

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 002**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2007 PCT/GB2007/001105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2007 WO07110629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2007 E 07712961 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2004155**

54 Título: **Inhibidores de la agregación de proteínas**

30 Prioridad:

29.03.2006 US 786700 P

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

09.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WISCHIK, CLAUDE, MICHEL;
RICKARD, JANET, ELIZABETH;
HARRINGTON, CHARLES, ROBERT y
HORSLEY, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 667 002 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

Inhibidores de la agregación de proteínas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en términos generales a la agregación de proteínas α -sinucleína asociada a enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Parkinson (PD) y a compuestos de diaminofenotiazina capaces de modular tal agregación como se define en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del movimiento neurodegenerativo humano que afecta a un 1 % de la población mayor de edad (véase la discusión de Kapurniotu (2004) *Chemistry & Biology* 11, pág. 1476-1478). Los síntomas clínicos primarios de PD son bradiquinesia, temblor en reposo, rigidez muscular, y dificultad de equilibrio. PD está caracterizada neuropatológicamente por una degeneración marcada y progresiva de las neuronas dopaminérgicas y por la presencia de inclusiones citoplasmática fibrilares (cuerpos de Lewy [LB]) y neuritas distróficas (neuritas de Lewy [LN]) en la sustancia negra y otras regiones del cerebro (Recchia et ál. (2004) *FASEB J* 18: 617-626).

15

Aunque la pérdida de las neuronas de dopamina está ciertamente relacionada con los síntomas clínicos principales de PD, las causas de la patogénesis de esta enfermedad multifactorial así como de las "sinucleinopatías" relacionadas aún son desconocidas en gran medida.

20

Los componentes principales tanto de los LB como de las LN son agregados fibrilares de α -sinucleína. La α -sinucleína es una proteína presináptica neuronal ampliamente expresada que parece desempeñar un papel en procesos asociados a membrana y en la plasticidad sináptica y se ha relacionado con procesos de aprendizaje y desarrollo. Aunque el mecanismo o mecanismos de la formación de LB y LN y su asociación con PD aún no se comprende, varias líneas de evidencia sugieren que la fibrilación de la α -sinucleína está asociada a PD y que la fibrilación de la α -sinucleína causa toxicidad (véanse, por ejemplo, Masliah et ál., *Science*, 287:1265-1269 (2000); Feany et ál., *Nature* 404:394-8 (2000)).

25

30

Además de la α -sinucleína, la β -sinucleína también se ha visto implicada en sinucleinopatías neurodegenerativas. La β -sinucleína humana es una proteína neuronal de 134 restos que es un 78 % homóloga a la α -sinucleína. Las α - y β -sinucleínas comparten un extremo C-terminal conservado con tres restos de tirosina situados idénticamente. Además de los LB y las LN que contienen α -sinucleína, el desarrollo de PD y la demencia con LB está acompañada por la aparición de nuevas lesiones positivas a α - y β -sinucleína en el hipocampo (Galvin et ál. 1999) que implica la β -sinucleína, además de la α -sinucleína, en el inicio y el progreso de estas enfermedades. Se ha indicado que la β -sinucleína puede regular la fibrilación de la α -sinucleína, actuando quizá como una chaperona para minimizar la agregación de α -sinucleína (Hashimoto et ál. 2001; Uversky et ál. 2002; Park y Lansbury, 2002). De ese modo se ha considerado una disminución en los niveles de β -sinucleína como factor positivo en la etiología de PD (Uversky et ál. 2002).

35

40

De ese modo, se cree que la inhibición o la reversión de la agregación de la sinucleína es de beneficio terapéutico.

45

Li et ál. (2004) *Chemistry & Biology* 11: pág. 1513-1521 discuten la inhibición de la fibrilación de la α -sinucleína y la desagregación de fibrillas, mediante el antibiótico rifampicina.

50

Zhu et ál. (2004) *Journal of Biological Chemistry* 279, 26: pág. 26846-26857 discuten la inhibición de la fibrilación de la α -sinucleína, y la desagregación de fibrillas, mediante el flavanoide baicaleína.

55

Existen diversas otras publicaciones en la técnica que dicen que se refieren a los inhibidores de tal agregación. Estas incluyen "Compositions for inhibiting the aggregation pathway of alpha-synuclein" (documento de Patente US6780971 - 2004-08-24); "Polyhydroxylated aromatic compounds for the treatment of amyloidosis and alpha-synuclein fibril diseases" (documento de Patente US2004152760 - 2004-08-05); "Peptide and peptide derivatives for the treatment of alpha-synuclein related diseases" (documento de Patente WO2004009625 - 2004-01-29); "Proanthocyanidins for the treatment of amyloid and alpha-synuclein diseases" (documento de Patente EP1377287 - 2004-01-07); "Methods for preventing neural tissue damage and for the treatment of alpha-synuclein diseases" (documento de Patente CN1440420T - 2003-09-03). El documento de Patente WO02/03972 desvela el uso de la forma reducida de fenotiazinas para el tratamiento, entre otras, de enfermedad de Parkinson.

60

Sin embargo, se ha de entender que la provisión de compuestos no conocidos previamente que son capaces de inhibir la agregación de la sinucleína proporcionaría una contribución a la técnica.

65 **Divulgación de la invención**

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines de información. Los presentes inventores han demostrado por primera vez que los compuestos de diaminofenotiazina se pueden usar para inhibir la agregación de proteínas de sinucleína.

5 En resumen, los inventores expresaron y purificaron dos formas de α -sinucleína y las usaron en ensayos para automontaje y formación de fibrillas. Se descubrió que una forma truncada de α -sinucleína (tsyn) fue particularmente eficaz en el ensayo de formación de fibrillas, y se mostró que tal tsyn montada mejoraba la fluorescencia de tioflavina T. Los inventores sometieron a ensayo la actividad de alteración de fibrillas de las diaminofenotiazinas, así como
10 otros compuestos. Se descubrió que las diaminofenotiazinas alteran la α -sinucleína montada a menos de 1 μ M.

También se concibió un ensayo en fase sólida para la unión de sinucleína, y se usó para mostrar que las diaminofenotiazinas tales como cloruros de tioninio, y las flavonas, inhibieron la unión. Como entenderán los expertos en la materia, a la luz de la presente divulgación, estos resultados demuestran la utilidad de tales
15 compuestos, entre otros, en el tratamiento de la causa subyacente de enfermedades (tales como PD y otras que se discuten en el presente documento) asociadas a la agregación de la sinucleína.

Piotrowski, G. (1936) "The treatment of parkinsonian tremor. Medical Record, 144:322-323" informó del alivio sintomático de temblores parkinsonianos en un estudio de 4 individuos usando azul de metileno (cloruro de metil tioninio - MTC). El MTC se administró por vía intravenosa con una dosis de 1 o 2 mg/kg. Una administración oral de
20 8 granos (= 518 mg)/día se discontinuó debido a efectos secundarios. Los efectos informados en los temblores no fueron fuertes y duraron únicamente durante un tiempo limitado mientras que un síntoma diferente (rigidez) no se vio afectado en gran medida. Un ensayo separado con tionina no dio ningún resultado. De ese modo, la esencia de la divulgación es que específicamente MTC, que se conocía por tener una acción parasimpática, tuvo un efecto limitado en un síntoma de la enfermedad de Parkinson, es decir, el "temblor parkinsoniano".
25

Por el contrario, la presente invención se refiere a un tratamiento dirigido al propio proceso subyacente de la enfermedad en lugar de a una manifestación sintomática de la enfermedad.

30 Se ha mostrado previamente que las diaminofenotiazinas inhiben la agregación de proteína tau y que alteran la estructura de PHF, e invierten la estabilidad proteolítica del núcleo de PHF (véase el documento de Patente WO 96/30766, F Hoffman-La Roche). Tales compuestos se desvelaron para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades, que incluyen enfermedad de Alzheimer y enfermedad de cuerpos de Lewy.

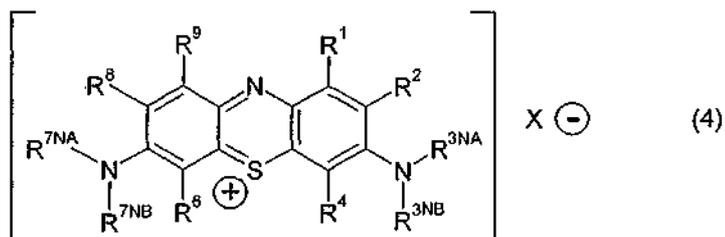
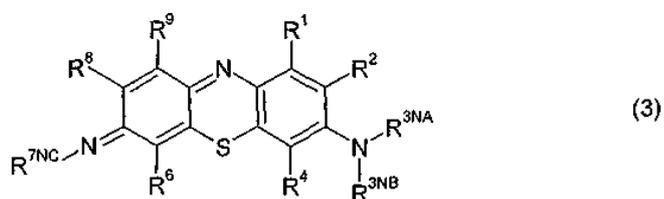
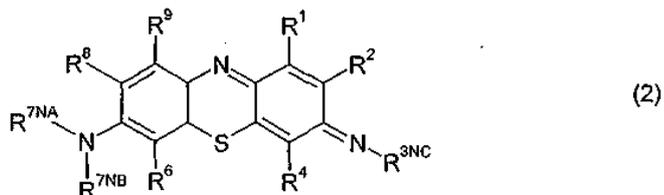
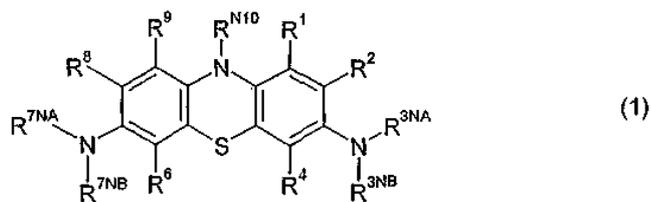
35 Además, el documento de Patente WO 02/055720 (The University Court of the University of Aberdeen) discute el uso de formas reducidas de diaminofenotiazinas específicamente para el tratamiento de diversas enfermedades de agregación de proteínas, aunque la divulgación se refiere principalmente a tauopatías.

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

Sin embargo, ninguna de estas publicaciones desvela específicamente el uso de diaminofenotiazinas, particularmente formas reducidas, para la inhibición o reversión de la agregación de α -sinucleína en particular.

45 *Compuestos de diaminofenotiazina*

La invención se refiere a ciertos compuestos de diaminofenotiazina como se definen en las reivindicaciones que tienen una de las siguientes fórmulas, y a sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos (denominados colectivamente en el presente documento "diaminofenotiazinas" o "compuestos de
50 diaminofenotiazina"):



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

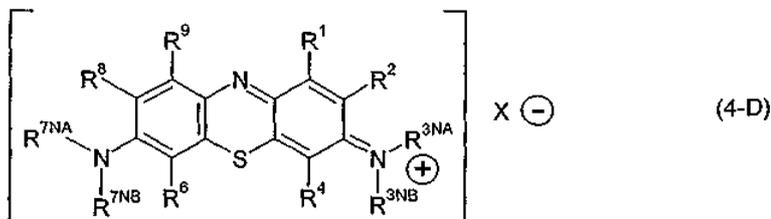
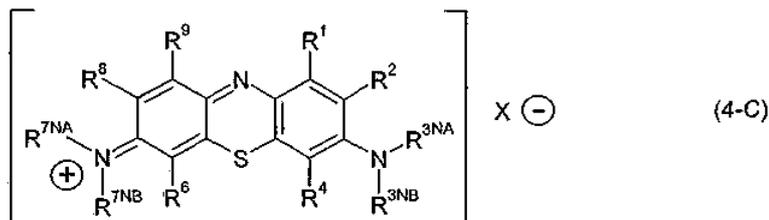
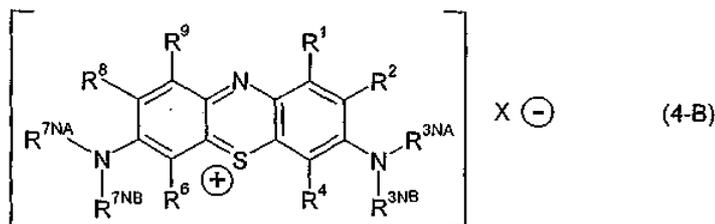
En una realización, los compuestos se seleccionan entre los compuestos de fórmula (1), y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos.

10 En una realización, los compuestos se seleccionan entre los compuestos de fórmula (2) o (3), y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos.

En una realización, los compuestos se seleccionan entre los compuestos de fórmula (4), y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos.

15 Cada una de las estructuras anteriores es solo una de numerosas estructuras de resonancia equivalentes, y se pretende que la totalidad de las mismas estén incluidas en la estructura representativa. Por ejemplo, la estructura (4) es solo una de numerosas estructuras de resonancia equivalentes, algunas de las cuales se muestran a continuación, y se pretende que la totalidad de las mismas estén incluidas en la estructura (4):

20



Sustituyentes de átomo de anillo de carbono

5 En cada una de las fórmulas anteriores, cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , y R^9 se selecciona independientemente entre:

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

20 en los que cada R se selecciona independientemente entre:

- alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
- alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
- cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
- 25 carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
- heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
- carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;

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

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

35 En una realización, cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , y R^9 se selecciona independientemente entre:

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

5

En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona independientemente entre:

- H;
- R.

10

En una realización, cada R se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido.

15

En una realización, cada R se selecciona independientemente entre:

alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.

20

En una realización, cada R se selecciona independientemente entre: -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

En una realización, cada R se selecciona independientemente entre: -Me y -Et.

25

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

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

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

30

Algunos ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir incluyen: metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, terc-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, etc.

Algunos ejemplos de grupos alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir incluyen: propen-1-ilo, propen-2-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, etc.

35

Algunos ejemplos de grupos cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir incluyen: ciclopropilo, ciclopropil-metilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.

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

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

40

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

Algunos ejemplos de grupos carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir incluyen: fenilo, naftilo.

45

Algunos ejemplos de grupos heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir incluyen: pirrolilo, tienilo, furilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo.

Algunos ejemplos de grupos carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir incluyen: bencilo, feniletilo.

50

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

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

55

60

en los que cada R' se selecciona independientemente entre:

65

alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;

- alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
 cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
 carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
 heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
- 5 carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;
- en los que, en cada grupo -NR^{N1}R^{N2}, independientemente, R^{N1} y R^{N2} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 3 a 7 átomos en el anillo.
- 10 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) se seleccionan independientemente entre:
- 15 -F; -Cl; -Br; -I;
 -OH; -OR;
 -C(=O)OH; -C(=O)OR';
 -R'.
- 20 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, excepto en que cada R' se selecciona independientemente entre:
- 25 alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir;
 alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir;
 cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir;
 carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir;
 heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir;
 carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir.
- 30 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, excepto en que cada R' se selecciona independientemente entre:
- 35 alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir;
 alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir;
 cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir.
- En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, excepto en que cada R' se selecciona independientemente entre:
- 40 alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.
- 45 En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, excepto en que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me, -Et, -nPr, y -iPr.
- En una realización, los sustituyentes opcionales (por ejemplo, en alquilo C₁₋₆ alifático, alqueno C₁₋₆ alifático, cicloalquilo C₃₋₆, carboarilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₅₋₁₀, carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄) son como se han definido anteriormente, excepto en que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me y -Et.
- 50 En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr, y -iPr.
- 55 En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona independientemente entre: -H, -Me, y -Et.
- En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona independientemente entre: -H y -Me.
- 60 En una realización, todos excepto cuatro de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ son -H.
 En una realización, todos excepto dos de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ son -H.
 En una realización, todos excepto uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ son -H.
 En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ es -H.
- 65 *Grupos amino*
- En cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si estuviera presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB}

es independientemente -H o como se ha definido anteriormente para R; o R^{3NA} y R^{3NB} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 3 a 7 átomos en el anillo.

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

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

10

-H;
alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
15 cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
carboarilo C_{6-10} sin sustituir; carboarilo C_{6-10} sustituido;
heteroarilo C_{5-10} sin sustituir; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sin sustituir; carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sustituido;

15

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

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

25

alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
carboarilo C_{6-10} sin sustituir; carboarilo C_{6-10} sustituido;
heteroarilo C_{5-10} sin sustituir; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
30 carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sin sustituir; carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sustituido;

30

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

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

40

-H;
alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;

40

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

45

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

50

alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;

50

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

55

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

60

-H;
alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir;

60

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

65

ES 2 667 002 T3

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

- 5 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir;
 alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir;
 cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir;

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

- 10 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, si estuviera presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr, y -iPr.

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

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

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

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

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

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

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

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

- 40 Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si estuviera presente, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

-H;
 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
 alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
 cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
 carboarilo C_{6-10} sin sustituir; carboarilo C_{6-10} sustituido;
 heteroarilo C_{5-10} sin sustituir; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
 carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sin sustituir; carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sustituido.

- 50 Por ejemplo, en una realización, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si estuviera presente, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
 alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
 cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido;
 carboarilo C_{6-10} sin sustituir; carboarilo C_{6-10} sustituido;
 heteroarilo C_{5-10} sin sustituir; heteroarilo C_{5-10} sustituido;
 carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sin sustituir; carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sustituido.

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

-H;
 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
 alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
 cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido.

65

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

- 5 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir; alqueno C_{2-6} alifático sustituido;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir; cicloalquilo C_{3-6} sustituido.

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

- 10 -H;
alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir.

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

- 20 alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir.

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

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

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

Por analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo $=NR^{7NC}$, si estuviera presente, R^{7NC} es independientemente como se ha definido anteriormente para R^{3NC} .

35 *Sustituyente de átomo de anillo de nitrógeno*

Además, por analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, R^{N10} , si estuviera presente, es independientemente como se ha definido anteriormente para R^{3NC} (o R^{7NC}).

- 40 Por ejemplo, en una realización, R^{N10} , si estuviera presente, se selecciona independientemente entre: -H y alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir.

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

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

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

50 *Contraión*

X^- , si estuviera presente, es uno o más contraiones aniónicos que consiguen neutralidad eléctrica.

Algunos ejemplos de contraiones aniónicos adecuados se discuten posteriormente bajo el encabezamiento "Sales".

- 55 En una realización, X^- es independientemente un anión de halógeno (es decir, un haluro).
En una realización, X^- es independientemente Cl^- , Br^- , o I^- .
En una realización, X^- es independientemente Cl^- .

- 60 En una realización, X^- es independientemente NO_3^- .

60 *Combinaciones*

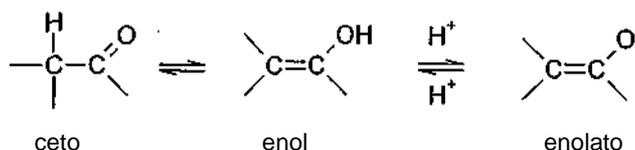
Todas las combinaciones plausibles de las realizaciones que se han descrito anteriormente se desvelan en el presente documento como si cada combinación se enumerara individual y explícitamente.

- 65 *Isómeros*

Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales, o anoméricas particulares, que incluyen, pero no se limitan a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; formas R, S, y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol, y enolato; formas syn y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axial y ecuatorial; formas de bote, silla, bote torcido, sobre, y semisilla; y las combinaciones de las mismas, denominadas colectivamente en lo sucesivo en el presente documento "isómeros" (o "formas isoméricas").

Se ha de observar que, excepto como se discute posteriormente para las formas tautoméricas, se excluyen específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en lugar de meramente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no se ha de interpretar como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. De forma análoga, una referencia a corto-clorofenilo no se puede interpretar como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir bien formas estructuralmente isoméricas que entran dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta-, y para-metoxifenilo).

La exclusión anterior no concierne a las formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol, y enolato, como por ejemplo, en los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (que se ilustra a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enotiol, N-nitroso/hidroxiato, y nitro/aci-nitro.



Se ha de observar que se incluyen específicamente en el término "isómero" los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^1H , ^2H (D), y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{12}C , ^{13}C , y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular incluye la totalidad de tales formas isoméricas, incluyendo (total o parcialmente) formas racémicas y otras mezclas de los mismos. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y la separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas se conocen la técnica o bien se obtienen fácilmente por adaptación de los métodos que se enseñan en el presente documento, o métodos conocidos, de una forma conocida.

