2 inmediatamente a continuación:

Tabla 2: Resumen de los datos *in vitro*

Compuesto	DL_{50} (μM)	CE_{50} (μM)	THx	B_{50} (NM)
MTC	65 ± 5	$0,59 \pm 0,04$	110	$195,6 \pm 16,1$ (n = 10)
LMT.2HBr	61 ± 4 (n = 20)	$0,66 \pm 0,15$ (n = 8)	92	$472,4 \pm 27,6$ (n = 3)
LMT.2MsOH	34 ± 4 (n = 8)	$0,19 \pm 0,04$ (n = 8)	179	$238,2 \pm 74,2$ (n = 3)
LMT.2HCl	64 ± 8 (n = 10)	$0,63 \pm 0,10$ (n = 7)	102	$360,8 \pm 38,2$ (n = 3)
LMT.2TsOH	87 ± 10 (n = 8)	$0,62 \pm 0,34$ (n = 2)	140	$296,0 \pm 37,9$ (n = 3)
LMT.NDSA	77 ± 15 (n = 8)	$0,71 \pm 0,34$ (n = 4)	108	$333,7 \pm 63,2$ (n = 2)
LMT.EDSA	78 ± 6 (n = 8)	$0,68 \pm 0,32$ (n = 4)	115	$399,9 \pm 17,6$ (n = 2)
LMT.2EsOH	52 ± 3 (n = 8)	$0,52 \pm 0,13$ (n = 3)	100	$297,0 \pm 75,1$ (n = 3)
MSA*	–	NE (20)	–	> 500
EDSA*	–	NE (20)	–	> 500

THx, índice terapéutico (THX = DL_{50}/CE_{50})

Los valores se expresan como LA media \pm SE. NE = no eficaz (a la dosis máxima analizada)

*MSA = ácido metanosulfónico; EDSA = ácido etanodisulfónico

Comentarios

Los valores de CE50 (media \pm SE) para LMT.2MsOH y LMT.2HCl son $0,19 \pm 0,04 \mu\text{M}$ Y $0,63 \pm 0,10 \mu\text{M}$, respectivamente, con índices terapéuticos de 179 y 102 correspondientes.

5 La potencia relativa de los compuestos en el modelo basado en células de la agregación de tau-tau es LMT.2MsOH > MTC, LMT.2HBr, LMT.2HCl. El índice terapéutico es un 63 % mayor para LMT.2MsOH en comparación con MTC.

10 El orden de potencia en el ensayo basado en células es MTC, LMT.2MsOH > LMT.2HCl > LMT.2HBr. Los valores de B₅₀ para LMT.2MsOH y LMT.2HCl son $238,2 \pm 74,2 \mu\text{M}$ Y $360,8 \pm 38,2 \mu\text{M}$, respectivamente. El orden de potencia relativa en el ensayo basado sin células es LMT.2MsOH > MTC, LMT.2HCl, LMT.2HBr.

10 Ejemplo 4 - Toxicología, impurezas y efectos sobre el sistema hematopoyético

15 LMT.2HBr, LMT.2HCl, LMT.2MsOH o MTC se administraron diariamente durante 14 días a ratas Wistar hembras; las dosis fueron de 95 mg de MT/kg/día entre los días 1 a 10 y de 60 mg de MT/kg/día entre los días 11 a 14. Los signos clínicos de la postura corporal elevada, el comportamiento sumiso y debilidad general se observaron en todos los grupos tratados. Se produjeron muertes relacionadas con el tratamiento en los grupos tratados con LMT.2HBr y MTC.

20 Se observaron cambios en los parámetros de glóbulos rojos en la sangre y la médula ósea de todos los grupos tratados, que eran indicativos de una anemia regenerativa. Estos incluyeron: disminución del número de glóbulos rojos, baja concentración de hemoglobina y aumento del número de reticulocitos en la sangre y un aumento del número de precursores de glóbulos rojos en la médula ósea. Esto se corroboró histológicamente por un aumento de los niveles de la eritropoyesis en el bazo.

25 Se observó una disminución en el número de granulocitos neutrófilos en la médula ósea de todos los animales tratados, aunque la magnitud de este efecto fue considerablemente mayor en el grupo tratado con LMT.2HBr que en los otros grupos. Esta diferencia también se observó en la gravedad de la neutropenia observada en frotis de sangre preparados, en los que hubo depleción marcada de neutrófilos maduros en los animales tratados con LMT.2HBr, una modesta disminución con MTC y ninguna disminución de los grupos tratados con LMT.2HCl o LMT.2MsOH. Los resultados de este estudio sugieren que, al menos en ratas, el LMT.2HBr tiene una mayor propensión a causar
30 depleción de neutrófilos que LMT.2HCl, LMT.2MsOH o MTC. También se observó disminución del número de neutrófilos y granulocitos maduros en la médula ósea a la dosis alta (45 mg de MT/kg/día) en un estudio de 6 meses de LMT.2HBr en la rata. La disminución de neutrófilos, o neutropenia, observada después de LMT.2HBr, aunque reversible, haría a los pacientes más susceptibles a las infecciones bacterianas dado que su función principal es la destrucción de las bacterias.

35 Por lo tanto, LMT.2MsOH muestra propiedades mejoradas en comparación con LMT.2HBr en ratas tanto en términos de tolerabilidad (muertes relacionadas con la dosis) como en la respuesta de los neutrófilos.

40 Tabla: Respuesta de neutrófilos en ratas después de la administración oral durante 14 días de las formas de sales de LMT. Se registran los neutrófilos totales como un porcentaje de glóbulos blancos totales (en cada portaobjetos se examinaron aproximadamente 100 glóbulos blancos (intervalo de 100 a 107)), la frecuencia de la presencia de neutrófilos inmaduros se registró por grupo de animales; las muertes relacionadas con la dosis se registraron como el número de animales por grupo de 8 ratas.

Compuesto	Neutrófilos	Neutrófilos tempranos	Muertes relacionadas con la dosis
Vehículo			
Control	15,50 %	0/8	0/8
LMT.2HBr	3,00 % *	8/8	2/8
LMT.2HCl	19,90 %	2/8	0/8
LMT.2MsOH	18,30 %	1/8	0/8
* P < 0,001 comparado con el control			

45 Aunque LMT.2HCl y LMT.2MsOH son comparables en el análisis anterior, existe una distinción en las impurezas que se encuentran en las dos formas de sal. Para LMT.2HCl, se detectó la presencia de cloruro de metilo durante la síntesis y atrapado dentro del producto de tal manera que era difícil de eliminar por completo. Por contraste, las impurezas tales como metanosulfonato de etilo y de metilo (EMS, MMS) se pudieron controlar a niveles mucho más
50 bajos en el proceso de síntesis de LMT.2MsOH.

Los estudios sobre el sistema hematopoyético se realizaron en ratas, monos y cerdo enano.

55 Las dosis más bajas a las cuales se observó metahemoglobinemia fueron 15 mg de MT/kg/día en ratas (MTC y LMT.2HBr) o 30 mg de MT/kg/día (LMT.2MsOH), 5,3 mg de MT/kg/día en primates (MTC) y 10 mg de MT/kg/día (LMT.2MsOH y LMT.2HBr) en cerdos enanos.

Después de los primeros 28 días de dosificación en el estudio de 9 meses DE LMT.2MsOH en cerdos enanos, no hay indicios DE metahemoglobinemia en 3 mg DE MT/kg/día.

5 Sin embargo, como era de esperar, ya que los niveles de dosis de MTC, LMT.2HBr o LMT.2MsOH aumentaron, los signos de estrés oxidativo a los glóbulos rojos surgieron de una forma dependiente de la dosis, evidenciado por el aumento de los niveles de metahemoglobina y, en última instancia, a dosis que no fueron toleradas, formación de cuerpos de Heinz (agregados de hemoglobina precipitada desnaturalizada dentro de los glóbulos rojos).

Ejemplo 5- Farmacocinética

10 La Figura 18 muestra una comparación de la concentración plasmática en cerdos del resto de MT con el tiempo después de la administración de LMT.2HBr, LMT.2HCl y LMT.2MsOH a (dos dosis orales, 2 y 15 mg/kg).

15 Como puede verse, la $C_{m\acute{a}x}$ (a $T_{m\acute{a}x}$ de 1 hora) para LMT.2MsOH fue más de 2 veces mayor que la de LMT.2HCl o LMT.2HBr. Por lo tanto, LMT.2MsOH puede proporcionar una exposición más eficaz para MT que para LMT.2HCl o LMT.2HBr.

Ejemplo 6 - Estudios de irritación gástrica

20 Estudio (rata de 28 días con MTC o LMT.2HBr): incidencia y gravedad de los hallazgos microscópicos seleccionados en el estómago de animales terminales

Incidencia y gravedad de los resultados seleccionados en esternón, fémur, hígado y bazo: sacrificio de animales terminales																
	Machos							Hembras								
	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	LMT.2HBr	
	MTC		MTC		LMT.2HBr		MTC		MTC		LMT.2HBr		LMT.2HBr			
Tejido y hallazgo	0	5	30	90	5	30	90	0	5	30	90	0	5	30	90	0
Nivel (mp/kg/día)	0	5	30	90	5	30	90	0	5	30	90	0	5	30	90	0
N.º examinados:	0	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	5	0
Estómago (no glandular)																
Gastritis	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1
infiltración de células inflamatorias	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Clave: "-" = no presente, 1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = moderadamente grave, 5 = grave

A partir de lo anterior, se puede predecir lo siguiente con 10 por grupo

Incidencia y gravedad de los resultados seleccionados en esternón, fémur, hígado y bazo: sacrificio de animales terminales														
	Machos							Hembras						
	1M	2M	3M	4M	5M	6M	7M	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F
	MTC		MTC		LMT.2HBr		LMT.2HBr		MTC		LMT.2HBr			
Nivel (mg/kg/día)	0	5	30	90	5	30	90	0	5	30	90	5	30	90
N.º examinado:	10	0	0	10	0	0	10	10	0	0	10	0	0	10
Tejido y hallazgo														
Estómago (no glandular)														
Gastritis	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	3	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-	-	-	2
total				2			4			2				4

Estudio (rata de 28 días con LMT.2MsOH): incidencia y gravedad de los hallazgos microscópicos seleccionados en esternón, hígado, bazo y estómago de animales terminales

Incidencia y gravedad de los resultados seleccionados en esternón, hígado y bazo: sacrificio de animales terminales

Tejido y hallazgo	Nivel (mp/kg/día)	Machos				Hembras			
		1M	2M	3M	4M	1F	2F	3F	4F
	N.º examinados: Grado* –	10	0	0	10	10	0	0	10
Estómago (no glandular)									
Gastritis	1	–				–			–
	2	–			2	–			2
	3	–			–	–			1
total					2				3
infiltración de células inflamatorias	1	–			4	–			4
	2	–			–	–			1

*Clave: "–" = no presente, 1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = moderadamente grave, 5 = grave

5 Estos resultados muestran que LMT.2MsOH causa menos irritación gástrica que LMT.2HBr.

Ejemplo 7 Formulaciones

Ejemplo de formulación 1: Preparación de comprimidos de LMTM usando compresión directa

10 Los comprimidos que tienen las siguientes composiciones se prepararon por un método de compresión directa:

	Concentración del comprimido (LMT mg/comprimido)				
	50	75	100	125	150
Ingrediente	(mg/comprimido)				
LMTM	84,43	126,65	168,86	211,08	253,29
Manitol secado por pulverización	344,57	302,35	290,14	392,92	425,71
Celulosa microcristalina (Avicel PH102 o PH112)	50,00	75,00	95,00	125,00	150,00
Crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Estearato de magnesio	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Peso total del núcleo del comprimido	500,00	525,00	575,00	750,00	850,00

15 LMTM, manitol secado por pulverización, celulosa microcristalina, crospovidona y estearato de magnesio se mezclaron en un mezclador de tambor, y a continuación se comprimieron usando una máquina de formación de comprimidos.

20 A continuación, los núcleos de los comprimidos se recubrieron con película con una suspensión acuosa de azul Opadry* (* marca registrada de Colorcon para una gama de materiales de recubrimiento pelicular).

Ejemplo de formulación 2: Preparación de comprimidos de LMTM utilizando granulación en seco (compactación con rodillo)

25 Los comprimidos que tienen las siguientes composiciones se prepararon por un método de granulación en seco:

	Concentración del comprimido (LMT mg/comprimido)				
	50	75	100	125	150
Ingrediente	(mg/comprimido)				
LMTM	84,43	126,65	168,86	211,08	253,29
Manitol secado por pulverización	344,57	302,35	290,14	392,92	425,71
Celulosa microcristalina (Avicel PH102 o PH112)	50,00	75,00	95,00	125,00	150,00
Crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Estearato de magnesio	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Peso total del núcleo del comprimido	500,00	525,00	575,00	750,00	850,00

30 LMTM, manitol secado por pulverización, celulosa microcristalina, crospovidona y estearato de magnesio se mezclaron en un mezclador de tambor. A continuación, la mezcla se granuló en seco usando un compactador de rodillos y después se molió con un granulador oscilante utilizando un tamiz adecuado. En este caso, se utilizó la mitad de estearato de magnesio antes de la compactación con rodillos y la mitad del estearato de magnesio se añadió después a la granulación y se mezcló antes de la compresión en una máquina de formación de comprimidos

convencional.

A continuación, los núcleos de los comprimidos se recubrieron con película con una suspensión acuosa de azul Opadry* (* marca registrada de Colorcon para una gama de materiales de recubrimiento pelicular).

Ejemplo de formulación 3: Preparación de comprimidos de LMTM mediante granulación en seco (precompresión)

Los comprimidos que tienen las siguientes composiciones se prepararon por un método adicional de granulación en seco:

Ingrediente	Concentración del comprimido (LMT mg/comprimido)				
	50	75	100	125	150
LMTM	84,43	126,65	168,86	211,08	253,29
Manitol secado por pulverización	344,57	302,35	290,14	392,92	425,71
Celulosa microcristalina (Avicel PH102 o PH112)	50,00	75,00	95,00	125,00	150,00
Crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Estearato de magnesio	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Peso total del núcleo del comprimido	500,00	525,00	575,00	750,00	850,00

El LMTM y los excipientes se mezclaron en un mezclador de tambor, y después se comprimieron para producir lingotes (comprimidos simples de superficies planas) usando una máquina de formación de comprimidos.

Los lingotes se molieron después usando un granulador oscilante equipado con un tamiz de malla 20.

En este ejemplo, se utilizó la mitad de estearato de magnesio antes de la precompresión y la mitad del estearato de magnesio se añadió después a la granulación y se mezcló antes de la compresión en una máquina de formación de comprimidos convencional.

A continuación, los núcleos de los comprimidos se recubrieron con película con una suspensión acuosa de azul Opadry* (* marca registrada de Colorcon para una gama de materiales de recubrimiento pelicular).

Ejemplo de formulación 4: Preparación de comprimidos de LMTM por granulación en húmedo de excipientes e incorporación de LMTM extragranular

Los comprimidos que tienen las siguientes composiciones se prepararon por un método de granulación en húmedo:

Ingrediente	Concentración del comprimido (LMT mg/comprimido)				
	50	75	100	125	150
LMTM	84,43	126,65	168,86	211,08	253,29
Manitol	334,57	292,35	280,14	380,92	413,71
Celulosa microcristalina (Avicel PH102)	50,00	75,00	95,00	125,00	150,00
Crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada)	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Polivinilpirrolidona	10,00	10,00	10,00	12,00	12,00
Estearato de magnesio	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Peso total del núcleo del comprimido	500,00	525,00	575,00	750,00	850,00

El manitol, la crospovidona (un tercio del total) y la celulosa microcristalina se mezclaron en un mezclador de tambor. A continuación, el material mezclado se granuló con una solución de PVP en agua. La masa húmeda se secó en un secador de lecho fluido y después se molió utilizando un granulador oscilante equipado con un tamiz adecuado.

A continuación, el material molido se mezcló con el resto de la crospovidona y el estearato de magnesio, y el LMTM, antes de la compresión en una máquina de formación de comprimidos convencional. A continuación, los núcleos de los comprimidos se recubrieron con película con una suspensión acuosa de azul Opadry* (* marca registrada de Colorcon para una gama de materiales de recubrimiento pelicular).

Ejemplo de formulación 5: Preparación de cápsulas de LMTM

Se prepararon cápsulas con las siguientes composiciones.

	Concentración de la cápsula (LMT mg/cápsula)					
	50	75	100	125	150	200
Ingrediente	mg/cápsula					
LMTM	84,43	126,65	168,86	211,08	253,29	337,72
Manitol secado por pulverización	191,07	148,85	116,64	79,42	42,21	37,78
Crospovidona (polivinilpirrolidona reticulada)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Estearato de magnesio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Peso total del relleno de la cápsula	280,00	280,00	290,00	295,00	300,00	380,00

5 El LMTM y los excipientes se mezclaron en un mezclador de tambor. Las mezclas de fármacos resultantes se cargaron en cápsulas (formulaciones de 50, 75, 100, 125 y 150 mg en cápsulas de tamaño 1 y la formulación de 200 mg en cápsulas de tamaño 0) utilizando una máquina de llenado de cápsulas. Se prepararon cápsulas de gelatina y cápsulas de HPMC.

10 Ejemplo de formulación 6: Resultados del ensayo de estabilidad de comprimidos de LMTM de 75 mg recubiertos con película

Prueba	Punto de tiempo (meses)	Localización de almacenamiento	
		25 °C/HR del 60%	40 °C/HR del 75%
Ensayo como % de base sin LMT	0	102,2	102,2
	1	101,5	94,8
	3	100,0	94,2
	6	96,4	no realizado
	9	95,6	no realizado
	12	96,0	no realizado

Ejemplo de formulación 7: Resultados del ensayo de estabilidad de comprimidos de LMTM de 100 mg recubiertos con película

Prueba	Punto de tiempo (meses)	Localización de almacenamiento	
		25 °C/HR del 60%	40 °C/HR del 75%
Ensayo como % de base sin LMT	0	101,0	101,0
	1	96,7	93,7
	3	95,9	92,8
	6	96,0	94,2
	9	97,1	no realizado
	12	96,8	no realizado

15 Ejemplo de formulación 8: Resultados del ensayo de estabilidad de comprimidos de 75 mg de LMTM recubiertos con película

Prueba	Punto de tiempo (meses)	Localización de almacenamiento	
		25 °C/HR del 60%	40 °C/HR del 75%
% de MT formado	0	2,16	2,06
	1	2,05	3,79
	3	2,19	4,51
	6	2,83	5,71
	9	3,53	no realizado
	12	3,28	no realizado

20 Ejemplo de formulación 9: Resultados del ensayo de estabilidad de comprimidos de LMTM de 100 mg recubiertos con película

Prueba	Punto de tiempo (meses)	Localización de almacenamiento	
		25 °C/HR del 60%	40 °C/HR del 75%
% de MT formado	0	2,07	2,07
	1	1,78	3,27
	3	1,81	4,92
	6	2,51	5,07

ES 2 594 703 T3

	9	2,72	
	12	2,88	

Ejemplo de formulación 10: Comprimidos de LMTB de 100 mg recubiertos con película

Material	mg/comprimido (como LMT)	mg/comprimido (como LMTM)	% (solo el núcleo)
<i>Núcleo del comprimido</i>			
LMTB (número de lote 0802100070)	100,00	163,03	32,61
Manitol secado por pulverización (Pearlitol 200 SD)	329,00	265,97	53,19
Celulosa microcristalina	50,00	50,00	10,00
Crospovidona	15,00	15,00	3,00
Estearato de magnesio	6,00	6,00	1,20
Total el núcleo del comprimido	500,00	500,00	100,00
<i>Recubrimiento pelicular</i>			
Alcohol polivinílico (parte hidrolizado)	8,80	8,80	
Talco	4,00	4,00	
Dióxido de titanio	3,10	3,10	
Macrogol PEG 3350	2,47	2,47	
Lecitina (soja)	0,70	0,70	
Amarillo de óxido de hierro	0,47	0,47	
Laca de aluminio carmín índigo	0,45	0,45	
Total de comprimido recubierto con película	520,00	520,00	
Fabricante	Piramal, Morpeth, RU		
Número de lote del núcleo del comprimido	A02581		
Fecha de fabricación	15 de octubre de 2009		

- 5 Los comprimidos que tienen la formulación anterior se prepararon mediante un método de compresión directa como se ha descrito anteriormente y después se recubrieron con película (véase el ejemplo de formulación 1).

Ejemplo de formulación 11: Comprimidos de de 75 mg de LMTM recubiertos con película

Material	mg/comprimido (teóricos)	mg/comprimido (reales)	% (solo el núcleo)
<i>Núcleo del comprimido</i>			
LMTM (números de lote 800225510 y 80224450)	75,00	126,80	24,15
Manitol secado por pulverización (Pearlitol 200 SD)	354,00	302,20	57,56
Celulosa microcristalina	75,00	75,00	14,29
Crospovidona	15,00	15,00	2,86
Estearato de magnesio	6,00	6,00	1,14
Total el núcleo del comprimido	525,00	525,00	100,00
<i>Recubrimiento pelicular</i>			
Alcohol polivinílico (parte hidrolizado)	13,86	13,86	
Talco	6,30	6,30	
Dióxido de titanio	4,89	4,89	
Macrogol PEG 3350	3,89	3,89	
Lecitina (soja)	1,10	1,10	
Amarillo de óxido de hierro	0,75	0,75	
Laca de aluminio carmín índigo	0,71	0,71	
Total de comprimido recubierto con película	556,5	556,5	
Fabricante	Piramal, Morpeth, RU		
Número de lote del núcleo del comprimido	A04827		
Fecha de fabricación	5 de agosto de 2010		

- 10 Los comprimidos que tienen la formulación anterior se prepararon mediante un método de compresión directa como se ha descrito anteriormente y después se recubrieron con película (véase el ejemplo de formulación 1).

Ejemplo de formulación 12 - Estudios de disolución

5 Los comprimidos de LMTB recubiertos con película (3 x 100 mg) y los comprimidos de LMTM (4 x 75 mg), preparados como en los ejemplos de formulación 10 y 11, se agitaron (véase la figura 19) a una velocidad de las paletas de 50 rpm y se evaluó la velocidad de disolución usando un método estándar de la Farmacopea (USP 34) y las condiciones especificadas a continuación.

Condiciones del instrumento	
Parámetro	Condición
Medio	HCl 0,1M (desgasificado con purga con He)
Volumen del medio	1.000 ml, 6 vasos
Oxígeno disuelto	< 3,00 ppm
Temperatura del baño	37 °C ± 0,5 °C
Paletas	Recubiertas con teflón
Velocidad de las paletas	50 rpm
Volumen de extracción	10 ml – sin sustitución del medio
Filtro	HDPE 10 µm
Puntos de tiempo	10, 15, 20, 30 y 45 min
Vasos	6 (protegidos de la luz)
λ _{máx} de LMT	255 nm
Concentración de trabajo de la muestra (µg/ml)	aprox., 5 µg/ml (como base libre) de LMT
Concentración de trabajo estándar (µg/ml)	aprox., 5 µg/ml (como base libre) de LMT
(Q = 75 % a 45 minutos. Para S1, 6 de 6 comprimidos no menos de disolución de 80 % a 45 minutos).	

10 Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

LMTM (4 x 75mg; n.º de lote: A04827) Disolución (% disuelto):

Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
1	94	95	97	99
2	90	91	94	95
3	94	94	97	97
4	95	94	97	97
5	92	92	94	94
6	93	92	96	97
Media	93	93	96	97

LMTB (3 x 100 mg; n.º de lote: A02581) Disolución (% disuelto):

Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
1	91	95	96	96
2	96	100	99	99
3	95	98	98	99
4	93	95	96	96
5	96	98	99	100
6	98	102	102	102
Media	95	98	98	99

15 Los comprimidos que se habían almacenado durante períodos variables de tiempo, en condiciones normales (25 °C/ HR del 60 %) o en condiciones de “estrés” (40 °C/ HR del 75 %), también se analizaron utilizando el mismo método.