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se discuten en Berge et ál., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pág. 1-19.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, $-\text{COOH}$ puede ser $-\text{COO}^-$), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Algunos ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como Na^+ y K^+ , cationes de metales alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{+3} . Algunos ejemplos adecuados de cationes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, ion amonio (es decir, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Algunos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son los que se obtienen a partir de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, $-\text{NH}_2$ puede ser $-\text{NH}_3^+$), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Algunos ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que se obtienen a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso.

Algunos ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que se obtienen a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico,

5 hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, y valérico. Algunos ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que se obtienen a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

10 El compuesto también se puede proporcionar en forma de una sal mixta (es decir, el compuesto en combinación con una sal, u otra sal). Por ejemplo, la sal mixta de cloruro de metil-tioninio y cloruro de cinc (MTZ) es una sal mixta de cloruro de metil-tioninio (MTC), una sal de cloruro, y otra sal, cloruro de cinc. Se pretende que tales sales mixtas estén incluidas por la expresión "y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos".

A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular también incluye las formas de sal de los mismos.

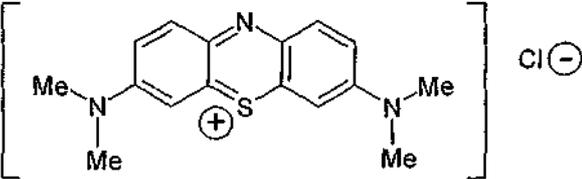
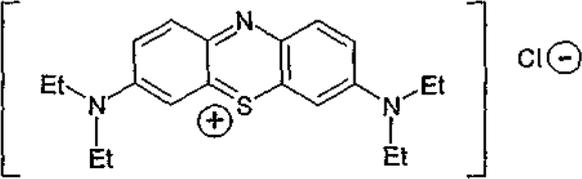
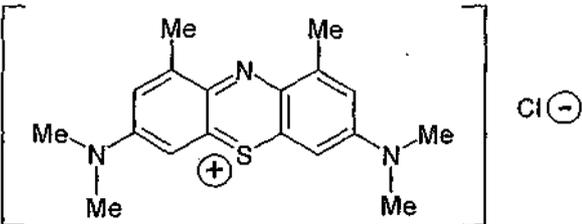
15 *Hidratos y Solvatos*

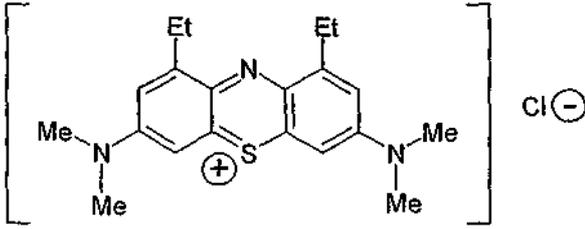
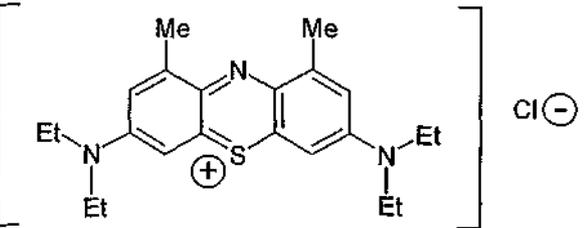
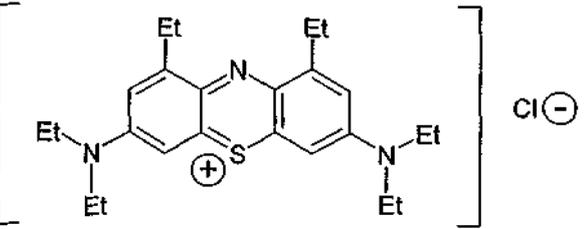
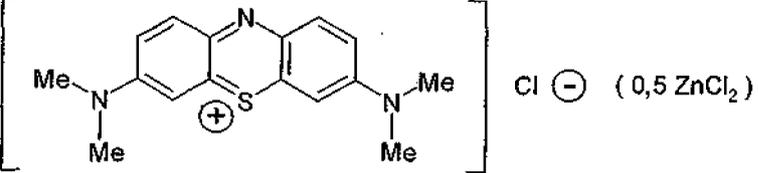
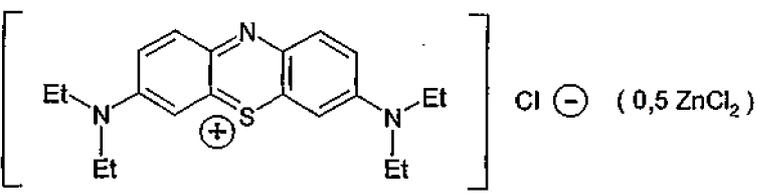
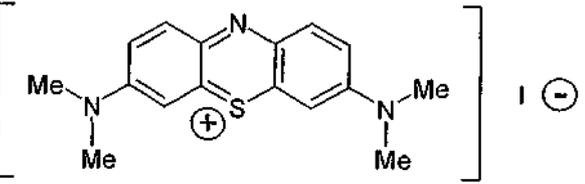
Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de un soluto (por ejemplo, un compuesto, una sal de compuesto) y un disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede denominar convencionalmente hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

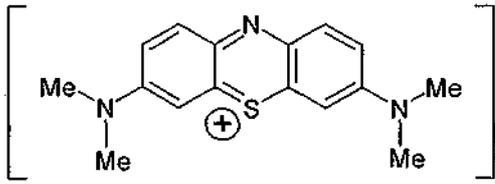
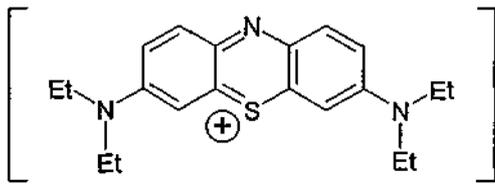
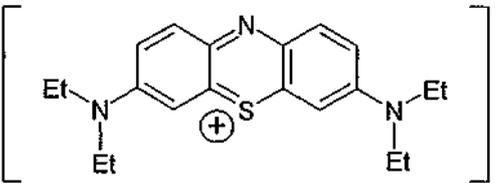
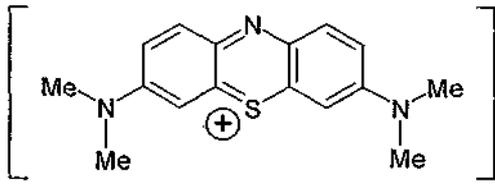
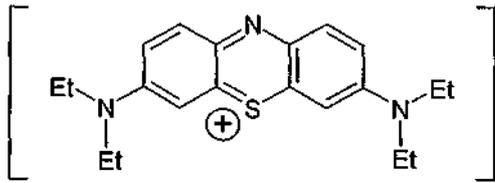
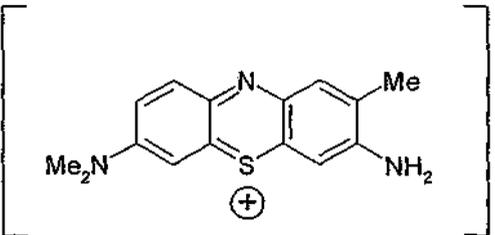
A menos que se especifique de otro modo, la referencia a un compuesto particular también incluye las formas de solvato de los mismos.

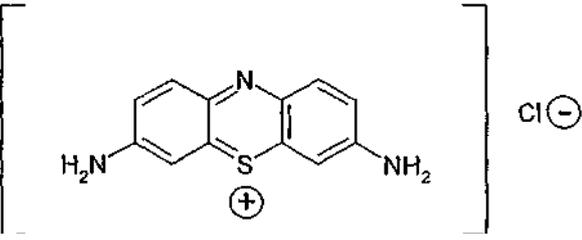
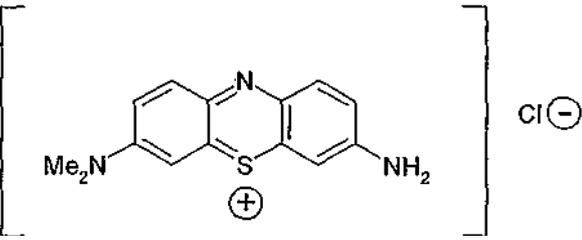
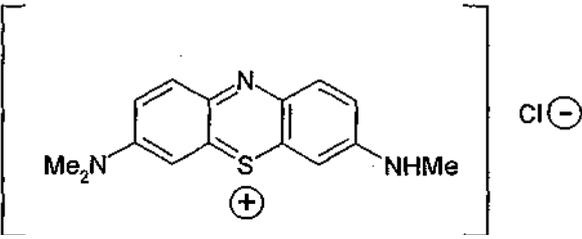
25 *Algunos ejemplos preferentes*

Algunas diaminofenotiazinas preferentes incluyen las siguientes, y las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de las mismas:

A	MTC	 <p style="text-align: center;">cloruro de metil-tioninio</p>
B	ETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de etil-tioninio</p>
C	DMMTC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dimetil-metil-tioninio</p>

D	DEMTC	 <p>cloruro de 1,9-dietil-metil-tioninio</p>
E	DMETC	 <p>cloruro de 1,9-dimetil-etil-tioninio</p>
F	DEETC	 <p>cloruro de 1,9-dietil-etil-tioninio</p>
G	MTZ	 <p>sal mixta de cloruro de metil-tioninio y cloruro de cinc</p>
H	ETZ	 <p>sal mixta de cloruro de etil-tioninio y cloruro de cinc</p>
I	MTI	 <p>yoduro de metil-tioninio</p>

J	MTI.HI	 $\left[\text{Me-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Me} \right] \text{I}^- \text{HI}$ <p>sal mixta de yoduro de metil-tioninio y yoduro de hidrógeno</p>
K	ETI	 $\left[\text{Et-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Et} \right] \text{I}^-$ <p>yoduro de etil-tioninio</p>
L	ETI.HI	 $\left[\text{Et-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Et} \right] \text{I}^- \text{HI}$ <p>sal mixta de yoduro de etil-tioninio y yoduro de hidrógeno</p>
M	MTN	 $\left[\text{Me-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Me} \right] \text{NO}_3^-$ <p>nitrate de metil-tioninio</p>
N	ETN	 $\left[\text{Et-N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Et} \right] \text{NO}_3^-$ <p>nitrate de etil-tioninio</p>
O		 $\left[\text{Me}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{S}^+ \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{N-Me-NH}_2 \right] \text{Cl}^-$ <p>cloruro de tolonio</p>

P		 <p style="text-align: center;">Tionina</p>
Q		 <p style="text-align: center;">Azura A</p>
R		 <p style="text-align: center;">Azura B</p>

En una realización, la diaminofenotiazina se selecciona entre: MTC, ETC, DEMTC, DEETC, Tionina, y Cloruro de Tolonio (también conocido como Azul de Toluidina O).

- 5 Los compuestos preferentes de la presente invención son los que muestran una alta actividad en los ensayos que se describen en el presente documento.

Inhibición de la agregación

- 10 En todos los aspectos terapéuticos y otros aspectos de la invención, es preferente que la diaminofenotiazina esté en forma básicamente oxidada por ejemplo al menos un 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99, o un 100 % de la forma oxidada.

De ese modo, en un primer aspecto de la presente invención, se desvela el uso de una diaminofenotiazina para inhibir la agregación de sinucleína, en particular, α -sinucleína, por ejemplo en una célula.

- 15 La agregación puede ser en el contexto de una patología manifestada como neurodegeneración y/o demencia clínica.

- 20 En otro aspecto, la invención proporciona una diaminofenotiazina para su uso en un método de tratamiento o terapia del cuerpo humano o animal, por ejemplo, en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica asociada a la agregación de sinucleína, particularmente α -sinucleína.

- 25 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una diaminofenotiazina en la preparación de un medicamento para inhibir la agregación de sinucleína, particularmente α -sinucleína, agregación que está asociada a una patología manifestada como neurodegeneración y/o demencia clínica, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica asociada a la agregación de sinucleína.

- 30 En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa y/o demencia clínica asociada a la agregación de sinucleína, particularmente α -sinucleína, método que comprende la administración a un sujeto de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una diaminofenotiazina, o una composición farmacéutica que comprende la misma, de un modo tal que inhiba la agregación de la sinucleína.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de regulación de la agregación de sinucleína, particularmente α -sinucleína, en el cerebro de un mamífero, agregación que está asociada a una patología como se describe posteriormente, comprendiendo el tratamiento la etapa de administrar a dicho mamífero con necesidad de dicho tratamiento, una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una diaminofenotiazina.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la producción de agregados de sinucleína, particularmente α -sinucleína, en el cerebro de un mamífero, siendo el tratamiento como se ha descrito anteriormente.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un producto farmacológico para el tratamiento de una enfermedad asociada a la agregación de sinucleína, particularmente α -sinucleína, en un mamífero que padece de la misma, que comprende un recipiente etiquetado o acompañado por una etiqueta que indica que el producto farmacológico es para el tratamiento de dicha enfermedad, conteniendo el recipiente una o más unidades de dosificación que comprenden cada una al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un compuesto de diaminofenotiazina puro aislado seleccionado entre los que se han descrito anteriormente.

Las diaminofenotiazinas se pueden administrar solas, o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección o enfermedad que se va a tratar. En particular, puede ser deseable usar o formular las diaminofenotiazinas con otros inhibidores de la reacción de agregación de proteína pertinente.

20 Las combinaciones preferentes son uno cualquiera o más de los compuestos de diaminofenotiazina que se han discutido anteriormente más un compuesto que modula los niveles de dopamina en el mamífero que se va a tratar. Tales compuestos adicionales pueden incluir levo-DOPA y agonistas dopaminérgicos tales como ropinirol (véase, por ejemplo, Olanow, C.W. 2004, The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease, Ann. Rev. Med. 55:41-60).

En cada caso, el mamífero es preferentemente un ser humano.

Ligandos

30 Los compuestos de diaminofenotiazina que se discuten en el presente documento que son capaces de inhibir la agregación de α -sinucleína también serán capaces de actuar como ligandos o etiquetas de α -sinucleína (o α -sinucleína agregada). De ese modo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es un ligando, por ejemplo, un ligando de sinucleína (o sinucleína agregada), particularmente α -sinucleína.

35 Tales compuestos de diaminofenotiazina (ligandos) pueden incorporar, estar conjugados a, estar quelados con, o estar asociados de otro modo a, otros grupos químicos, tales como etiquetas detectables, tales como isótopos detectables estables e inestables, radioisótopos, átomos emisores de positrones, etiquetas de resonancia magnética, colorantes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos, restos terapéuticos, o cualquier otro resto que pueda ayudar en una aplicación de pronóstico, diagnóstico o terapéutica.

40 Por ejemplo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que el compuesto incorpora, está conjugado a, está quelado con, o está asociado de otro modo a uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) isótopos, radioisótopos, átomos emisores de positrones, etiquetas de resonancia magnética, colorantes, marcadores fluorescentes, grupos antigénicos, o restos terapéuticos.

45 En una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es un ligando así como una etiqueta, por ejemplo, una etiqueta para α -sinucleína (o α -sinucleína agregada) e incorpora, está conjugado a, está quelado con, o está asociado de otro modo a una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) etiquetas detectables.

50 Por ejemplo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que el compuesto incorpora, está conjugado a, está quelado con, o está asociado de otro modo a, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) etiquetas detectables

55 En una realización, la etiqueta detectable es, o incorpora, un isótopo detectable estable, un isótopo detectable inestable, un radioisótopo (por ejemplo, ^{99}Tc), un átomo emisor de positrones (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F), una etiqueta de resonancia magnética (por ejemplo, ^{19}F), un colorante, un grupo fluorescente, o un grupo antigénico.

60 Los compuestos de diaminofenotiazina etiquetados (por ejemplo, cuando están ligados a α -sinucleína o a α -sinucleína agregada) se pueden visualizar o detectar mediante cualquier medio adecuado, y el experto en la materia entenderá que se puede usar cualquier medio de detección adecuado que se conozca en la técnica.

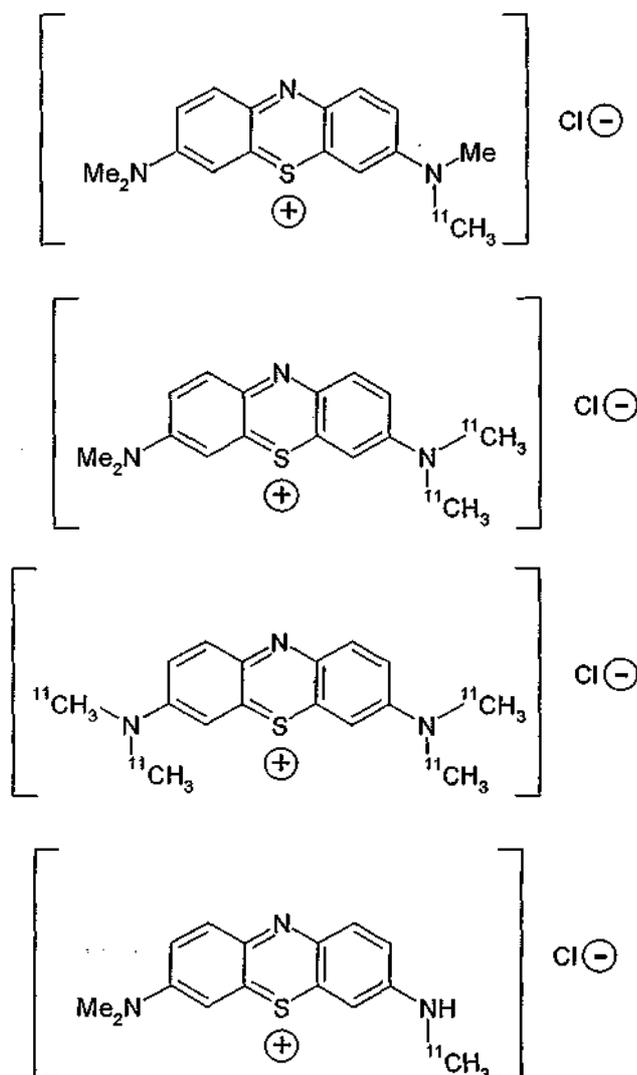
65 Por ejemplo, el compuesto de diaminofenotiazina (ligando-etiqueta) se puede detectar de forma adecuada mediante la incorporación de un átomo emisor de positrones (por ejemplo, ^{11}C) (por ejemplo, en forma de un átomo de carbono de uno o más sustituyentes de grupo alquilo, por ejemplo, sustituyentes de grupo metilo) y detección del compuesto usando tomografía de emisión de positrones (PET) como se conoce en la técnica.

5 Por ejemplo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los átomos de carbono en el anillo del compuesto de diaminofenotiazina es un átomo de carbono emisor de positrones, por ejemplo, ^{11}C ; y/o al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los átomos de carbono de al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , R^9 , $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{3\text{NC}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NC}}$ y $\text{R}^{\text{N}10}$ es un átomo de carbono emisor de positrones, por ejemplo, ^{11}C .

10 En una realización, al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los átomos de carbono de al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4) de los sustituyentes $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{3\text{NC}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, y $\text{R}^{7\text{NC}}$ es un átomo de carbono emisor de positrones, por ejemplo, ^{11}C .

En una realización, al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los sustituyentes $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{3\text{NC}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, y $\text{R}^{7\text{NC}}$ es $^{-11}\text{CH}_3$.

15 Algunos ejemplos de tales compuestos de diaminofenotiazina (es decir, que incorporan un átomo emisor de positrones detectable por PET) incluyen los siguientes:



20 Algunos métodos adecuados para la preparación de estas y otras diaminofenotiazinas similares etiquetadas con ^{11}C se muestran, por ejemplo, en el documento de Patente WO 02/075318 (véanse las Figuras 11a, 11b, 12) y el documento de Patente WO 2005/030676.

25 Además, o alternativamente, el compuesto de diaminofenotiazina puede estar conjugado a un grupo quelante (es decir, un resto adecuado para conjugación a otra molécula o átomo o ion mediante la formación de un complejo o quelato) (por ejemplo, un grupo quelante de radioisótopo, por ejemplo, un grupo quelante de tecnecio, por ejemplo, un grupo ácido dietilentriaminapentaacético) que está quelado a una etiqueta detectable (por ejemplo, un

radioisótopo, por ejemplo, ^{99}Tc).

Por ejemplo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , R^9 , $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{3\text{NC}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NC}}$ y $\text{R}^{\text{N}10}$ es, o incorpora, un grupo quelante (por ejemplo, un grupo quelante de tecnecio, por ejemplo, un grupo ácido dietilentriaminapentaacético) que es capaz de quelarse a una etiqueta detectable (por ejemplo, un radioisótopo, por ejemplo, ^{99}Tc).

Además, o alternativamente, el compuesto de diaminofenotiazina puede incorporar una etiqueta de resonancia magnética (por ejemplo, ^{19}F), y de ese modo ser adecuado para formación de imágenes por MRI (véase, por ejemplo Higuchi et ál. Nat Neurosci. Abril de 2005; 8(4):527-33).

Por ejemplo, en una realización, el compuesto de diaminofenotiazina es como se ha definido anteriormente, pero con la limitación adicional de que al menos uno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , R^9 , $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{3\text{NC}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$, $\text{R}^{7\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NC}}$ y $\text{R}^{\text{N}10}$ es, o incorpora, una etiqueta de resonancia magnética (por ejemplo, ^{19}F , por ejemplo, tal como ^{-19}F , $-\text{C}(^{19}\text{F})_3$, etc.).

De ese modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para etiquetar sinucleína (o sinucleína agregada), particularmente α -sinucleína, que comprende las etapas de: poner en contacto la sinucleína (o la sinucleína agregada) con un compuesto de diaminofenotiazina que incorpore, esté conjugado a, esté quelado con, o esté asociado de otro modo a, una etiqueta detectable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar sinucleína (o sinucleína agregada), particularmente α -sinucleína, que comprende las etapas de: poner en contacto la sinucleína (o la sinucleína agregada) con un compuesto de diaminofenotiazina que incorpore, esté conjugado a, esté quelado con, o esté asociado de otro modo a, una etiqueta detectable, y detectar la presencia y/o la cantidad de dicho compuesto unido a sinucleína (o sinucleína agregada).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico o pronóstico de una sinucleinopatía en un sujeto que se cree que padece la enfermedad, que comprende las etapas de:

- (i) introducir en el sujeto un compuesto de diaminofenotiazina capaz de etiquetar la sinucleína o la sinucleína agregada, particularmente α -sinucleína (por ejemplo, un compuesto de diaminofenotiazina que incorpore, esté conjugado a, esté quelado con, o esté asociado de otro modo a, una etiqueta detectable),
- (ii) determinar la presencia y/o la cantidad de dicho compuesto unido a sinucleína o sinucleína agregada en el cerebro del sujeto,
- (iii) correlacionar el resultado con la determinación realizada en (ii) con la patología del sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de diaminofenotiazina capaz de etiquetar sinucleína o sinucleína agregada, particularmente α -sinucleína (por ejemplo, un compuesto de diaminofenotiazina que incorpore, esté conjugado a, esté quelado con, o esté asociado de otro modo a, una etiqueta detectable), para su uso en un método de diagnóstico o pronóstico de una sinucleinopatía.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de diaminofenotiazina capaz de etiquetar sinucleína o sinucleína agregada, particularmente α -sinucleína (por ejemplo, un compuesto de diaminofenotiazina que incorpore, esté conjugado a, esté quelado con, o esté asociado de otro modo a, una etiqueta detectable), en un método de fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico para su uso en el diagnóstico o pronóstico de una sinucleinopatía.

Los expertos en la materia entenderán que en lugar de administrar los ligandos/etiquetas de diaminofenotiazina directamente, se podrían administrar en forma de un precursor, para la conversión en la forma activa (por ejemplo, forma de ligando, forma de etiqueta) mediante un agente de activación presente en, o administrado a, el mismo sujeto.

Enfermedades

Las patologías con las que está relacionada la presente invención son sinucleinopatías.

Como comprenderán los expertos en la materia, el término sinucleinopatías se usa para nombrar un grupo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por agregados fibrilares de proteínas de sinucleína, particularmente α -sinucleína, en el citoplasma de poblaciones selectivas de neuronas y células gliales, y en particular en los que la presencia de inclusiones que contienen sinucleína son patognomónicas para la enfermedad.

Esto se distinguiría de los trastornos que no son sinucleinopatías en que las inclusiones que contienen sinucleína pueden estar o no estar presentes además de otras patologías.

Las sinucleinopatías consisten en la actualidad en los siguientes trastornos: enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), atrofia sistémica múltiple (MSA), parkinsonismo inducido por fármacos (por ejemplo, producido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina [MPTP] o pesticidas tales como rotenona), y fallo autónomo puro (PAF).

5 Los trastornos que no son sinucleinopatías en los que se pueden encontrar cuerpos de Lewy incluyen los siguientes: enfermedad de Alzheimer, demencia de Pick/frontotemporal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, ataxia telangiectasia, degeneración corticobasal, distonía, parálisis supranuclear progresiva, distrofia neuroaxonal, panencefalitis esclerosante subaguda, esclerosis lateral amiotrófica, complejo de ALS-demencia de Guam, síndrome de Meige y enfermedad de Hallervorden-Spatz (HSD) (neurodegeneración con hierro cerebral). Los LB se producen habitualmente en diversas enfermedades neurodegenerativas. Los estudios han indicado que la morfología de las fibrillas de α -sinucleína en los LB neuronales muestran similitudes básicas independientemente de la enfermedad subyacente.

15 La enfermedad de Parkinson tiene una elevada prevalencia (aproximadamente 100 por 100.000) en comparación con MSA (4 por 100.000).

DLB se adoptó como el nombre de consenso para incluir otras diversas que habían existido anteriormente (McKeith, I. G. et ál. (1996). "Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*, 47, 1113-1124." *Neurology* 47: 1113-1124). Estas incluyen demencia senil del tipo de cuerpos de Lewy, variante con cuerpos de Lewy de enfermedad de Alzheimer, demencia cortical con cuerpos de Lewy y demencia con cuerpos de Lewy. MSA incluye síndrome de Shy Drager, atrofia olivopontocerebelosa y degeneración estratonigral. Se ha informado que DLB es la segunda forma más habitual de demencia en las personas de edad avanzada después de la enfermedad de Alzheimer.

25 La enfermedad de Parkinson está caracterizada por LB en la sustancia negra, pero también se pueden encontrar en la corteza cerebral. DLB se caracteriza por una aparición más frecuente de los LB corticales. En la MSA se encuentran inclusiones filamentosas, denominadas inclusiones citoplasmáticas gliales (GCI) en los oligodendrocitos. La naturaleza de los filamentos componentes en los LB se desconocía hasta 1997, cuando dos descubrimientos establecieron el componente principal: (i) se descubrió que una mutación con cambio de sentido en la α -sinucleína causaba una rara forma de PD familiar (Polymeropoulos, M. H. et ál. (1997). "Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* 276: 2045-2047) y (ii) se descubrió que los LB y las LN en PD idiopática eran inmunorreactivos para α -sinucleína (Spillantini, M. G. et ál. (1997). " α -Synuclein in Lewy bodies." *Nature* 388: 839-840). La α -sinucleína recombinante puede formar filamentos *in vitro*. La proteína es una proteína desdoblada nativamente. En las enfermedades en las que se agrega, forma fibrillas con una estructura de lámina β .

Preferentemente los compuestos de la presente invención se usan con respecto a una sinucleinopatía seleccionada entre PD, PAF, MSA y HSD.

40 Selección del sujeto

Los ligandos que se desvelan en el presente documento se pueden usar como parte de un método de diagnóstico o pronóstico. Se pueden usar para seleccionar un paciente para tratamiento, o para evaluar la eficacia de un tratamiento o un compuesto terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de la asociación de α -sinucleína administrado al sujeto.

Los sujetos adecuados para el método se pueden seleccionar basándose en factores convencionales. De ese modo, la selección inicial de un paciente puede implicar una cualquiera o más de: evaluación rigurosa mediante un médico experto; exclusión de diagnóstico no AD hasta lo posible mediante un laboratorio suplementario u otras investigaciones; evaluación objetiva del nivel de función cognitiva usando una batería validada neuropatológicamente.

Unidades de dosificación, y formulación y administración de los compuestos

55 La administración de los compuestos, las composiciones o los medicamentos que se describen en el presente documento es preferentemente en una "cantidad profiláctica mente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (como puede ser el caso, aunque la profilaxis se puede considerar terapia), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio para el individuo.

60 Para los ligandos, la cantidad será una cantidad diagnósticamente eficaz que dará lugar a una unión detectable en el paciente que padece una sinucleinopatía.

Para los medicamentos, la cantidad real administrada, y la tasa y el curso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se trata. La prescripción de un tratamiento, por ejemplo decisiones de dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos practicantes generales y otros médicos, y por lo general tiene en cuenta el trastorno que se trata, las condiciones del paciente individual, el

sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos practicantes.

Por lo general, el mamífero será un ser humano, aunque también está incluido en la presente invención el uso en animales (por ejemplo, confines de ensayo, o con fines terapéuticos veterinarios).

5 Algunos ejemplos de fenotiazinas de la presente invención se conocen en la técnica y se pueden fabricar mediante procesos a los que se hace referencia en textos convencionales (por ejemplo, Merck Manual, Houben-Weyl, Beilstein E III/IV 27, 1214 ff, J. Heterocycl. Chem 21, 613 (1984), etc.). Los compuestos de las fórmulas anteriores, sus sales farmacéuticamente aceptables, u otros compuestos que se ha encontrado que tienen las propiedades
10 definidas en los ensayos proporcionados, se podrían usar como medicamentos después de someterse a un ensayo adicional para toxicidad (por ejemplo, en forma de preparaciones farmacéuticas).

Se ha descrito el uso farmacéutico anterior del azul de metileno en una amplia diversidad de indicaciones médicas, incluyendo el tratamiento de metahemoglobinemia y la profilaxis de psicosis depresiva maniaca (Naylor (1986) Biol.
15 Psychiatry 21, 915-920), y se ha descrito la penetración en el SNC después de administración sistémica (Muller (1992) Acta Anat., 144, 39-44). La producción de Azura A y B se produce como los productos de degradación metabólica normales del azul de metileno (Disanto y Wagner (1972a) J. Pharm. Sci. 61, 598-602; Disanto y Wagner (1972b) J. Pharm. Sci. 61 1086-1094). La administración de compuestos farmacéuticos se puede efectuar por vía parenteral tal como por vía oral, en forma de comprimidos, comprimidos revestidos, grageas, cápsulas de gelatina
20 dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones), por vía nasal (por ejemplo, en forma de pulverizaciones nasales) o por vía rectal (por ejemplo, en forma de supositorios). Sin embargo, la administración también se puede efectuar por vía parenteral tal como por vía intramuscular o intravenosa (por ejemplo, en forma de soluciones para inyección).

25 Las composiciones pueden incluir, además de los constituyentes anteriores, excipientes farmacéuticamente aceptables, agentes conservantes, solubilizantes, sustancias para el aumento de la viscosidad, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulgentes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, o agentes de revestimiento. Tales materiales no serían tóxicos y no interferirían en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material
30 puede depender de la ruta de administración. Se pueden encontrar algunos ejemplos de técnicas y protocolos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, Osol, A. (ed.), 1980.

Cuando la composición se formula en una composición farmacéutica, la administración de la misma se puede efectuar por vía parenteral tal como por vía oral, en forma de polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, grageas,
35 cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones, por vía nasal (por ejemplo en forma de pulverizaciones nasales) o por vía rectal (por ejemplo, en forma de supositorios). Sin embargo, la administración también se puede efectuar por vía parenteral tal como por vía intramuscular, intravenosa, cutánea, subcutánea o intraperitoneal (por ejemplo, en forma de soluciones para inyección).

40 De ese modo, por ejemplo, cuando la composición farmacéutica está en forma de un comprimido, puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Para la fabricación de comprimidos, comprimidos revestidos, grageas y cápsulas de gelatina dura, los compuestos activos y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden procesar con excipientes inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente inertes. Se pueden usar
45 lactosa, maíz, almidón o derivados del mismo, talco, ácido esteárico o sus sales, etc., por ejemplo, como tales excipientes para comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Algunos excipientes adecuados para cápsulas de gelatina blanda son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos, etc. Cuando la composición está en forma de una formulación farmacéutica líquida, incluirá generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacarido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Otros excipientes adecuados para la fabricación de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua,
50 polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, trihalosa, etc. Los excipientes adecuados para soluciones para inyección son, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, etc. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o infusión intracatéter en el cerebro, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia pertinente serán capaces de preparar las soluciones adecuadas usando, por
55 ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones y otros aditivos según sea necesario.

60 Los usos de los compuestos del presente documento como ligandos pueden utilizar vehículos o composiciones similares.

De ese modo, en los aspectos de la invención en los que se usa una diaminofenotiazina (por ejemplo MTC) en un método de tratamiento o terapia del cuerpo humano o animal, ese método implicará preferentemente la administración de una cantidad eficaz de diaminofenotiazina por vía oral.

65 Preferentemente, el medicamento se adapta para administración oral, y preferentemente está en forma de unidad de

dosificación sólida.

Preferentemente, la dosificación se administrará por vía oral. Preferentemente será menor o igual que 400, 300, 200, o 100 mg de dosis total diaria. Por ejemplo, puede consistir en unidades de dosificación de 10,20, 30, 40, 50, 60, 60, 80, 90, 100, 110, 120, o 130 mg t.i.d. (tres veces al día)

Alternativamente, puede consistir en unidades de dosificación de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 60, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 mg b.i.d. (dos veces al día).

Preferentemente en tratamiento se continúa durante igual a o al menos 2, 3 o 4 semanas.

Se pueden incluir instrucciones con respecto a estas dosificaciones en forma escrita o dentro del recipiente de un producto farmacológico de la invención.

Cuando la administración es intravenosa, es preferente que la diaminofenotiazina no sea MTC.

La divulgación de cualquier referencia cruzada realizada en el presente documento, en vista de que puede ser requerida por el experto en la materia para complementar la presente divulgación, se incorpora por la presente de forma específica en el presente documento.

La invención se describirá adicionalmente a continuación por referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes. Se podrán ocurrir otras realizaciones de la invención a los expertos en la materia a la luz de estos.

Figuras

Figura 1: *Muestras de la purificación de tsyn mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía por afinidad de Ni.* Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 % y tinción con Azul de Coomassie.

Figura 2: *Muestras de la purificación de fsyn mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía por intercambio aniónico de DEAE-Sefarosa.* Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 % y tinción con Azul de Coomassie.

Figura 3: *Muestras de la purificación de fsyn mediante cromatografía por intercambio aniónico de DEAE-Sefarosa e intercambio catiónico de CM-Sefarosa.* Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE al 15 % y tinción con Azul de Coomassie.

Figura 4: *Curso de tiempo de la formación de fibrillas por tsyn y fsyn monitorizado por fluorescencia de tioflavina T y primulina.* Se incubaron tsyn-8 a 1 mg/ml (A) y fsyn-14 (B) a 2 mg/ml en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, más 50 µg/ml de heparina cuando estuvo indicado, a 37 °C con mezcla. La formación de fibrillas se sometió a ensayo por adición de 10 µl de la incubación a 100 µl totales de tioflavina T o primulina 1 µM y se midieron los espectros de excitación, con una longitud de onda de emisión de 480 nm. La señal para el fluoróforo solo se restó de los espectros antes de la medición de la señal en el pico de excitación (420 nm para primulina, 450 nm para tioflavina T).

Figura 5: *Efecto de MTC y ETC en la fluorescencia de tioflavina T o primulina inducida por tsyn montada.* Se incubaron tsyn-13 a 1 mg/ml (-95 µM) más 50 µg/ml de heparina a 37 °C durante 20 h, a continuación se mezclaron alícuotas con MTC (A, C) o ETC (B, D) para dar las concentraciones mostradas (µM) y se incubaron durante un periodo adicional de 1 h. Se añadieron 10 µl de la proteína a un volumen total de 100 µl de tioflavina T (A, B) o primulina (C, D) 1 µM y se midieron los espectros de excitación, con una longitud de onda de emisión de 480 nm. Las trazas que se muestran son el resultado de restar la señal para el fluoróforo más el compuesto de la señal para la proteína más fluoróforo y el compuesto.

Figura 6: *Efecto de MTC y ETC en la fluorescencia de primulina inducida por fsyn-14 montada.* Se incubó proteína a 2 mg/ml (~140 µM) más 50 µg/ml de heparina a 37 °C durante 47 h, a continuación se mezclaron alícuotas con MTC (A, C) o ETC (B, D) para dar las concentraciones mostradas (µM) y se incubaron durante un periodo adicional de 1 h. Se añadieron 10 µl de la proteína a un volumen total de 100 µl de primulina y se midieron los espectros de excitación, con una longitud de onda de emisión de 480 nm. Las trazas que se muestran son el resultado de restar la señal para el fluoróforo más el compuesto de la señal para la proteína más fluoróforo y el compuesto.

Figura 7: *Efecto de MTC y ETC en la fluorescencia de tioflavina T o primulina inducida por tsyn o fsyn montada.* Los valores de fluorescencia se midieron a partir de las trazas que se muestran en la Figura 5 para tsyn-8 (A) o la Figura 6 para fsyn-14 (B) y se normalizaron con el valor medido sin compuesto.

Figura 8: *Efecto de MTC y ETC en la fluorescencia de tioflavina T o primulina inducida por tsyn montada, sometida a ensayo a diferentes concentraciones de tioflavina T y primulina.* Se montó y se sometió a ensayo

tsyn-16 para el efecto de MTC o ETC como se describe para la Figura 5, excepto en que la tioflavina T y la primulina estaban a 0,2, 1 o 5 μM . Los valores de fluorescencia de pico después de la corrección del fondo se normalizaron con el valor medido sin compuesto y se representaron gráficamente en función de la concentración de compuesto. El efecto de MTC (A, B) o ETC (C, D) se monitorizó con tioflavina T (A, C) o primulina (B, D).

5 Figura 9. *Unión de fsyn en fase acuosa a tsyn en fase sólida*. Se incubó fsyn-20 a 0-10 μM con tsyn-13 unida a la fase sólida a 0-2 μM y se detectó fsyn unida usando el anticuerpo 211.

10 Figura 10. *Efecto de los compuestos en la unión sinucleína-sinucleína*. Se incubó fsyn-10 en fase acuosa a 5 μM con tsyn-13 a 1 μM en la fase sólida en presencia de los compuestos que se muestran.

15 Figura 11. *Efecto inhibidor de MTC*. Se montó tsyn (1 mg/ml en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5 + 50 $\mu\text{g/ml}$ de heparina) a 37° C durante 24 h. MTC inhibe el montaje de tsyn a concentraciones mayores de 5 μM (O, círculos sin relleno). Se montó fsyn en las mismas condiciones, excepto en que la concentración de fsyn fue 2 mg/ml y la incubación fue durante 120 h. MTC muestra un mayor efecto inhibidor con fsyn que con tsyn, con la inhibición produciéndose a 0,05 μM con el primero (●, círculos con relleno).

20 Figura 12. Esta figura muestra que en los estadios posteriores de montaje (160 h) cuando la señal de tioflavina T ha alcanzado una meseta, la señal de tioflavina T es más sensible a la inhibición por parte de MTC que la señal de primulina, con un efecto significativo observándose 0,05 μM .

25 Figura 13. *Acción inhibidora de DEETC sobre la expresión de SSFsyn en células NIE*. Cada concentración de fármaco (0-100 nM) se llevó a cabo por triplicado. Se añadió DEETC con dbcAMP y las células se analizaron después de 2 días mediante inmunotransferencia con mAb 42.

Figura 14. *Presencia de bandas de proteína adicionales que se detectan con mAb 42 pero no con mAb 211*. Carril 1, sin tratar; carriles 2, 3, 4, tres placas independientes que se diferenciaron usando dbcAMP.