20 Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

LMTM (4 x 75 mg; n.º de lote: A04827) – disolución almacenada a 25 °C/ HR del 60 % (% disuelto):

Tiempo de almacenamiento	Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
1 mes	1	97	97	97	99
	2	96	98	101	101
	3	98	99	102	102
	4	95	97	98	100
	5	97	98	101	101
	6	98	98	100	101
	Media	97	98	100	101
	1	91	93	95	97
	2	92	95	96	96

ES 2 594 703 T3

3 meses	3	93	94	95	97
	4	92	93	96	96
	5	93	94	95	96
	6	90	91	94	95
	Media	92	93	95	96
6 meses	1	89	89	90	91
	2	91	90	93	94
	3	98	97	98	98
	4	97	97	99	99
	5	94	94	96	96
9 meses	6	88	90	93	93
	Media	93	93	95	95
	1	92	93	92	94
	2	90	94	95	97
	3	86	91	90	93
9 meses	4	85	91	96	94
	5	90	85	94	94
	6	92	96	94	96
	Media	89	92	93	94

LMTM (4 x 75mg; n.º de lote: A048271) – disolución almacenada a 40 °C/ HR del 75 % (% disuelto):

Tiempo de almacenamiento	Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
1 mes	1	94	95	97	98
	2	94	96	96	97
	3	94	96	94	96
	4	94	95	95	95
	5	100	102	103	101
	6	93	94	96	97
	Media	95	96	97	97
3 meses	1	92	93	95	96
	2	93	94	95	97
	3	89	91	92	92
	4	89	89	89	91
	5	93	95	96	97
	6	93	95	98	97
	Media	91	93	94	95
6 meses	1	69	84	92	94
	2	93	94	97	91
	3	64	85	92	94
	4	74	89	92	94
	5	91	95	95	96
	6	73	90	93	94
	Media	77	89	94	94

LMTB (3 x 100 mg; n.º de lote: A02581) – disolución almacenada a 25 °C/ HR del 60 % (% disuelto):

Tiempo de almacenamiento	Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
3 semanas	1	96	98	98	98
	2	94	97	97	98
	3	94	97	97	97
	4	98	100	101	101
	5	92	94	95	95
	6	92	95	97	97
	Media	94	97	98	98
3 meses	1	89	92	92	92
	2	89	92	93	92
	3	93	96	96	96
	4	95	98	99	98
	5	95	96	96	96
	6	96	99	98	97
	Media	93	96	96	95
6 meses	1	96	97	96	97
	2	95	101	100	101
	3	95	97	96	97
	4	95	95	95	96

ES 2 594 703 T3

	5	96	98	99	99
	6	95	94	94	96
	Media	95	97	97	98
9 meses	1	87	91	93	91
	2	88	92	94	92
	3	90	93	91	92
	4	91	95	93	94
	5	91	93	93	92
	6	94	95	95	93
	Media	90	93	93	92
12 meses	1	92	97	98	97
	2	91	92	92	92
	3	95	96	95	96
	4	94	95	95	95
	5	89	89	89	89
	6	97	98	98	98
	Media	93	94	95	94

LMTB (3 x 100 mg; n.º de lote: A02581) – disolución almacenada a 40 °C/ HR del 75 % (% disuelto):

Tiempo de almacenamiento	Vaso	T = 10 min	T = 15 min	T = 30 min	T = 45 min
3 semanas	1	94	98	99	98
	2	96	100	100	101
	3	94	97	96	97
	4	94	98	98	98
	5	95	97	98	98
	6	95	97	98	97
	Media	95	98	98	98
3 meses	1	92	93	94	93
	2	93	97	97	97
	3	90	92	92	92
	4	84	89	94	94
	5	84	97	97	97
	6	93	94	93	94
	Media	89	94	95	95
6 meses	1	8	72	96	96
	2	48	82	95	96
	3	91	93	94	94
	4	94	98	98	99
	5	13	71	93	93
	6	74	87	92	93
	Media	55	84	95	95

Anexo – Datos cristalográficos

5

Datos cristalográficos para LMT.EDSA (Figura 17a):

Tabla 1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura para LMT.EDSA.	
Código de identificación	6408CM136
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₇ S ₃
Peso de la fórmula	493,62
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Dimensiones de la celda unidad	a = 18,2832(3) Å α = 90° b = 11,8667(3) Å β = 114,1990(10)° c = 10,9539(2) Å γ = 90°
Volumen	2167,74(8) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1,519 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,389 mm ⁻¹

ES 2 594 703 T3

F(000)	1048
Tamaño del cristal	0,28x0,21x0,18 mm ³
Intervalo theta para recogida de datos	de 2,11 a 27,51°.
Intervalos del índice	-23<=h<=23,-15<=k<=15,-14<=l<=14
Reflexiones recogidas	25214
Reflexiones independientes	2487 [R(int) = 0,0486]
Cumplimiento de theta = 25,00°	99,9 %
Corrección de absorción	Semiempírica a partir de equivalentes
Transmisión máx. y mín.	0,9333 and 0,8989
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	2487 / 0 / 144
Bondad de ajuste en F ²	1,080
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0315, wR2 = 0,0906
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0336, wR2 = 0,0925
Mayor dif. entre pico y agujero	0,333 y -0,654 e.Å ⁻³

Tabla 2. Coordenadas atómicas (x 10⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalentes (A²x 10³) para LMT.EDSA. U (equiv.) se define como un tercio de la traza del tensor U^{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	U (equiv.)
S(1)	10000	2270(1)	12500	19(1)
S(2)	3802(1)	204(1)	9934(1)	11(1)
N(1)	10000	-370(1)	12500	18(1)
N(2)	7750(1)	1619(1)	7782(1)	12(1)
O(1)	3943(1)	-435(1)	11137(1)	18(1)
O(2)	3830(1)	1425(1)	10131(1)	17(1)
O(3)	3063(1)	-144(1)	8793(1)	15(1)
C(1)	9411(1)	1332(1)	11218(1)	13(1)
C(2)	9493(1)	154(1)	11332(1)	14(1)
C(3)	9040(1)	-512(1)	10228(1)	16(1)
C(4)	8481(1)	-30(1)	9061(1)	16(1)
C(5)	8383(1)	1126(1)	8996(1)	13(1)
C(6)	8852(1)	1814(1)	10051(1)	13(1)
C(8)	7127(1)	2225(1)	8087(1)	16(1)
C(9)	8070(1)	2352(1)	7003(1)	17(1)
C(10)	4593(1)	-141(1)	9448(1)	13(1)
O(1S)	5000	2293(1)	2500	24(1)

5

Tabla 3. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para LMT.EDSA.

S(1)-C(1)	1,7696(13)
S(1)-C(1)n.º 1	1,7696(13)
S(2)-O(1)	1,4488(10)
S(2)-O(2)	1,4629(10)
S(2)-O(3)	1,4747(10)
S(2)-C(10)	1,7802(13)
N(1)-C(2)	1,3826(15)
N(1)-C(2)n.º 1	1,3826(15)
N(1)-H(1)	0,8800
N(2)-C(5)	1,4785(16)
N(2)-C(9)	1,4959(17)
N(2)-C(8)	1,4970(17)
N(2)-H(2)	0,9300
C(1)-C(6)	1,3913(17)
C(1)-C(2)	1,4049(18)
C(2)-C(3)	1,3972(19)
C(3)-C(4)	1,3908(19)
C(3)-H(3)	0,9500
C(4)-C(5)	1,3804(19)
C(4)-H(4)	0,9500
C(5)-C(6)	1,3881(18)
C(6)-H(6)	0,9500
C(8)-H(8A)	0,9800

ES 2 594 703 T3

C(8)-H(8B)	0,9800
C(8)-H(8C)	0,9800
C(9)-H(9A)	0,9800
C(9)-H(9B)	0,9800
C(9)-H(9C)	0,9800
C(10)-C(10)n.º 2	1,522(2)
C(10)-H(10A)	0,9900
C(10)-H(10B)	0,9900
O(1S)-H(1O1)	0,7486
O(1S)-H(2O1)	0,9717
C(1)-S(1)-C(1)n.º 1	102,05(9)
O(1)-S(2)-O(2)	113,66(6)
O(1)-S(2)-O(3)	112,60(6)
O(2)-S(2)-O(3)	111,52(6)
O(1)-S(2)-C(10)	106,77(6)
O(2)-S(2)-C(10)	106,71(6)
O(3)-S(2)-C(10)	104,89(6)
C(2)-N(1)-C(2)n.º 1	126,50(17)
C(2)-N(1)-H(1)	116,7
C(2)n.º 1-N(1)-H(1)	116,7
C(5)-N(2)-C(9)	113,51(10)
C(5)-N(2)-C(8)	112,13(10)
C(9)-N(2)-C(8)	111,06(11)
C(5)-N(2)-H(2)	106,5
C(9)-N(2)-H(2)	106,5
C(8)-N(2)-H(2)	106,5
C(6)-C(1)-C(2)	120,17(12)
C(6)-C(1)-S(1)	116,69(10)
C(2)-C(1)-S(1)	123,14(10)
N(1)-C(2)-C(3)	118,76(13)
N(1)-C(2)-C(1)	122,44(13)
C(3)-C(2)-C(1)	118,79(12)
C(4)-C(3)-C(2)	120,95(13)
C(4)-C(3)-H(3)	119,5
C(2)-C(3)-H(3)	119,5
C(5)-C(4)-C(3)	119,15(13)
C(5)-C(4)-H(4)	120,4
C(3)-C(4)-H(4)	120,4
C(4)-C(5)-C(6)	121,24(12)
C(4)-C(5)-N(2)	118,50(12)
C(6)-C(5)-N(2)	120,25(12)
C(5)-C(6)-C(1)	119,54(12)
C(5)-C(6)-H(6)	120,2
C(1)-C(6)-H(6)	120,2
N(2)-C(8)-H(8A)	109,5
N(2)-C(8)-H(8B)	109,5
H(8A)-C(8)-H(8B)	109,5
N(2)-C(8)-H(8C)	109,5
H(8A)-C(8)-H(8C)	109,5
H(8B)-C(8)-H(8C)	109,5
N(2)-C(9)-H(9A)	109,5
N(2)-C(9)-H(9B)	109,5
H(9A)-C(9)-H(9B)	109,5
N(2)-C(9)-H(9C)	109,5
H(9A)-C(9)-H(9C)	109,5
H(9B)-C(9)-H(9C)	109,5
C(10)n.º 2-C(10)-S(2)	111,21(12)
C(10)n.º 2-C(10)-H(10A)	109,4
S(2)-C(10)-H(10A)	109,4
C(10)n.º 2-C(10)-H(10B)	109,4
S(2)-C(10)-H(10B)	109,4
H(10A)-C(10)-H(10B)	108,0
H(1O1)-O(1S)-H(2O1)	100,8

Transformaciones simétricas usadas para generar átomos equivalentes: n.º 1
 $-x+2, y, -z+5/2$ n.º 2 $-x+1, -y, -z+2$

Tabla 4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para LMT.EDSA. El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2p^2[h^2 a^* U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
S(1)	20(1)	10(1)	14(1)	0	-6(1)	0
S(2)	10(1)	12(1)	9(1)	0(1)	2(1)	0(1)
N(1)	22(1)	9(1)	14(1)	0	-3(1)	0
N(2)	12(1)	13(1)	9(1)	0(1)	2(1)	-1(1)
O(1)	16(1)	22(1)	13(1)	5(1)	5(1)	0(1)
O(2)	17(1)	13(1)	17(1)	-2(1)	4(1)	0(1)
O(3)	11(1)	16(1)	13(1)	-1(1)	0(1)	-1(1)
C(1)	12(1)	13(1)	11(1)	-1(1)	2(1)	-2(1)
C(2)	12(1)	13(1)	13(1)	0(1)	2(1)	0(1)
C(3)	19(1)	11(1)	14(1)	-2(1)	3(1)	-1(1)
C(4)	16(1)	15(1)	12(1)	-2(1)	2(1)	-1(1)
C(5)	12(1)	15(1)	10(1)	1(1)	2(1)	0(1)
C(6)	13(1)	12(1)	12(1)	0(1)	4(1)	0(1)
C(8)	13(1)	18(1)	15(1)	1(1)	5(1)	1(1)
C(9)	18(1)	22(1)	12(1)	2(1)	6(1)	-2(1)
C(10)	11(1)	17(1)	10(1)	-2(1)	3(1)	-1(1)
O(1S)	25(1)	14(1)	18(1)	0	-7(1)	0

Tabla 5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para LMT.EDSA.

	x	y	z	U (equiv.)
H(1)	10000	-1111	12500	22
H(2)	7492	1019	7227	15
H(3)	9114	-1305	10275	19
H(4)	8171	-489	8319	19
H(6)	8791	2610	9978	15
H(8A)	6937	1734	8616	23
H(8B)	6675	2426	7248	23
H(8C)	7359	2911	8596	23
H(9A)	8321	3023	7531	26
H(9B)	7629	2582	6164	26
H(9C)	8469	1933	6802	26
H(10A)	4571	-955	9239	16
H(10B)	4521	284	8628	16
H(1O1)	5146	2050	3190	29
H(2O1)	4556	1790	2015	29

5

Datos cristalográficos para LMT.2EsOH (Figura 17b)

Tabla 1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura para LMT.2EsOH.

Código de identificación	6408cm173c_0m
Fórmula empírica	$C_{20}H_{31}N_3O_6S_3$
Peso de la fórmula	505,66
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Dimensiones de la celda unidad	a = 40,8384(12) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 25,2658(7) Å $\beta = 115,4540(10)^\circ$ c = 20,3833(6) Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	18990,2(9) Å ³
Z	32
Densidad (calculada)	1,415 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,354 mm ⁻¹
F(000)	8576
Tamaño del cristal	0,32 x 0,24 x 0,18 mm ³
Intervalo theta para recogida de datos	0,98 a 25,00°
Intervalos del índice	-48<=h<=48, -29<=k<=30, -24<=l<=23
Reflexiones recogidas	108984
Reflexiones independientes	16707 [R(int) = 0,0912]
Cumplimiento de theta = 25,00°	99,9 %
Corrección de absorción	Semiempírica a partir de equivalentes
Transmisión máx. y mín.	0,9391 y 0,8952

ES 2 594 703 T3

Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	16707 / 25 / 1205
Bondad de ajuste en F ²	1,085
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0628, wR2 = 0,1638
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0986, wR2 = 0,1918
Mayor dif. entre pico y agujero	2,683 y -0,811 e.Å ⁻³

Tabla 2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para LMT.2EsOH. U (equiv.) se define como un tercio de la traza del tensor U^{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	U (equiv.)
S(1A)	256(1)	3950(1)	1866(1)	69(1)
N(1A)	-401(1)	3176(1)	1220(2)	29(1)
N(2A)	980(1)	2230(1)	2700(2)	25(1)
N(3A)	-743(1)	5348(1)	744(2)	25(1)
C(1A)	-207(1)	4102(2)	1408(3)	33(1)
C(2A)	-297(1)	4633(2)	1295(3)	32(1)
C(3A)	-652(1)	4786(2)	916(2)	24(1)
C(4A)	-926(1)	4413(2)	664(2)	27(1)
C(5A)	-836(1)	3880(2)	784(3)	28(1)
C(6A)	-479(1)	3714(2)	1142(2)	25(1)
C(7A)	-60(1)	2948(2)	1584(2)	25(1)
C(8A)	-27(1)	2402(2)	1631(2)	24(1)
C(9A)	308(1)	2154(2)	1988(2)	25(1)
C(10A)	614(1)	2468(2)	2318(2)	24(1)
C(11A)	588(1)	3011(2)	2281(3)	29(1)
C(12A)	254(1)	3255(2)	1917(3)	32(1)
C(13A)	1017(1)	1896(2)	3334(3)	36(1)
C(14A)	1092(1)	1933(2)	2196(3)	41(1)
C(15A)	-662(2)	5526(2)	130(3)	50(2)
C(16A)	-570(1)	5712(2)	1375(3)	33(1)
S(1B)	2816(1)	1091(1)	1548(1)	26(1)
N(1B)	2213(1)	258(1)	1144(2)	21(1)
N(2B)	3639(1)	-517(1)	2667(2)	27(1)
N(3B)	1743(1)	2378(1)	956(2)	22(1)
C(1 B)	2355(1)	1198(2)	1329(2)	19(1)
C(2B)	2237(1)	1719(2)	1291(2)	22(1)
C(3B)	1873(1)	1825(2)	1032(2)	21(1)
C(4B)	1620(1)	1417(2)	832(2)	22(1)
C(5B)	1738(1)	896(2)	890(2)	21(1)
C(6B)	2104(1)	778(2)	1128(2)	21(1)
C(7B)	2566(1)	73(2)	1537(2)	22(1)
C(8B)	2628(1)	-468(2)	1684(2)	23(1)
C(9B)	2974(1)	-666(2)	2055(2)	24(1)
C(10B)	3263(1)	-320(2)	2304(2)	24(1)
C(11B)	3213(1)	220(2)	2178(2)	23(1)
C(12B)	2866(1)	417(2)	1788(2)	22(1)
C(13B)	3693(2)	-973(2)	3183(3)	38(1)
C(14B)	3785(1)	-651(2)	2126(2)	29(1)
C(15B)	1835(1)	2684(2)	426(3)	34(1)
C(16B)	1872(1)	2660(2)	1668(3)	35(1)
S(1C)	5390(1)	3672(1)	1826(1)	25(1)
N(1C)	4792(1)	2826(1)	1436(2)	25(1)
N(2C)	6224(1)	2099(1)	3029(2)	20(1)
N(3C)	4310(1)	4945(1)	1101(2)	26(1)
C(1C)	4925(1)	3774(2)	1581(2)	20(1)
C(2C)	4803(1)	4289(2)	1510(2)	21(1)
C(3C)	4436(1)	4388(2)	1235(2)	21(1)
C(4C)	4184(1)	3984(2)	1037(2)	25(1)
C(5C)	4307(1)	3464(2)	1126(2)	23(1)
C(6C)	4676(1)	3350(2)	1388(2)	21(1)
C(7C)	5145(1)	2651(2)	1833(2)	22(1)
C(8C)	5213(1)	2113(2)	1990(2)	22(1)
C(9C)	5559(1)	1925(2)	2384(2)	21(1)
C(10C)	5847(1)	2278(2)	2639(2)	20(1)
C(11C)	5788(1)	2813(2)	2493(2)	21(1)
C(12C)	5443(1)	3002(2)	2087(2)	20(1)

ES 2 594 703 T3

C(13C)	6374(1)	1945(2)	2499(2)	26(1)
C(14C)	6284(1)	1670(2)	3576(2)	24(1)
C(15C)	4375(2)	5182(2)	496(3)	47(1)
C(16C)	4468(2)	5280(2)	1771(3)	47(2)
S(1D)	7907(1)	1349(1)	2060(1)	32(1)
N(1D)	7269(1)	547(1)	1633(2)	29(1)
N(2D)	8670(1)	-331(2)	2894(2)	28(1)
N(3D)	6848(1)	2694(1)	1136(2)	27(1)
C(1 D)	7440(1)	1484(2)	1723(2)	25(1)
C(2D)	7333(1)	2011(2)	1602(2)	27(1)
C(3D)	6969(1)	2136(2)	1304(2)	26(1)
C(4D)	6709(1)	1744(2)	1117(3)	32(1)
C(5D)	6818(1)	1220(2)	1238(3)	32(1)
C(6D)	7179(1)	1080(2)	1536(2)	24(1)
C(TD)	7614(1)	338(2)	1971(2)	22(1)
C(8D)	7660(1)	-209(2)	2063(2)	24(1)
C(9D)	8001(1)	-439(2)	2370(2)	25(1)
C(10D)	8302(1)	-111(2)	2608(2)	24(1)
C(11 D)	8268(1)	437(2)	2537(2)	26(1)
C(12D)	7925(1)	662(2)	2212(2)	23(1)
C(13D)	8743(1)	-762(2)	3435(3)	43(1)
C(14D)	8764(1)	-504(2)	2294(3)	31(1)
C(15D)	6807(2)	2848(2)	397(3)	41(1)
C(16D)	7078(1)	3086(2)	1700(3)	36(1)
S(2)	525(1)	500(1)	1331(1)	35(1)
S(3)	827(1)	2850(1)	152(1)	25(1)
S(4)	1743(1)	4426(1)	389(1)	29(1)
S(5)	3048(1)	3051(1)	1414(1)	30(1)
S(6)	5663(1)	497(1)	1723(1)	33(1)
S(T)	5874(1)	2562(1)	455(1)	34(1)
S(8)	8160(1)	2896(1)	1391(1)	23(1)
S(9)	8481(1)	615(1)	291(1)	26(1)
O(1)	619(4)	884(5)	1948(7)	56(2)
O(2)	392(10)	52(10)	1452(19)	70(6)
O(3)	886(4)	594(6)	1706(8)	55(2)
O(1')	342(2)	769(3)	1689(4)	61(2)
O(2')	419(6)	-77(6)	1226(11)	70(5)
O(3')	893(2)	480(4)	1357(5)	58(2)
O(4)	1009(1)	2335(1)	358(2)	35(1)
O(5)	1031(1)	3269(1)	635(2)	41(1)
O(6)	718(1)	2970(1)	-613(2)	27(1)
O(7)	1911(1)	3966(1)	826(2)	45(1)
O(8)	1422(1)	4299(1)	-282(2)	45(1)
O(9)	1667(1)	4851(1)	790(2)	30(1)
O(10)	3321(1)	2861(1)	1185(2)	41(1)
O(11)	2835(1)	2637(2)	1525(3)	68(1)
O(12)	3217(1)	3392(1)	2047(2)	46(1)
O(13)	5318(1)	542(2)	1772(2)	56(1)
O(14)	5728(1)	-26(1)	1506(2)	60(1)
O(15)	5964(1)	678(1)	2388(2)	42(1)
O(16)	5932(1)	2520(1)	-212(2)	32(1)
O(17)	5774(1)	2071(2)	681(2)	57(1)
O(18)	6182(1)	2836(1)	1038(2)	39(1)
O(19)	8126(1)	2360(1)	1113(2)	31(1)
O(20)	8540(1)	3032(1)	1876(2)	35(1)
O(21)	7918(1)	3019(1)	1720(2)	31(1)
O(22)	8264(1)	640(1)	-494(2)	26(1)
O(23)	8590(1)	62(1)	534(2)	31(1)
O(24)	8786(1)	983(1)	553(2)	33(1)
C(1S)	298(2)	782(2)	463(4)	62(2)
C(2S)	387(2)	1337(2)	396(3)	45(1)
C(3S)	2064(1)	4682(2)	95(3)	30(1)
C(4S)	1928(1)	5196(2)	-337(3)	39(1)
C(5S)	2748(1)	3452(2)	689(3)	37(1)
C(6S)	2934(1)	3925(2)	551(3)	32(1)
C(7S)	5504(1)	2984(2)	239(3)	39(1)

ES 2 594 703 T3

C(8S)	5570(2)	3516(2)	-63(4)	54(2)
C(9S)	5626(2)	921(2)	1016(3)	38(1)
C(10S)	5990(3)	881(4)	989(5)	100(3)
C(11S)	8047(1)	3340(2)	650(3)	28(1)
C(12S)	7648(1)	3320(2)	118(3)	38(1)
C(13S)	8200(1)	808(2)	708(3)	27(1)
C(14S)	7876(1)	454(2)	490(3)	34(1)
C(15S)	414(1)	2769(2)	254(3)	36(1)
C(16S)	186(2)	3261(2)	66(3)	49(2)

Tabla 3. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para LMT.2EsOH.

S(1A)-C(1A)	1,756(5)
S(1A)-C(12A)	1,759(5)
N(1A)-C(7A)	1,390(6)
N(1A)-C(6A)	1,389(6)
N(1A)-H(1AA)	0,8800
N(2A)-C(10A)	1,485(5)
N(2A)-C(14A)	1,492(6)
N(2A)-C(13A)	1,495(6)
N(2A)-H(2AA)	0,9300
N(3A)-C(3A)	1,474(5)
N(3A)-C(16A)	1,489(6)
N(3A)-C(15A)	1,494(6)
N(3A)-H(3A)	0,9300
C(1A)-C(2A)	1,384(6)
C(1A)-C(6A)	1,404(6)
C(2A)-C(3A)	1,371(6)
C(2A)-H(2A)	0,9500
C(3A)-C(4A)	1,384(6)
C(4A)-C(5A)	1,389(6)
C(4A)-H(4A)	0,9500
C(5A)-C(6A)	1,384(6)
C(5A)-H(5A)	0,9500
C(7A)-C(8A)	1,387(6)
C(7A)-C(12A)	1,399(6)
C(8A)-C(9A)	1,391(6)
C(8A)-H(8A)	0,9500
C(9A)-C(10A)	1,384(6)
C(9A)-H(9A)	0,9500
C(10A)-C(11A)	1,376(6)
C(11A)-C(12A)	1,388(6)
C(11A)-H(11A)	0,9500
C(13A)-H(13A)	0,9800
C(13A)-H(13B)	0,9800
C(13A)-H(13C)	0,9800
C(14A)-H(14A)	0,9800
C(14A)-H(14B)	0,9800
C(14A)-H(14C)	0,9800
C(15A)-H(15A)	0,9800
C(15A)-H(15B)	0,9800
C(15A)-H(15C)	0,9800
C(16A)-H(16A)	0,9800
C(16A)-H(16B)	0,9800
C(16A)-H(16C)	0,9800
S(1B)-C(12B)	1,761(4)
S(1B)-C(1B)	1,762(4)
N(1B)-C(6B)	1,385(5)
N(1B)-C(7B)	1,392(6)
N(1B)-H(1B)	0,8800
N(2B)-C(10B)	1,474(6)
N(2B)-C(14B)	1,502(6)
N(2B)-C(13B)	1,512(6)
N(2B)-H(2BB)	0,9300
N(3B)-C(3B)	1,479(5)
N(3B)-C(16B)	1,496(6)
N(3B)-C(15B)	1,501(6)

ES 2 594 703 T3

N(3B)-H(3B)	0,9300
C(1B)-C(2B)	1,392(6)
C(1B)-C(6B)	1,410(6)
C(2B)-C(3B)	1,372(6)
C(2B)-H(2B)	0,9500
C(3B)-C(4B)	1,391(6)
C(4B)-C(5B)	1,391(6)
C(4B)-H(4B)	0,9500
C(5B)-C(6B)	1,389(6)
C(5B)-H(5B)	0,9500
C(7B)-C(8B)	1,399(6)
C(7B)-C(12B)	1,406(6)
C(8B)-C(9B)	1,377(6)
C(8B)-H(8B)	0,9500
C(9B)-C(10B)	1,381(6)
C(9B)-H(9B)	0,9500
C(10B)-C(11B)	1,384(6)
C(11B)-C(12B)	1,388(6)
C(11B)-H(11B)	0,9500
C(13B)-H(13D)	0,9800
C(13B)-H(13E)	0,9800
C(13B)-H(13F)	0,9800
C(14B)-H(14D)	0,9800
C(14B)-H(14E)	0,9800
C(14B)-H(14F)	0,9800
C(15B)-H(15D)	0,9800
C(15B)-H(15E)	0,9800
C(15B)-H(15F)	0,9800
C(16B)-H(16D)	0,9800
C(16B)-H(16E)	0,9800
C(16B)-H(16F)	0,9800
S(1C)-C(12C)	1,760(4)
S(1C)-C(1C)	1,765(4)
N(1C)-C(7C)	1,387(5)
N(1C)-C(6C)	1,395(5)
N(1C)-H(1C)	0,8800
N(2C)-C(10C)	1,469(5)
N(2C)-C(14C)	1,498(5)
N(2C)-C(13C)	1,503(5)
N(2C)-H(2CC)	0,9300
N(3C)-C(3C)	1,482(5)
N(3C)-C(15C)	1,494(6)
N(3C)-C(16C)	1,497(6)
N(3C)-H(3C)	0,9300
C(1C)-C(2C)	1,377(6)
C(1C)-C(6C)	1,411(6)
C(2C)-C(3C)	1,380(6)
C(2C)-H(2C)	0,9500
C(3C)-C(4C)	1,381(6)
C(4C)-C(5C)	1,390(6)
C(4C)-H(4C)	0,9500
C(5C)-C(6C)	1,397(6)
C(5C)-H(5C)	0,9500
C(7C)-C(8C)	1,397(6)
C(7C)-C(12C)	1,413(6)
C(8C)-C(9C)	1,378(6)
C(8C)-H(8C)	0,9500
C(9C)-C(10C)	1,386(6)
C(9C)-H(9C)	0,9500
C(10C)-C(11C)	1,384(6)
C(11C)-C(12C)	1,377(6)
C(11C)-H(11C)	0,9500
C(13C)-H(13G)	0,9800
C(13C)-H(13H)	0,9800
C(13C)-H(13I)	0,9800
C(14C)-H(14G)	0,9800