30 Figura 15. *α -Sinucleína agregada en células NIE que expresan SSFsyn*. Panel izquierdo, células SSFsyn; panel derecho, células no transfectadas de control NIE-115 después de tratamiento con dbcAMP.

35 Figura 16. *α -Sinucleína agregada en células NIE que expresan SSFsyn*. Células SSFsyn teñidas con anti- α -sinucleína etiquetado con rojo Texas (izquierda); panel derecho, etiquetado con primulina; panel medio, imagen fusionada que muestra la ubicación conjunta de etiquetado con anticuerpo y primulina.

40 Figura 17. *Efecto de MTC en la polimerización de tsyn*. Se incubó tsyn-16 a 1 mg/ml (95 μM) en Tris.HCl 20 mM pH 7,5, 50 $\mu\text{g/ml}$ de heparina a 37 °C con mezcla, en presencia de MTC a las concentraciones que se muestran. Se tomaron muestras (10 μl) a diversos tiempos y se sometieron a ensayo para su efecto en la fluorescencia de tioflavina T (panel superior) o primulina (panel inferior) a 1 μM .

Figura 18. *Curvas de unión para diferentes preparaciones de syn*. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de tres preparaciones diferentes de syn como se muestra. El tampón de la fase acuosa fue Tris.HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %.

45 Figura 19A y 19B: *Curvas de unión para syn-10 en diferentes tampones*. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de syn-10. Los tampones de la fase acuosa fueron todos 20 mM, e incluían NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %.

50 Figura 20: *Curvas de unión para diferentes preparaciones de syn*. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de preparaciones de syn como se muestra. El tampón de la fase acuosa fue Tris.HCl 20 mM, pH 7,0, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %.

55 Figura 21: *Curvas de unión para diferentes preparaciones de syn*. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de preparaciones de syn como se muestra. El tampón de la fase acuosa fue Tris.HCl 20 mM, pH 7,0, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %.

60 Figura 22. *Curvas de unión para fsyn-20 y fsyn-22 en diferentes tampones*. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de fsyn-20 en Tris 20 mM pH 7,0 o fosfato de Na 50 mM pH 6,0 o 5,5. B. Se incubó tsyn-13 a 1 μM unido a placas de ELISA con una serie de diluciones de fsyn-20 o fsyn-22 en Na fosfato pH 6,0. En ambos casos, los tampones también contenían NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %.

Ejemplos

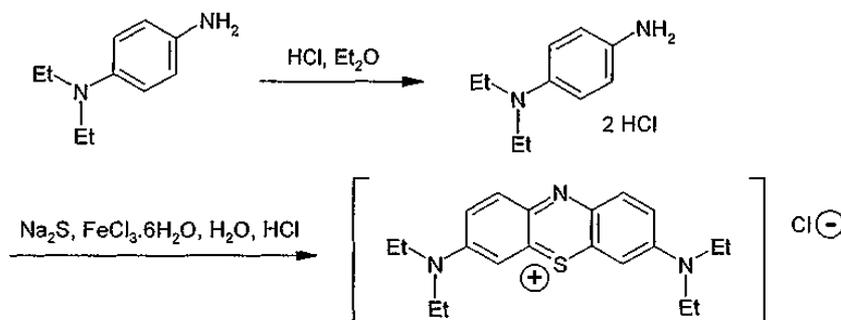
65 Síntesis química

Las siguientes síntesis se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención, como se describe en el presente documento.

Síntesis 1

5

Cloruro de etil-tioninio (ETC)



10 Diclorhidrato de *N,N*-diethyl-*p*-fenilendiamina

Se disolvió *N,N*-diethyl-*p*-fenilendiamina (5 g, 30,4 mmol) en dietil éter (25 cm³) y se añadió ácido clorhídrico (6 cm³, 10 M) y la mezcla se concentró para dar el compuesto del título (7,22 g, 100 %) en forma de un sólido de color rojo/pardo. δ_H (250 MHz; D₂O): 7,68 (4H, m, ArH), 3,69 (4H, c, 7,32, NCH₂), 1,11 (6H, t, 7,32, CH₃); δ_C (62,9 MHz; D₂O): 12,1 (CH₃), 56,4 (NCH₂), 126,8 (ArC), 127,6 (ArC), 135,5 (ArC), 139,1 (ArC).

15

Cloruro de etil-tioninio

Se disolvió diclorhidrato de *N,N*-diethyl-*p*-fenilendiamina (7,22 g, 30,4 mmol) en agua (250 cm³) y el pH se ajustó a 1,6 con HCl, a lo que se añadió sulfuro sódico (> 60 %) (3,95 g, 30,4 mmol) en porciones. La suspensión se agitó hasta que se disolvió la totalidad del sulfuro sódico. Se preparó una solución de cloruro de hierro (III) (27,15 g, 100 mmol) en agua (200 cm³) y la mitad de la solución se añadió a la mezcla. Se produjo un cambio de color inmediato de amarillo claro a azul. La solución se aireó a continuación durante 1 hora antes de que se añadiera la solución restante de cloruro de hierro (III). La mezcla se enfrió a 5 °C y se filtró para retirar una suspensión de color verde claro. Se añadió HCl acuoso (15 cm³, 6 M) al filtrado, seguido de cloruro sódico (60 g), y la suspensión se agitó durante 5 minutos antes de que se filtrara para dar un producto sólido, que se disolvió en DCM, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró para dar un sólido de color púrpura/verde (1,28 g, 22 %). Este sólido de color púrpura/verde se cargó sobre una columna C18 de fase inversa preparada y se lavó con agua (1 l) o hasta que desapareciera el color amarillo. El producto se retiró por lavado de la columna con MeOH/HCl (pH 2) y se concentró para dar el compuesto del título (0,64 g, 11 %) en forma de un sólido pegajoso de color púrpura. δ_H (250 MHz; D₂O): 1,26 (12H, t, 6,5, CH₃), 3,56 (8H, c, 6,5, NCH₂), 7,01 (2H, s, ArH), 7,20 (2H, d, 9,25, ArH), 7,54 (2H, d, 9,25, ArH); m/z (ESI) 340,2 (100 %, [M - Cl]⁺).

20

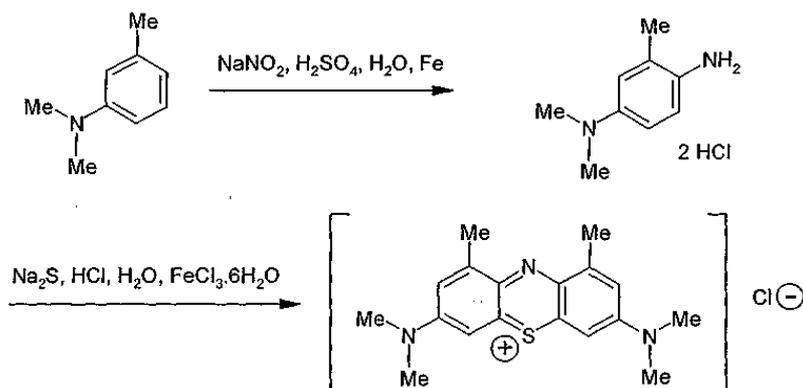
25

30

Síntesis 2

35

Cloruro de 1,9-dimetil-metil-tioninio (DMMTC)



Diclorhidrato de 3-metil-N,N-dimetilfenilendiamina

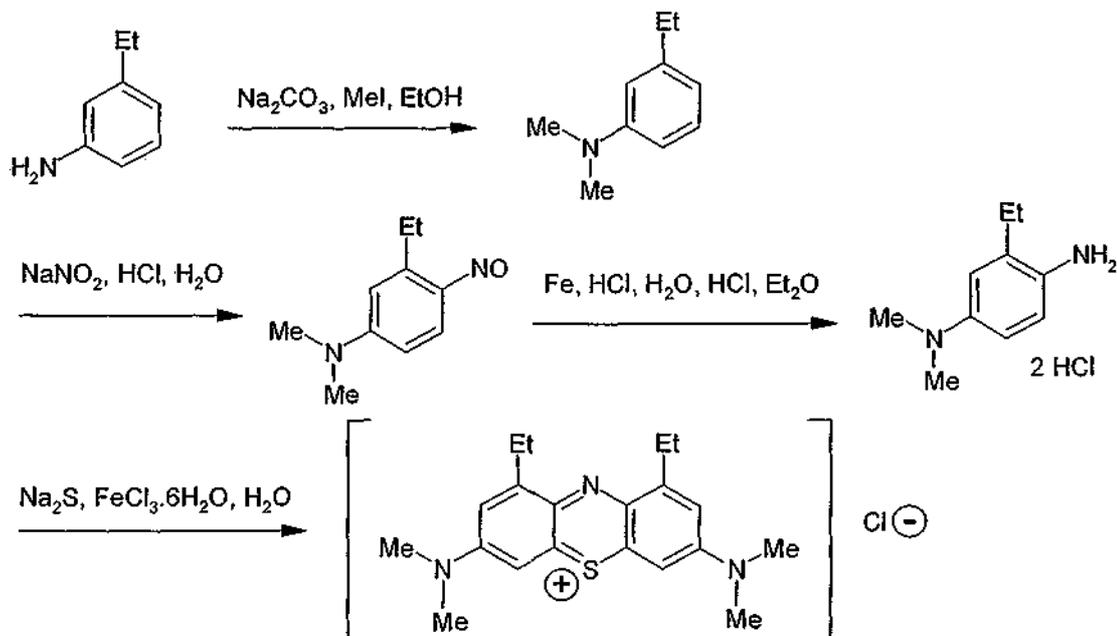
A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ se añadió agua (100 cm³) y la temperatura se redujo a 5 °C con un baño de hielo. A esta solución enfriada se añadió cuidadosamente ácido sulfúrico (98 %, 22,5 g). A esta solución se añadió 3-metil-N,N-dimetilanilina (10 g, 74 mmol) y a continuación nitrito sódico (5,6 g, 81,4 mmol), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron limaduras de (Fe) (12,8 g, 229 mmol) y la mezcla se agitó durante un periodo adicional de 2 horas. La solución se filtró y a continuación se neutralizó con solución saturada de hidrogenocarbonato sódico y las sustancias orgánicas se extrajeron en acetato de etilo (3 x 100 cm³). Los extractos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para dar un aceite de color pardo. El aceite se disolvió en dietil éter (100 cm³) y se añadió ácido clorhídrico concentrado (50 cm³). La solución se evaporó hasta sequedad para dar el compuesto del título (10 g, 60 %) en forma de un sólido de color castaño claro. ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 2849 (CH), 2821 (CH), 2543 (CH), 2444 (CH), 1586 (C=N), 1487 (CH), 1445 (CH), 1415 (CH), 1138 (CH); δ_{H} (250 MHz; D₂O): 7,59 (1H, s, ArH), 7,50 (2H, s, ArH), 3,24 (6H, s, CH₃), 2,39 (3H, s, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; D₂O) 18,9 (CH₃), 48,8 (CH₃), 122,1 (ArC), 126,2 (ArC), 127,6 (ArC), 133,7 (ArC), 137,4 (ArC), 144,4 (ArC).

Cloruro de dimetilmetiltioninio

A un matraz de fondo redondo de 500 cm³ se añadió diclorhidrato de 3-metil-N,N-dimetil-fenilendiamina (0,9 g, 4,03 mmol) que se disolvió en ácido clorhídrico acuoso (50 cm³, 3 M) antes de que se añadiera sulfuro sódico (> 60 %) (0,52 g, 4,03 mmol). Se disolvió hexahidrato de cloruro de hierro (III) (7,26 g, 27 mmol) en agua (50 cm³) y la mitad de esta solución se vertió en la mezcla de reacción, para dar un color azul inmediato. La solución se aireó a continuación durante 2 horas antes de que se añadiera la solución acuosa restante de cloruro de hierro (III). La mezcla se enfrió a 5 °C y se filtró; el precipitado se disolvió en agua a ebullición (60 cm³), se filtró, y se enfrió. Se añadió ácido clorhídrico (10 cm³, 6 M) a la solución enfriada, que a continuación se filtró para producir el compuesto del título (0,22 g, 16 %) en forma de un sólido de color púrpura/azul. ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 2926 (CH), 1604 (C=N), 1535, 1496, 1444 (CH), 1404 (CH), 1315 (CH), 1185 (CH); δ_{H} (250 MHz; DMSO): 7,29 (2H, s, ArH), 7,23 (2H, s, ArH), 3,29 (12H, s, CH₃), 2,55 (6H, s, CH₃); δ_{C} (62,9 MHz; DMSO): 18,9 (CH₃), 41,5 (CH₃), 105,7 (ArC), 118,7 (ArC), 133,6 (ArC), 134,5 (ArC), 147,2 (ArC), 154,2 (ArC); Anál. calc. para C₁₈H₂₂N₃S·3H₂O: C, 51,98; H, 6,74; N, 10,11; S, 7,70. Encontrado: C, 52,03; H, 6,59; N, 10,05; S, 7,66.

Síntesis 3

Cloruro de 1,9-dietil-metil-tioninio (DEMTC)

*N,N-Dimetil-m-etilanilina*

A un matraz de fondo redondo de 100 cm³ se añadieron 3-etilanilina (10 g, 82,5 mmol), etanol (15 cm³), carbonato sódico (11,81 g, 111,4 mmol). Se añadió gota a gota yoduro de metilo (31,63 g, 222 mmol). A continuación, la mezcla se calentó a 45 °C durante 10 horas antes de enfriarse a temperatura ambiente y añadir agua (100 cm³). La

mezcla se extrajo en dietil éter ($3 \times 100 \text{ cm}^3$) y los extractos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para dar el compuesto del título (4,68 g, 38 %) en forma de un aceite de color amarillo claro. v_{max} (puro)/ cm^{-1} : 3045 (CH), 2960 (CH), 2920 (CH), 2891 (CH), 2797 (CH), 1597 (C=N), 1494 (CH), 1438 (CH), 1352 (CH), 1225 (CH); δ_{H} (250 MHz; CDCl_3): 7,22 (1H, t, 7,75, ArH), 6,63 (3H, m, ArH), 2,97 (6H, s, NCH_3), 2,63 (2H, c, 7,5, CH_2), 1,27 (3H, t, 7,5, CH_3); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl_3): 15,8 (CH_3), 29,5 (NCH_2), 40,8 (NCH_3), 110,3 (ArC), 112,4 (ArC), 116,5 (ArC), 129,1 (ArC), 145,3 (ArC), 150,9 (ArC).

Diclorhidrato de *N,N*-dimetil-*m*-etil-*p*-fenilendiamina

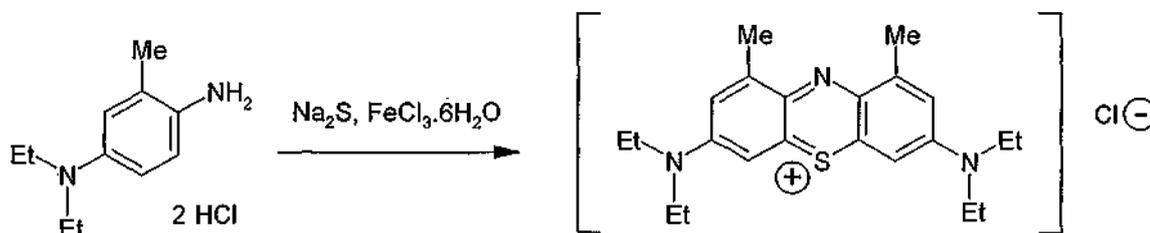
10 A un matraz de fondo redondo de 250 cm^3 se añadieron *N,N*-dimetil-*m*-etilanilina (4,68 g, 31,3 mmol), agua (100 cm^3) y ácido clorhídrico ($8,5 \text{ cm}^3$, 37 %) y la solución se enfrió a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación se añadió gota a gota una solución acuosa (80 cm^3) de nitrito sódico (2,46 g, 3,57 mmol) a la mezcla de anilina y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadieron limaduras de hierro (Fe) (5,24 g, 94 mmol) y ácido clorhídrico ($8,5 \text{ cm}^3$, 37 %) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La suspensión se filtró y el filtrado se ajustó a pH 7 con solución de bicarbonato sódico antes de la extracción en acetato de etilo ($3 \times 50 \text{ cm}^3$). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para producir un aceite de color pardo. El aceite se disolvió en etanol (100 cm^3) y dietil éter (80 cm^3) y se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico (7 cm^3 , 37 %) para dar el compuesto del título (7,42 g, 72 %) en forma de un sólido de color castaño claro. v_{max} (KBr)/ cm^{-1} : 2976 (CH), 2894 (CH), 2859 (CH), 2753 (CH), 1583 (C=N), 1508 (CH), 1486 (CH), 1459 (CH), 1183 (CH); δ_{H} (250 MHz; D_2O): 7,66 (1H, s, ArH), 7,56 (2H, s, ArH), 3,29 (6H, s, NCH_3), 2,74 (2H, c, 7,5, CH_2), 1,25 (3H, t, 7,5, CH_3); δ_{C} (62,9 MHz; CDCl_3): 15,5 (CH_3), 25,6 (NCH_2), 48,9 (NCH_3), 122,1 (ArC), 124,6 (ArC), 128,1 (ArC), 132,6 (ArC), 143,3 (ArC), 144,9 (ArC).

Cloruro de 1,9-dietil metiltioninio

25 Se disolvió diclorhidrato de *N,N*-Dimetil-*m*-etil-*p*-fenilendiamina (1,3 g, 5,5 mmol) en agua (50 cm^3) y la solución se ajustó a pH 1,6. A continuación se añadió sulfuro sódico > 60 % (0,71 g, 5,5 mmol) a la solución de color rosa. A la suspensión se añadió una solución acuosa de cloruro de hierro (III) (2,23 g, 8,2 mmol en 50 cm^3 de agua) y se produjo un cambio de color inmediato a púrpura. La solución se aireó a continuación durante 1 hora antes de que se añadiera una segunda porción de solución de cloruro de hierro (III) (2,23 g, 8,2 mmol en 50 cm^3 de agua). La solución se enfrió a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de filtrarse y lavarse el precipitado con agua. Al filtrado se añadió cloruro sódico (50 g) y la solución se agitó durante 10 minutos, y el color cambió a rojo/púrpura a medida que el producto precipitaba. La suspensión se filtró y el sólido se disolvió en diclorometano (100 cm^3) y metanol (10 cm^3) antes de secarse sobre sulfato de magnesio. La filtración y la concentración dieron el compuesto del título (0,15 g, 15 %) en forma de un sólido de color verde. v_{max} (KBr)/ cm^{-1} : 3408 (CH), 2613 (CH), 1606 (C=N), 1399 (CH), 1316 (CH); δ_{H} (250 MHz; D_2O): 6,55 (2H, s, ArH), 6,23 (2H, s, ArH), 2,92 (12H, s, NCH_3), 2,56 (4H, c, 7,5, CH_2), 0,99 (6H, t, 7,5, CH_3); (ESI), 340,4 (100 %, $[\text{M} - \text{Cl}]^+$). Opcionalmente, se llevó a cabo cromatografía en columna ultrarrápida para retirar los residuos de cloruro de hierro, con un 10 % de metanol: 90 % de diclorometano como eluyente y usando sílice 40-63 μ 60 Å.

Síntesis 4

Cloruro de 1,9-dimetil-etil-tioninio (DMETC)



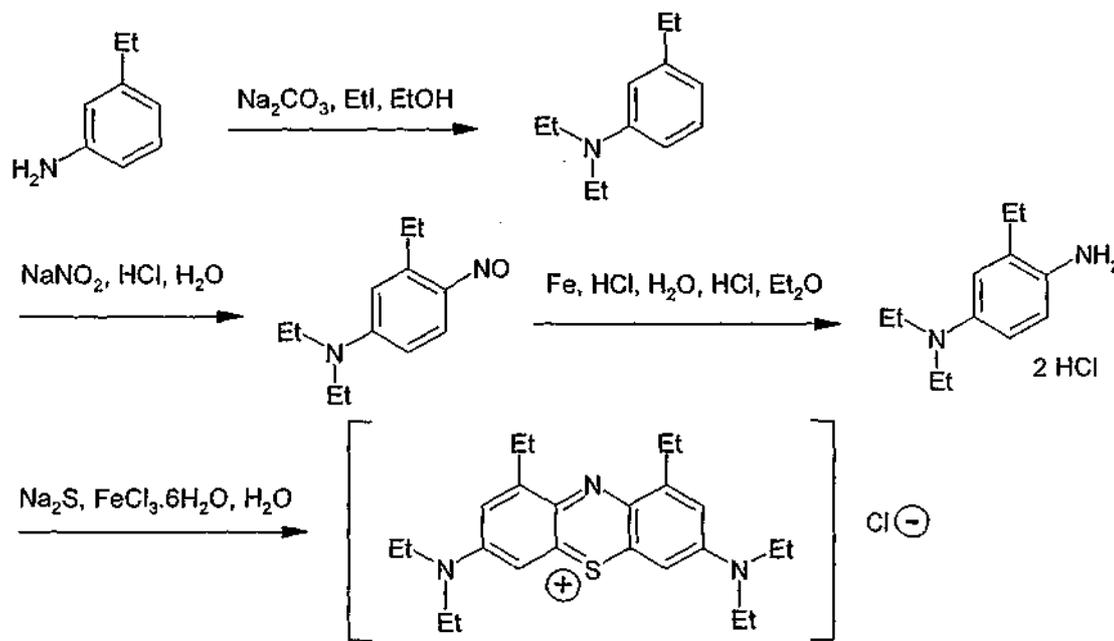
45 Se disolvió diclorhidrato de *N,N*-di-etil-3-metil-4-fenilendiamina (10,74 g, 50 mmol) en agua (400 cm^3) y el pH se ajustó a 1,6, a lo que se añadió a continuación sulfuro sódico (>60 %) (3,90 g, 50 mmol). Se añadió cloruro de hierro (III) (20,28 g, 75 mmol) en forma de una solución acuosa (175 cm^3) para dar un cambio de color inmediato de amarillo a azul oscuro. La mezcla se aireó durante 1 hora antes de que se añadiera una segunda alícuota de cloruro de hierro (III) acuoso (20,28 g, 75 mmol en 175 cm^3). La solución se enfrió a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo a esa temperatura durante 1 hora antes de filtrarse. El filtrado tenía cloruro sódico (200 g) añadido y se filtró para producir el producto en bruto en forma de un sólido de color azul/púrpura. El sólido en bruto se purificó por cromatografía en columna (eluyéndose con un 10 % de MeOH, 90 % de DCM usando sílice 40-63 μ 60 Å) para dar el compuesto del título (0,80 g, 4 %) en forma de un sólido de color verde/púrpura. v_{max} (KBr)/ cm^{-1} : 2971 (CH), 2921 (CH), 2865 (CH), 1600 (C=N), 1412 (CH), 1326 (CH); δ_{H} (250 MHz; D_2O): 6,62 (2H, s, ArH), 6,39 (2H, s, ArH), 3,30 (8H, c, NCH_2), 1,89 (6H,

s, ArCH₃), 1,09 (12H, t, CH₃); δ_c (62,9 MHz; D₂O) 12,6 (CH₃), 18,0 (CH₃), 46,2 (NCH₂), 103,6 (ArC), 117,1 (ArC), 132,3 (ArC), 133,9 (ArC), 147,3 (ArC), 151,9 (ArC); m/z (ESI) 368,1 (100 %, [M - Cl]⁺).

Síntesis 5

5

Cloruro de 1,9-dietil-etil-tioninio (DEETC)



10 *N,N*-Dietil-*m*-etilanilina

A un matraz de fondo redondo de 100 cm³ se añadieron 3-etilanilina (5,0 g, 41,3 mmol), etanol (7,5 cm³), carbonato sódico (5,9 g, 55,7 mmol). Se añadió gota a gota yoduro de etilo (17,38 g, 111,4 mmol). A continuación, la mezcla se calentó a 45 °C durante 12 horas antes de enfriarse a temperatura ambiente y añadir agua (50 cm³). La mezcla se extrajo en dietil éter (3 x 50 cm³) los extractos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para dar el compuesto del título (7,03 g, 96 %) en forma de un aceite de color amarillo claro. δ_H (250 MHz; CDCl₃): 7,20 (1H, dd, 9, 7,25, ArH), 6,60 (3H, m, ArH), 3,43 (4H, c, 7, NCH₂), 2,69 (2H, c, 7,25, CH₂), 1,32 (3H, t, 7,5, CH₃), 1,23 (6H, t, 7, CH₃); δ_c (62,9 MHz; CDCl₃): 12,7 (CH₃), 15,8 (CH₃), 29,5 (CH₂), 44,4 (NCH₃), 109,4 (ArC), 111,4 (ArC), 115,1 (ArC), 129,2 (ArC), 145,4 (ArC), 147,9 (ArC).

20

Diclorhidrato de *N,N*-Dietil-*m*-etil-*p*-fenilendiamina

A un matraz de fondo redondo de 250 cm³ se añadieron *N,N*-dietil-*m*-etilanilina (5 g, 28,2 mmol), agua (50 cm³) y ácido clorhídrico (9 cm³, 37 %) y la solución se enfrió a 5 °C. A continuación se añadió gota a gota una solución acuosa (20 cm³) de nitrito sódico (2,14 g, 31,0 mmol) a la mezcla de anilina y se agitó durante 1 hora a baja temperatura. Se añadieron limaduras de hierro (Fe) (4,72 g, 84,6 mmol) y ácido clorhídrico (9 cm³, 37 %) y la mezcla se agitó por debajo de 30 °C durante 2 horas. La suspensión se filtró y el filtrado se ajustó a pH 7 con solución de bicarbonato sódico antes de la extracción en acetato de etilo (3 x 50 cm³). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para producir un aceite de color pardo. El aceite en bruto se purificó por cromatografía en columna (eluyéndose con acetato de etilo usando sílice 40-63 μ 60 Å) para dar la fenilendiamina en forma de un aceite de color pardo (2,2 g, 41 %). El aceite se disolvió en dietil éter (50 cm³) y se añadió ácido clorhídrico (2,5 cm³, 37 %) y la solución se concentró para dar el compuesto del título (2,76 g, 41 %) en forma de un sólido de color pardo claro. δ_H (250 MHz; D₂O): 7,50 (3H, m, ArH), 3,59 (4H, c, 7,25, NCH₂), 2,69 (2H, c, 7,5, CH₂), 1,20 (3H, t, 7,5, CH₃), 1,03 (6H, t, 7,25, CH₃); δ_c (62,9 MHz; D₂O): 12,1 (CH₃), 15,5 (CH₃), 25,5 (CH₂), 56,3 (NCH₂), 123,9 (ArC), 126,0 (ArC), 127,9 (ArC), 133,1 (ArC), 139,4 (ArC), 143,3 (ArC).

35

Cloruro de 1,9-dietil etiltioninio

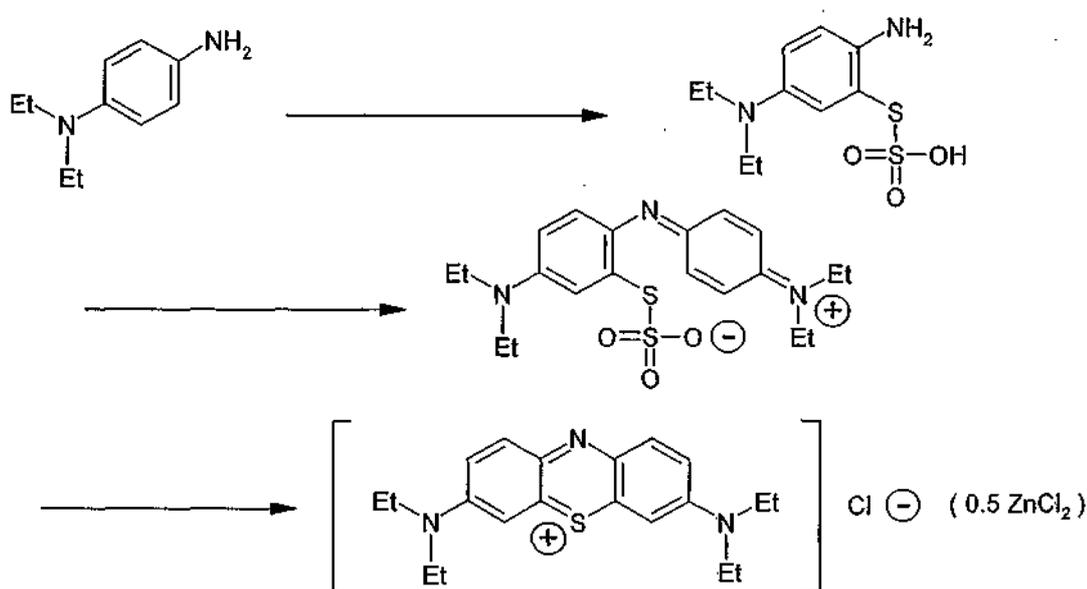
Se disolvió diclorhidrato de *N,N*-dietil-*m*-etil-*p*-fenilendiamina (2 g, 7,5 mmol) en agua (75 cm³) y la solución se ajustó a pH 1,6. A la solución de color rosa se añadió a continuación sulfuro sódico (> 60 %) (1,35 g, 10,4 mmol) en porciones. A la suspensión se añadió una solución acuosa de cloruro de hierro (III) (4,22 g, 15,6 mmol en 35 cm³ de agua) donde hubo un cambio de color inmediato a púrpura. La solución se aireó a continuación durante 1 hora antes

40

de que se añadiera una segunda porción de solución de cloruro de hierro (III) (4,22 g, 15,6 mmol en 35 cm³ de agua). La solución se enfrió a 5 °C antes de enfriarse y lavar el precipitado con agua. El precipitado también se lavó con etanol y el etanol se concentró para dar un sólido pegajoso de color púrpura. Al filtrado acuoso se añadió cloruro sódico (50 g) y la solución se agitó durante 10 minutos mediante lo cual el color cambió a rojo/púrpura a medida que el producto precipitó. La suspensión se filtró y el sólido se disolvió en diclorometano (100 cm³) y metanol (10 cm³) antes de secarse sobre sulfato de magnesio. La filtración y la concentración con el producto soluble en etanol dieron el compuesto del título (0,06 g, 3 %) en forma de un sólido de color púrpura. δ_H (250 MHz; D₂O): 6,73 (2H, s, ArH), 6,48 (2H, s, ArH), 3,45 (8H, dc a, NCH₂), 2,46 (4H, c, 7,5, CH₂), 1,17 (12H, dt a, CH₃), 0,93 (6H, t, 7,5, CH₃); m/z (ESI) 396,2 (100 %, [M - Cl]⁺). Opcionalmente, se llevó a cabo cromatografía en columna ultrarrápida para retirar los residuos de ion cloruro, con un 10 % de metanol: 90 % de diclorometano como eluyente y usando sílice 40-63 μ 60 Å.

Síntesis 6

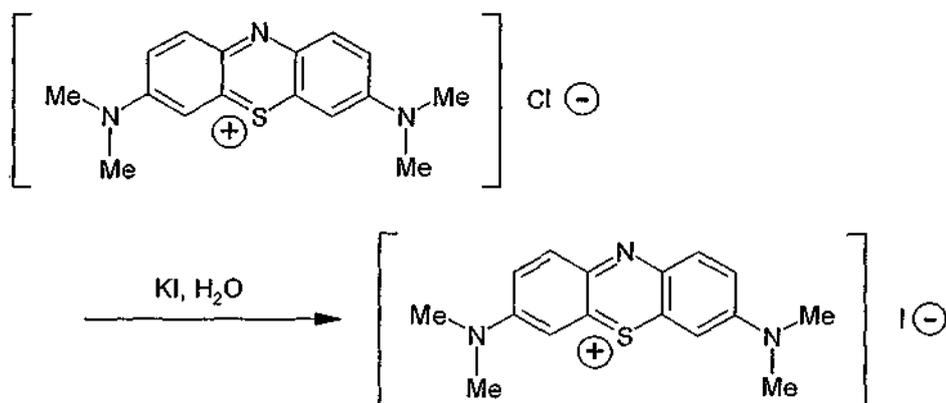
15 Sal doble de cloruro de etil-tioninio y cloruro de cinc (ETZ)



Una mezcla en agitación de *N,N*-dietil-*p*-fenilendiamina (5,0 g, 30,4 mmol) en H₂O (100 cm³) y H₂SO₄ (conc., '98 %', 1 cm³) se trató con solución no reductora de ZnCl₂ (ZnCl₂, 7,60 g, 55 mmol en 15 cm³ de H₂O con Na₂Cr₂O₇·2H₂O, 100 mg) para producir una mezcla de reacción de color rojizo. Las adiciones de solución de Al₂(SO₄)₃·16H₂O (5,80 g, 9,2 mmol en 10 cm³ de H₂O), solución de Na₂S₂O₃·5H₂O (8,0 g, 32,2 mmol en 10 cm³ H₂O) y un tercio de una solución de Na₂Cr₂O₇·2H₂O (8,7 g, 29,2 mmol en 15 cm³ de H₂O) fueron seguidas por un rápido aumento en la temperatura hasta 40 °C. Se añadió una solución de *N,N*-dietilanilina (3,0 g, 20,1 mmol en HCl conc., 4 cm³), y se siguió de una adición de la solución restante de Na₂Cr₂O₇·2H₂O. Se observó un precipitado de color verde oscuro. La temperatura aumentó rápidamente hasta 75 °C, después de que se añadiera una suspensión de MnO₂ activado (3,80 g, 44,7 mmol en 5 cm³ de H₂O). La temperatura se aumentó hasta 85 °C, y se mantuvo en agitación a esa temperatura durante 30 minutos. Se observó una solución de color azul con precipitado. La mezcla de reacción se enfrió a 50 °C y se añadió lentamente H₂SO₄ (conc., 11 cm³). La reacción se enfrió adicionalmente hasta 20 °C; y se filtró al vacío para recuperar el precipitado, que se lavó a continuación con solución salina saturada (agua saturada con sal). Este sólido de color negro se redisolvió en H₂O (250 cm³) a 100 °C, y se enfrió, seguido de filtración al vacío para retirar los materiales insolubles. El filtrado se trató con ZnCl₂ (4 g) y NaCl (23 g) y se dejó en el frigorífico durante 16 horas, después de lo cual se recuperó el precipitado resultante por filtración al vacío, se lavó con solución salina saturada (30 cm³), y se secó en un horno de vacío durante 3 horas, para dar el compuesto del título (5,7 g, 71 %) en forma de un polvo de color rojo herrumbroso. δ_H (250 MHz, D₂O): 1,20 (12H, t a, CH₃), 3,50 (8H, c a, CH₂), 6,80 (2H, s, ArH), 7,05 (2H, c a, ArH) y 7,30 (2H, d a, ArH). Véase, por ejemplo, Fierz-David y Blangley, 1949, "F. Oxazine and Thiazine Dyes," en: Fundamental Processes of Dye Chemistry, publicado por Interscience (Londres, UK), pág. 308-314.

40 Síntesis 7

Yoduro de metil-tioninio (MTI)

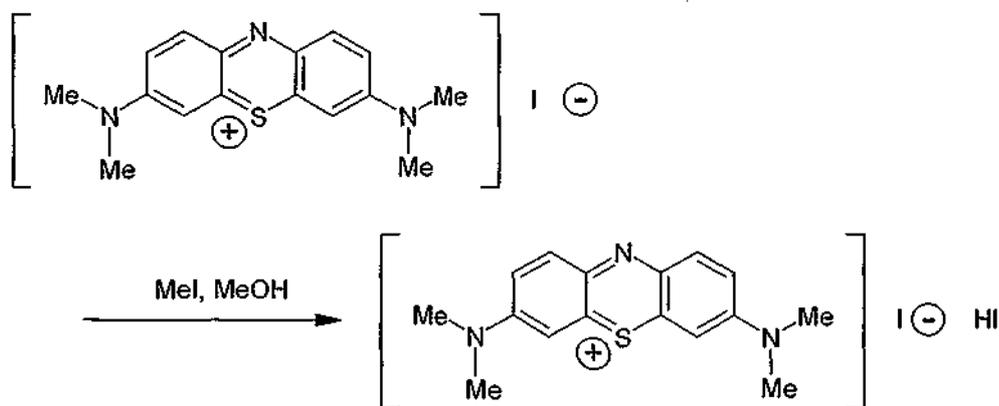


- 5 Se disolvió cloruro de metil-tioninio (2,00 g, 6,25 mmol) en agua (50 cm³) y se añadió yoduro potásico (1,56 g, 9,4 mmol) con agitación. Se formó un precipitado, que se filtró y el sólido se recristalizó en agua a ebullición (50 cm³) para producir el compuesto del título (1,98 g, 77 %) en forma de agujas finas de color verde. δ_{H} (250 MHz; DMSO): 7,88 (2H, d a, ArH), 7,49 (4H, s a, ArH), 3,37 (12H, s, CH₃). Análisis para C₁₆H₁₈N₃SI: C, 46,72; H, 4,41; N, 10,22; S, 7,80; I, 30,85; Encontrado: C, 46,30; H, 4,21; N, 10,14; S, 7,86; I, 29,34.

Síntesis 8

10

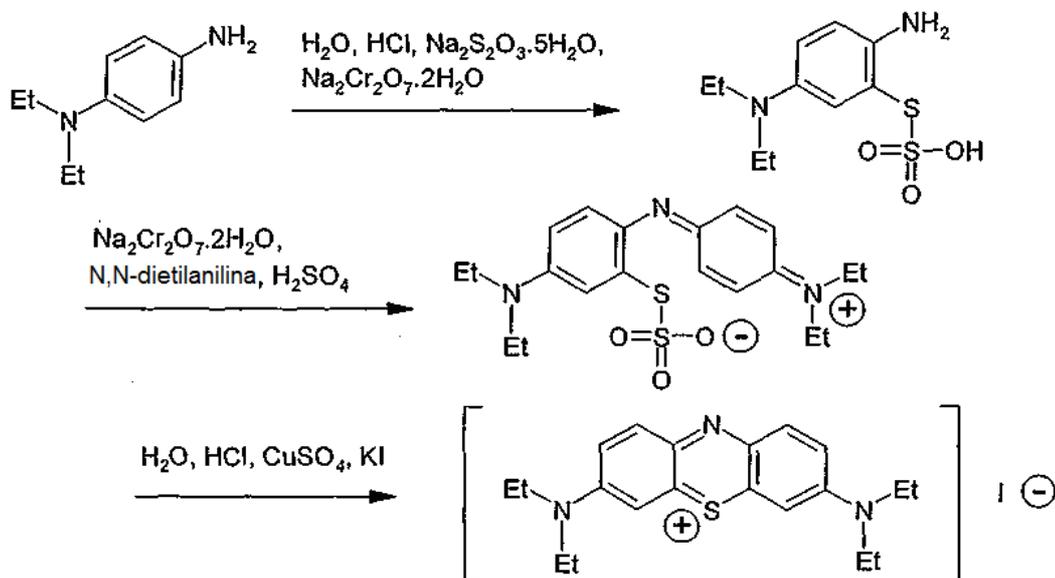
Sal mixta de yoduro de metil-tioninio y yoduro de hidrógeno (MTI.HI)



- 15 Se disolvió yoduro de metil-tioninio (0,50 g, 1,22 mmol) en metanol (20 cm³) y se añadió yoduro de metilo (1,90 g, 13,37 mmol) mientras se agitaba. La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas antes de que se añadiera una cantidad adicional de yoduro de metilo (0,42 g, 6,69 mmol) y la mezcla se calentó de nuevo una vez a reflujo y se agitó durante 8 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, para dar un sólido que se filtró y se lavó con metanol para producir el compuesto del título (0,30 g, 46 %) en forma de un sólido de color verde bronce. δ_{H} (250 MHz; DMSO): 7,82 (2H, d, $J = 8,5$, ArH), 7,42 (4H, s, ArH), 3,34 (12H, s, CH₃). δ_{C} (62,9 MHz; DMSO): 153,8 (ArC), 137,9 (ArC), 134,9 (ArC), 133,5 (ArC), 119,1 (ArC), 118,8 (ArC), 106,9 (ArC), 106,6 (ArC), 41,1 (NCH₃).