ES 2 594 703 T3

C(14C)-H(14H)	0,9800
C(14C)-H(14I)	0,9800
C(15C)-H(15G)	0,9800
C(15C)-H(15H)	0,9800
C(15C)-H(15I)	0,9800
C(16C)-H(16G)	0,9800
C(16C)-H(16H)	0,9800
C(16C)-H(16I)	0,9800
S(1D)-C(12D)	1,760(4)
S(1D)-C(1D)	1,761(5)
N(1D)-C(7D)	1,381(6)
N(1D)-C(6D)	1,389(6)
N(1D)-H(1D)	0,8800
N(2D)-C(10D)	1,471(6)
N(2D)-C(13D)	1,486(6)
N(2D)-C(14D)	1,495(6)
N(2D)-H(2D)	0,9300
N(3D)-C(3D)	1,483(6)
N(3D)-C(15D)	1,495(6)
N(3D)-C(16D)	1,504(6)
N(3D)-H(3D)	0,9300
C(1D)-C(2D)	1,389(6)
C(1D)-C(6D)	1,405(6)
C(2D)-C(3D)	1,379(6)
C(2D)-H(2DD)	0,9500
C(3D)-C(4D)	1,381(6)
C(4D)-C(5D)	1,385(7)
C(4D)-H(4D)	0,9500
C(5D)-C(6D)	1,377(6)
C(5D)-H(5D)	0,9500
C(7D)-C(8D)	1,394(6)
C(7D)-C(12D)	1,409(6)
C(8D)-C(9D)	1,385(6)
C(8D)-H(8D)	0,9500
C(9D)-C(10D)	1,384(6)
C(9D)-H(9D)	0,9500
C(10D)-C(11D)	1,391(6)
C(11D)-C(12D)	1,388(6)
C(11D)-H(11D)	0,9500
C(13D)-H(13J)	0,9800
C(13D)-H(13K)	0,9800
C(13D)-H(13L)	0,9800
C(14D)-H(14J)	0,9800
C(14D)-H(14K)	0,9800
C(14D)-H(14L)	0,9800
C(15D)-H(15J)	0,9800
C(15D)-H(15K)	0,9800
C(15D)-H(15L)	0,9800
C(16D)-H(16J)	0,9800
C(16D)-H(16K)	0,9800
C(16D)-H(16L)	0,9800
S(2)-O(2)	1,32(3)
S(2)-O(3)	1,359(16)
S(2)-O(1')	1,423(7)
S(2)-O(3')	1,481(8)
S(2)-O(2')	1,510(16)
S(2)-O(1)	1,503(13)
S(2)-C(1S)	1,756(6)
S(3)-O(5)	1,442(3)
S(3)-O(6)	1,459(3)
S(3)-O(4)	1,469(3)
S(3)-C(15S)	1,795(5)
S(4)-O(7)	1,446(4)
S(4)-O(9)	1,461(3)
S(4)-O(8)	1,466(3)
S(4)-C(3S)	1,779(5)

S(5)-O(11)	1,438(4)
S(5)-O(12)	1,456(4)
S(5)-O(10)	1,463(3)
S(5)-C(5S)	1,775(5)
S(6)-O(14)	1,453(4)
S(6)-O(15)	1,456(4)
S(6)-O(13)	1,458(4)
S(6)-C(9S)	1,749(5)
S(7)-O(17)	1,442(4)
S(7)-O(18)	1,479(4)
S(7)-O(16)	1,482(3)
S(7)-C(7S)	1,744(5)
S(8)-O(21)	1,447(3)
S(8)-O(19)	1,452(3)
S(8)-O(20)	1,479(3)
S(8)-C(11S)	1,776(4)
S(9)-O(24)	1,458(3)
S(9)-O(22)	1,458(3)
S(9)-O(23)	1,486(3)
S(9)-C(13S)	1,765(5)
O(1)-O(3)	1,56(2)
C(1S)-C(2S)	1,470(8)
C(1S)-H(1S1)	0,9900
C(1S)-H(1S2)	0,9900
C(2S)-H(2S1)	0,9800
C(2S)-H(2S2)	0,9800
C(2S)-H(2S3)	0,9800
C(3S)-C(4S)	1,534(7)
C(3S)-H(3S1)	0,9900
C(3S)-H(3S2)	0,9900
C(4S)-H(4S1)	0,9800
C(4S)-H(4S2)	0,9800
C(4S)-H(4S3)	0,9800
C(5S)-C(6S)	1,506(7)
C(5S)-H(5S1)	0,9900
C(5S)-H(5S2)	0,9900
C(6S)-H(6S1)	0,9800
C(6S)-H(6S2)	0,9800
C(6S)-H(6S3)	0,9800
C(7S)-C(8S)	1,550(7)
C(7S)-H(7S1)	0,9900
C(7S)-H(7S2)	0,9900
C(8S)-H(8S1)	0,9800
C(8S)-H(8S2)	0,9800
C(8S)-H(8S3)	0,9800
C(9S)-C(10S)	1,511(10)
C(9S)-H(9S1)	0,9900
C(9S)-H(9S2)	0,9900
C(10S)-H(10A)	0,9800
C(10S)-H(10B)	0,9800
C(10S)-H(10C)	0,9800
C(11S)-C(12S)	1,522(7)
C(11S)-H(11E)	0,9900
C(11S)-H(11F)	0,9900
C(12S)-H(12A)	0,9800
C(12S)-H(12B)	0,9800
C(12S)-H(12C)	0,9800
C(13S)-C(14S)	1,498(6)
C(13S)-H(13M)	0,9900
C(13S)-H(13N)	0,9900
C(14S)-H(14M)	0,9800
C(14S)-H(14N)	0,9800
C(14S)-H(14O)	0,9800
C(15S)-C(16S)	1,500(7)
C(15S)-H(15M)	0,9900
C(15S)-H(15N)	0,9900

ES 2 594 703 T3

C(16S)-H(16M)	0,9800
C(16S)-H(16N)	0,9800
C(16S)-H(16O)	0,9800
C(1A)-S(1A)-C(12A)	102,6(2)
C(7A)-N(1A)-C(6A)	126,5(4)
C(7A)-N(1A)-H(1AA)	116,8
C(6A)-N(1A)-H(1AA)	116,8
C(10A)-N(2A)-C(14A)	112,3(4)
C(10A)-N(2A)-C(13A)	112,8(4)
C(14A)-N(2A)-C(13A)	111,3(4)
C(10A)-N(2A)-H(2AA)	106,7
C(14A)-N(2A)-H(2AA)	106,7
C(13A)-N(2A)-H(2AA)	106,7
C(3A)-N(3A)-C(16A)	114,4(3)
C(3A)-N(3A)-C(15A)	111,3(4)
C(16A)-N(3A)-C(15A)	110,1(4)
C(3A)-N(3A)-H(3A)	106,8
C(16A)-N(3A)-H(3A)	106,8
C(15A)-N(3A)-H(3A)	106,8
C(2A)-C(1A)-C(6A)	120,3(4)
C(2A)-C(1A)-S(1A)	116,7(3)
C(6A)-C(1A)-S(1A)	123,0(3)
C(3A)-C(2A)-C(1A)	120,4(4)
C(3A)-C(2A)-H(2A)	119,8
C(1A)-C(2A)-H(2A)	119,8
C(2A)-C(3A)-C(4A)	120,6(4)
C(2A)-C(3A)-N(3A)	120,2(4)
C(4A)-C(3A)-N(3A)	119,1(4)
C(3A)-C(4A)-C(5A)	118,8(4)
C(3A)-C(4A)-H(4A)	120,6
C(5A)-C(4A)-H(4A)	120,6
C(6A)-C(5A)-C(4A)	121,8(4)
C(6A)-C(5A)-H(5A)	119,1
C(4A)-C(5A)-H(5A)	119,1
C(5A)-C(6A)-N(1A)	119,7(4)
C(5A)-C(6A)-C(1A)	118,0(4)
N(1A)-C(6A)-C(1A)	122,3(4)
C(8A)-C(7A)-N(1A)	119,7(4)
C(8A)-C(7A)-C(12A)	118,4(4)
N(1A)-C(7A)-C(12A)	121,9(4)
C(7A)-C(8A)-C(9A)	121,9(4)
C(7A)-C(8A)-H(8A)	119,0
C(9A)-C(8A)-H(8A)	119,0
C(10A)-C(9A)-C(8A)	118,4(4)
C(10A)-C(9A)-H(9A)	120,8
C(8A)-C(9A)-H(9A)	120,8
C(11A)-C(10A)-C(9A)	120,9(4)
C(11A)-C(10A)-N(2A)	117,9(4)
C(9A)-C(10A)-N(2A)	121,2(4)
C(10A)-C(11A)-C(12A)	120,4(4)
C(10A)-C(11A)-H(11A)	119,8
C(12A)-C(11A)-H(11A)	119,8
C(11A)-C(12A)-C(7A)	119,9(4)
C(11A)-C(12A)-S(1A)	116,5(3)
C(7A)-C(12A)-S(1A)	123,5(3)
N(2A)-C(13A)-H(13A)	109,5
N(2A)-C(13A)-H(13B)	109,5
H(13A)-C(13A)-H(13B)	109,5
N(2A)-C(13A)-H(13C)	109,5
H(13A)-C(13A)-H(13C)	109,5
H(13B)-C(13A)-H(13C)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14A)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14B)	109,5
H(14A)-C(14A)-H(14B)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14C)	109,5
H(14A)-C(14A)-H(14C)	109,5

ES 2 594 703 T3

H(14B)-C(14A)-H(14C)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15A)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15B)	109,5
H(15A)-C(15A)-H(15B)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15C)	109,5
H(15A)-C(15A)-H(15C)	109,5
H(15B)-C(15A)-H(15C)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16A)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16B)	109,5
H(16A)-C(16A)-H(16B)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16C)	109,5
H(16A)-C(16A)-H(16C)	109,5
H(16B)-C(16A)-H(16C)	109,5
C(12B)-S(1B)-C(1B)	101,6(2)
C(6B)-N(1B)-C(7B)	125,1(4)
C(6B)-N(1B)-H(1B)	117,4
C(7B)-N(1B)-H(1B)	117,4
C(10B)-N(2B)-C(14B)	111,3(3)
C(10B)-N(2B)-C(13B)	114,6(4)
C(14B)-N(2B)-C(13B)	110,7(4)
C(10B)-N(2B)-H(2BB)	106,5
C(14B)-N(2B)-H(2BB)	106,5
C(13B)-N(2B)-H(2BB)	106,5
C(3B)-N(3B)-C(16B)	113,0(3)
C(3B)-N(3B)-C(15B)	111,8(3)
C(16B)-N(3B)-C(15B)	111,1(4)
C(3B)-N(3B)-H(3B)	106,9
C(16B)-N(3B)-H(3B)	106,9
C(15B)-N(3B)-H(3B)	106,9
C(2B)-C(1B)-C(6B)	120,4(4)
C(2B)-C(1B)-S(1B)	117,8(3)
C(6B)-C(1B)-5(1B)	121,5(3)
C(3B)-C(2B)-C(1B)	119,7(4)
C(3B)-C(2B)-H(2B)	120,2
C(1B)-C(2B)-H(2B)	120,2
C(2B)-C(3B)-C(4B)	121,1(4)
C(2B)-C(3B)-N(3B)	120,3(4)
C(4B)-C(3B)-N(3B)	118,7(4)
C(5B)-C(4B)-C(3B)	119,2(4)
C(5B)-C(4B)-H(4B)	120,4
C(3B)-C(4B)-H(4B)	120,4
C(4B)-C(5B)-C(6B)	121,1(4)
C(4B)-C(5B)-H(5B)	119,5
C(6B)-C(5B)-H(5B)	119,5
N(1B)-C(6B)-C(5B)	120,1(4)
N(1B)-C(6B)-C(1B)	121,4(4)
C(5B)-C(6B)-C(1B)	118,5(4)
N(1B)-C(7B)-C(8B)	119,9(4)
N(1B)-C(7B)-C(12B)	121,8(4)
C(8B)-C(7B)-C(12B)	118,3(4)
C(9B)-C(8B)-C(7B)	121,6(4)
C(9B)-C(8B)-H(8B)	119,2
C(7B)-C(8B)-H(8B)	119,2
C(8B)-C(9B)-C(10B)	119,0(4)
C(8B)-C(9B)-H(9B)	120,5
C(10B)-C(9B)-H(9B)	120,5
C(9B)-C(10B)-C(11B)	121,4(4)
C(9B)-C(10B)-N(2B)	120,8(4)
C(11B)-C(10B)-N(2B)	117,6(4)
C(10B)-C(11B)-C(12B)	119,5(4)
C(10B)-C(11B)-H(11B)	120,3
C(12B)-C(11B)-H(11B)	120,3
C(11B)-C(12B)-C(7B)	120,3(4)
C(11B)-C(12B)-S(1B)	118,2(3)
C(7B)-C(12B)-S(1B)	121,2(3)
N(2B)-C(13B)-H(13D)	109,5

N(2B)-C(13B)-H(13E)	109,5
H(13D)-C(13B)-H(13E)	109,5
N(2B)-C(13B)-H(13F)	109,5
H(13D)-C(13B)-H(13F)	109,5
H(13E)-C(13B)-H(13F)	109,5
N(2B)-C(14B)-H(14D)	109,5
N(2B)-C(14B)-H(14E)	109,5
H(14D)-C(14B)-H(14E)	109,5
N(2B)-C(14B)-H(14F)	109,5
H(14D)-C(14B)-H(14F)	109,5
H(14E)-C(14B)-H(14F)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15D)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15E)	109,5
H(15D)-C(15B)-H(15E)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15F)	109,5
H(15D)-C(15B)-H(15F)	109,5
H(15E)-C(15B)-H(15F)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16D)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16E)	109,5
H(16D)-C(16B)-H(16E)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16F)	109,5
H(16D)-C(16B)-H(16F)	109,5
H(16E)-C(16B)-H(16F)	109,5
C(12C)-S(1C)-C(1C)	101,7(2)
C(7C)-N(1C)-C(6C)	125,4(4)
C(7C)-N(1C)-H(1C)	117,3
C(6C)-N(1C)-H(1C)	117,3
C(10C)-N(2C)-C(14C)	114,9(3)
C(10C)-N(2C)-C(13C)	110,2(3)
C(14C)-N(2C)-C(13C)	111,2(3)
C(10C)-N(2C)-H(2CC)	106,7
C(14C)-N(2C)-H(2CC)	106,7
C(13C)-N(2C)-H(2CC)	106,7
C(3C)-N(3C)-C(15C)	111,2(4)
C(3C)-N(3C)-C(16C)	112,9(4)
C(15C)-N(3C)-C(16C)	111,5(4)
C(3C)-N(3C)-H(3C)	106,9
C(15C)-N(3C)-H(3C)	106,9
C(16C)-N(3C)-H(3C)	106,9
C(2C)-C(1C)-C(6C)	120,3(4)
C(2C)-C(1C)-S(1C)	117,7(3)
C(6C)-C(1C)-S(1C)	121,8(3)
C(1C)-C(2C)-C(3C)	119,7(4)
C(1C)-C(2C)-H(2C)	120,2
C(3C)-C(2C)-H(2C)	120,2
C(2C)-C(3C)-C(4C)	121,8(4)
C(2C)-C(3C)-N(3C)	118,6(4)
C(4C)-C(3C)-N(3C)	119,5(4)
C(3C)-C(4C)-C(5C)	118,7(4)
C(3C)-C(4C)-H(4C)	120,7
C(5C)-C(4C)-H(4C)	120,7
C(4C)-C(5C)-C(6C)	120,9(4)
C(4C)-C(5C)-H(5C)	119,5
C(6C)-C(5C)-H(5C)	119,5
N(1C)-C(6C)-C(5C)	119,9(4)
N(1C)-C(6C)-C(1C)	121,3(4)
C(5C)-C(6C)-C(1C)	118,7(4)
N(1C)-C(7C)-C(8C)	119,9(4)
N(1C)-C(7C)-C(12C)	122,0(4)
C(8C)-C(7C)-C(12C)	118,1(4)
C(9C)-C(8C)-C(7C)	121,5(4)
C(9C)-C(8C)-H(8C)	119,2
C(7C)-C(8C)-H(8C)	119,2
C(8C)-C(9C)-C(10C)	119,3(4)
C(8C)-C(9C)-H(9C)	120,3
C(10C)-C(9C)-H(9C)	120,3

ES 2 594 703 T3

C(11C)-C(10C)-C(9C)	120,5(4)
C(11C)-C(10C)-N(2C)	117,5(4)
C(9C)-C(10C)-N(2C)	121,9(4)
C(12C)-C(11C)-C(10C)	120,4(4)
C(12C)-C(11C)-H(11C)	119,8
C(10C)-C(11C)-H(11C)	119,8
C(11C)-C(12C)-C(7C)	120,1(4)
C(11C)-C(12C)-S(1C)	118,4(3)
C(7C)-C(12C)-S(1C)	121,3(3)
N(2C)-C(13C)-H(13G)	109,5
N(2C)-C(13C)-H(13H)	109,5
H(13G)-C(13C)-H(13H)	109,5
N(2C)-C(13C)-H(13I)	109,5
H(13G)-C(13C)-H(13I)	109,5
H(13H)-C(13C)-H(13I)	109,5
N(2C)-C(14C)-H(14G)	109,5
N(2C)-C(14C)-H(14H)	109,5
H(14G)-C(14C)-H(14H)	109,5
N(2C)-C(14C)-H(14I)	109,5
H(14G)-C(14C)-H(14I)	109,5
H(14H)-C(14C)-H(14I)	109,5
N(3C)-C(15C)-H(15G)	109,5
N(3C)-C(15C)-H(15H)	109,5
H(15G)-C(15C)-H(15H)	109,5
N(3C)-C(15C)-H(15I)	109,5
H(15G)-C(15C)-H(15I)	109,5
H(15H)-C(15C)-H(15I)	109,5
N(3C)-C(16C)-H(16G)	109,5
N(3C)-C(16C)-H(16H)	109,5
H(16G)-C(16C)-H(16H)	109,5
N(3C)-C(16C)-H(16I)	109,5
H(16G)-C(16C)-H(16I)	109,5
H(16H)-C(16C)-H(16I)	109,5
C(12D)-S(1D)-C(1D)	102,4(2)
C(7D)-N(1D)-C(6D)	126,5(4)
C(7D)-N(1D)-H(1D)	116,7
C(6D)-N(1D)-H(1D)	116,7
C(10D)-N(2D)-C(13D)	114,5(4)
C(10D)-N(2D)-C(14D)	111,3(3)
C(13D)-N(2D)-C(14D)	110,7(4)
C(10D)-N(2D)-H(2D)	106,6
C(13D)-N(2D)-H(2D)	106,6
C(14D)-N(2D)-H(2D)	106,6
C(3D)-N(3D)-C(15D)	111,2(4)
C(3D)-N(3D)-C(16D)	114,3(4)
C(15D)-N(3D)-C(16D)	111,2(4)
C(3D)-N(3D)-H(3D)	106,5
C(15D)-N(3D)-H(3D)	106,5
C(16D)-N(3D)-H(3D)	106,5
C(2D)-C(1D)-C(6D)	120,2(4)
C(2D)-C(1D)-S(1D)	117,4(3)
C(6D)-C(1D)-S(1D)	122,4(3)
C(3D)-C(2D)-C(1D)	119,7(4)
C(3D)-C(2D)-H(2DD)	120,1
C(1D)-C(2D)-H(2DD)	120,1
C(2D)-C(3D)-C(4D)	120,7(4)
C(2D)-C(3D)-N(3D)	120,7(4)
C(4D)-C(3D)-N(3D)	118,4(4)
C(3D)-C(4D)-C(5D)	119,2(5)
C(3D)-C(4D)-H(4D)	120,4
C(5D)-C(4D)-H(4D)	120,4
C(6D)-C(5D)-C(4D)	121,5(4)
C(6D)-C(5D)-H(5D)	119,2
C(4D)-C(5D)-H(5D)	119,2
C(5D)-C(6D)-N(1D)	118,7(4)
C(5D)-C(6D)-C(1D)	118,6(4)

ES 2 594 703 T3

N(1D)-C(6D)-C(1D)	122,7(4)
N(1D)-C(7D)-C(8D)	119,7(4)
N(1D)-C(7D)-C(12D)	121,5(4)
C(8D)-C(7D)-C(12D)	118,7(4)
C(9D)-C(8D)-C(7D)	121,8(4)
C(9D)-C(8D)-H(8D)	119,1
C(7D)-C(8D)-H(8D)	119,1
C(10D)-C(9D)-C(8D)	118,3(4)
C(10D)-C(9D)-H(9D)	120,9
C(8D)-C(9D)-H(9D)	120,9
C(9D)-C(10D)-C(11D)	121,7(4)
C(9D)-C(10D)-N(2D)	121,0(4)
C(11D)-C(10D)-N(2D)	117,1(4)
C(12D)-C(11D)-C(10D)	119,5(4)
C(12D)-C(11D)-H(11D)	120,3
C(10D)-C(11D)-H(11D)	120,3
C(11D)-C(12D)-C(7D)	120,0(4)
C(11D)-C(12D)-S(1D)	116,4(3)
C(7D)-C(12D)-S(1D)	123,4(3)
N(2D)-C(13D)-H(13J)	109,5
N(2D)-C(13D)-H(13K)	109,5
H(13J)-C(13D)-H(13K)	109,5
N(2D)-C(13D)-H(13L)	109,5
H(13J)-C(13D)-H(13L)	109,5
H(13K)-C(13D)-H(13L)	109,5
N(2D)-C(14D)-H(14J)	109,5
N(2D)-C(14D)-H(14K)	109,5
H(14J)-C(14D)-H(14K)	109,5
N(2D)-C(14D)-H(14L)	109,5
H(14J)-C(14D)-H(14L)	109,5
H(14K)-C(14D)-H(14L)	109,5
N(3D)-C(15D)-H(15J)	109,5
N(3D)-C(15D)-H(15K)	109,5
H(15J)-C(15D)-H(15K)	109,5
N(3D)-C(15D)-H(15L)	109,5
H(15J)-C(15D)-H(15L)	109,5
H(15K)-C(15D)-H(15L)	109,5
N(3D)-C(16D)-H(16J)	109,5
N(3D)-C(16D)-H(16K)	109,5
H(16J)-C(16D)-H(16K)	109,5
N(3D)-C(16D)-H(16L)	109,5
H(16J)-C(16D)-H(16L)	109,5
H(16K)-C(16D)-H(16L)	109,5
O(2)-S(2)-O(3)	118,5(17)
O(2)-S(2)-O(1')	87,9(12)
O(3)-S(2)-O(1')	108,0(8)
O(2)-S(2)-O(3')	117,2(14)
O(3)-S(2)-O(3')	31,5(6)
O(1')-S(2)-O(3')	138,3(6)
O(2)-S(2)-O(2')	23,8(18)
O(3)-S(2)-O(2')	115,1(10)
O(1')-S(2)-O(2')	110,6(8)
O(3')-S(2)-O(2')	101,4(8)
O(2)-S(2)-O(1)	111,9(14)
O(3)-S(2)-O(1)	65,7(9)
O(1')-S(2)-O(1)	42,6(5)
O(3')-S(2)-O(1)	95,8(7)
O(2')-S(2)-O(1)	134,1(9)
O(2)-S(2)-C(1S)	117,0(16)
O(3)-S(2)-C(1S)	118,1(6)
O(1')-S(2)-C(1S)	99,1(4)
O(3')-S(2)-C(1S)	97,8(4)
O(2')-S(2)-C(1S)	104,8(8)
O(1)-S(2)-C(1S)	114,6(5)
O(5)-S(3)-O(6)	113,5(2)
O(5)-S(3)-O(4)	112,5(2)

O(6)-S(3)-O(4)	111,9(2)
O(5)-S(3)-C(15S)	107,5(2)
O(6)-S(3)-C(15S)	106,2(2)
O(4)-S(3)-C(15S)	104,6(2)
O(7)-S(4)-O(9)	113,8(2)
O(7)-S(4)-O(8)	113,4(2)
O(9)-S(4)-O(8)	111,3(2)
O(7)-S(4)-C(3S)	106,0(2)
O(9)-S(4)-C(3S)	106,6(2)
O(8)-S(4)-C(3S)	104,9(2)
O(11)-S(5)-O(12)	112,3(3)
O(11)-S(5)-O(10)	114,1(3)
O(12)-S(5)-O(10)	109,9(2)
O(11)-S(5)-C(5S)	107,4(2)
O(12)-S(5)-C(5S)	107,2(2)
O(10)-S(5)-C(5S)	105,5(2)
O(14)-S(6)-O(15)	112,2(2)
O(14)-S(6)-O(13)	113,4(3)
O(15)-S(6)-O(13)	111,4(2)
O(14)-S(6)-C(9S)	105,6(2)
O(15)-S(6)-C(9S)	108,3(2)
O(13)-S(6)-C(9S)	105,4(3)
O(17)-S(7)-O(18)	114,0(2)
O(17)-S(7)-O(16)	114,2(2)
O(18)-S(7)-O(16)	110,7(2)
O(17)-S(7)-C(7S)	105,8(3)
O(18)-S(7)-C(7S)	105,3(2)
O(16)-S(7)-C(7S)	106,0(2)
O(21)-S(8)-O(19)	114,3(2)
O(21)-S(8)-O(20)	111,7(2)
O(19)-S(8)-O(20)	111,95(19)
O(21)-S(8)-C(11S)	106,3(2)
O(19)-S(8)-C(11S)	108,1(2)
O(20)-S(8)-C(11S)	103,7(2)
O(24)-S(9)-O(22)	113,23(19)
O(24)-S(9)-O(23)	112,94(19)
O(22)-S(9)-O(23)	111,07(18)
O(24)-S(9)-C(13S)	106,1(2)
O(22)-S(9)-C(13S)	107,7(2)
O(23)-S(9)-C(13S)	105,3(2)
S(2)-O(1)-O(3)	52,7(7)
S(2)-O(3)-O(1)	61,6(8)
C(2S)-C(1S)-S(2)	115,9(5)
C(2S)-C(1S)-H(1S1)	108,3
S(2)-C(1S)-H(1S1)	108,3
C(2S)-C(1S)-H(1S2)	108,3
S(2)-C(1S)-H(1S2)	108,3
H(1S1)-C(1S)-H(1S2)	107,4
C(1S)-C(2S)-H(2S1)	109,5
C(1S)-C(2S)-H(2S2)	109,5
H(2S1)-C(2S)-H(2S2)	109,5
C(1S)-C(2S)-H(2S3)	109,5
H(2S1)-C(2S)-H(2S3)	109,5
H(2S2)-C(2S)-H(2S3)	109,5
C(4S)-C(3S)-S(4)	111,3(3)
C(4S)-C(3S)-H(3S1)	109,4
S(4)-C(3S)-H(3S1)	109,4
C(4S)-C(3S)-H(3S2)	109,4
S(4)-C(3S)-H(3S2)	109,4
H(3S1)-C(3S)-H(3S2)	108,0
C(3S)-C(4S)-H(4S1)	109,5
C(3S)-C(4S)-H(4S2)	109,5
H(4S1)-C(4S)-H(4S2)	109,5
C(3S)-C(4S)-H(4S3)	109,5
H(4S1)-C(4S)-H(4S3)	109,5
H(4S2)-C(4S)-H(4S3)	109,5