Síntesis 9

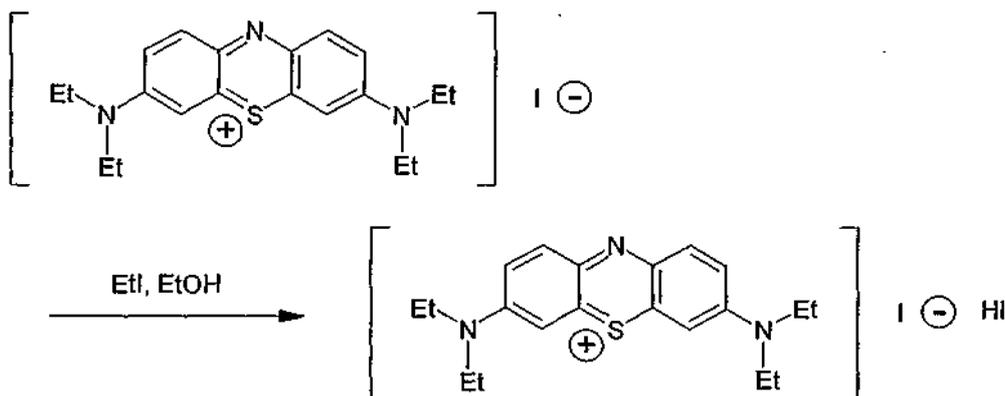
- 25 Yoduro de etil-tioninio (ETI)



- Una mezcla en agitación de *N,N*-dietil-*p*-fenilendiamina (10,0 g, 61 mmol) en ácido clorhídrico acuoso (0,5 M, 200 cm³) se ajustó a pH 2 con hidróxido sódico acuoso (10 %). La solución de diamina se enfrió a 5 °C antes de la adición de Na₂S₂O₃·5H₂O acuoso (16,65 g, 67 mmol en 20 cm³ H₂O). Se añadió gota a gota una solución acuosa de Na₂Cr₂O₇·2H₂O (7,27 g, 24 mmol en 35 cm³ de H₂O) a la mezcla durante un periodo de 15 minutos para dar una suspensión de color negro. La suspensión se agitó a 5 °C durante 1 hora (pH = 8,07, T = 3,7 °C). Una solución de *N,N*-dietilanilina (8,25 g, 61 mmol), H₂SO₄ (6 g) y agua (10 cm³) se enfrió a 5 °C antes de la adición a la suspensión. A continuación se añadió gota a gota una solución acuosa de Na₂Cr₂O₇·2H₂O (19,09 g, 64 mmol en 50 cm³ de H₂O) a la mezcla durante un periodo de 20 minutos para dar una suspensión espesa de color verde oscuro. La mezcla se agitó a 5 °C durante 2 horas (pH = 6,75, T = 6 °C) antes de filtrarse. El sólido de color verde púrpura obtenido se lavó con agua (2 x 50 cm³). El sólido se suspendió en ácido clorhídrico acuoso (300 cm³, pH 2) para dar una suspensión con un pH = 6,37 a 22 °C. A la suspensión se añadió CuSO₄ (1,52 g, 6,1 mmol) y la mezcla se calentó a 90 °C donde se formó una solución de color azul oscuro. Después de agitar a esta temperatura durante 1 hora la mezcla se enfrió a 25 °C y se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 50 cm³), el filtrado se ajustó de pH 6,33 a pH 2,00, T = 25 °C con ácido clorhídrico (5 M). La solución de color azul oscuro se calentó a 80 °C y se añadió yoduro potásico (14 g) y después de enfriamiento se depositó un precipitado de color naranja púrpura. La filtración dio un polvo de color púrpura (8,8 g, 31 %),
- que se recristalizó en etanol caliente (400 cm³) para dar el compuesto del título en forma de agujas finas de color púrpura. Pf 211 °C; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹: 3574 (CH), 3484 (CH), 3028 (CH), 2965 (CH), 1662 (C=C), 1539 (CH), 1474 (CH), 1346 (CH); δ_{c} (62,9 MHz, CDCl₃): 1,33 (12H, t, 7, CH₃), 3,72 (8H, c, 7, NCH₂), 7,23 (2H, d, 9,75, ArH), 7,41 (2H, s, ArH), 7,83 (2H, d, 9,75, ArH); δ_{H} (62,9 MHz, CDCl₃): 152,4, 138,8, 135,7, 135,2, 118,3, 106,4, 46,8, 13,2.

25 Síntesis 10

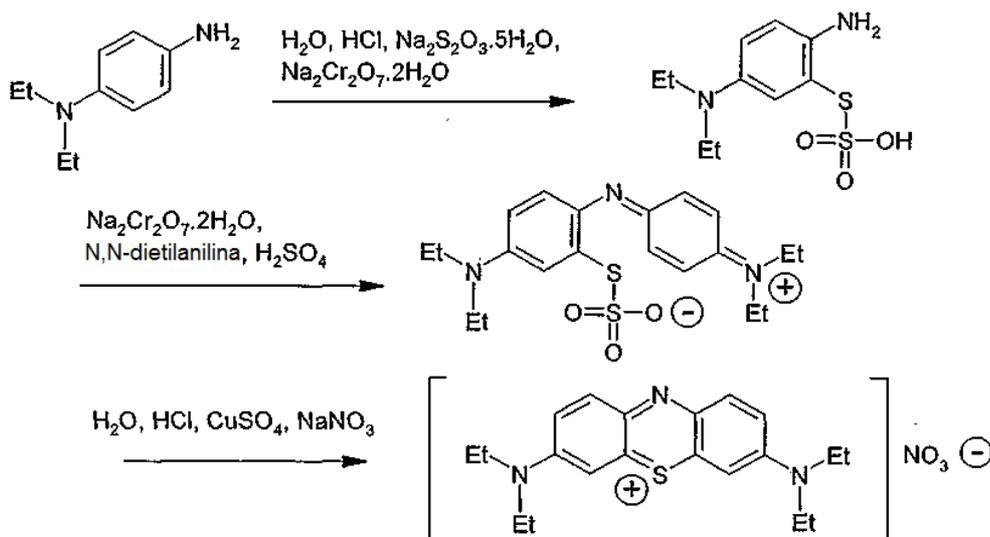
Sal mixta de yoduro de etil-tioninio y yoduro de hidrógeno (ETI.HI)



Se disolvió yoduro de etil-tioninio (2,00 g, 4,28 mmol) en etanol (100 cm³) y se añadió yoduro de etilo (27,35 g, 175 mmol) mientras se agitaba. La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas, a continuación se enfrió a temperatura ambiente, para dar un precipitado que se filtró y se lavó con etanol para producir el compuesto del título (1,02 g, 40 %) en forma de un sólido de color bronce. δ_H (250 MHz; D₂O): 7,90 (2H, d a, ArH), 7,42 (4H, s, ArH), 2,45 (8H, c a, NCH₂), 1,23 (12H, t a, CH₃).

Síntesis 11

Nitrato de etil-tioninio (ETN)



Una mezcla en agitación de N,N -dietyl-*p*-fenilendiamina (10,0 g, 61 mmol) en ácido clorhídrico acuoso (0,5 M, 200 cm³) se ajustó a pH 2 con hidróxido sódico acuoso (10 %). La solución de diamina se enfrió a 5 °C antes de la adición de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ acuoso (16,65 g, 67 mmol en 20 cm³ H₂O). Se añadió gota a gota una solución acuosa de $Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ (7,27 g, 24 mmol en 35 cm³ de H₂O) a la mezcla durante un periodo de 15 minutos para dar una suspensión de color negro. La suspensión se agitó a 5 °C durante 1 hora (pH = 8,07, T = 3,7 °C). Una solución de N,N -diethylanilina (8,25 g, 61 mmol), H_2SO_4 (6 g) y agua (10 cm³) se enfrió a 5 °C antes de la adición a la suspensión. A continuación se añadió gota a gota una solución acuosa de $Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ (19,09 g, 64 mmol en 50 cm³ de H₂O) a la mezcla durante un periodo de 20 minutos para dar una suspensión espesa de color verde oscuro. La mezcla se agitó a 5 °C durante 2 horas (pH = 6,75, T = 6 °C) antes de filtrarse. El sólido de color verde púrpura obtenido se lavó con agua (2 x 50 cm³). El sólido se suspendió en ácido clorhídrico acuoso (300 cm³, pH 2) para dar una suspensión con un pH = 6,37 a 22 °C. A la suspensión se añadió $CuSO_4$ (1,52 g, 6,1 mmol) y la mezcla se calentó a 90 °C en la que se formó una solución de color azul oscuro. Después de agitar a esta temperatura durante 1 hora, la mezcla se enfrió a 25 °C y se filtró. El sólido se lavó con agua (2 x 50 cm³), y el filtrado se ajustó de pH 6,33 a pH 2,00, T = 25 °C con ácido clorhídrico (5 M). La solución de color azul oscuro se calentó a 80 °C y tenía añadido nitrato sódico (50 g) y se dejó enfriar a 25 °C lentamente mientras se agitaba suavemente. El producto se filtró en forma de agujas de color verde (6,80 g, 28 %). δ_H (250 MHz, CDCl₃): 1,36 (12H, t, 7, CH₃), 3,72 (8H, c, 7, NCH₂), 7,23 (2H, d, 9,5, ArH), 7,39 (2H, s, ArH), 7,89 (2H, d, 9,5, ArH); δ_C (62,9 MHz, CDCl₃): 152,5, 138,8, 135,7, 135,6, 118,1, 106,4, 46,6, 12,9.

Estudios biológicos

Métodos

Purificación de proteínas de α -sinucleína

Se construyeron dos plásmidos para la expresión de α -sinucleína en *E. coli*. El dominio de agregación del núcleo de la α -sinucleína (aminoácidos 31-109) se expresó con una etiqueta de polihistidina N-terminal (tsyn), que permite su purificación en una columna de quelación con Ni. Se expresó α -sinucleína de longitud completa (syn) sin etiqueta, y se purificó por cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE Sefarosa, y en algunos casos seguido de purificación en CM-Sefarosa. Para ambas proteínas, el extracto bacteriano se enriqueció en primer lugar tomando un corte de sulfato de amonio al 30-50 %. Las proteínas eluidas de la columna se dializaron frente a CAPS 20 mM, pH 9,5 o Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM (véase la Tabla 1 para detalles), y se almacenaron a -70 °C.

Ensayo de fluorescencia para montaje de filamentos

Se incubaron las proteínas de α -sinucleína (tsyn o fsyn) a 37 °C durante los tiempos indicados en las leyendas de las Figuras con mezcla para inducir la formación de fibrillas. En algunos casos, se incluyeron 50 μ g/ml de heparina para mejorar la formación de fibrillas.

Las muestras de 10 μ l se diluyeron a continuación a 100 μ l con agua, más tioflavina T o primulina a 1 μ M, o 0,2 o 5 μ M en algunos casos. Se midieron los espectros de excitación de fluorescencia en placas de 96 pocillos en un Espectrofotómetro de Fluorescencia Varian Carey Eclipse, con una longitud de onda de emisión de 480 nm. Los espectros de excitación se corrigieron para la señal medida sin tsyn y la señal de pico medida de los espectros. Los datos se normalizaron al valor medido sin compuesto y se midieron los valores de P50 a partir de gráficas de la fluorescencia normalizada frente a la concentración del compuesto.

Ensayo de ELISA para la unión sinucleína-sinucleína

Se usó un ensayo en fase sólida para medir la autoasociación de α -sinucleína. Se unió a la placa de ensayo tsyn diluida en tampón de carbonato (pH 8,5), y se añadió α -sinucleína de longitud completa (fsyn) a la fase acuosa. El tampón de unión de la fase acuosa fue fosfato de Na 50 mM, pH 6,0, NaCl 20 mM, Tween-20 al 0,05 %, gelatina de piel de pescado al 1 %. La fsyn unida se detectó usando un anticuerpo comercial (211) que no reconoce tsyn.

Ejemplo 1. Purificación de α -sinucleína

La Figura 1 muestra muestras de la purificación de tsyn analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie. La columna de afinidad de Ni proporciona una purificación muy eficaz; la proteína purificada final (tsyn-8 en la Figura 1) es más de un 95 % pura, con un rendimiento de 44 mg de proteína a partir de un cultivo de 750 ml de bacterias.

La Figura 2 muestra la purificación de fsyn en DEAE-Sefarosa. La proteína final que usa este método no es tan pura (fsyn-9 en la Figura 2).

La Figura 3 muestra la purificación de fsyn en DEAE Sefarosa seguida de CM-Sefarosa. Este método produce una proteína de >95 % de pureza, pero el rendimiento es inferior (12 mg de proteína en comparación con 85 mg con DEAE Sefarosa sola).

Se han usado varias preparaciones diferentes de α -sinucleína en los ensayos que se describen posteriormente, y se resumen breves detalles de su purificación en la Tabla 1.

Tabla 1. *Detalles de purificación de las preparaciones de sinucleína*

Prep.	Detalles de purificación
tsyn-8	Corte de AS, columna de Ni, dializada CAPS 20 mM, pH 9,5
fsyn-9	Corte de AS, columna de DEAE, dializada Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM
tsyn-16	Corte de AS, columna de Ni, dializada Tris 20 mM, pH 7,5
fsyn-10,17,18,19	Corte de AS, columna de DEAE, columna de CM, dializada Tris.HCl 20 mM, 50 mM NaCl, pH 7,5
fsyn-14	Corte de AS, columna de DEAE, dializada Tris.HCl 20 mM, pH 7,5
fsyn-15	Corte de AS, columna de DEAE, columna de SP, dializada Tris.HCl 20 mM, pH 7,5
fsyn-20,22	Corte de AS, columna de DEAE, columna de CM, dializada CAPS 20 mM, pH 9,5

La proteína preparada mediante tratamiento térmico se inactivó en el ensayo. La proteína preparada mediante cromatografía de intercambio iónico de DEAE fue activa. Por lo tanto se llevó a cabo una etapa de purificación adicional en CM- o SP-Sefarosa. Se descubrió que CM-Sefarosa dio la preparación más limpia, pero con un rendimiento inferior que con SP-Sefarosa. Estas preparaciones se compararon para la actividad de unión (véase el Ejemplo 9). La Tabla 1 resume las preparaciones de sinucleína que se usan para estos experimentos.

Ejemplo 2. Ensayo de montaje de sinucleína por fluorescencia

Se ha informado que el montaje y la formación de fibrillas de α -sinucleína mejoran la fluorescencia de la tioflavina T. Los presentes inventores han sometido a ensayo el efecto de la α -sinucleína en la fluorescencia de esta y también de la primulina. Las proteínas se indujeron a montarse por incubación a 37 °C, con y sin 50 μ g/ml de heparina y las

muestras se sometieron a ensayo con tioflavina T o primulina 1 μM en varios puntos temporales.

La Figura 4 muestra el curso del tiempo del montaje de preparaciones de tsyn y fsyn. En ausencia de heparina, existe muy poca aparición de fluorescencia de tioflavina T con cualquiera de las dos proteínas (Figura 4A, 4B).
 5 Existe la aparición de una señal de primulina durante 20-30 h con proteína tsyn en ausencia de heparina, en presencia de heparina no existe ninguna fase de retraso para la aparición de la señal de primulina pero el alcance final de la fluorescencia es similar con y sin heparina (Figura 4A). La heparina estimula la aparición de una señal de tioflavina T para tsyn con un alcance similar que para primulina (Figura 4A). Existe una aparición muy lenta de las
 10 señales tanto de tioflavina T como de primulina para fsyn en ausencia de heparina. En presencia de heparina, existe la aparición de una señal con ambos fluoróforos, pero con una fase de retraso más prolongada que la observada con tsyn (Figura 4 B). La fase de retraso para la aparición de la señal de primulina es más corta que para la tioflavina T, pero el alcance final de la señal de tioflavina T es mayor que para la primulina (Figura 4 B). La diferencia en la señal entre la primulina y la tioflavina T indica que estos dos fluoróforos detectan diferentes estados de montaje de la sinucleína, y es consistente con la idea de que la primulina detecta un estado precursor temprano de montaje antes
 15 de la formación de fibrillas, que se detecta mediante la tioflavina T.

Ejemplo 3. Ensayo de alteración de fibrillas mediante MTC y ETC

20 Se han usado los efectos de la fluorescencia para someter a ensayo el efecto de los compuestos MTC y ETC en α -sinucleína montada.

La Figura 5 muestra el efecto de MTC y ETC en la señal de fluorescencia de cualquiera de tioflavina T o primulina inducida por tsyn montada, y los valores de fluorescencia de pico a partir de las trazas se muestran en función de la
 25 concentración del compuesto en la Figura 7A. La Figura 6 muestra el efecto de MTC y ETC en la señal de fluorescencia de cualquiera de tioflavina T o primulina inducida por fsyn montada, y los valores de fluorescencia de pico a partir de las trazas se muestran en función de la concentración del compuesto en la Figura 7B. Los valores de P50 medidos a partir de los gráficos de la Figura 7 se resumen en la Tabla 2.

30 Tabla 2. Valores de P50 para la inhibición de fluorescencia dependiente de α -sinucleína de tioflavina T o primulina por parte de MTC y ETC.

proteína	fluoróforo	compuesto	P50 (μM)
tsyn-13	tioflavina T	MTC	18,5
tsyn-13	tioflavina T	ETC	30,3
tsyn-13	primulina	MTC	12,9
tsyn-13	primulina	ETC	24,1
fsyn-14	tioflavina T	MTC	3,8
fsyn-14	tioflavina T	ETC	25,3
fsyn-14	primulina	MTC	23,5
fsyn-14	primulina	ETC	30,6

El efecto de los compuestos en la fluorescencia de tioflavina T y primulina se podría deber a la competición por el ligando de fluorescencia en lugar de la alteración de las fibrillas. Para someter a ensayo esto, el experimento se
 35 realizó con tres concentraciones diferentes de fluoróforo, dado que P 50 dependerá de la concentración de fluoróforo solo si el efecto se debe a la competición. Los datos de un experimento se muestran en la Figura 8, y los valores medios de P50 de todos los experimentos se muestran en la Tabla 3. No existe ninguna diferencia significativa en los valores de P50 medidos a lo largo de una diferencia de 25 veces en las concentraciones de fluoróforo, lo que indica que el efecto de los compuestos se debe a la alteración de fibrillas.

40 Tabla 3. Valores de P50 para la inhibición de fluorescencia dependiente de α -sinucleína de tioflavina T o primulina por parte de MTC y ETC. Efecto de la concentración de fluoróforo.

compuesto	fluoróforo	[fluoróforo] (μM)	P50 (μM)	SEM	N
MTC	tioflavina T	0,2	11,6	6,7	3
MTC	tioflavina T	1,0	12,7	3,9	3
MTC	tioflavina T	5,0	20,2	0,0	2
MTC	primulina	0,2	41,7	8,2	2
MTC	primulina	1,0	35,1	2,2	3

MTC	primulina	5,0	31,2	0,7	2
ETC	tioflavina T	0,2	3,2	2,5	3
ETC	tioflavina T	1,0	9,0	6,6	3
ETC	tioflavina T	5,0	17,6	2,3	2
ETC	primulina	0,2	41,7	8,2	2
ETC	primulina	1,0	34,0	3,3	3
ETC	primulina	5,0	32,3	-	1

Ejemplo 4. Efecto de los compuestos en el montaje de agregados de α -sinucleína *in vitro*.