ES 2 594 703 T3

C(6S)-C(5S)-S(5)	112,7(3)
C(6S)-C(5S)-H(5S1)	109,0
S(5)-C(5S)-H(5S1)	109,0
C(6S)-C(5S)-H(5S2)	109,0
S(5)-C(5S)-H(5S2)	109,0
H(5S1)-C(5S)-H(5S2)	107,8
C(5S)-C(6S)-H(6S1)	109,5
C(5S)-C(6S)-H(6S2)	109,5
H(6S1)-C(6S)-H(6S2)	109,5
C(5S)-C(6S)-H(6S3)	109,5
H(6S1)-C(6S)-H(6S3)	109,5
H(6S2)-C(6S)-H(6S3)	109,5
C(8S)-C(7S)-S(7)	110,6(4)
C(8S)-C(7S)-H(7S1)	109,5
S(7)-C(7S)-H(7S1)	109,5
C(8S)-C(7S)-H(7S2)	109,5
S(7)-C(7S)-H(7S2)	109,5
H(7S1)-C(7S)-H(7S2)	108,1
C(7S)-C(8S)-H(8S1)	109,5
C(7S)-C(8S)-H(8S2)	109,5
H(8S1)-C(8S)-H(8S2)	109,5
C(7S)-C(8S)-H(8S3)	109,5
H(8S1)-C(8S)-H(8S3)	109,5
H(8S2)-C(8S)-H(8S3)	109,5
C(10S)-C(9S)-S(6)	104,5(5)
C(10S)-C(9S)-H(9S1)	110,8
S(6)-C(9S)-H(9S1)	110,8
C(10S)-C(9S)-H(9S2)	110,8
S(6)-C(9S)-H(9S2)	110,8
H(9S1)-C(9S)-H(9S2)	108,9
C(9S)-C(10S)-H(10A)	109,5
C(9S)-C(10S)-H(10B)	109,5
H(10A)-C(10S)-H(10B)	109,5
C(9S)-C(10S)-H(10C)	109,5
H(10A)-C(10S)-H(10C)	109,5
H(10B)-C(10S)-H(10C)	109,5
C(12S)-C(11S)-S(8)	113,0(3)
C(12S)-C(11S)-H(11E)	109,0
S(8)-C(11S)-H(11E)	109,0
C(12S)-C(11S)-H(11F)	109,0
S(8)-C(11S)-H(11F)	109,0
H(11E)-C(11S)-H(11F)	107,8
C(11S)-C(12S)-H(12A)	109,5
C(11S)-C(12S)-H(12B)	109,5
H(12A)-C(12S)-H(12B)	109,5
C(11S)-C(12S)-H(12C)	109,5
H(12A)-C(12S)-H(12C)	109,5
H(12B)-C(12S)-H(12C)	109,5
C(14S)-C(13S)-S(9)	111,6(3)
C(14S)-C(13S)-H(13M)	109,3
S(9)-C(13S)-H(13M)	109,3
C(14S)-C(13S)-H(13N)	109,3
S(9)-C(13S)-H(13N)	109,3
H(13M)-C(13S)-H(13N)	108,0
C(13S)-C(14S)-H(14M)	109,5
C(13S)-C(14S)-H(14N)	109,5
H(14M)-C(14S)-H(14N)	109,5
C(13S)-C(14S)-H(14O)	109,5
H(14M)-C(14S)-H(14O)	109,5
H(14N)-C(14S)-H(14O)	109,5
C(16S)-C(15S)-S(3)	112,7(4)
C(16S)-C(15S)-H(15M)	109,0
S(3)-C(15S)-H(15M)	109,0
C(16S)-C(15S)-H(15N)	109,0
S(3)-C(15S)-H(15N)	109,0
H(15M)-C(15S)-H(15N)	107,8

C(15S)-C(16S)-H(16M)	109,5
C(15S)-C(16S)-H(16N)	109,5
H(16M)-C(16S)-H(16N)	109,5
C(15S)-C(16S)-H(16O)	109,5
H(16M)-C(16S)-H(16O)	109,5
H(16N)-C(16S)-H(16O)	109,5

Transformaciones simétricas usadas para generar átomos equivalentes:

Tabla 4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para LMT.2EsOH. El exponente del factor anisotrópico toma la forma: $-2 \square^2 [h^2 a^* U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
S(1A)	18(1)	21(1)	121(2)	12(1)	-15(1)	-2(1)
N(1A)	15(2)	24(2)	36(2)	1(2)	0(2)	-3(2)
N(2A)	19(2)	20(2)	27(2)	5(2)	1(2)	0(2)
N(3A)	17(2)	23(2)	27(2)	-1(2)	3(2)	1(2)
C(1A)	20(3)	22(2)	39(3)	3(2)	-4(2)	-1(2)
C(2A)	17(2)	24(2)	39(3)	2(2)	-4(2)	-1(2)
C(3A)	22(2)	22(2)	25(2)	-1(2)	7(2)	-2(2)
C(4A)	17(2)	29(2)	31(3)	-5(2)	7(2)	2(2)
C(5A)	15(2)	28(2)	37(3)	-6(2)	9(2)	-6(2)
C(6A)	18(2)	23(2)	26(2)	-2(2)	3(2)	-3(2)
C(7A)	22(2)	23(2)	25(2)	0(2)	5(2)	-2(2)
C(8A)	21(2)	25(2)	21(2)	-3(2)	6(2)	-7(2)
C(9A)	25(2)	22(2)	24(2)	2(2)	7(2)	-3(2)
C(10A)	19(2)	24(2)	22(2)	3(2)	4(2)	2(2)
C(11A)	19(2)	23(2)	33(3)	2(2)	1(2)	-8(2)
C(12A)	20(3)	22(2)	42(3)	6(2)	2(2)	-1(2)
C(13A)	28(3)	39(3)	30(3)	15(2)	0(2)	-2(2)
C(14A)	34(3)	44(3)	37(3)	1(2)	7(2)	13(2)
C(15A)	96(5)	26(3)	36(3)	3(2)	37(3)	2(3)
C(16A)	32(3)	26(2)	30(3)	-9(2)	4(2)	6(2)
S(1 B)	17(1)	18(1)	39(1)	3(1)	7(1)	-1(1)
N(1 B)	21(2)	16(2)	25(2)	-2(2)	8(2)	-3(2)
N(2B)	29(2)	24(2)	20(2)	4(2)	1(2)	6(2)
N(3B)	21(2)	19(2)	21(2)	-2(2)	3(2)	2(2)
C(1B)	17(2)	20(2)	18(2)	0(2)	5(2)	0(2)
C(2B)	21(2)	23(2)	16(2)	-3(2)	3(2)	-4(2)
C(3B)	22(2)	18(2)	18(2)	-2(2)	6(2)	1(2)
C(4B)	16(2)	23(2)	20(2)	-1(2)	3(2)	0(2)
C(5B)	16(2)	21(2)	21(2)	-1(2)	5(2)	-4(2)
C(6B)	25(2)	20(2)	17(2)	0(2)	9(2)	1(2)
C(7B)	22(2)	24(2)	20(2)	-3(2)	9(2)	0(2)
C(8B)	29(3)	19(2)	27(2)	0(2)	17(2)	-2(2)
C(9B)	32(3)	20(2)	25(2)	3(2)	16(2)	4(2)
C(10B)	31(3)	24(2)	14(2)	1(2)	7(2)	9(2)
C(11B)	24(2)	23(2)	19(2)	-2(2)	6(2)	-1(2)
C(12B)	28(3)	18(2)	20(2)	0(2)	9(2)	2(2)
C(13B)	53(3)	30(3)	26(3)	14(2)	11(2)	17(2)
C(14B)	22(2)	30(2)	27(3)	1(2)	4(2)	6(2)
C(15B)	42(3)	22(2)	35(3)	3(2)	15(2)	3(2)
C(16B)	39(3)	30(3)	25(3)	-8(2)	2(2)	10(2)
S(1C)	16(1)	21(1)	34(1)	2(1)	6(1)	0(1)
N(1C)	15(2)	22(2)	31(2)	-8(2)	4(2)	-5(2)
N(2C)	16(2)	19(2)	23(2)	0(2)	6(2)	0(1)
N(3C)	21(2)	28(2)	27(2)	1(2)	7(2)	5(2)
C(1C)	16(2)	25(2)	15(2)	-1(2)	2(2)	0(2)
C(2C)	20(2)	24(2)	17(2)	-2(2)	6(2)	-1(2)
C(3C)	21(2)	20(2)	19(2)	1(2)	6(2)	5(2)
C(4C)	20(2)	34(3)	20(2)	-2(2)	7(2)	4(2)
C(5C)	20(2)	26(2)	20(2)	-1(2)	6(2)	-1(2)
C(6C)	22(2)	24(2)	15(2)	-4(2)	7(2)	-1(2)
C(7C)	18(2)	29(2)	17(2)	-4(2)	6(2)	2(2)
C(8C)	17(2)	22(2)	27(2)	-8(2)	9(2)	-6(2)

ES 2 594 703 T3

C(9C)	21(2)	20(2)	22(2)	-3(2)	10(2)	-2(2)
C(10C)	14(2)	25(2)	18(2)	-3(2)	5(2)	1(2)
C(11C)	15(2)	24(2)	21(2)	-5(2)	6(2)	-7(2)
C(12C)	18(2)	19(2)	21(2)	-4(2)	7(2)	2(2)
C(13C)	17(2)	30(2)	29(3)	2(2)	9(2)	3(2)
C(14C)	23(2)	23(2)	23(2)	2(2)	7(2)	-2(2)
C(15C)	46(3)	45(3)	56(4)	22(3)	29(3)	11(3)
C(16C)	38(3)	33(3)	46(3)	-18(2)	-4(3)	8(2)
S(1 D)	25(1)	23(1)	46(1)	-3(1)	13(1)	-4(1)
N(1D)	26(2)	23(2)	36(2)	-4(2)	11(2)	-4(2)
N(2D)	22(2)	35(2)	23(2)	2(2)	7(2)	2(2)
N(3D)	27(2)	24(2)	34(2)	0(2)	16(2)	2(2)
C(1 D)	28(3)	28(2)	20(2)	-3(2)	10(2)	0(2)
C(2D)	30(3)	29(2)	23(2)	-5(2)	13(2)	-4(2)
C(3D)	33(3)	24(2)	24(2)	-1(2)	13(2)	1(2)
C(4D)	27(3)	31(3)	33(3)	0(2)	10(2)	-1(2)
C(5D)	26(3)	29(3)	36(3)	-6(2)	8(2)	-6(2)
C(6D)	29(3)	24(2)	19(2)	-3(2)	10(2)	0(2)
C(TD)	23(2)	27(2)	16(2)	0(2)	9(2)	-1(2)
C(8D)	30(3)	27(2)	19(2)	0(2)	15(2)	-3(2)
C(9D)	29(3)	29(2)	16(2)	3(2)	9(2)	-2(2)
C(10D)	24(2)	30(2)	17(2)	-2(2)	8(2)	0(2)
C(11D)	26(3)	32(2)	17(2)	-6(2)	7(2)	-6(2)
C(12D)	28(3)	24(2)	18(2)	-5(2)	11(2)	-1(2)
C(13D)	33(3)	60(4)	33(3)	19(3)	11(2)	10(3)
C(14D)	30(3)	33(3)	32(3)	3(2)	16(2)	5(2)
C(15D)	51(3)	34(3)	41(3)	6(2)	23(3)	10(2)
C(16D)	35(3)	26(2)	47(3)	-12(2)	19(3)	-3(2)
S(2)	36(1)	27(1)	45(1)	9(1)	18(1)	2(1)
S(3)	23(1)	22(1)	24(1)	-3(1)	4(1)	-1(1)
S(4)	16(1)	23(1)	40(1)	-4(1)	4(1)	-1(1)
S(5)	23(1)	24(1)	41(1)	8(1)	12(1)	4(1)
S(6)	42(1)	19(1)	29(1)	0(1)	9(1)	-2(1)
S(T)	31(1)	28(1)	39(1)	4(1)	12(1)	1(1)
S(8)	20(1)	19(1)	24(1)	0(1)	4(1)	-1(1)
S(9)	23(1)	23(1)	27(1)	-1(1)	7(1)	4(1)
O(1)	67(4)	53(4)	52(5)	19(4)	29(4)	10(4)
O(2)	56(6)	25(9)	107(14)	17(8)	13(8)	-20(7)
O(3)	55(4)	54(4)	57(5)	23(4)	25(4)	8(3)
O(1')	79(5)	68(4)	48(4)	25(3)	39(4)	31(4)
O(2')	53(4)	20(7)	109(13)	14(6)	9(7)	-4(5)
O(3')	35(3)	71(5)	68(5)	41(4)	21(4)	9(3)
O(4)	26(2)	26(2)	44(2)	3(2)	7(2)	2(1)
O(5)	40(2)	33(2)	35(2)	-10(2)	0(2)	-8(2)
O(6)	23(2)	31(2)	26(2)	-2(1)	9(1)	-6(1)
O(7)	27(2)	27(2)	72(3)	11(2)	11(2)	0(2)
O(8)	16(2)	42(2)	57(2)	-18(2)	-3(2)	-2(2)
O(9)	24(2)	29(2)	38(2)	-2(1)	14(2)	-3(1)
O(10)	43(2)	49(2)	33(2)	12(2)	18(2)	30(2)
O(11)	37(2)	48(2)	95(4)	34(2)	4(2)	-11(2)
O(12)	78(3)	30(2)	34(2)	-2(2)	28(2)	3(2)
O(13)	52(3)	72(3)	56(3)	-16(2)	35(2)	-33(2)
O(14)	94(3)	25(2)	35(2)	-2(2)	3(2)	13(2)
O(15)	37(2)	40(2)	35(2)	-9(2)	1(2)	5(2)
O(16)	23(2)	37(2)	36(2)	-16(2)	13(2)	-8(1)
O(17)	59(3)	36(2)	68(3)	23(2)	21(2)	-5(2)
O(18)	28(2)	52(2)	32(2)	-9(2)	9(2)	0(2)
O(19)	33(2)	19(2)	34(2)	-1(1)	7(2)	-2(1)
O(20)	20(2)	24(2)	45(2)	-4(2)	-1(2)	-2(1)
O(21)	32(2)	34(2)	28(2)	3(1)	14(2)	2(1)
O(22)	26(2)	27(2)	24(2)	-2(1)	9(1)	-2(1)
O(23)	26(2)	23(2)	39(2)	3(1)	9(2)	8(1)
O(24)	26(2)	25(2)	42(2)	-5(2)	8(2)	-4(1)
C(1S)	60(4)	50(4)	56(4)	14(3)	5(3)	6(3)
C(2S)	48(3)	52(3)	36(3)	10(3)	19(3)	-2(3)
C(3S)	20(2)	37(3)	30(3)	-4(2)	6(2)	5(2)

ES 2 594 703 T3

C(4S)	32(3)	57(3)	28(3)	14(2)	12(2)	8(2)
C(5S)	23(3)	31(3)	50(3)	11(2)	9(2)	8(2)
C(6S)	37(3)	32(3)	26(3)	6(2)	13(2)	3(2)
C(7S)	32(3)	47(3)	38(3)	-2(2)	14(2)	1(2)
C(8S)	48(4)	22(3)	73(4)	9(3)	8(3)	-3(2)
C(9S)	45(3)	31(3)	43(3)	11(2)	24(3)	7(2)
C(10S)	118(8)	88(6)	104(7)	-11(5)	58(6)	-22(6)
C(11S)	30(3)	25(2)	30(3)	3(2)	14(2)	-2(2)
C(12S)	40(3)	40(3)	30(3)	3(2)	11(2)	2(2)
C(13S)	29(3)	25(2)	26(2)	0(2)	11(2)	1(2)
C(14S)	35(3)	32(3)	37(3)	-2(2)	18(2)	-2(2)
C(15S)	38(3)	39(3)	35(3)	2(2)	19(2)	-2(2)
C(16S)	51(4)	50(3)	63(4)	5(3)	40(3)	4(3)

Tabla 5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) para LMT.2EsOH.

	x	y	z	U (equiv.)
H(1AA)	-585	2958	1019	35
H(2AA)	1142	2510	2886	30
H(3A)	-993	5379	587	30
H(2A)	-112	4894	1482	38
H(4A)	-1173	4519	414	32
H(5A)	-1024	3623	616	33
H(8A)	-239	2190	1412	29
H(9A)	327	1779	2005	30
H(11A)	801	3220	2506	34
H(13A)	956	2107	3668	55
H(13B)	1268	1770	3586	55
H(13C)	853	1592	3162	55
H(14A)	950	1606	2041	62
H(14B)	1350	1846	2447	62
H(14C)	1048	2153	1770	62
H(15A)	-399	5529	288	75
H(15B)	-759	5883	-21	75
H(15C)	-775	5281	-280	75
H(16A)	-638	5607	1762	49
H(16B)	-652	6075	1222	49
H(16C)	-306	5694	1555	49
H(1B)	2048	25	885	25
H(2BB)	3779	-238	2945	33
H(3B)	1492	2364	765	27
H(2B)	2408	2001	1444	26
H(4B)	1368	1494	658	26
H(5B)	1566	616	765	25
H(8B)	2428	-704	1523	28
H(9B)	3012	-1036	2140	29
H(11B)	3416	453	2358	28
H(13D)	3579	-889	3507	57
H(13E)	3953	-1033	3472	57
H(13F)	3582	-1293	2905	57
H(14D)	3650	-952	1829	43
H(14E)	4042	-744	2383	43
H(14F)	3758	-345	1811	43
H(15D)	2099	2713	612	50
H(15E)	1729	3039	363	50
H(15F)	1737	2500	-42	50
H(16D)	1800	2460	1997	53
H(16E)	1763	3014	1591	53
H(16F)	2137	2692	1883	53
H(1C)	4627	2587	1195	30
H(2CC)	6358	2390	3285	24
H(3C)	4060	4939	950	32
H(2C)	4971	4574	1649	25
H(4C)	3932	4060	845	30
H(5C)	4137	3182	1006	27
H(8C)	5015	1871	1821	26
H(9C)	5601	1557	2480	25

ES 2 594 703 T3

H(11C)	5987	3052	2673	25
H(13G)	6256	1619	2248	39
H(13H)	6636	1887	2761	39
H(13I)	6327	2230	2142	39
H(14G)	6168	1769	3891	36
H(14H)	6544	1621	3871	36
H(14I)	6177	1339	3323	36
H(15G)	4636	5189	631	70
H(15H)	4280	5544	406	70
H(15I)	4252	4970	55	70
H(16G)	4450	5092	2174	70
H(16H)	4333	5614	1683	70
H(16I)	4723	5354	1894	70
H(1D)	7088	320	1462	34
H(2D)	8828	-56	3133	33
H(3D)	6618	2711	1123	32
H(2DD)	7510	2283	1724	32
H(4D)	6459	1833	909	38
H(5D)	6639	950	1112	38
H(8D)	7452	-429	1911	28
H(9D)	8028	-812	2416	30
H(11D)	8478	655	2709	31
H(13J)	8654	-656	3792	65
H(13K)	9004	-828	3683	65
H(13L)	8618	-1085	3187	65
H(14J)	8622	-820	2060	46
H(14K)	9023	-587	2493	46
H(14L)	8707	-220	1935	46
H(15J)	7042	2819	377	61
H(15K)	6720	3214	295	61
H(15L)	6632	2612	33	61
H(16J)	7101	2976	2179	54
H(16K)	6965	3437	1582	54
H(16L)	7320	3101	1708	54
H(1S1)	354	568	117	74
H(1S2)	34	756	315	74
H(2S1)	348	1552	757	67
H(2S2)	230	1466	-93	67
H(2S3)	641	1363	479	67
H(3S1)	2296	4750	523	36
H(3S2)	2109	4415	-213	36
H(4S1)	1692	5133	-749	59
H(4S2)	2102	5315	-517	59
H(4S3)	1901	5469	-21	59
H(5S1)	2641	3235	241	44
H(5S2)	2548	3575	803	44
H(6S1)	3029	4152	984	48
H(6S2)	2760	4126	137	48
H(6S3)	3134	3806	444	48
H(7S1)	5283	2814	-129	47
H(7S2)	5465	3051	679	47
H(8S1)	5796	3675	290	81
H(8S2)	5368	3758	-148	81
H(8S3)	5587	3453	-521	81
H(9S1)	5428	806	551	46
H(9S2)	5579	1289	1119	46
H(10A)	6182	981	1462	150
H(10B)	5993	1119	613	150
H(10C)	6028	516	875	150
H(11E)	8109	3705	840	33
H(11F)	8195	3253	387	33
H(12A)	7581	2956	-55	57
H(12B)	7605	3553	-295	57
H(12C)	7500	3438	363	57
H(13M)	8341	797	1242	33
H(13N)	8118	1177	569	33

H(14M)	7744	447	-41	52
H(14N)	7716	589	698	52
H(14O)	7955	95	671	52
H(15M)	272	2476	-63	44
H(15N)	475	2669	763	44
H(16M)	317	3544	407	74
H(16N)	-43	3188	97	74
H(16O)	135	3371	-430	74

Datos cristalográficos para LMT.2MsOH (Figura 17c)

Tabla 1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura para LMT.2MsOH.

Código de identificación	64412SC171
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₆ S ₃
Peso de la fórmula	477,61
Temperatura	150(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema de cristal	Triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unidad	a = 11,6401 (6) Å α = 104,682(2)°. b = 12,0744(6) Å β = 92,386(2)°. c = 18,4846(9) Å γ = 116,151(2)°.
Volumen	2220,42(19) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1,429 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,374 mm ⁻¹
F(000)	1008
Tamaño del cristal	0,30x0,18x0,04 mm ³
Intervalo theta para recogida de datos	1,16 a 27,57°.
Intervalos del índice	-15<=h<=15, -15<=k<=15, -24<=l<=24
Reflexiones recogidas	42564
Reflexiones independientes	10184 [R(int) = 0,0662]
Cumplimiento de theta = 25,00°	99,6 %
Corrección de absorción	Semiempírica a partir de equivalentes
Transmisión máx. y mín.	0,9852 y 0,8962
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	10184 / 198 / 552
Bondad de ajuste en F ²	1,071
Índices R finales [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0593, wR2 = 0,1399
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0909, wR2 = 0,1566
Mayor dif. entre pico y agujero	1,192 y -0,905 e.Å ⁻³

5

Tabla 2. Coordenadas atómicas (x 10⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalentes (Å²x 10³) para eul1_0m. U (equiv.) se define como un tercio de la traza del tensor U^{ij} ortogonalizado.

	x	y	z	U (equiv.)
C(1A)	2847(3)	7453(4)	3069(2)	28(1)
C(2A)	2545(3)	8117(3)	2643(2)	27(1)
C(3A)	3528(3)	9173(4)	2496(2)	29(1)
C(4A)	4823(3)	9566(4)	2760(2)	37(1)
C(5A)	5121(3)	8863(4)	3154(2)	39(1)
C(6A)	4156(3)	7809(4)	3317(2)	34(1)
C(7A)	3630(5)	5911(5)	3768(2)	48(1)
C(8A)	4139(5)	5179(5)	4015(2)	55(1)
C(9A)	3314(5)	4011(5)	4119(2)	58(1)
C(10A)	1978(5)	3531(5)	3953(2)	52(1)
C(11A)	1451(5)	4217(4)	3678(2)	45(1)
C(12A)	2292(4)	5408(4)	3601(2)	42(1)
C(13A)	3947(4)	10426(4)	1555(2)	39(1)
C(14A)	3035(4)	10981(4)	2698(2)	36(1)
C(15A)	479(5)	2617(4)	4788(2)	56(1)
C(16A)	422(9)	1431(7)	3338(3)	21(2)
C(16')	-175(7)	1295(6)	3509(4)	38(2)
C(1B)	1734(3)	3733(3)	1573(2)	20(1)
C(2B)	467(3)	2802(3)	1532(2)	20(1)
C(3B)	-556(3)	2949(3)	1228(2)	20(1)
C(4B)	-328(3)	4011(3)	986(2)	21(1)

C(5B)	938(3)	4959(3)	1054(2)	22(1)
C(6B)	1992(3)	4819(3)	1335(2)	21(1)
C(7B)	4382(3)	5861(3)	1707(2)	21(1)
C(8B)	5559(3)	6955(3)	1766(2)	22(1)
C(9B)	6724(3)	7111(3)	2126(2)	22(1)
C(10B)	6691(3)	6167(3)	2435(2)	20(1)
C(11B)	5535(3)	5073(3)	2382(2)	20(1)
C(12B)	4385(3)	4907(3)	2011(2)	20(1)
C(13B)	-2276(3)	1245(3)	1673(2)	27(1)
C(14B)	-2081(3)	892(3)	317(2)	27(1)
C(15B)	8932(3)	7573(3)	3209(2)	26(1)
C(16B)	8431(3)	5579(3)	2180(2)	29(1)
C(1S)	3536(4)	59(4)	4695(2)	38(1)
C(2S)	8797(4)	7948(3)	434(2)	33(1)
C(3S)	5403(4)	3853(4)	327(2)	40(1)
C(4S)	6718(6)	3037(5)	4356(2)	67(2)
N(1A)	4480(3)	7134(4)	3726(2)	46(1)
N(2A)	3126(3)	9915(3)	2118(2)	29(1)
N(3A)	1056(5)	2317(4)	4117(2)	68(1)
N(1B)	3245(2)	5734(3)	1338(2)	24(1)
N(2B)	-1895(2)	1871(3)	1060(1)	21(1)
N(3B)	7903(2)	6237(2)	2774(2)	21(1)
O(1S)	1876(5)	153(5)	5602(3)	31(1)
O(2S)	1457(5)	367(5)	4352(3)	27(1)
O(3S)	3166(4)	2156(4)	5329(3)	28(1)
O(2S')	3198(4)	1901(4)	4683(3)	26(1)
O(1S')	2515(5)	924(5)	5683(3)	25(1)
O(3S')	1291(5)	-191(6)	4380(3)	27(1)
O(4S)	10898(2)	10147(2)	1042(1)	34(1)
O(5S)	9224(3)	9462(3)	1796(2)	40(1)
O(6S)	10527(2)	8353(2)	1521(2)	39(1)
O(7S)	6954(2)	2997(3)	-257(1)	34(1)
O(8S)	6130(2)	2435(2)	845(1)	31(1)
O(9S)	4703(3)	1484(2)	-383(2)	44(1)
O(10S)	7552(3)	4905(3)	3786(2)	53(1)
O(11S)	8403(4)	3384(4)	3483(2)	73(1)
O(12S)	6252(3)	2791(3)	2924(2)	57(1)
S(1)	2478(1)	713(1)	4948(1)	30(1)
S(2)	9944(1)	9074(1)	1257(1)	23(1)
S(3)	5818(1)	2588(1)	111(1)	22(1)
S(4)	7286(1)	3562(1)	3574(1)	26(1)
S(1A)	1567(1)	6322(1)	3376(1)	32(1)
S(1B)	2994(1)	3393(1)	1838(1)	26(1)

Tabla 3. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para eull_0m.

C(1A)-C(2A)	1,390(5)
C(1A)-C(6A)	1,408(4)
C(1A)-S(1A)	1,753(4)
C(2A)-C(3A)	1,388(5)
C(2A)-H(2A)	0,9500
C(3A)-C(4A)	1,388(5)
C(3A)-N(2A)	1,472(5)
C(4A)-C(5A)	1,387(6)
C(4A)-H(4A)	0,9500
C(5A)-C(6A)	1,390(6)
C(5A)-H(5A)	0,9500
C(6A)-N(1A)	1,393(5)
C(7A)-C(12A)	1,386(6)
C(7A)-N(1A)	1,394(6)
C(7A)-C(8A)	1,409(5)
C(8A)-C(9A)	1,380(7)
C(8A)-H(8A)	0,9500
C(9A)-C(10A)	1,387(7)
C(9A)-H(9A)	0,9500
C(10A)-C(11A)	1,399(5)
C(10A)-N(3A)	1,502(7)

ES 2 594 703 T3

C(11A)-C(12A)	1,386(7)
C(11A)-H(11A)	0,9500
C(12A)-S(1A)	1,768(3)
C(13A)-N(2A)	1,506(4)
C(13A)-H(13A)	0,9800
C(13A)-H(13B)	0,9800
C(13A)-H(13C)	0,9800
C(14A)-N(2A)	1,499(5)
C(14A)-H(14A)	0,9800
C(14A)-H(14B)	0,9800
C(14A)-H(14C)	0,9800
C(15A)-N(3A)	1,477(6)
C(15A)-H(15A)	0,9800
C(15A)-H(15B)	0,9800
C(15A)-H(15C)	0,9800
C(16A)-N(3A)	1,482(6)
C(16A)-H(16H)	0,9800
C(16A)-H(16I)	0,9800
C(16A)-H(16J)	0,9800
C(16')-N(3A)	1,563(6)
C(16')-H(16K)	0,9800
C(16')-H(16L)	0,9800
C(16')-H(16M)	0,9800
C(1B)-C(2B)	1,390(4)
C(1B)-C(6B)	1,398(4)
C(B)-S(1B)	1,770(3)
C(2B)-C(3B)	1,394(4)
C(2B)-H(2B)	0,9500
C(3B)-C(4B)	1,384(4)
C(3B)-N(2B)	1,479(4)
C(4B)-C(5B)	1,386(4)
C(4B)-H(4B)	0,9500
C(5B)-C(6B)	1,407(4)
C(5B)-H(5B)	0,9500
C(6B)-N(1B)	1,387(4)
C(7B)-N(1B)	1,391(4)
C(7B)-C(8B)	1,397(4)
C(7B)-C(12B)	1,405(4)
C(8B)-C(9B)	1,398(4)
C(8B)-H(8B)	0,9500
C(9B)-C(10B)	1,385(4)
C(9B)-H(9B)	0,9500
C(10B)-C(11B)	1,387(4)
C(0B)-N(3B)	1,478(4)
C(11B)-C(12B)	1,386(4)
C(11B)-H(11B)	0,9500
C(12B)-S(1B)	1,766(3)
C(13B)-N(2B)	1,494(4)
C(13B)-H(13D)	0,9800
C(13B)-H(13E)	0,9800
C(13B)-H(13F)	0,9800
C(14B)-N(2B)	1,503(4)
C(14B)-H(14D)	0,9800
C(14B)-H(14E)	0,9800
C(14B)-H(14F)	0,9800
C(15B)-N(3B)	1,497(4)
C(15B)-H(15D)	0,9800
C(15B)-H(15E)	0,9800
C(15B)-H(15F)	0,9800
C(16B)-N(3B)	1,503(4)
C(16B)-H(16A)	0,9800
C(16B)-H(16B)	0,9800
C(16B)-H(16C)	0,9800
C(1S)-S(1)	1,755(4)
C(1S)-H(1S1)	0,9800
C(1S)-H(1S2)	0,9800

ES 2 594 703 T3

C(1S)-H(1S3)	0,9800
C(2S)-S(2)	1,768(3)
C(2S)-H(2S1)	0,9800
C(2S)-H(2S2)	0,9800
C(2S)-H(2S3)	0,9800
C(3S)-S(3)	1,755(4)
C(3S)-H(3S1)	0,9800
C(3S)-H(3S2)	0,9800
C(3S)-H(3S3)	0,9800
C(4S)-S(4)	1,762(4)
C(4S)-H(4S1)	0,9800
C(4S)-H(4S2)	0,9800
C(4S)-H(4S3)	0,9800
N(1A)-H(1A)	0,8800
N(2A)-H(2A1)	0,9300
N(3A)-H(3A)	0,9300
N(1B)-H(1B)	0,8800
N(2B)-H(2B1)	0,9300
N(3B)-H(3B)	0,9300
O(1S)-S(1)	1,573(5)
O(2S)-S()	1,422(5)
O(3S)-S(1)	1,508(5)
O(2S')-S(1)	1,528(5)
O(1S')-S(1)	1,312(5)
O(3S')-S(1)	1,473(5)
O(4S)-S(2)	1,449(2)
O(5S)-S(2)	1,447(3)
O(6S)-S(2)	1,472(2)
O(7S)-S(3)	1,458(2)
O(8S)-S(3)	1,467(2)
O(9S)-S(3)	1,433(3)
O(10S)-S(4)	1,451(3)
O(11S)-S(4)	1,417(3)
O(12S)-S(4)	1,443(3)
C(2A)-C(1A)-C(6A)	119,8(3)
C(2A)-C(1A)-S(1A)	117,7(2)
C(6A)-C(1A)-S(1A)	122,0(3)
C(3A)-C(2A)-C(1A)	120,3(3)
C(3A)-C(2A)-H(2A)	119,9
C(1A)-C(2A)-H(2A)	119,9
C(2A)-C(3A)-C(4A)	120,5(4)
C(2A)-C(3A)-N(2A)	116,9(3)
C(4A)-C(3A)-N(2A)	122,3(3)
C(5A)-C(4A)-C(3A)	118,9(4)
C(5A)-C(4A)-H(4A)	120,5
C(3A)-C(4A)-H(4A)	120,5
C(4A)-C(5A)-C(6A)	121,7(3)
C(4A)-C(5A)-H(5A)	119,1
C(6A)-C(5A)-H(5A)	119,1
C(5A)-C(6A)-N(1A)	120,6(3)
C(5A)-C(6A)-C(1A)	118,6(4)
N(1A)-C(6A)-C(1A)	120,8(4)
C(12A)-C(7A)-N(1A)	122,0(3)
C(12A)-C(7A)-C(8A)	118,7(5)
N(1A)-C(7A)-C(8A)	119,3(4)
C(9A)-C(8A)-C(7A)	120,2(5)
C(9A)-C(8A)-H(8A)	119,9
C(7A)-C(8A)-H(8A)	119,9
C(8A)-C(9A)-C(10A)	120,1(4)
C(8A)-C(9A)-H(9A)	120,0
C(10A)-C(9A)-H(9A)	120,0
C(9A)-C(10A)-C(11A)	120,6(5)
C(9A)-C(10A)-N(3A)	121,4(4)
C(11A)-C(10A)-N(3A)	117,8(4)
C(12A)-C(11A)-C(10A)	118,5(4)
C(12A)-C(11A)-H(11A)	120,7

ES 2 594 703 T3

C(10A)-C(11A)-H(11A)	120,7
C(7A)-C(12A)-C(11A)	121,8(4)
C(7A)-C(12A)-S(1A)	121,7(4)
C(11A)-C(12A)-S(1A)	116,2(3)
N(2A)-C(13A)-H(13A)	109,5
N(2A)-C(13A)-H(13B)	109,5
H(13A)-C(13A)-H(13B)	109,5
N(2A)-C(13A)-H(13C)	109,5
H(13A)-C(13A)-H(13C)	109,5
H(13B)-C(13A)-H(13C)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14A)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14B)	109,5
H(14A)-C(14A)-H(14B)	109,5
N(2A)-C(14A)-H(14C)	109,5
H(14A)-C(14A)-H(14C)	109,5
H(14B)-C(14A)-H(14C)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15A)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15B)	109,5
H(15A)-C(15A)-H(15B)	109,5
N(3A)-C(15A)-H(15C)	109,5
H(15A)-C(15A)-H(15C)	109,5
H(15B)-C(15A)-H(15C)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16H)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16I)	109,5
N(3A)-C(16A)-H(16J)	109,5
N(3A)-C(16')-H(16K)	109,5
N(3A)-C(16')-H(16L)	109,5
H(16K)-C(16')-H(16L)	109,5
N(3A)-C(16')-H(16M)	109,5
H(16K)-C(16')-H(16M)	109,5
H(16L)-C(16')-H(16M)	109,5
C(2B)-C(1B)-C(6B)	121,3(3)
C(2B)-C(1B)-S(1B)	116,9(2)
C(6B)-C(1B)-S(1B)	121,5(2)
C(1B)-C(2B)-C(3B)	118,7(3)
C(1B)-C(2B)-H(2B)	120,7
C(3B)-C(2B)-H(2B)	120,7
C(4B)-C(3B)-C(2B)	121,2(3)
C(4B)-C(3B)-N(2B)	118,7(3)
C(2B)-C(3B)-N(2B)	119,5(3)
C(3B)-C(4B)-C(5B)	119,7(3)
C(3B)-C(4B)-H(4B)	120,1
C(5B)-C(4B)-H(4B)	120,1
C(4B)-C(5B)-C(6B)	120,4(3)
C(4B)-C(5B)-H(5B)	119,8
C(6B)-C(5B)-H(5B)	119,8
N(1B)-C(6B)-C(1B)	122,5(3)
N(1B)-C(6B)-C(5B)	118,7(3)
C(1B)-C(6B)-C(5B)	118,7(3)
N(1B)-C(7B)-C(8B)	119,3(3)
N(1B)-C(7B)-C(12B)	121,7(3)
C(8B)-C(7B)-C(12B)	119,0(3)
C(7B)-C(8B)-C(9B)	120,9(3)
C(7B)-C(8B)-H(8B)	119,5
C(9B)-C(8B)-H(8B)	119,5
C(10B)-C(9B)-C(8B)	118,7(3)
C(0B)-C(9B)-H(9B)	120,6
C(8B)-C(9B)-H(9B)	120,6
C(9B)-C(10B)-C(11B)	121,4(3)
C(9B)-C(10B)-N(3B)	121,0(3)
C(11B)-C(10B)-N(3B)	117,4(3)
C(12B)-C(11B)-C(10B)	119,7(3)
C(12B)-C(11B)-H(11B)	120,1
C(10B)-C(11B)-H(11B)	120,1
C(11B)-C(12B)-C(7B)	120,2(3)
C(11B)-C(12B)-S(1B)	117,6(2)

ES 2 594 703 T3

C(7B)-C(12B)-S(1B)	121,8(2)
N(2B)-C(13B)-H(13D)	109,5
N(2B)-C(13B)-H(13E)	109,5
H(13D)-C(13B)-H(13E)	109,5
N(2B)-C(13B)-H(13F)	109,5
H(13D)-C(13B)-H(13F)	109,5
H(13E)-C(13B)-H(13F)	109,5
N(2B)-C(14B)-H(14D)	109,5
N(2B)-C(14B)-H(14E)	109,5
H(14D)-C(14B)-H(14E)	109,5
N(2B)-C(4B)-H(14F)	109,5
H(14D)-C(14B)-H(14F)	109,5
H(14E)-C(14B)-H(14F)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15D)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15E)	109,5
H(15D)-C(15B)-H(15E)	109,5
N(3B)-C(15B)-H(15F)	109,5
H(15D)-C(15B)-H(15F)	109,5
H(15E)-C(15B)-H(15F)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16A)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16B)	109,5
H(16A)-C(16B)-H(16B)	109,5
N(3B)-C(16B)-H(16C)	109,5
H(16A)-C(16B)-H(16C)	109,5
H(16B)-C(16B)-H(16C)	109,5
S(1)-C(1S)-H(1S1)	109,5
S(1)-C(1S)-H(1S2)	109,5
H(1S1)-C(1S)-H(1S2)	109,5
S(1)-C(1S)-H(1S3)	109,5
H(1S1)-C(1S)-H(1S3)	109,5
H(1S2)-C(1S)-H(1S3)	109,5
S(2)-C(2S)-H(2S1)	109,5
S(2)-C(2S)-H(2S2)	109,5
H(2S1)-C(2S)-H(2S2)	109,5
S(2)-C(2S)-H(2S3)	109,5
H(2S1)-C(2S)-H(2S3)	109,5
H(2S2)-C(2S)-H(2S3)	109,5
S(3)-C(3S)-H(3S1)	109,5
S(3)-C(3S)-H(3S2)	109,5
H(3S1)-C(3S)-H(3S2)	109,5
S(3)-C(3S)-H(3S3)	109,5
H(3S1)-C(3S)-H(3S3)	109,5
H(3S2)-C(3S)-H(3S3)	109,5
S(4)-C(4S)-H(4S1)	109,5
S(4)-C(4S)-H(4S2)	109,5
H(4S1)-C(4S)-H(4S2)	109,5
S(4)-C(4S)-H(4S3)	109,5
H(4S1)-C(4S)-H(4S3)	109,5
H(4S2)-C(4S)-H(4S3)	109,5
C(6A)-N(1A)-C(7A)	124,8(3)
C(6A)-N(1A)-H(1A)	117,6
C(7A)-N(1A)-H(1A)	117,6
C(3A)-N(2A)-C(14A)	110,2(3)
C(3A)-N(2A)-C(13A)	114,9(3)
C(14A)-N(2A)-C(13A)	111,1(3)
C(3A)-N(2A)-H(2A1)	106,7
C(14A)-N(2A)-H(2A1)	106,7
C(13A)-N(2A)-H(2A1)	106,7
C(15A)-N(3A)-C(10A)	111,1(3)
C(15A)-N(3A)-C(16A)	130,2(6)
C(10A)-N(3A)-C(16A)	101,3(4)
C(15A)-N(3A)-C(16')	102,0(5)
C(10A)-N(3A)-C(16')	119,1(4)
C(16A)-N(3A)-C(16')	28,2(3)
C(15A)-N(3A)-H(3A)	103,9
C(10A)-N(3A)-H(3A)	103,9

ES 2 594 703 T3

C(16A)-N(3A)-H(3A)	103,9
C(16')-N(3A)-H(3A)	116,0
C(6B)-N(1B)-C(7B)	125,8(3)
C(6B)-N(1B)-H(1B)	117,1
C(7B)-N(1B)-H(1B)	117,1
C(3B)-N(2B)-C(13B)	114,9(2)
C(3B)-N(2B)-C(14B)	109,1(2)
C(13B)-N(2B)-C(14B)	111,1(3)
C(3B)-N(2B)-H(2B1)	107,1
C(13B)-N(2B)-H(2B1)	107,1
C(14B)-N(2B)-H(2B1)	107,1
C(10B)-N(3B)-C(15B)	114,9(2)
C(10B)-N(3B)-C(16B)	110,6(2)
C(15B)-N(3B)-C(16B)	110,8(2)
C(10B)-N(3B)-H(3B)	106,7
C(15B)-N(3B)-H(3B)	106,7
C(16B)-N(3B)-H(3B)	106,7
O(1S')-S(1)-O(2S)	131,2(3)
O(1S')-S(1)-O(3S')	123,5(3)
O(2S)-S(1)-O(3S')	25,1(2)
O(1S')-S(1)-O(3S)	71,7(3)
O(2S)-S(1)-O(3S)	110,8(3)
O(3S')-S(1)-O(3S)	134,9(3)
O(1S')-S(1)-O(2S')	116,5(3)
O(2S)-S(1)-O(2S')	84,3(3)
O(3S')-S(1)-O(2S')	107,5(3)
O(3S)-S(1)-O(2S')	45,0(2)
O(1S')-S(1)-O(1S)	33,5(2)
O(2S)-S(1)-O(1)	109,1(3)
O(3S')-S(1)-O(1S)	93,0(3)
O(3S)-S(1)-O(1S)	103,3(3)
O(2S')-S(1)-O(1S)	148,0(3)
O(1S')-S(1)-C(1S)	107,0(2)
O(2S)-S(1)-C(1S)	114,7(2)
O(3S')-S(1)-C(1S)	102,3(2)
O(3S)-S(1)-C(1S)	113,6(2)
O(2S')-S(1)-C(1S)	95,2(2)
O(1S)-S(1)-C(1S)	104,4(2)
O(4S)-S(2)-O(5S)	112,76(15)
O(4S)-S(2)-O(6S)	111,68(16)
O(5S)-S(2)-O(6S)	112,07(17)
O(4S)-S(2)-C(2S)	108,24(17)
O(5S)-S(2)-C(2S)	106,71(17)
O(6S)-S(2)-C(2S)	104,86(16)
O(9S)-S(3)-O(7S)	112,41(17)
O(9S)-S(3)-O(8S)	113,91(16)
O(7S)-S(3)-O(8S)	111,12(14)
O(9S)-S(3)-C(3S)	105,99(19)
O(7S)-S(3)-C(3S)	107,38(18)
O(8S)-S(3)-C(3S)	105,42(16)
O(11S)-S(4)-O(12S)	112,8(2)
O(11S)-S(4)-O(10S)	114,1(2)
O(12S)-S(4)-O(10S)	110,8(2)
O(11S)-S(4)-C(4S)	106,2(3)
O(12S)-S(4)-C(4S)	107,6(2)
O(10S)-S(4)-C(4S)	104,6(2)
C(1A)-S(1A)-C(12A)	100,76(19)
C(12B)-S(1B)-C(1B)	101,93(14)

Transformaciones simétricas usadas para generar átomos equivalentes:

Tabla 4. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para eull_0m. El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2[h^2a^2U^{11} + \dots + 2hka^*b^*U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C(1A)	22(1)	45(2)	19(1)	2(1)	1(1)	21(1)
C(2A)	17(1)	41(2)	20(1)	4(1)	0(1)	14(1)
C(3A)	19(1)	46(2)	15(1)	2(1)	1(1)	12(1)
C(4A)	19(1)	57(2)	19(1)	-4(1)	2(1)	12(1)
C(5A)	19(1)	66(2)	20(1)	-6(1)	-2(1)	21(1)
C(6A)	23(1)	59(2)	17(1)	-4(1)	-2(1)	26(1)
C(7A)	75(2)	90(2)	15(1)	8(2)	5(1)	73(2)
C(8A)	86(2)	98(2)	19(1)	6(2)	0(1)	83(2)
C(9A)	101(2)	92(2)	20(2)	6(2)	-2(2)	86(2)
C(10A)	100(2)	76(2)	18(1)	9(1)	3(2)	78(2)
C(11A)	86(2)	71(2)	16(1)	14(1)	7(1)	69(2)
C(12A)	75(2)	75(2)	15(1)	15(1)	8(1)	67(2)
C(13A)	27(2)	44(2)	20(2)	8(2)	4(2)	-3(2)
C(14A)	39(2)	30(2)	25(2)	7(2)	10(2)	5(2)
C(15A)	104(4)	34(2)	28(2)	4(2)	-10(2)	34(3)
C(1B)	17(1)	22(1)	18(1)	4(1)	3(1)	10(1)
C(2B)	21(1)	22(1)	18(1)	6(1)	4(1)	10(1)
C(3B)	19(1)	23(1)	19(1)	5(1)	4(1)	10(1)
C(4B)	20(1)	23(1)	22(1)	6(1)	3(1)	12(1)
C(5B)	22(1)	21(1)	24(1)	7(1)	4(1)	11(1)
C(6B)	18(1)	22(1)	23(1)	5(1)	6(1)	10(1)
C(7B)	21(1)	20(1)	23(1)	6(1)	6(1)	11(1)
C(8B)	23(1)	19(1)	26(1)	6(1)	6(1)	11(1)
C(9B)	21(1)	19(1)	26(1)	5(1)	7(1)	9(1)
C(10B)	19(1)	21(1)	19(1)	3(1)	4(1)	10(1)
C(11B)	20(1)	21(1)	20(1)	5(1)	5(1)	10(1)
C(12B)	18(1)	20(1)	20(1)	6(1)	5(1)	8(1)
C(13B)	21(2)	30(2)	24(2)	10(2)	4(1)	7(1)
C(14B)	24(2)	26(2)	21(2)	0(1)	0(1)	6(1)
C(15B)	24(2)	22(2)	25(2)	0(1)	0(1)	8(1)
C(16B)	27(2)	31(2)	27(2)	0(2)	2(1)	18(2)
C(1S)	33(2)	49(2)	28(2)	7(2)	0(2)	20(2)
C(2S)	35(2)	29(2)	26(2)	2(2)	-6(2)	12(2)
C(3S)	62(3)	44(2)	31(2)	12(2)	9(2)	40(2)
C(4S)	95(4)	51(3)	30(2)	16(2)	22(2)	11(3)
N(1A)	42(2)	88(3)	23(2)	2(2)	-6(1)	52(2)
N(2A)	20(1)	32(2)	19(1)	5(1)	2(1)	0(1)
N(3A)	159(4)	58(2)	17(2)	1(2)	-12(2)	84(3)
N(1B)	18(1)	25(1)	34(2)	17(1)	7(1)	9(1)
N(2B)	17(1)	25(1)	21(1)	6(1)	2(1)	10(1)
N(3B)	18(1)	20(1)	21(1)	2(1)	1(1)	8(1)
O(4S)	39(2)	25(1)	33(1)	10(1)	12(1)	9(1)
O(5S)	37(2)	35(2)	34(2)	0(1)	14(1)	10(1)
O(6S)	30(1)	27(1)	54(2)	14(1)	-11(1)	8(1)
O(7S)	27(1)	48(2)	42(2)	28(1)	16(1)	22(1)
O(8S)	33(1)	42(1)	34(1)	23(1)	13(1)	25(1)
O(9S)	33(2)	28(1)	53(2)	7(1)	-5(1)	3(1)
O(10S)	96(2)	27(1)	26(1)	4(1)	-11(2)	24(2)
O(11S)	84(3)	128(3)	45(2)	25(2)	15(2)	82(3)
O(12S)	43(2)	54(2)	28(2)	2(1)	-5(1)	-11(1)
S(1)	21(1)	19(1)	45(1)	13(1)	-12(1)	5(1)
S(2)	23(1)	22(1)	20(1)	5(1)	3(1)	9(1)
S(3)	19(1)	22(1)	28(1)	10(1)	6(1)	11(1)
S(4)	29(1)	22(1)	18(1)	6(1)	2(1)	4(1)
S(1A)	29(1)	43(1)	39(1)	19(1)	5(1)	26(1)
S(1B)	17(1)	22(1)	39(1)	15(1)	1(1)	7(1)

Tabla 5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópicos ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) para eull_0m.