Además de afectar a los agregados de α -sinucleína montados, MTC también inhibe el montaje de α -sinucleína en agregados, como se determina por competición de la unión de primulina. Se determinaron las condiciones óptimas para el montaje de agregados a partir de tsyn y fsyn y el efecto inhibitor de MTC se muestra en la Figura 11. Se montó tsyn (1 mg/ml en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5 + 50 μ g/ml de heparina) a 37 °C durante 24 h. MTC inhibe el montaje de tsyn a concentraciones mayores de 5 μ M (O, círculos sin relleno). Se montó fsyn en las mismas condiciones, excepto en que la concentración de fsyn fue de 2 mg/ml y la incubación fue durante 120 h. MTC muestra un mayor efecto inhibitor con fsyn que con tsyn, con la inhibición produciéndose a 0,05 μ M con la primera (●, círculos con relleno).

La inhibición de la agregación de α -sinucleína (fsyn; usando el ensayo de primulina que se ha descrito anteriormente) por parte de MTC y ETC fue comparable y mayor que la observada con DEMTC y DEETC. Todos estos compuestos inhibieron completamente el montaje a una concentración de 50 μ M.

Tabla 4. Efecto de diaminofenotiazinas en la agregación de α -sinucleína usando fsyn.

Fluorescencia con concentración de fármaco (μ M):

Compuesto	0	0,5	5,0	50
MTC	311,3	145,9	24,2	1,2
ETC	311,3	190,6	44,6	1,5
DEMTC	311,3	295,7	23,4	0,0
DEETC	311,3	369,2	18,2	0,0

También se usó la tioflavina T para monitorizar el montaje de fsyn. La evolución de la señal de tioflavina T es más lenta que la señal de primulina, pero alcanza un nivel mayor y parece informarse una elongación de las fibrillas en lugar de la formación de agregados. En etapas posteriores del montaje (160 h) cuando la señal de tioflavina T ha alcanzado una meseta, la señal de tioflavina T es más sensible a la inhibición por parte de MTC que la señal de primulina, observándose un efecto significativo a 0,05 μ M. Esto se muestra en la Figura 12.

Ejemplo 5. Ensayo de unión de α -sinucleína mediante ensayo de ELISA en fase sólida.

Las dos proteínas de α -sinucleína también se usaron en un ensayo de unión. La tsyn está unida en la fase sólida, y la fsyn de longitud completa se añade a la fase acuosa. Se usa un anticuerpo frente a un epítipo C-terminal de la α -sinucleína que no reconoce tsyn para cuantificar la fsyn unida.

La Figura 9 muestra las curvas de unión de las fases acuosa y sólida para la unión de fsyn-20 a tsyn-13. La unión de fsyn-20 alcanza una meseta a ~5 μ M y la unión de tsyn-13 alcanza una meseta a ~2 μ M. Estas concentraciones se usaron para someter a ensayo el efecto de diversos cloruros de tioninio y flavonas en la unión sinucleína-sinucleína.

Las curvas de inhibición se muestran en la Figura 10, y los valores de B50 calculados a partir de las curvas se resumen en la Tabla 4.

Todas las flavonas sometidas a ensayo en el ensayo de unión tienen una buena actividad inhibitora mientras que, aunque la mayoría de los cloruros de tioninio son activos, en concreto MTC, ETC, DMMTC, DEMTC, DMETC, DEETC, tionina y cloruro de tononio, otros tales como azura A y azura B son inactivos.

Tabla 5. Valores de P50 y B50 para la inhibición de la unión sinucleína-sinucleína. P50 se midió con 1 µg/ml de tsyn-16 montada en Tris.HCl 20 µM (pH 7,5) con heparina (50 µg/ml) y se sometió a ensayo con cualquiera de los dos fluoróforos (1 µM), tioflavina T o primulina. B50 se midió con tsyn-16 1 µM (fase sólida) y fsyn-20 5 µM (fase acuosa), usando tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 20 mM.

Compuesto	P50 (mM) usando tioflavina T	P50 (mM) usando primulina	B50 (mM) en el ensayo de unión de α-sinucleína
MTC	15,4 ± 3,7 (6)	30,4 ± 3,0 (6)	130,8 ± 15,0 (5)
ETC	7,3 ± 3,8 (5)	26,0 ± 6,0 (5)	3,8 ± 0,3 (2)
DMMTC	0,2(1)	20,7 ± 7,8 (2)	4,9 (1)
DEMTC			0,8 ± 0,4 (2)
DMETC	0,9 ± 0,2 (2)	5,0 ± 0,9 (3)	0,5 ± 0,1 (2)
DEETC			0,4 (1)
Azura A	3,8 ± 0,9 (2)	17,9 ± 2,0 (2)	> 500
Azura B			> 500
Tionina	3,8 ± 0,3 (5)	23,0 ± 2,2 (5)	32,2 ± 11,7 (2)
Cloruro de Tolonio	1,5 ± 0,2 (5)	8,8 ± 3,3 (5)	3,3 ± 0,3 (2)
Baicaleína	47,6	28,2	2,5 (1)
7-Hidroxi-flavona	> 50	> 50	35,3 (1)
7-hidroxi-3-metil-flavona			141,2 (1)
Fisetina			88,2 (1)
Geraldol	> 50	> 50	60,8 (1)
Ramnetina	39,4	34,7	11,4 ± 9,7 (2)
Robinetina	21,1	27,6	39,2 (1)
3,3',4'-Trihidroxi-flavona			43,1 (1)
Primulina		(1,0)	
Tioflavina T	(1,0)		

5

Ejemplo 6. Ensayo basado en células para la agregación de α-sinucleína

El ensayo basado en células empleó una línea celular de neuroblastoma de ratón NIE-115 que se había sometido a ingeniería para expresar α-sinucleína de longitud completa incorporando una secuencia de señal N-terminal (SSfsyn) para dirigir la incorporación de la proteína a la membrana (véase el documento de Patente WO02/059150). Cuando las células se diferenciaron con dibutiril AMP cíclico (dbcAMP) (1 mM), la expresión de la proteína α-sinucleína aumentó.

10

La proteína α-sinucleína se detectó mediante inmunotransferencia usando diversos anticuerpos anti-α-sinucleína. Estos incluyeron: mAb 42 (BD Biosciences, n.º de catálogo 610787) que reconoce un epítipo en tsyn (restos 31-109 de α-sinucleína). Además de la α-sinucleína, mAb 42 también reacciona de forma no específica con una proteína de mayor masa molecular (la proteína no se reconoce por ningún otro anticuerpo anti-α-sinucleína). Esta proteína se usó como una estimación del número de células dado que el nivel de esta proteína en las células correlaciona con la densidad celular. Se sometieron a ensayo fármacos con estas células y se calculó la actividad inhibitoria (CE50) mediante la determinación de la concentración de fármaco en la que la proporción de la α-sinucleína con respecto a la banda no específica caía a un 50 % del valor para las células tratadas solo con dbcAMP.

15

20

Se varió la programación de la adición de dbcAMP y fármaco y también se varió la cantidad de tiempo que las células se dejaron en presencia de fármaco + dbcAMP antes de recoger las células. Se muestra un resultado habitual en la Figura 13 para DEETC.

25

MTC fue inhibidor cuando las células se habían dejado durante más de 2 días en presencia de MTC y dbcAMP. El compuesto más eficaz fue DEETC que inhibió en el intervalo de nM; DEMTC, DMETC y ETC también mostraron actividad inhibitoria (Tabla 6). La flavona, ramnetina, también fue inhibidora.

30

Tabla 6. *Inhibición de la expresión de FSyn en células NIE diferenciadas con dbcAMP por parte de compuestos de fenotiazina.*

Compuesto	CE50 (mM)	DL50 (mM)
MTC	1,17 ± 0,3 (7)	62
ETC	0,08 ± 0,02 (13)	38
DMMTC	0,10 ± 0,02 (4)	1,2
DMETC	0,05 ± 0,04 (2)	6
DEMTTC	0,012 ± 0,005 (3)	3
DEETC	0,004 ± 0,001 (3)	1,0
Cloruro de tolonio	0,26 ± 0,05 (3)	1,2
Azura A	0,32	8,8
Azura B	0,25	0,8
Ramnetina	2,5	31

Ejemplo 7. Truncación y agregación de α -sinucleína en un ensayo basado en células.

5 Cuando se diferenciaron células DH60.21 NIE usando dbcAMP, se aumentó la expresión de SSFsyn, que se detectó usando mAb 42 (reconocimiento del núcleo de α -sinucleína) o mAb 211 (reconocimiento del epítipo C-terminal de α -sinucleína). Además, se produjeron dos bandas de masa molecular inferior de aproximadamente 15 y 16 kDa. Las últimas pueden corresponder a Fsyn que carece de secuencia de señal. Aunque la mayor de estas dos proteínas se detectó mediante ambos de estos anticuerpos, la banda de 15 kDa solo se detectó débilmente, en las mejores circunstancias, usando mAb 211. Un ejemplo habitual se muestra en la Figura 14. Esto sugiere que esta es una proteína que se ha truncado C-terminalmente. También se observó una banda adicional de 22 kDa con una movilidad aparente mayor que FSyn, pero solo usando mAb 42 y no mAb 211 (Figura 14). La proporción de la banda de 22 kDa con respecto a la banda de SSFsyn difirió significativamente dependiendo del anticuerpo usado ($p < 0,001$; Tabla 7). Esto sugiere la presencia de sinucleína agregada que se había truncado tanto en N-terminal como en C-terminal. Esta banda de 22 kDa también se observó en células de neuroblastoma SH-SY5Y transfectadas con SSFsyn.

Tabla 7. *Presencia de α -sinucleína agregada y truncada en células que se demuestra por la ausencia de reactividad con mAb 211 C-terminal.*

Anticuerpo de detección	Proporción media de 22 kDa:SSFsyn (6 SEM; n = 30)
mAb 42	0,14 ± 0,02
mAb 211	0,01 ± 0,003

20 Cuando se examinaron las células que expresan SSFsyn mediante microscopia de fluorescencia, se observó una expresión abundante, incluyendo material de naturaleza granular, lo que sugiere proteína agregada (Figura 15). Además, los agregados observados en las células se reconocieron simultáneamente mediante primulina, un fluoróforo que se une a proteínas agregadas (Figura 16). Esto confirma otros estudios que demuestran que la agregación de α -sinucleína surge después de diferenciación de células de neuroblastoma SH-SY5Y (Hasegawa et ál. 2004; Brain Res. 1013:51-59).

Ejemplo 8. Efecto de MTC en el montaje de oligómero de α -sinucleína y en la unión de α -sinucleína *in vitro*.

30 Por referencia a los resultados de las mediciones de P50 y B50 en los ensayos de sinucleína de la Tabla 5, se puede observar que los cloruros de tioninio tienen generalmente valores de P50 menores que las flavonas en los ensayos de sinucleína, aunque algunas de las flavonas tienen valores de B50 bajos, en comparación con los cloruros de tioninio. Esto sugiere que aunque ambas clases de compuestos son eficaces en la inhibición de la reacción de autoagregación de sinucleína, solo los cloruros de tioninio tienen la capacidad de alterar los agregados preformados.

40 Como ensayo adicional de la actividad de MTC, su efecto se midió en el curso del tiempo del montaje de tsyn (Figura 17). Como se muestra en la Figura 17, en ausencia de MTC, existe una fase de retraso antes del montaje de ~2 horas. La señal de fluorescencia tiene un pico a 4-5 horas, y a continuación disminuye gradualmente durante 20 horas. El curso del tiempo de la aparición de fluorescencia es similar para los dos fluoróforos. En presencia de una concentración baja de MTC (0,05 μ M), la fase de retraso antes del inicio del montaje se reduce a 1 hora y la señal de fluorescencia final después de 24 horas es mayor. En particular, con la primulina, la fluorescencia máxima es mayor con la primulina en comparación con la tioflavina T. En presencia de MTC 0,5 μ M, el montaje es más lento que con el control, pero el nivel de fluorescencia final es mayor que con el control. Para MTC 5 μ M, el curso del tiempo para

el montaje durante las primeras 4-5 horas es similar para el control, pero a continuación existe un decaimiento más rápido en la fluorescencia, aunque el nivel de fluorescencia final es similar al del control. Para MTC 50 μ M, no existe ningún montaje a lo largo del curso del tiempo del experimento. Los datos de la Figura 17 muestran que MTC tiene un efecto complejo en el montaje de la sinucleína; a bajas concentraciones (proporción molar sinucleína:MTC 2000:1) MTC estimula aparentemente el montaje en cierto grado, mientras que a concentraciones mayores (proporción molar máxima de sinucleína:MTC 2:1), inhibe completamente el montaje. Sin el deseo de quedar unidos a teoría alguna, se supone que MTC proporciona un efecto de reticulación de ligando a una proporción molar baja que es insuficiente para permitir la inhibición de la agregación pero permite la unión del compuesto a más de una molécula de sinucleína para estimular la agregación.

Ejemplo 9. Optimización del ensayo de unión en fase sólida de α -sinucleína

La Figura 18 muestra las curvas de unión para tres preparaciones de sinucleína diferentes, que se describen en el Ejemplo 1. La mejor unión se mostró usando syn-10, que fue la preparación más pura, y la peor unión usando syn-14, que fue la preparación menos pura. Esto sugiere que la segunda etapa de purificación retira un contaminante que inhibe la unión, y que la proteína se debería purificar con una segunda etapa de CM-Sefarosa, incluso aunque esto reduzca el rendimiento.

Syn-10 dio la mejor unión de las tres preparaciones sometidas a ensayo, pero el máximo alcance de la unión es aún demasiado bajo. Se sometieron a ensayo dos preparaciones en fase sólida diferentes de tsyn y no mostraron ninguna diferencia, y se mostró que la concentración de tsyn usada era óptima (no se muestran los datos). Por lo tanto, se sometieron a ensayo diferentes condiciones de tampones para la etapa de fase acuosa.

La Figura 19A muestra que los tampones, HEPES y MES, suprimieron completamente la unión de syn. La Figura 19B muestra que el tampón Tris a pH 7,0 permitió una mejor unión que el pH 7,5 usado previamente. Tris a pH 8,0 dio una unión peor, de modo que un pH inferior pareció ser mejor para la unión de syn. Dado que Tris no se puede usar para tamponar a valores de pH inferiores, también se sometió a ensayo un tampón de fosfato, para permitir el ensayo a pH 6,5. Fosfato a pH 6,5 dio una mejor unión que fosfato a pH 7,0. A pesar de la variación de la unión entre los experimentos, estos resultados muestran que la naturaleza química del tampón, así como el pH, influyen la unión de syn, y que el mejor tampón fue Tris a pH 7,0.

Los datos de la Figura 18 muestran que el mejor método de purificación para syn para los ensayos de unión en fase sólida es cromatografía en DEAE seguido de cromatografía en CM. También se sometieron a ensayo tres preparaciones más de syn, purificadas de este modo, en tampón Tris (pH 7,0) (Figura 20). Los resultados demuestran que existe cierta variabilidad en las características de unión entre las preparaciones. En un método adicional, la proteína se dializó frente a un tampón de pH elevado (syn-20). La unión de esta proteína se compara con syn-19 en la Figura 21. El decaimiento de la unión después de 2 μ M se debe a una elevada unión no específica, cuyo valor se resta de la unión. Syn-20 mostró una unión considerablemente mejor que syn-19, validando el cambio de tampón de diálisis.

Con el fin de probar y reducir la variabilidad, también se investigó el uso de tampón de fosfato a valores de pH inferiores. La Figura 22A muestra que fsyn-20 sometida a ensayo en tampón de fosfato a pH 6,0 da una unión mejor que Tris a pH 7,0 o fosfato a pH 5,5. De forma importante, no existe ningún decaimiento de la curva a una concentración mayor de fsyn debido al aumento del fondo. Una segunda preparación de fsyn (fsyn-22) también dializada frente a CAPS a pH elevado se sometió a ensayo en tampón de fosfato a pH 6,0 y dio una unión similar a fsyn-20 (Figura 22B). Fsyn preparado con una diálisis a pH elevado final y sometida a ensayo en tampón de fosfato a pH 6,0 se usó para los ensayos de inhibición en fase sólida (Ejemplo 5).

Referencias

- Galvin, J. E., Uryu, K., Lee, V. M., y Trojanowski, J. Q. (1999) Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 13450-13455.
- Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P. O., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., y Fink, A. L. (2002) Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins, J. Biol. Chem. 277, 11970-11978.
- Park, J. Y., y Lansbury, P. T., Jr. (2003) β -Synuclein inhibits formation of α -synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease, Biochemistry 42, 3696-3700.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., y Masliah, E. (2001) β -Synuclein inhibits α -synuclein aggregation: A possible role as an anti-parkinsonian factor, Neuron 32, 213-223.

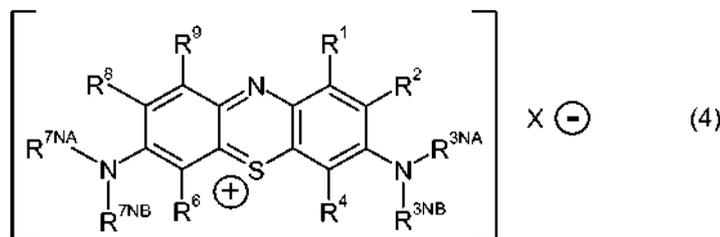
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de diaminofenotiazina en la preparación de un medicamento para inhibir o revertir la agregación de sinucleína,

en el que la agregación está asociada a una patología manifestada como neurodegeneración y/o demencia clínica, enfermedades que se seleccionan entre: enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), atrofia sistémica múltiple (MSA), parkinsonismo inducido por fármacos; fallo autónomo puro (PAF), y en el que dicho medicamento es para el tratamiento de dicha patología, y en el que en dicho tratamiento el compuesto de diaminofenotiazina se administra por vía oral en forma de:

- (i) unidades de dosificación de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 110, 120 o 130 mg tres veces al día; o
- (ii) unidades de dosificación de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg dos veces al día; o
- (iii) una dosificación de una dosis diaria total menor o igual a 400 mg,

en el que dicho compuesto se selecciona entre los compuestos de las siguientes fórmulas:



en la que cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ se selecciona independientemente entre:

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

en la que cada R se selecciona independientemente entre:

- alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
- alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
- cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
- carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
- heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
- carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;

en la que, en cada grupo -NR^{N1}R^{N2}, independientemente, R^{N1} y R^{N2} tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 3 a 7 átomos en el anillo;

y en la que, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

- H;
- alquilo C₁₋₆ alifático sin sustituir; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
- alqueno C₂₋₆ alifático sin sustituir; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
- cicloalquilo C₃₋₆ sin sustituir; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
- carboarilo C₆₋₁₀ sin sustituir; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
- heteroarilo C₅₋₁₀ sin sustituir; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
- carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sin sustituir; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;

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

anillo;

y en la que el grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$ es el mismo que $-NR^{3NA}R^{3NB}$;

y en la que X- es uno o más contraiones aniónicos para conseguir neutralidad eléctrica;

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

5

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre:

10

-H;
-R.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que cada R se selecciona independientemente entre:

15

alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir; alquilo C_{1-6} alifático sustituido.

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los sustituyentes en R, si estuvieran presentes, se seleccionan independientemente entre:

20

-F; -Cl; -Br; -I;
-OH; -OR;
-C(=O)OH; -C(=O)OR';
-R', en donde cada R' se selecciona independientemente entre:

25

alquilo C_{1-6} alifático sin sustituir;
alqueno C_{2-6} alifático sin sustituir;
cicloalquilo C_{3-6} sin sustituir;
carboarilo C_{6-10} sin sustituir;
heteroarilo C_{5-10} sin sustituir;
30 carboaril C_{6-10} -alquilo C_{1-4} sin sustituir.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.

35

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre: -H, -Me y -Et.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 y R^9 se selecciona independientemente entre: -H y -Me.

40

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que cada uno de R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 y R^9 es -H.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.

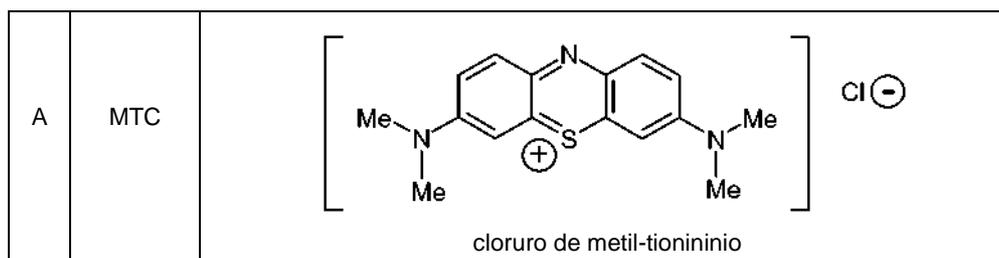
45

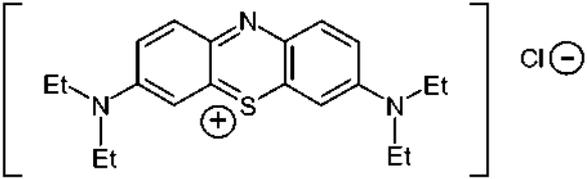
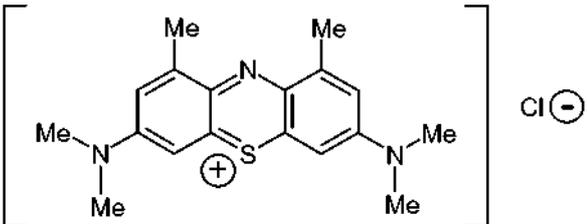
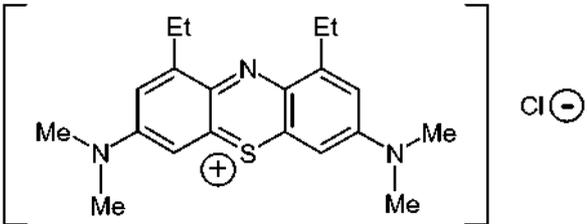
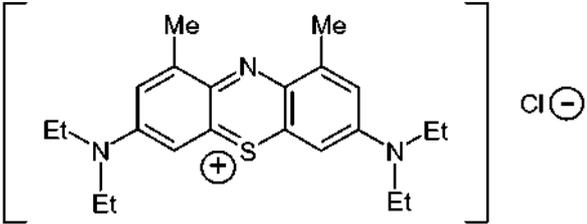
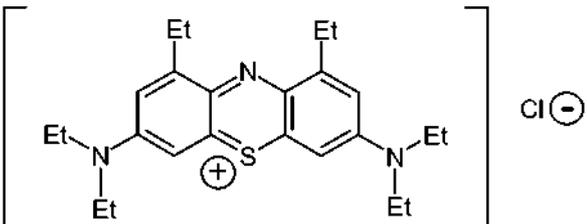
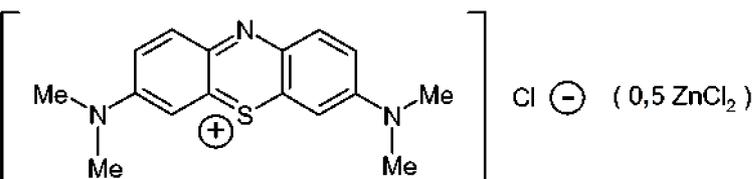
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H y -Me.

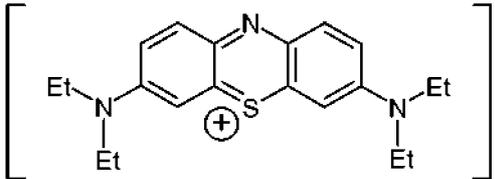
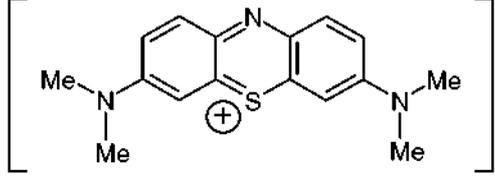
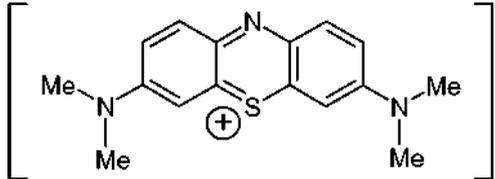
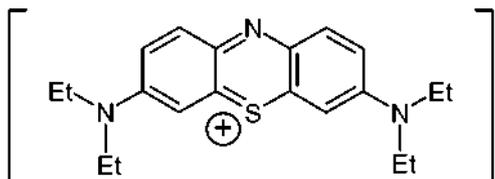
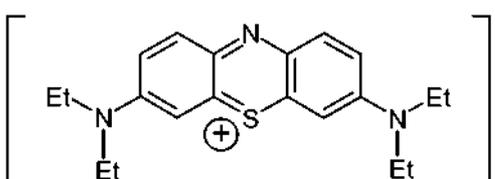
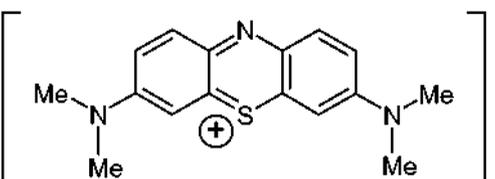
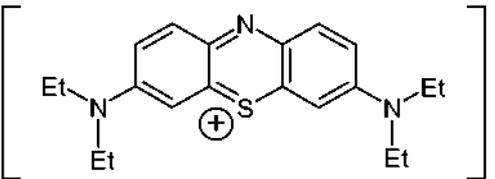
50

11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que X-, si estuviera presente, es uno o más contraiones aniónicos para conseguir neutralidad eléctrica, seleccionado opcionalmente entre Cl⁻, Br o I⁻.

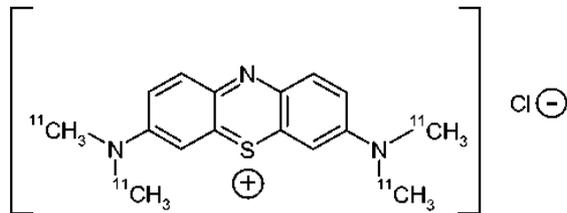
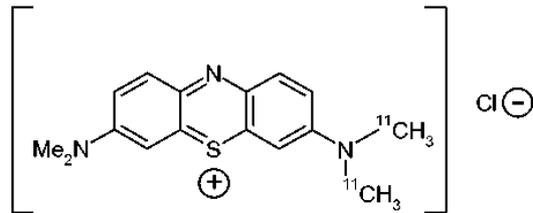
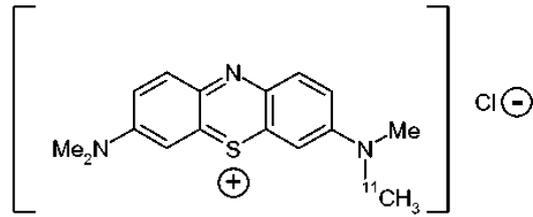
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre los siguientes compuestos, y sales, sales mixtas, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos:



B	ETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de etil-tionininio</p>
C	DMMTC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dimetil-metil-tionininio</p>
D	DEMTC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-diethyl-metil-tionininio</p>
E	DMETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dimetil-etil-tionininio</p>
F	DEETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-diethyl-etil-tionininio</p>
G	MTZ	 <p style="text-align: center;">sal mixta de cloruro de metil-tionininio y cloruro de cinc</p>

H	ETZ	 $\text{Cl}^- \quad (0,5 \text{ ZnCl}_2)$
		sal mixta de cloruro de etil-tionininio y cloruro de cinc
I	MTI	 I^-
		yoduro de metil-tionininio
J	MTI.HI	 $\text{I}^- \quad \text{HI}$
		sal mixta de yoduro de metil-tionininio y yoduro de hidrógeno
K	ETI	 I^-
		yoduro de etil-tionininio
L	ETI.HI	 $\text{I}^- \quad \text{HI}$
		sal mixta de yoduro de etil-tionininio y yoduro de hidrógeno
M	MTN	 NO_3^-
		nitrato de metil-tionininio
N	ETN	 NO_3^-
		nitrato de etil-tionininio

13. Un compuesto de diaminofenotiazina como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una patología neurodegenerativa y/o demencia clínica asociadas a la agregación de sinucleína, método que comprende administrar a un sujeto una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de diaminofenotiazina, o una composición terapéutica que comprende el mismo, de un modo tal que inhiba la agregación de la sinucleína, en el que la agregación está asociada a una patología manifestada como neurodegeneración y/o demencia clínica, enfermedad que se selecciona entre: enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), atrofia sistémica múltiple (MSA), parkinsonismo inducido por fármacos; fallo autónomo puro (PAF), en el que en dicho método el compuesto de diaminofenotiazina se administra por vía oral en forma de:
- (i) unidades de dosificación de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 110, 120 o 130 mg tres veces al día; o
 - (ii) unidades de dosificación de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg dos veces al día; o
 - (iii) una dosificación de una dosis diaria total menor o igual a 400 mg.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el que dicho tratamiento comprende administrar dicho compuesto de diaminofenotiazina en combinación con un compuesto que modula los niveles de dopamina en el mamífero que se va a tratar.
15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o 14 en el que se administra una dosis diaria total mayor o igual a 300, 200 o 100 mg.
16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 13 en el que dicho tratamiento comprende administrar dicho compuesto de diaminofenotiazina en combinación con un compuesto que modula los niveles de dopamina en el mamífero que se va a tratar.
17. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 16 en el que se administra una dosis diaria total mayor o igual a 300, 200 o 100 mg.
18. Uso de un compuesto de diaminofenotiazina capaz de etiquetar sinucleína agregada, en un método de fabricación de un reactivo de diagnóstico o pronóstico para su uso en el diagnóstico o el pronóstico de una patología de sinucleinopatía, en donde dicho compuesto de diaminofenotiazina es un compuesto como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 e incorpora, está conjugado a, está quelado con o está asociado de cualquier otro modo a uno o más isótopos, radioisótopos, átomos emisores de positrones, etiquetas de resonancia magnética, colorantes, marcadores fluorescentes o grupos antigénicos.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos uno de los átomos de carbono en el anillo del compuesto de diaminofenotiazina es ^{11}C y/o al menos uno de los átomos de carbono de al menos uno de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^4 , R^6 , R^8 , R^9 , $\text{R}^{3\text{NA}}$, $\text{R}^{3\text{NB}}$, $\text{R}^{7\text{NA}}$ y $\text{R}^{7\text{NB}}$, es ^{11}C .
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, seleccionado entre los siguientes compuestos y las sales, sales mixtas, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos:



21. Método para etiquetar sinucleína agregada que comprende las etapas de: poner en contacto la sinucleína agregada con un compuesto de diaminofenotiazina como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
22. Un compuesto de diaminofenotiazina como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 para su uso en un método de diagnóstico o de pronóstico de una sinucleinopatía en un sujeto que se cree que padece la enfermedad, que comprende las etapas de:
- (i) introducir en el sujeto dicho compuesto de diaminofenotiazina,
 - (ii) determinar la presencia y/o la cantidad de dicho compuesto unido a sinucleína o a sinucleína agregada en el cerebro del sujeto,
 - (iii) correlacionar el resultado de la determinación realizada en (ii) con la patología del sujeto.
23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o 14 a 15 o 18 a 20, en donde la sinucleína es α -sinucleína.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 21 en el que la sinucleína es α -sinucleína.
25. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13, o 16 a 17 en donde la sinucleína es α -sinucleína.

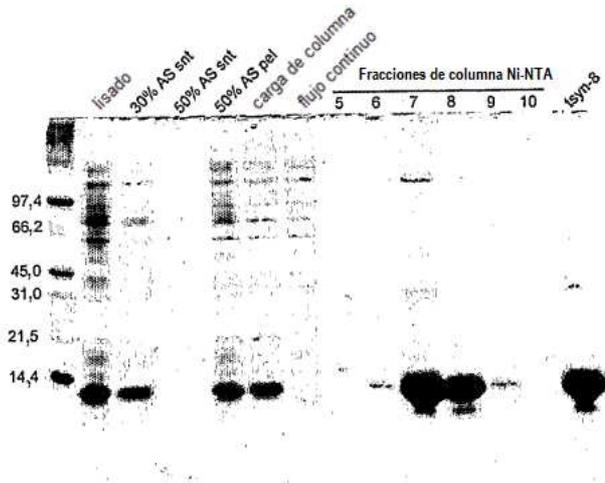


Figura 1

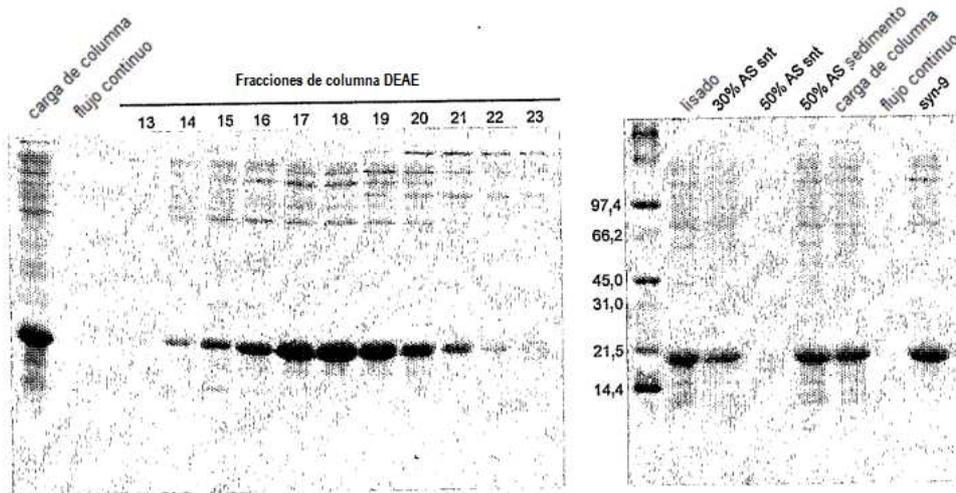


Figura 2

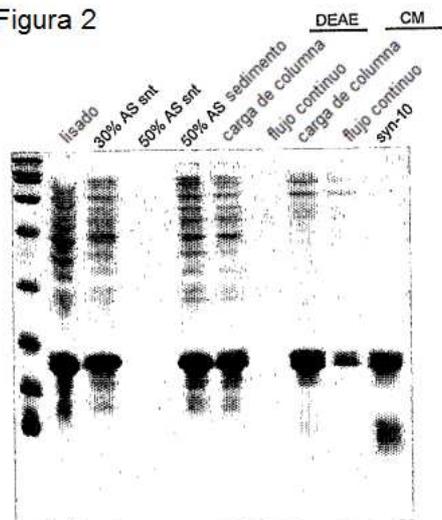


Figura 3

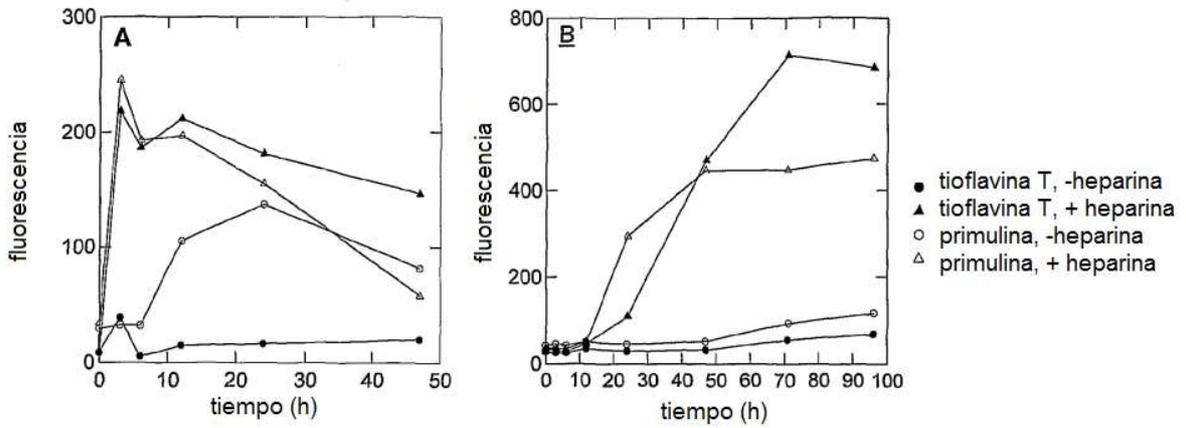


Figura 4

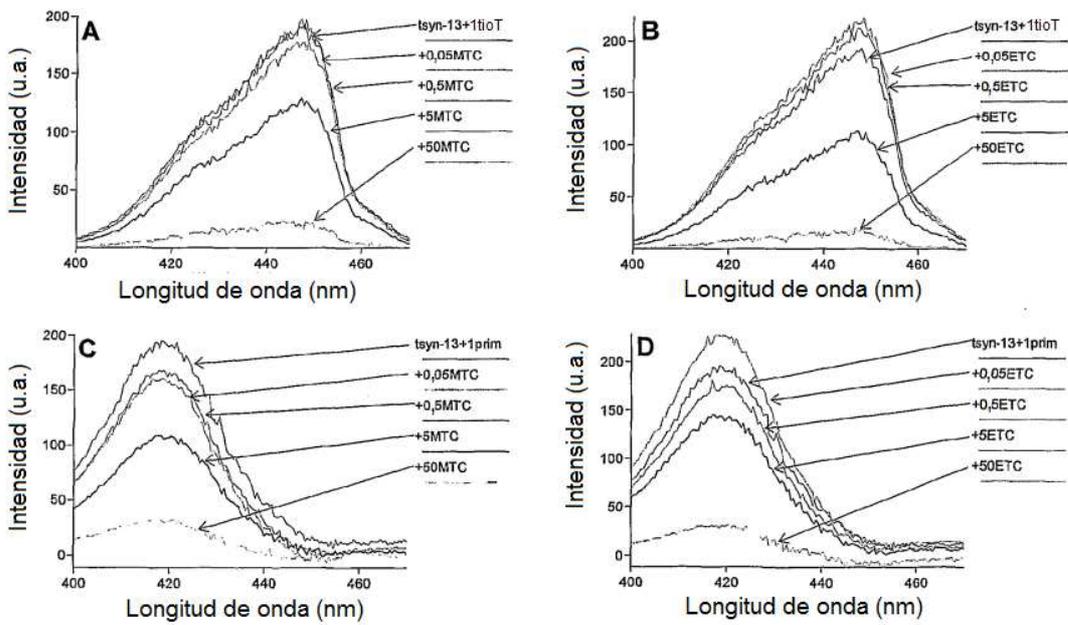


Figura 5

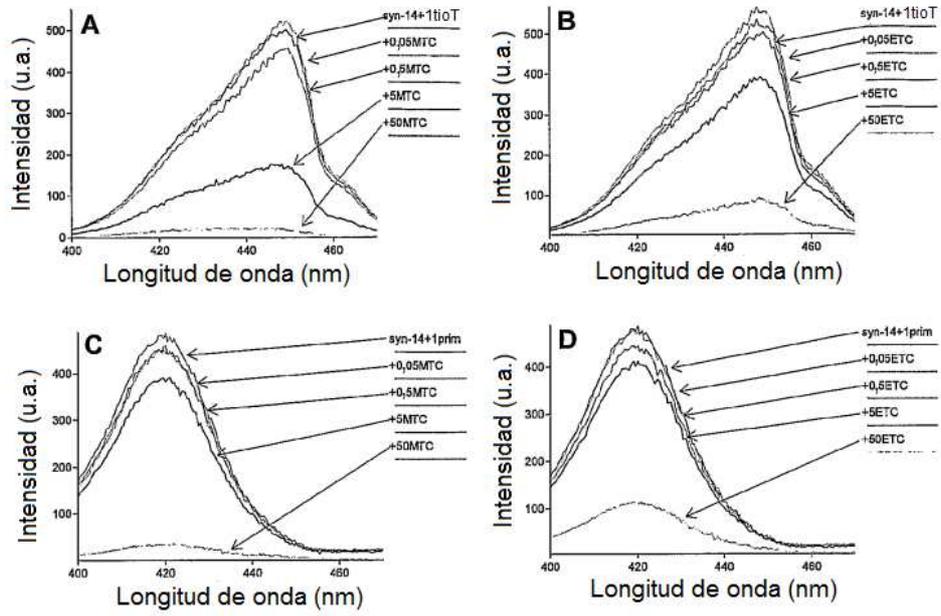


Figura 6