	x	y	z	U (equiv.)
H(2A)	1662	7847	2452	32
H(4A)	5495	10304	2671	45
H(5A)	6007	9108	3318	47
H(8A)	5053	5489	4110	66
H(9A)	3662	3536	4304	69
H(11A)	536	3874	3547	54
H(13A)	4800	11131	1827	58
H(13B)	3517	10752	1260	58
H(13C)	4057	9728	1211	58
H(14A)	2513	10627	3064	54
H(14B)	2623	11370	2445	54
H(14C)	3910	11643	2966	54
H(15A)	1173	3266	5213	84
H(15B)	-13	1828	4928	84
H(15C)	-105	2958	4669	84
H(16H)	-60	541	3357	32
H(16I)	1086	1487	3019	32
H(16J)	-179	1679	3122	32
H(16K)	-683	569	3701	56
H(16L)	94	977	3039	56
H(16M)	-708	1698	3407	56
H(2B)	301	2081	1708	24
H(4B)	-1035	4090	775	25
H(5B)	1095	5709	911	26
H(8B)	5567	7602	1559	27
H(9B)	7524	7850	2158	27
H(11B)	5531	4439	2601	24
H(13D)	-1727	843	1744	41
H(13E)	-3189	582	1529	41
H(13F)	-2161	1901	2148	41
H(14D)	-1922	1307	-87	41
H(14E)	-2973	184	197	41
H(14F)	-1468	547	355	41
H(15D)	9282	8071	2855	39
H(15E)	9634	7519	3485	39
H(15F)	8555	8004	3570	39
H(16A)	7739	4713	1898	43
H(16B)	9145	5506	2426	43
H(16C)	8752	6089	1829	43
H(1S1)	4324	513	5083	56
H(1S2)	3770	163	4204	56
H(1S3)	3106	-863	4655	56
H(2S1)	8396	8376	210	50
H(2S2)	8124	7229	571	50
H(2S3)	9237	7616	64	50
H(3S1)	5170	3997	-144	60
H(3S2)	6146	4646	652	60
H(3S3)	4661	3623	594	60
H(4S1)	6520	2129	4255	100
H(4S2)	5930	3121	4436	100
H(4S3)	7389	3569	4811	100
H(1A)	5282	7506	3975	55
H(2A1)	2289	9350	1848	35
H(3A)	1596	2011	4279	82
H(1B)	3327	6282	1083	29
H(2B1)	-2456	2212	994	26
H(3B)	7679	5766	3119	25

Referencias:

- 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.
- Andersen, P. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase

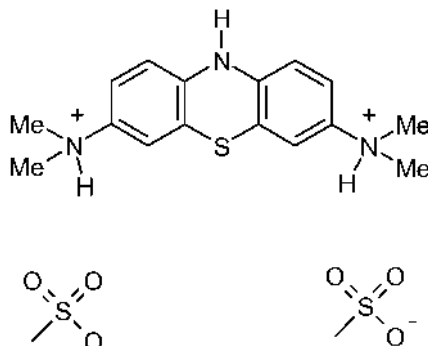
- gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 6, 37-46.
- Arai, T., Hasegawa, M., Nonaka, T., Kametani, F., Yamashita, M., Hosokawa, M., Niizato, K., Tsuchiya, K., Kobayashi, Z., Ikeda, K., Yoshida, M., Onaya, M., Fujishiro, H. & Akiyama, H. (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 30, 170-181.
- 5 Askanas, V., Engel, W.K. & Nogalska, A. (2009) Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathology* 19, 493-506.
- Barmada, S.J., Skibinski, G., Korb, E., Rao, E.J., Wu, J.Y. & Finkbeiner, S. (2010) Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience* 30, 639-649.
- 10 Blair, I.P., Williams, K.L., Warraich, S.T., Durnall, J.C., Thoeng, A.D., Manavis, J., Blumbergs, P.C., Vucic, S., Kiernan, M.C. & Nicholson, G.A. (2010) FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 81, 639-645.
- 15 Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C.F. & Pepys, M.B. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385, 787-793.
- Byrne, S., Walsh, C., Lynch, C., Bede, P., Elamin, M., Kenna, K., McLaughlin, R. & Hardiman, O. (2011) Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82, 623-627.
- 20 Carrell, R.W. & Gooptu, B. (1998) Conformational changes and disease - serpins, prions and Alzheimer's. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 799-809.
- Chen-Plotkin, A.S., Lee, V.M.Y. & Trojanowski, J.Q. (2010) TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* 6, 211-220.
- 25 Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Estados Unidos* 96, 3590-3594.
- Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., Morrison, K.E., Wharton, S.B., Grierson, A.J., Ince, P.G., Kirby, J. & Shaw, P.J. (2010) Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLOS One* 5, e9872.
- 30 Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* 60, 363-384.
- 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.
- 35 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.
- 40 Dische, F.E., Wernstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. & Watkins, P.J. (1988) Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. *Diabetologia* 31, 158-161.
- Elden, A.C., Kim, H.-J., Hart, M.P., Chen-Plotkin, A.S., Johnson, B.S., Fang, X., Armarkola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M.M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juhr, D., Gruber, P.J., Rub, U., Auburger, G., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., Van Deerlin, V.M., Bonini, N.M. & Gitler, A.D. (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466, 1069-1075.
- 45 Finsterer, J. (2009) Mitochondrial disorders, cognitive impairment and dementia. *J. Neurol. Sci.* 283:143-148
- Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D.H., Abriél, 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, Estados Unidos* 89, 10940-10944.
- 50 Gendron, T.F., Josephs, K.A. & Petrucelli, L. (2010) Review: Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36, 97-112.
- Geser, F., Lee, V.M.-Y. & Trojanowski, J.Q. (2010) Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: A spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology* 30, 103-112.
- 55 Gitcho, M.A., Baloh, R.H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J.B., Levitch, D., Hatanpaa, K.J., White, C.L., III, Bigio, E.H., Caselli, R., Baker, M., Al-Lozi, M.T., Morris, J.C., Pestronk, A., Rademakers, R., Goate, A.M. & Cairns, N.J. (2008) TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Annals of Neurology* 63, 535-538. Glenner, 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.
- 60 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.
- 65 Gorevic, P.D., Casey, T.T., Stone, W.J., DiRaimondo, C.R., Prelli, F.C. & Frangione, B. (1985) b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *Journal of Clinical Investigation* 76, 2425-2429.
- Gustavsson, A., Engstrom, U. & Westermark, P. (1991) Normal transthyretin and synthetic transthyretin fragments

- form amyloid-like fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 1159-1164.
- Higashi, S., Tsuchiya, Y., Araki, T., Wada, K. & Kabuta, T. (2010) TDP-43 physically interacts with amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochemistry International* 57, 906-913.
- 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.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Chen-Plotkin, A., Winton, M.J., Unger, T.L., Xu, Y., Neumann, M., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.Y. (2009) Expression of TDP-43 C-terminal fragments in vitro recapitulates pathological features of TDP-43 proteinopathies. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8516-8524.
- Jinwal, UK, Miyata, Y., Koren, J, III, Jones, JR, Trotter, JH et al. (2009) Chemical manipulation of Hsp70 ATPase activity regulates tau stability. *J. Neurosci.* 29:12079-12088
- Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P. (1987) Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1087-1092.
- Johnson, B.S., McCaffery, J.M., Lindquist, S. & Gitler, A.D. (2008) A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 6439-6444.
- Johnson, B.S., Snead, D., Lee, J.J., McCaffery, J.M., Shorter, J. & Gitler, A.D. (2009) TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 284, 20329-20339.
- Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D.G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J.C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y.-D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurro, M.R., Battistini, S., Salvi, F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G., Galassi, G., Scholz, S.W., Taylor, J.P., Restagno, G., Chio, A. & Traynor, B.J. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857-864.
- Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M.L., Dion, P.A., Bercier, V., Bourguoin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H.D., Velde, C.V., Rouleau, G.A. & Drapeau, P. (2010) Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Human Molecular Genetics* 19, 671-683.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Velde, C.V., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.-F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N. & Rouleau, G.A. (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics* 40, 572-574.
- Ling, S.-C., Albuquerque, C.P., Han, J.S., Lagier-Tourenne, C., Tokunaga, S., Zhou, H. & Cleveland, D.W. (2010) ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 13318-13323.
- Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T. & Carrell, R.W. (1992) The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.
- Love, S., Bridges, L.R. & Case, C.P. (1995) Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain* 118, 119-129.
- Mackenzie, I.R.A., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H.A., Monoranu, C.M., Highley, J.R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P.J., Lee, V.M.Y. & Trojanowski, J.Q. (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology* 61,427-434.
- Mackenzie, I.R.A., Rademakers, R. & Neumann, M. (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology* 9, 995-1007.
- Maury, C.P. & Baumann, M. (1990) Isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV (Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1096, 84-86.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, A., Robert, P.H., Albert, M., Boone, K., Miller, B.L., Cummings, J. & Benson, D.F. (1998) Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51, 1546-1554.
- Neumann, M. (2009) Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 232-246.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Masliah, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H.A., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.Y. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130-133.
- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H. & Hasegawa, M. (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Human Molecular Genetics* 18, 3353-3364.
- Ohmi, K., Kudo, L.C., Ryazantsev, S., Zhao, H.-Z., Karsten, S.L. & Neufeld, E.F. (2009) Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 8332-8337.
- Orr, H.T. & Zoghbi, H.Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annual Review of Neuroscience* 30, 575-621.

- Paulson, H.L. (1999) Human genetics '99: trinucleotide repeats. *American Journal of Human Genetics* 64, 339-345.
- Pepys, M.B., Hawkins, P.N., Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C.F., Terry, C.J., Feest, T.G., Zalin, A.M. & Hsuan, J.J. (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362, 553-557.
- 5 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.
- 10 Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.
- Seetharaman, S.V., Prudencio, M., Karch, C., Holloway, S.P., Borchelt, D.R. & Hart, P.J. (2009) Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Biology and Medicine* 234, 1140-1154.
- 15 Seilhean, D., Cazeneuve, C., Thuries, V., Russaouen, O., Millecamps, S., Salachas, F., Meininger, V., LeGuern, E. & Duyckaerts, C. (2009) Accumulation of TDP-43 and α -actin in an amyotrophic lateral sclerosis patient with the K171 ANG mutation *Acta Neuropathologica* 118, 561-573.
- 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.
- 20 Sletten, K., Westerm ark, P. & Natvig, J.B. (1976) Characterization of amyloid fibril proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *Journal of Experimental Medicine* 143, 993-998.
- 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, Estados Unidos* 95, 6469-6473.
- 25 Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G. & Shaw, C.E. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668-1672.
- Uemichi, T., Liuepnicks, J.j. & Benson, M.D. (1994) Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 93, 731-736.
- 30 van Bebber, F., Paquet, D., Hruscha, A., Schmid, B. & Haass, C. (2010) Methylene blue fails to inhibit Tau and polyglutamine protein dependent toxicity in zebrafish. *Neurobiology of Disease* 39, 265-271.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K.L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J.-M., Miller, C.C. & Shaw, C.E. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208-1211.
- 35 Westerm ark, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westerm ark, G.T. & Betsholtz, C. (1990) Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Estados Unidos* 87, 5036-5040.
- Westerm ark, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P. (1985) Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis. *Applied Physiology* 3, 55-68.
- 40 Westerm ark, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholtz, C. (1992) Islet amyloid polypeptide - a novel controversy in diabetes research. *Diabetologia* 35, 297-303.
- Wijesekera, L. & Leigh, P.N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4, 3.
- 45 Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, 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, Estados Unidos* 85, 4506-4510.
- Yamashita, M., Nonaka, T., Arai, T., Kametani, F., Buchman, V.L., Ninkina, N., Bachurin, S.O., Akiyama, H., Goedert, M. & Hasegawa, M. (2009) Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Letters* 583, 2419-2424.
- 50 Zhang, Y.-J., Xu, Y.-F., Cook, C., Gendron, T.F., Roettges, P., Link, C.D., Lin, W.-L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., Gass, J., Rangachari, V., Buratti, E., Baralle, F., Golde, T.E., Dickson, D.W. & Petrucelli, L. (2009) Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7607-7612.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es de la siguiente fórmula:



5

o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en un método de tratamiento o profilaxis del cuerpo humano o animal mediante terapia.

- 10 2. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que está en forma cristalina.
3. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que está en forma sustancialmente purificada.
- 15 4. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está presente en una composición que comprende el compuesto y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha composición es una composición farmacéutica que es una forma de dosificación sólida que comprende el compuesto y al menos un diluyente adecuado para la compresión en seco.
- 20 6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la forma de dosificación sólida se produce mediante compresión directa o mediante granulación en seco.
- 25 7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que dicho al menos un diluyente se selecciona de celulosa microcristalina, lactosa, manitol, sales de calcio, tales como fosfato dibásico de calcio, sulfato de calcio y carbonato de calcio, y azúcares tales como lactosa, sacarosa, dextrosa y maltodextrina.
- 30 8. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicha composición comprende además al menos un disgregante.
9. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el disgregante se selecciona de polivinilpirrolidona reticulada, glicolato de almidón sódico, carboximetilcelulosa sódica reticulada o almidón pregelatinizado.
- 35 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la forma de dosificación sólida está recubierta de película.
- 40 11. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que dicha composición comprende además un ácido que tiene un pK1 mayor de 1,5.
12. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el ácido se selecciona de ácido maleico, ácido fosfórico, ácido ascórbico, ácido sórbico, ácido aspártico y ácido siálico.
- 45 13. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que dicha composición comprende además un vehículo seleccionado de manitol, un material celulósico, un almidón o mezclas de los mismos.
14. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, **caracterizado por que** dicha composición comprende partículas de las cuales más del 10 % tiene un tamaño superior a 10 micrómetros.
- 50 15. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una proteinopatía TDP-43.

16. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una tauopatía.
- 5 17. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT), DFT con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, síndromes de degeneración lobular frontotemporal (DLFT); complejo de desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia, degeneración palidopontonigra (DPPN), síndrome de Guam-ELA, degeneración palidonigroluisiana (DPNL), degeneración córticobasal, demencia con granos argirófilos, demencia del púgil
- 10 encefalopatía traumática crónica, síndrome de Down, demencia con cuerpos de Lewy, panencefalitis esclerosante subaguda, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Niemann-pick, tipo C, síndrome de Sanfilippo de tipo B, distrofias miotónicas DM1 o DM2, o esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 15 18. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer.
19. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Parkinson.
- 20 20. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de PSP, ELA o DLFT.
- 25 21. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de un trastorno de poliglutamina.
22. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Huntington, atrofia muscular bulbar espinal, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana o ataxias espinocerebelosas.
- 30 23. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de cáncer de piel o melanoma; o una patología vírica, bacteriana o protozoica.
24. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la enfermedad vírica, bacteriana o protozoica se selecciona de hepatitis C, VIH, virus del Nilo Occidental (VNO) y malaria.
- 35 25. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que en dichos tratamiento o profilaxis el compuesto se administra por vía oral.
- 40 26. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, en el que la composición es un comprimido o una cápsula.

Figura 1:

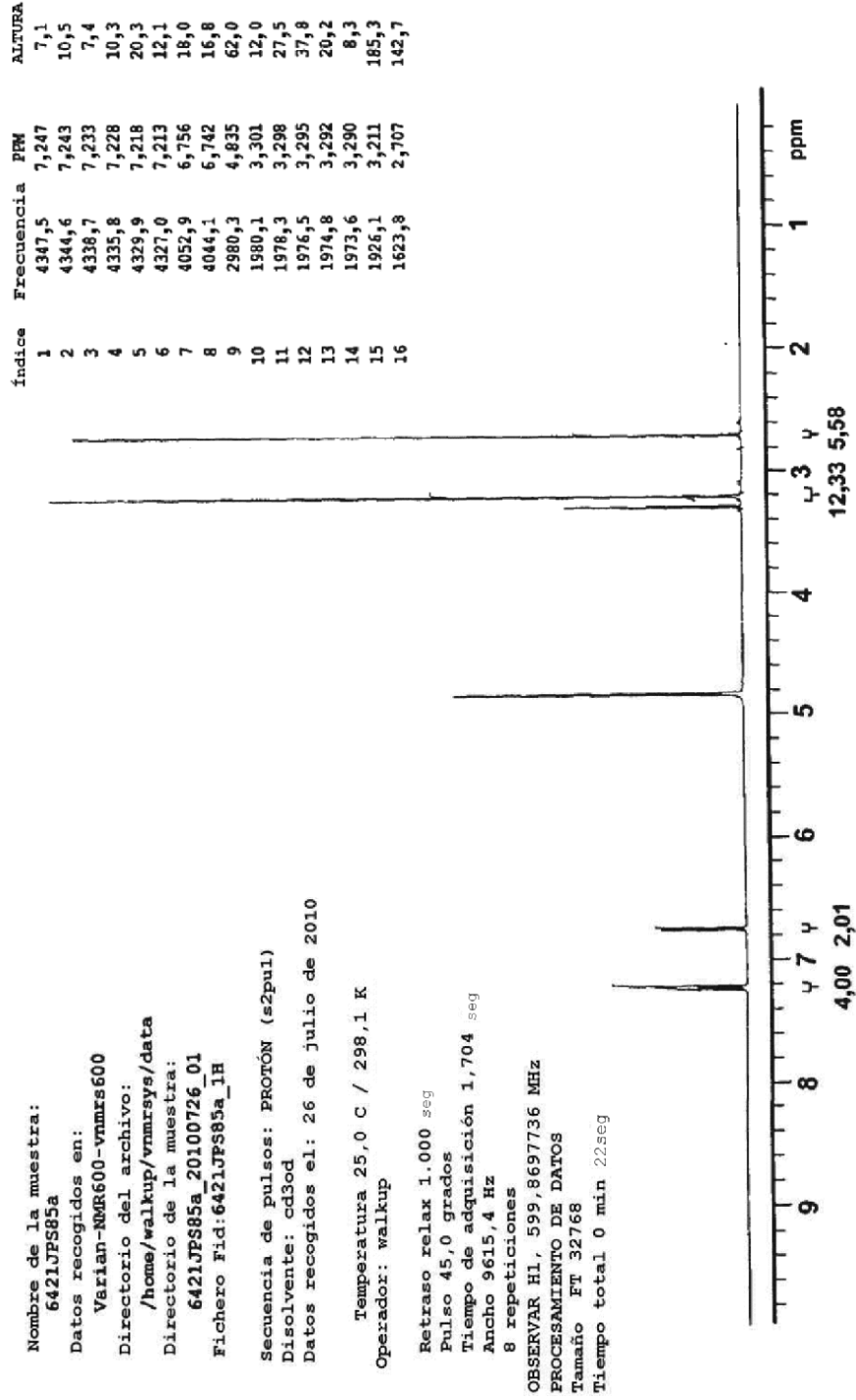


Figura 2:

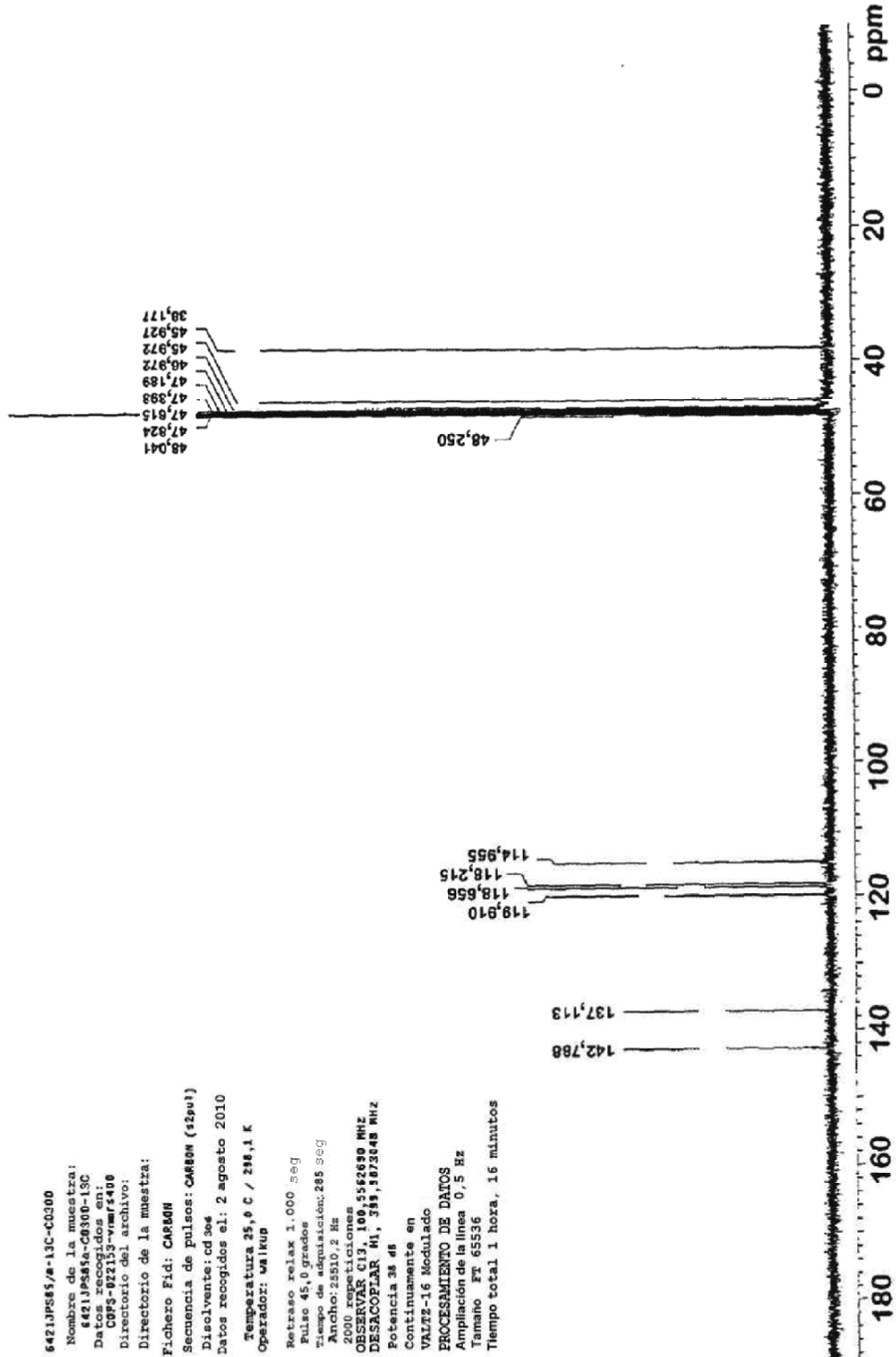


Figura 3:

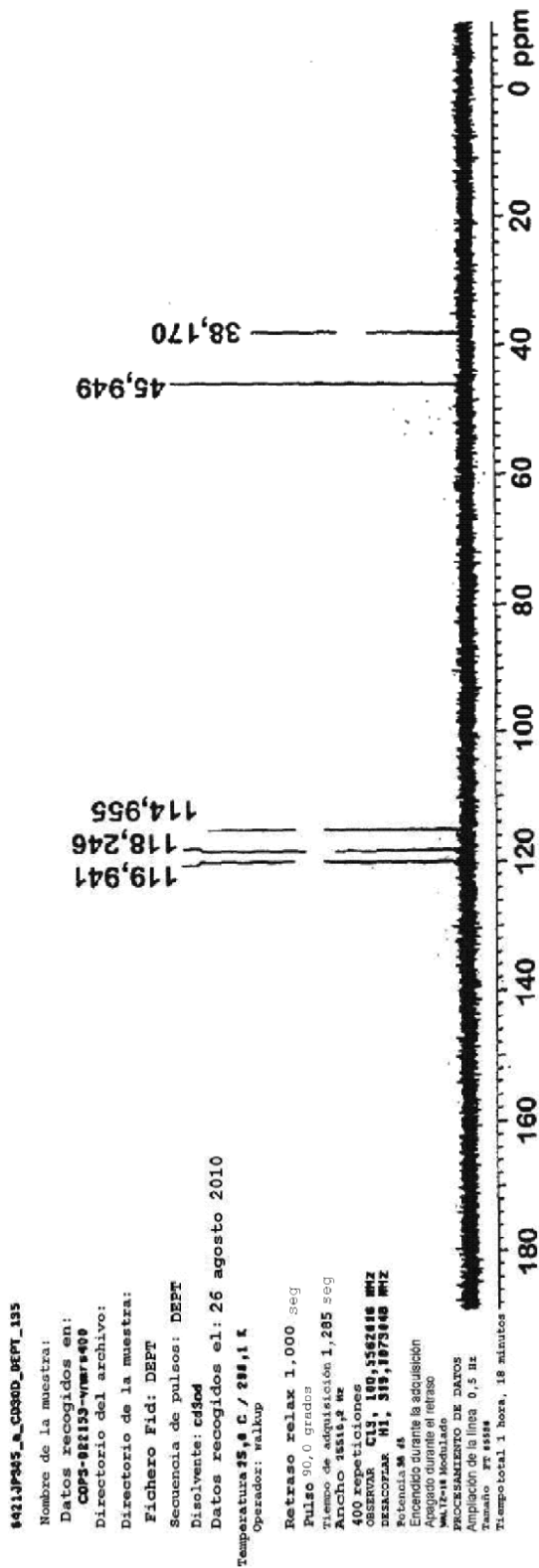


Figura 4:

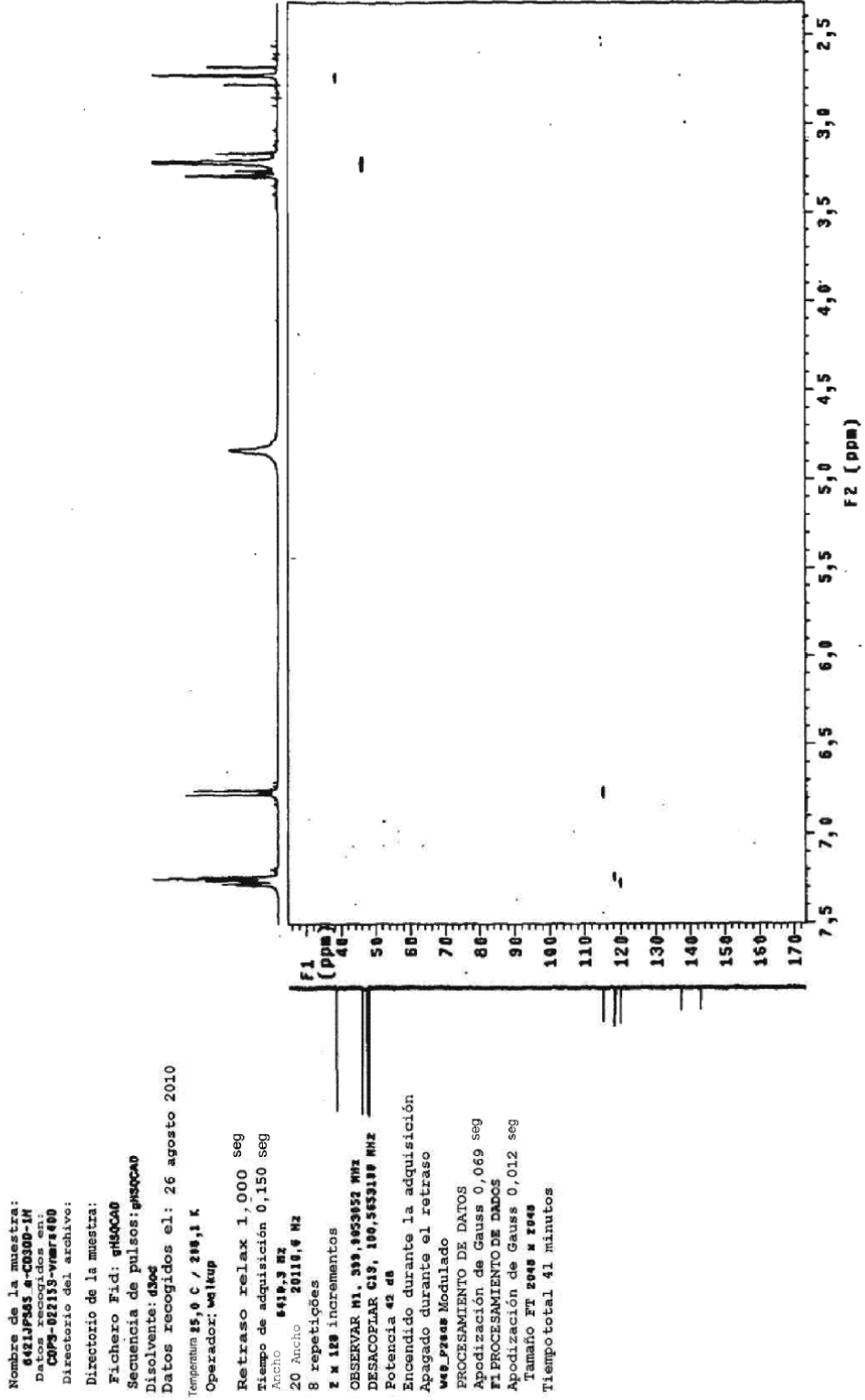


Figura 5:

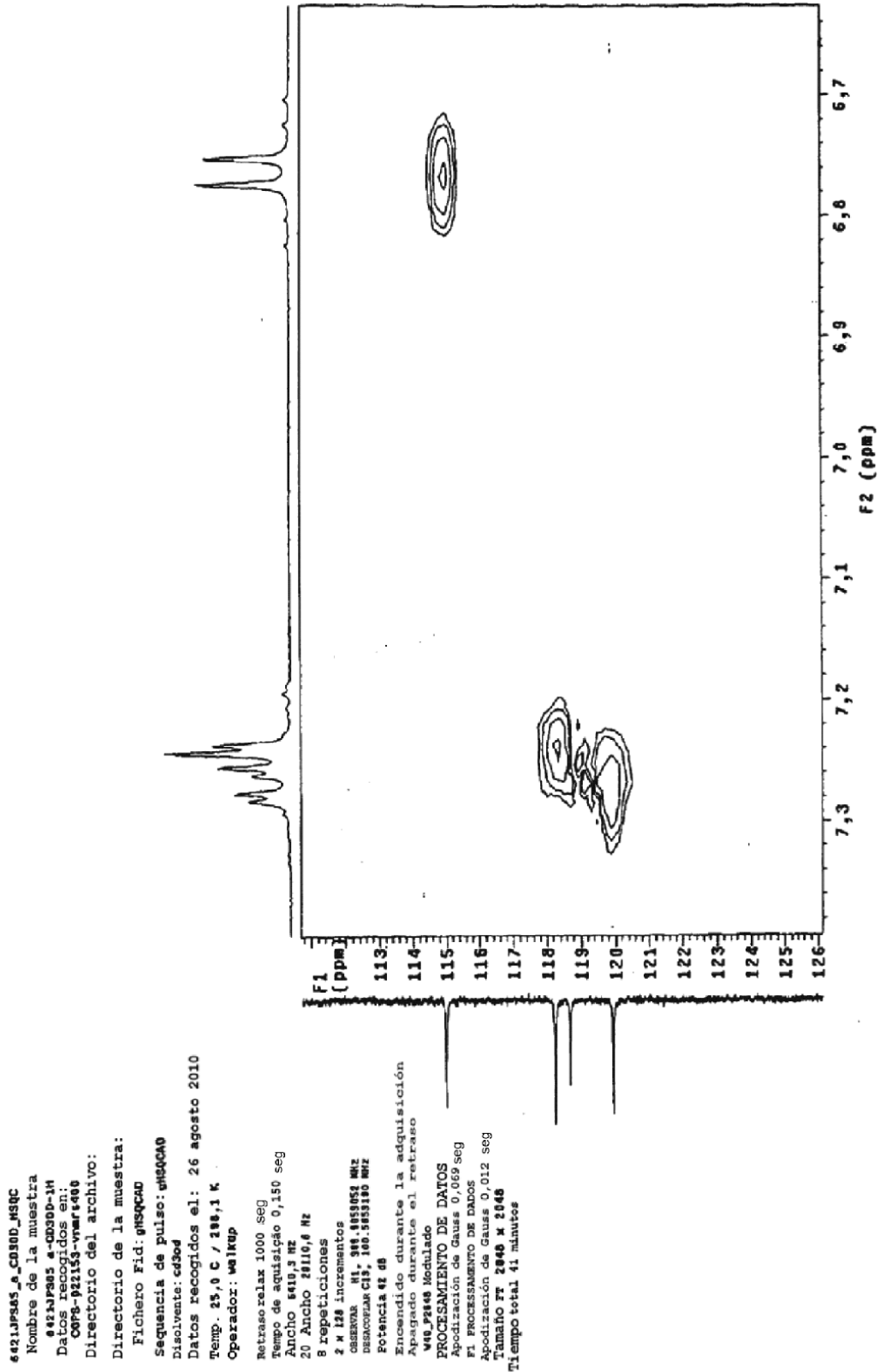
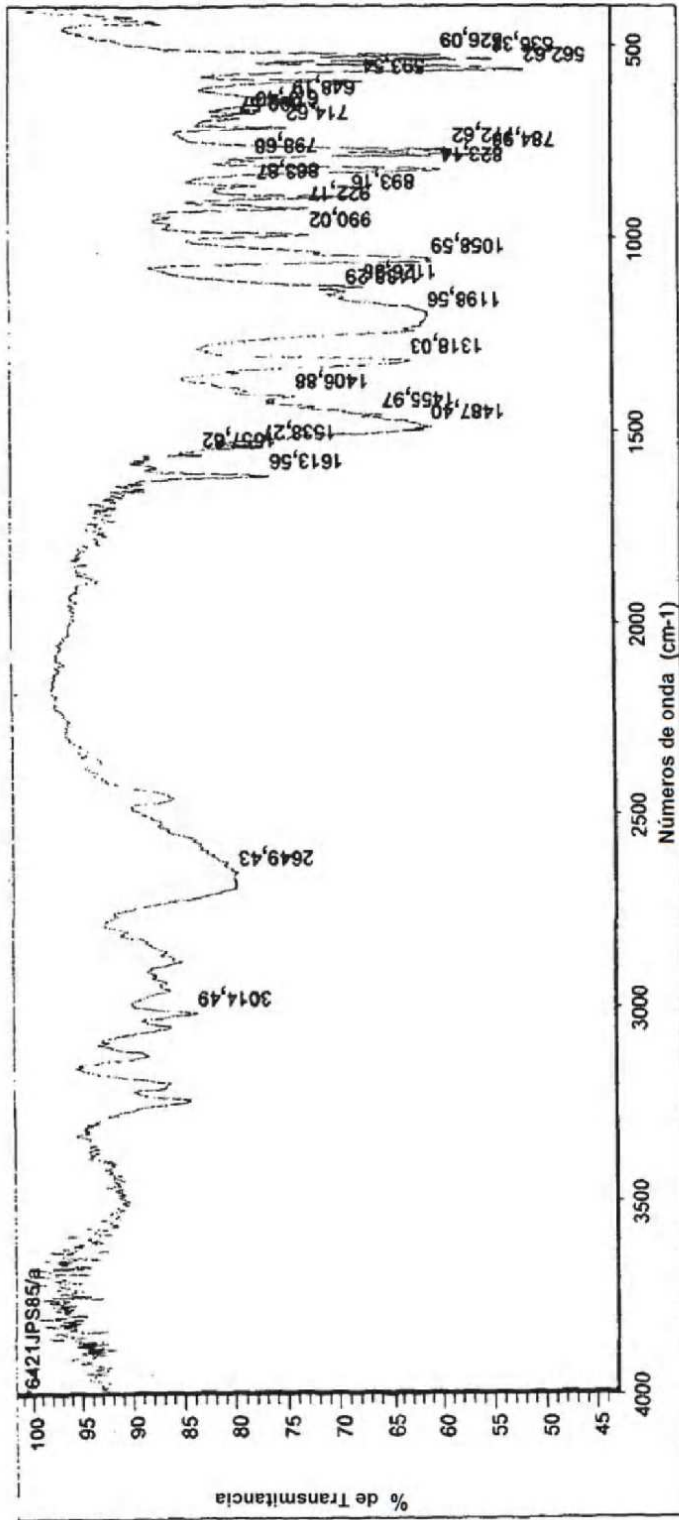


Figura 6:



Lunes 3 de mayo de 2010 00:42:11

ENCONTRAR PICOS:

Espectro: *6421JPS85/a
 Región: 4000,00 400,00
 Umbral absoluto: 84,166
 Sensibilidad: 50

Lista de picos:

Posición: 526,09	Intensidad: 59,505
Posición: 536,32	Intensidad: 54,578
Posición: 562,62	Intensidad: 51,500
Posición: 593,54	Intensidad: 87,112
Posición: 648,19	Intensidad: 73,812
Posición: 677,40	Intensidad: 77,342
Posición: 690,57	Intensidad: 78,882

JPS
 20 Julio 2010
 [Nicolet IR100]

Figura 7:

Fichero :26ABERDEN02 Ident:34+35 Mer Def 0.25 Acq : 2-JUL-2010 15:51:11 +1:40 Cal:PFK250610A
AutoSpecE EI+ Iman BpM:285 BpI:3649536 TIC:27582534 Flags:HALL
Texto del archivo S. Clunas 6421JPS85/a

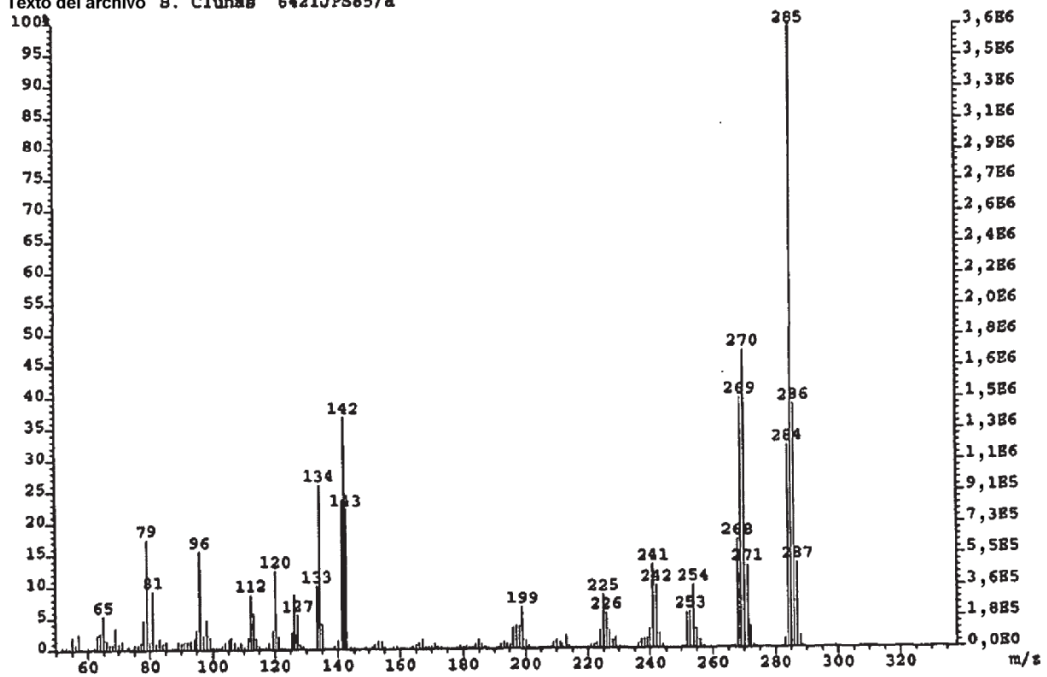


Figura 8:

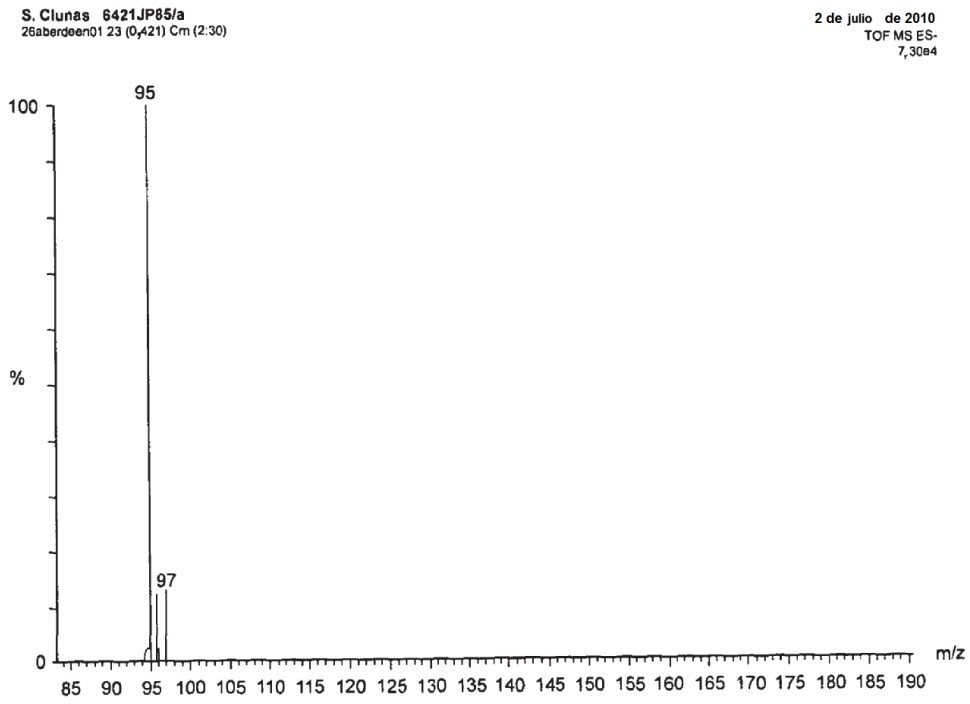


Figura 9:

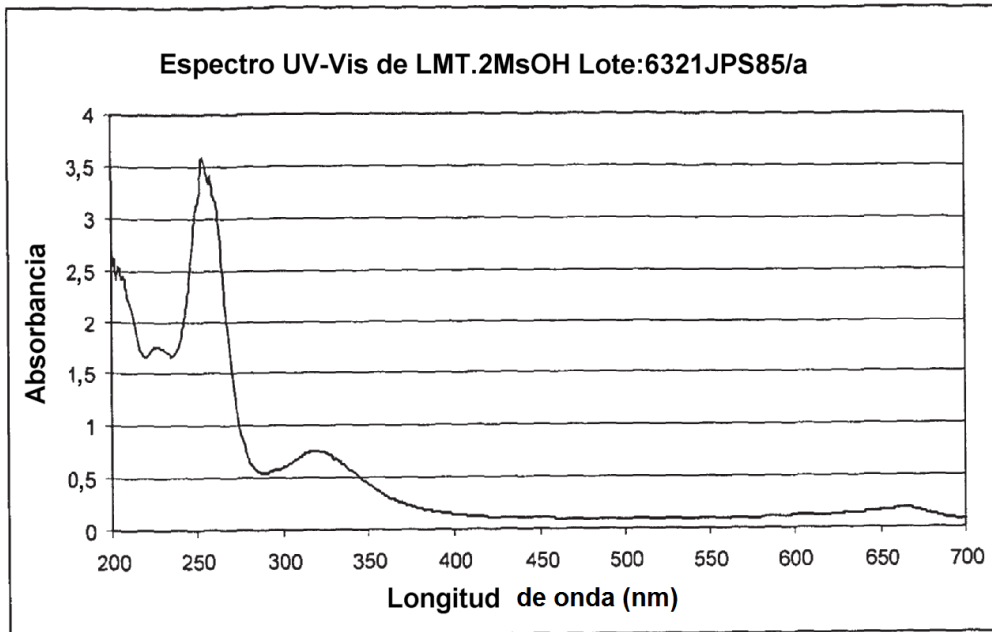


Figura 10:

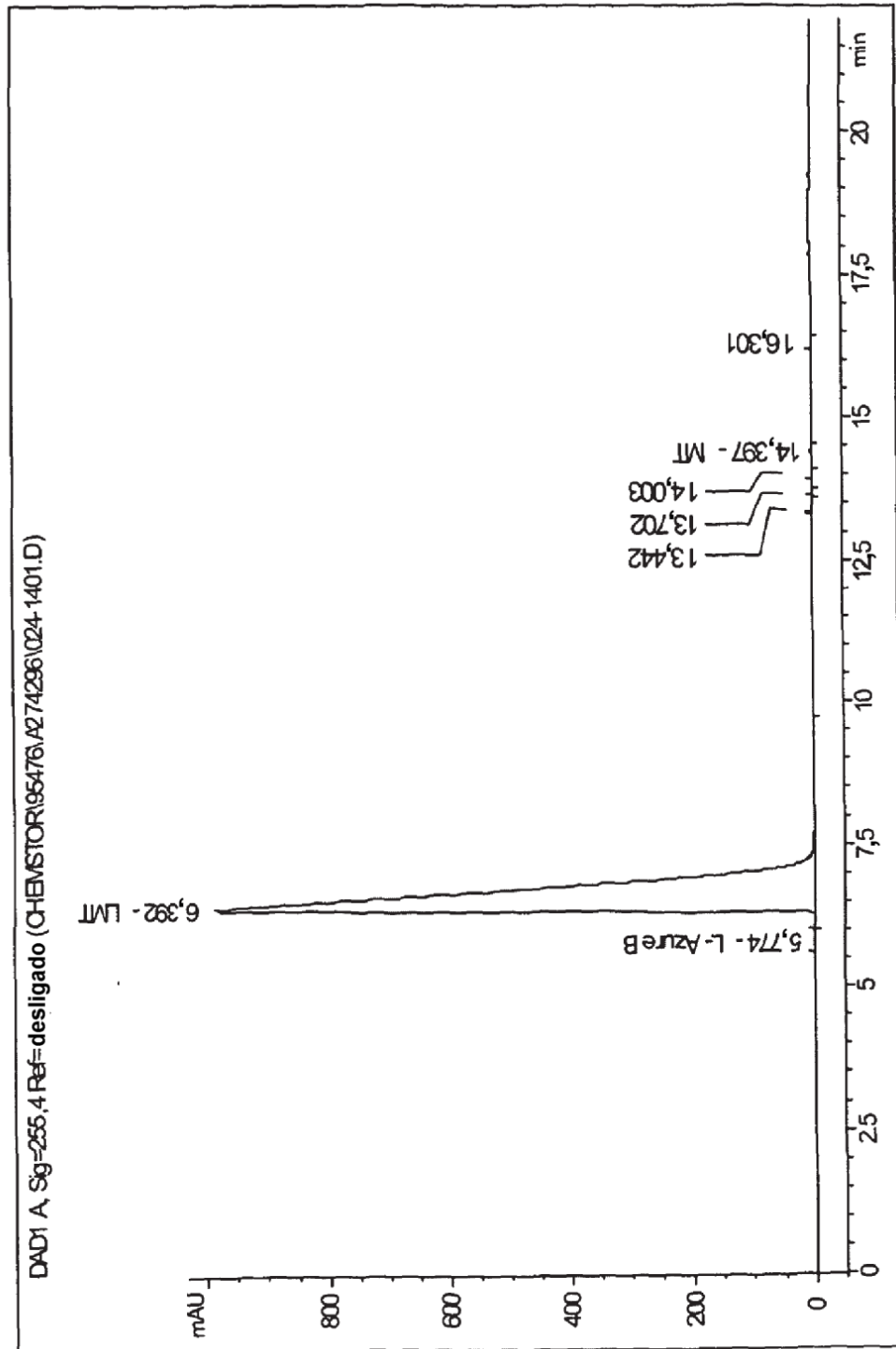


Figura 11:

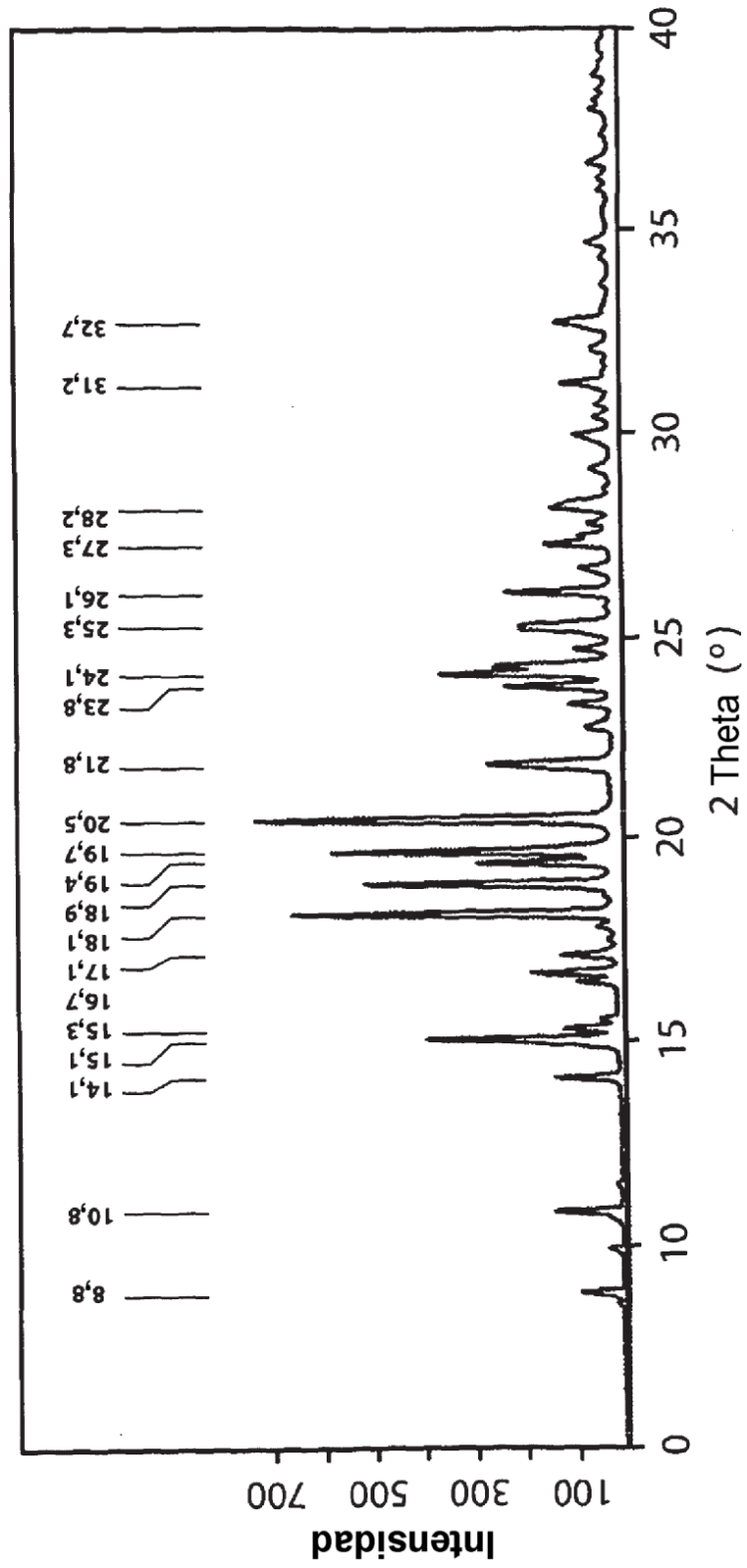


Figura 12:

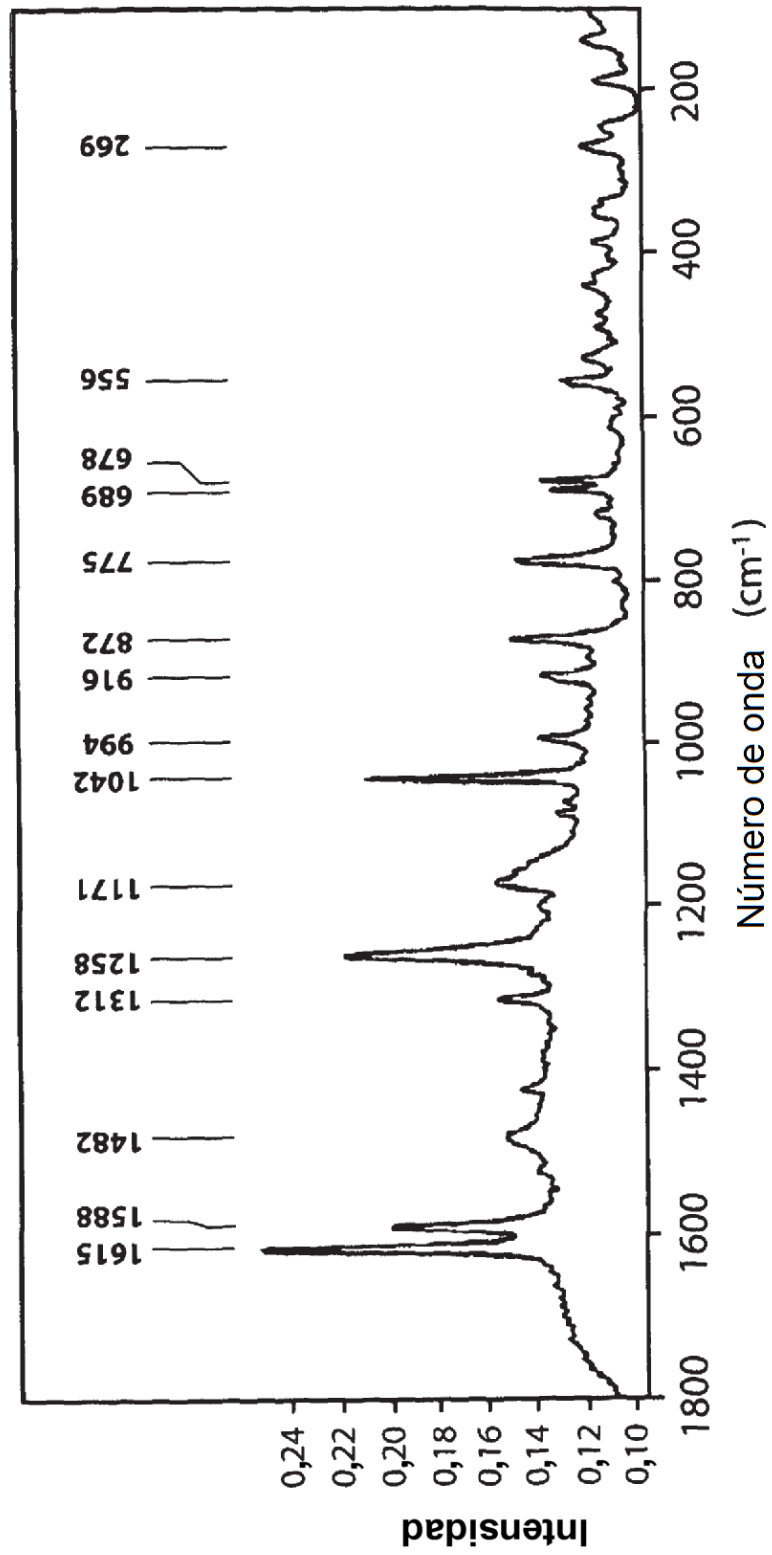


Figura 13:

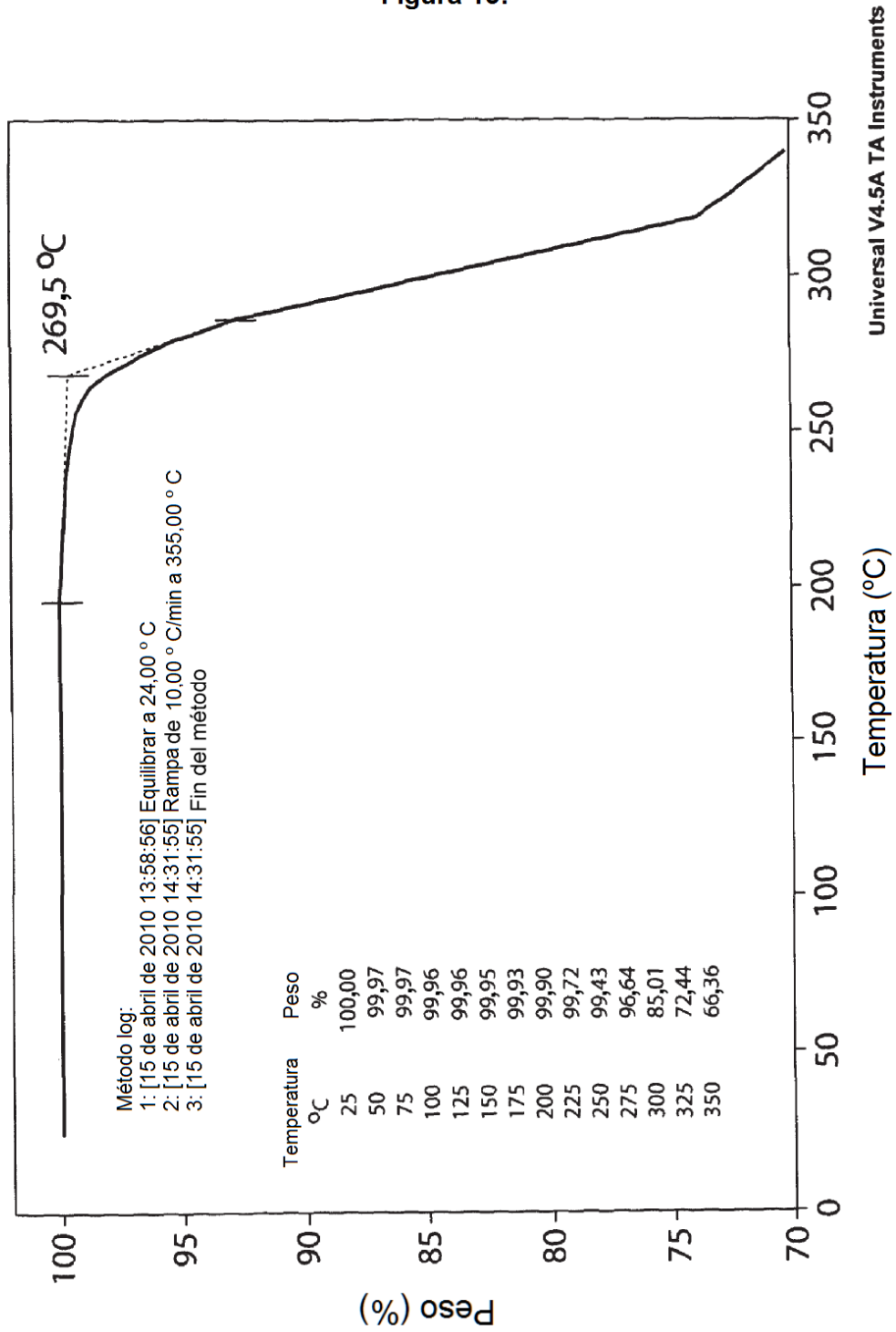


Figura 14:

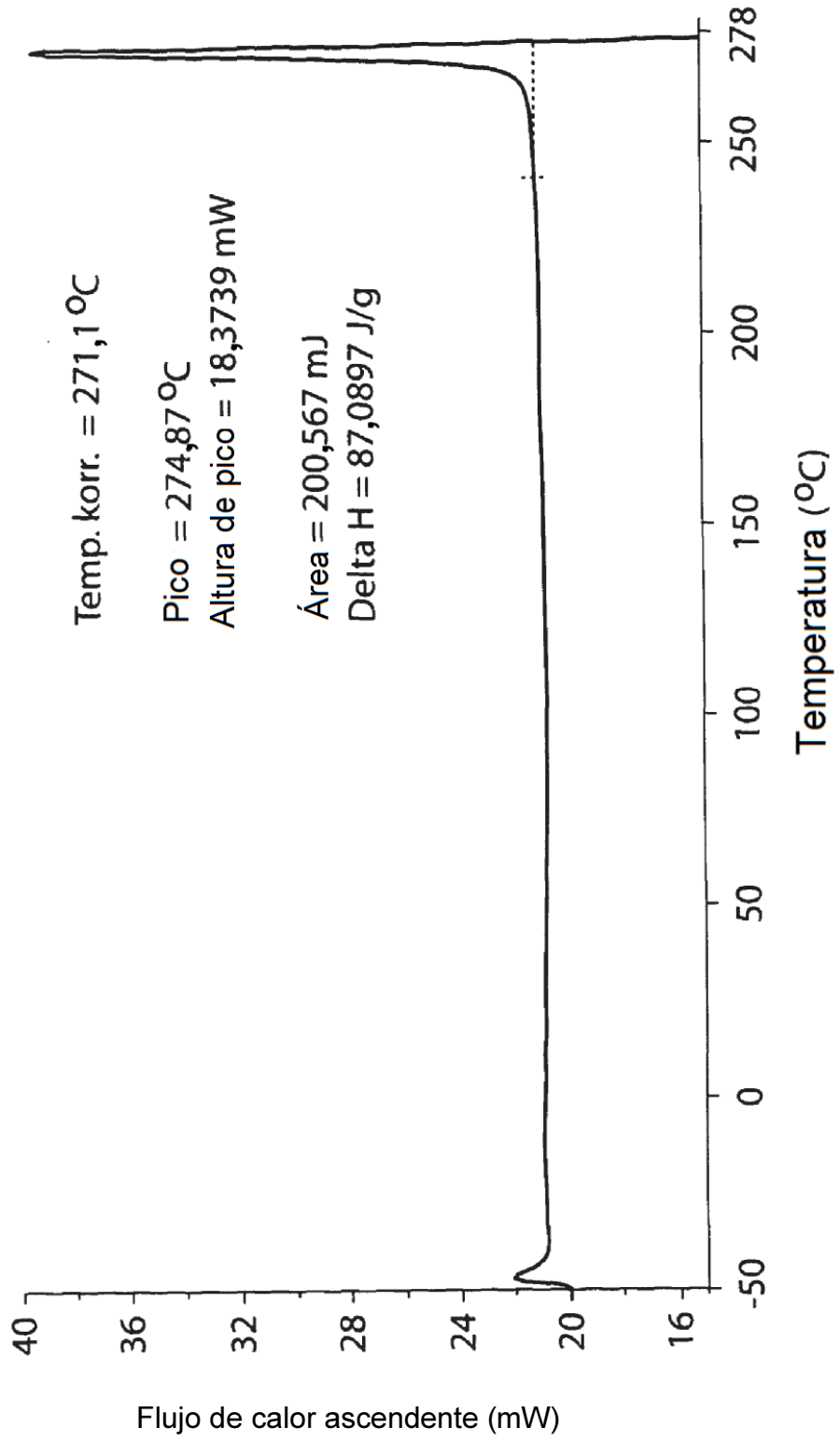


Figura 15a:

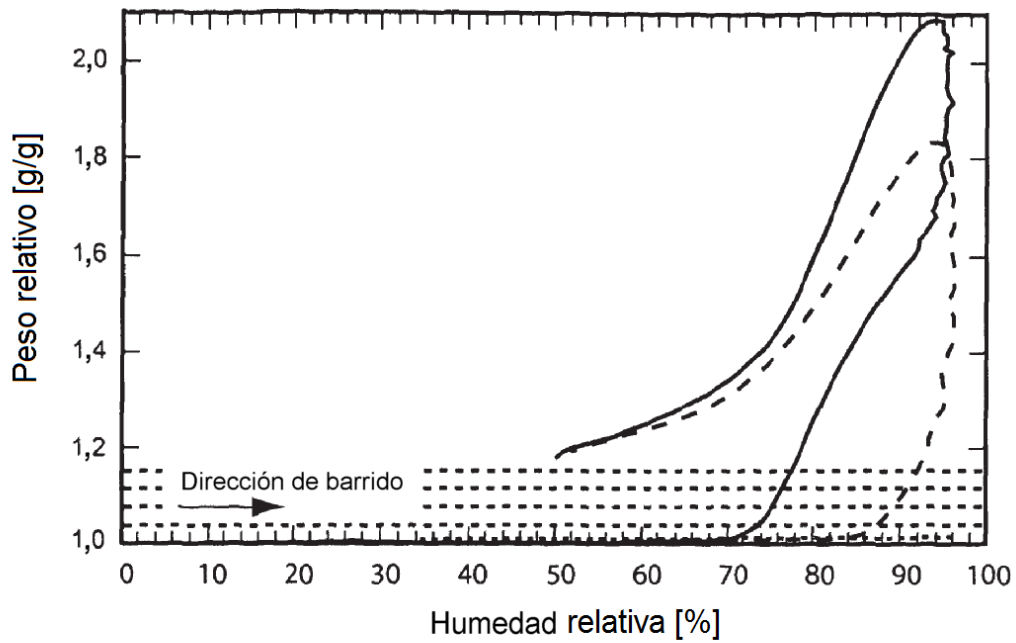


Figura 15b – Vista expandida

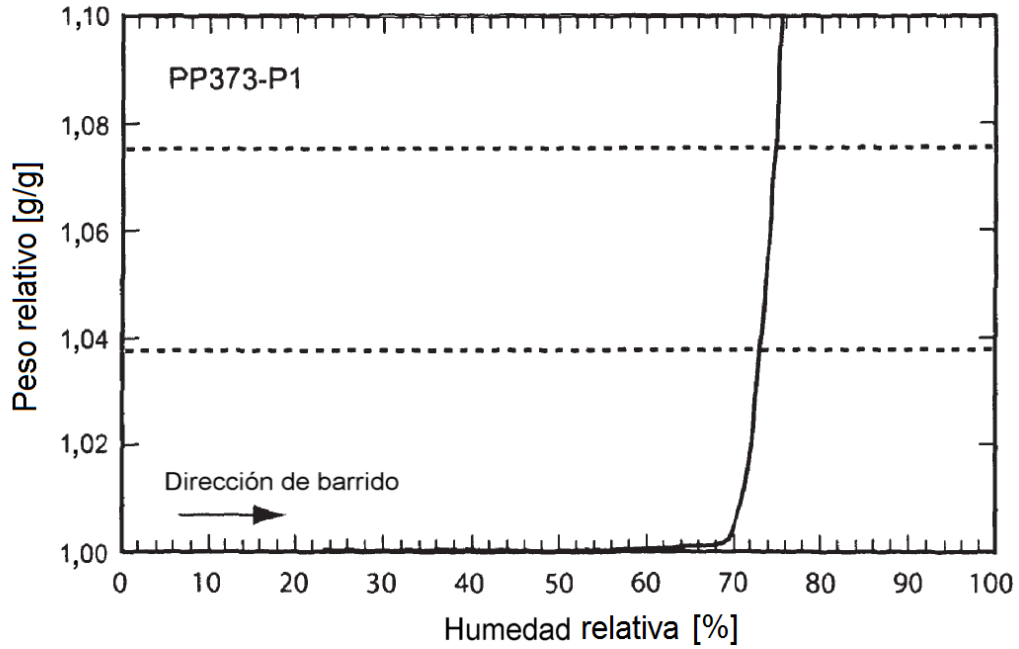


Figura 15c:

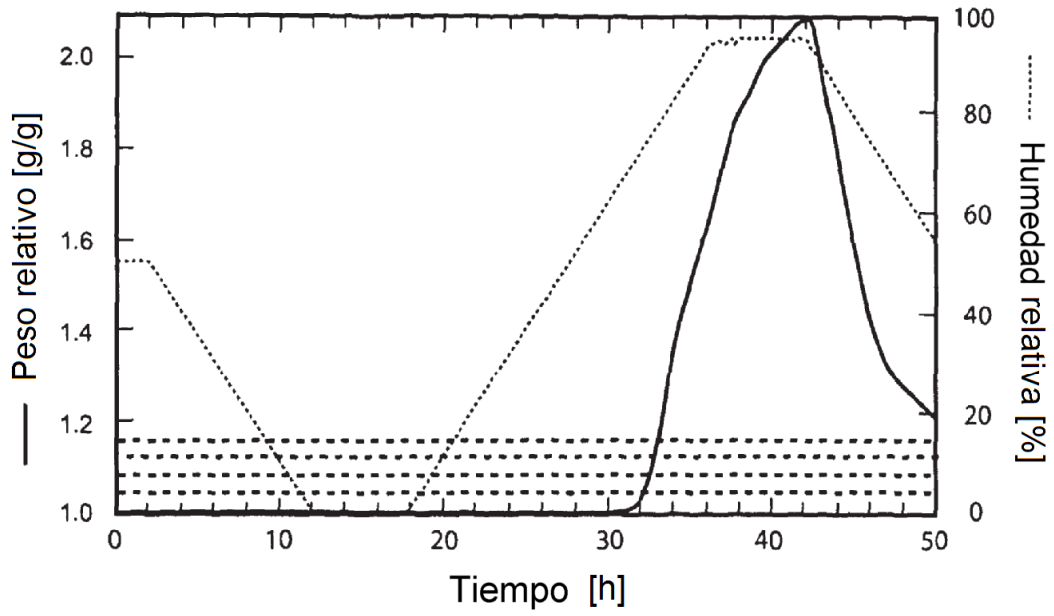


Figura 16:

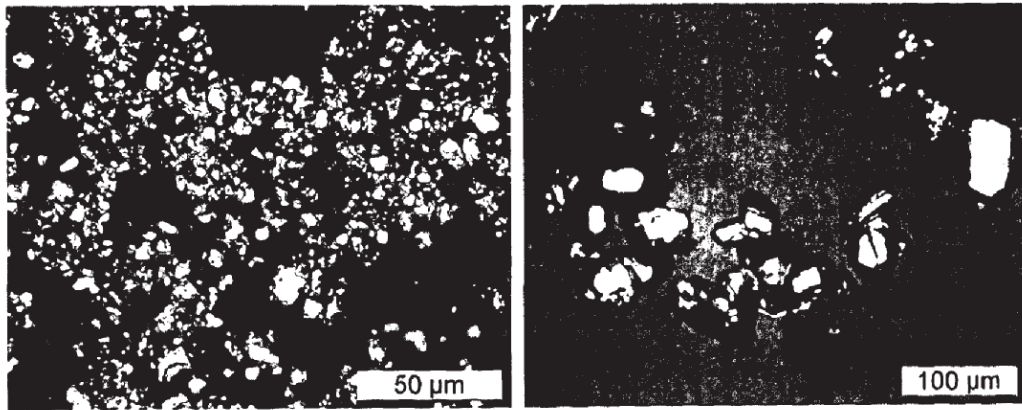
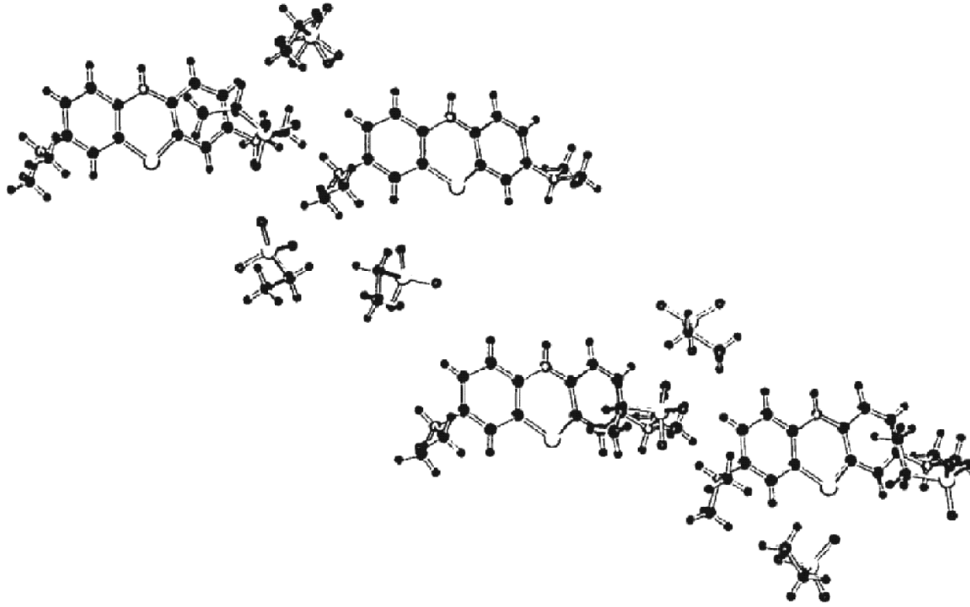
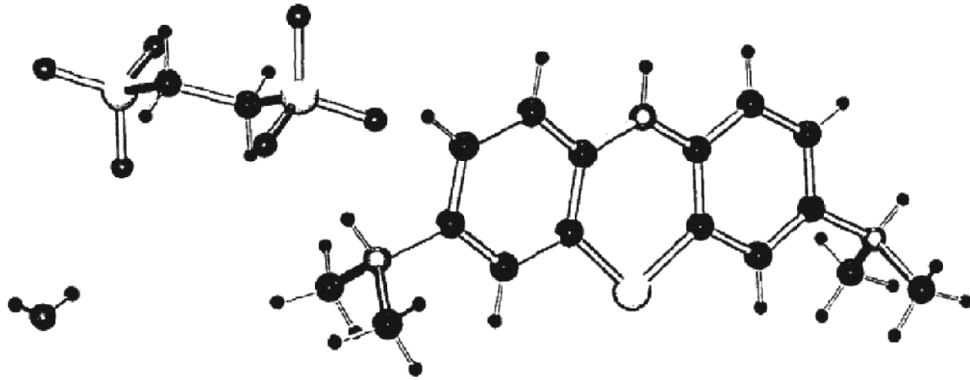


Figura 17A:



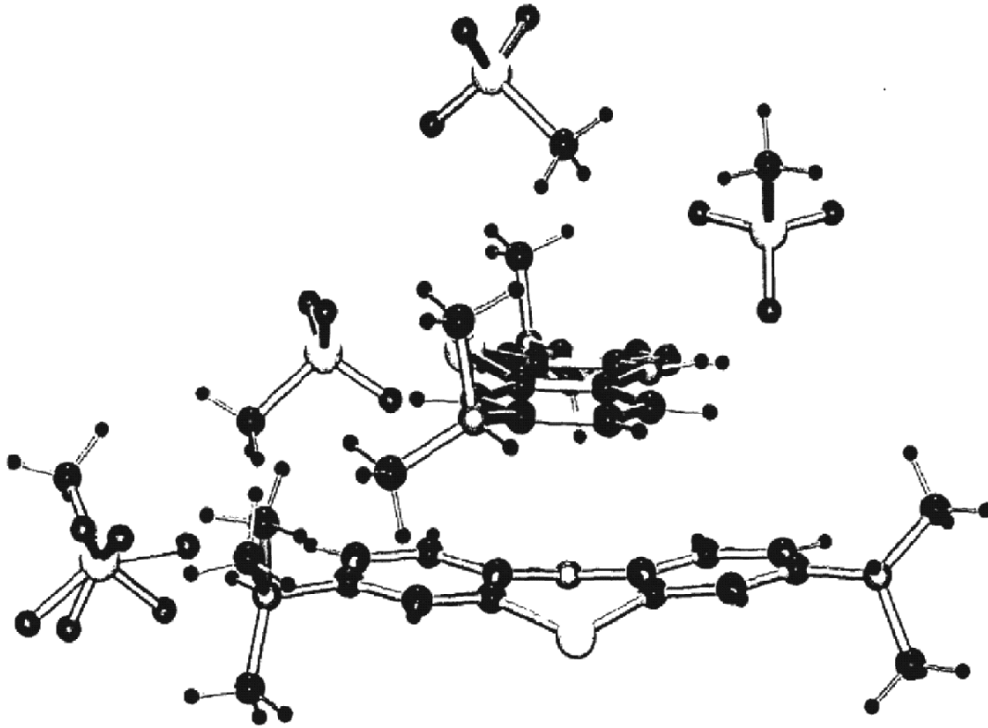
Estructura de rayos X (celda unidad) de LMTEs

Figura 17B:



Estructura de rayos X (celda unidad) de LMT.EDSA

Figura 17C:



Estructura de rayos X (celda unidad) de LMTM

Figura 18:

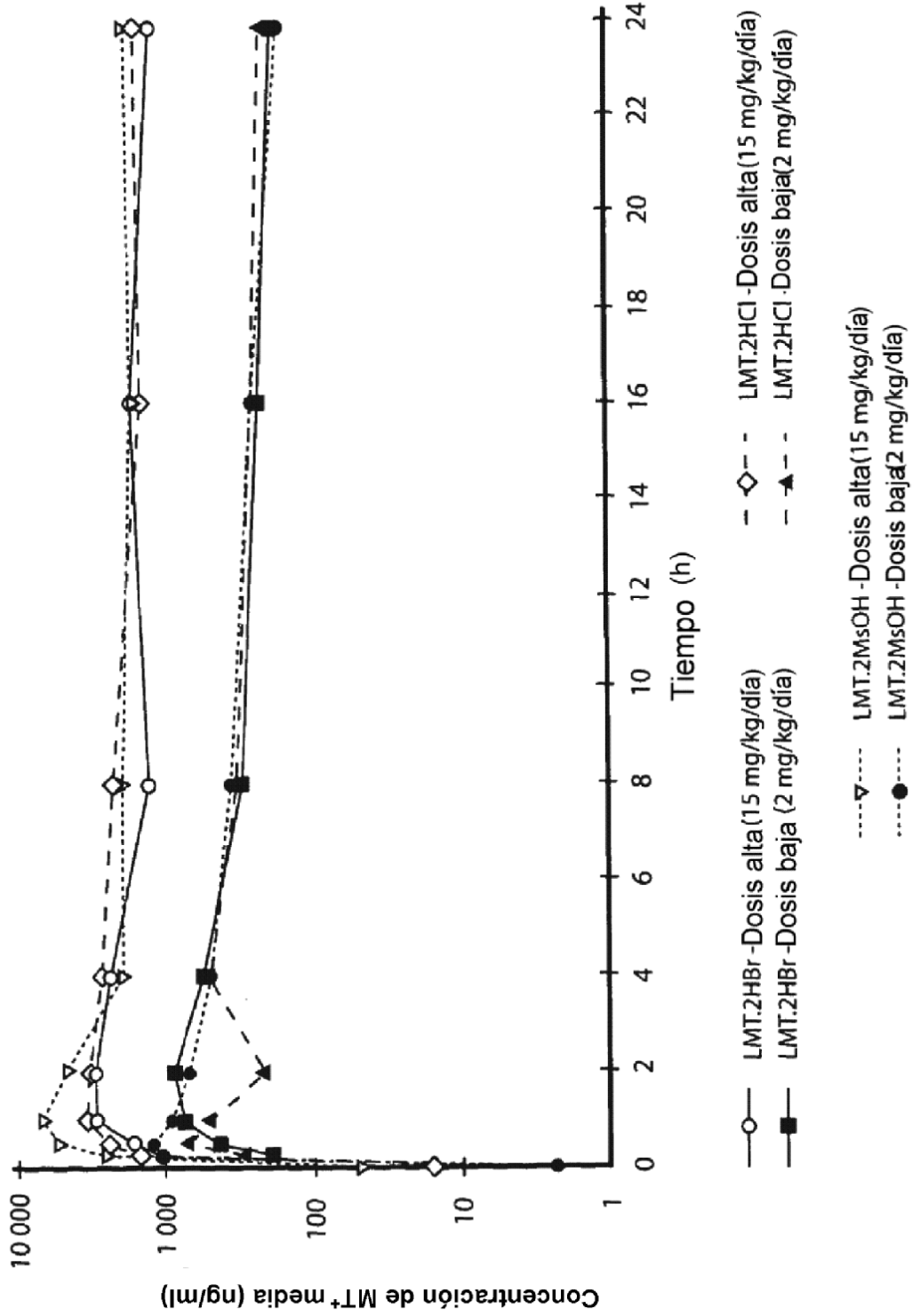


Figura 19:

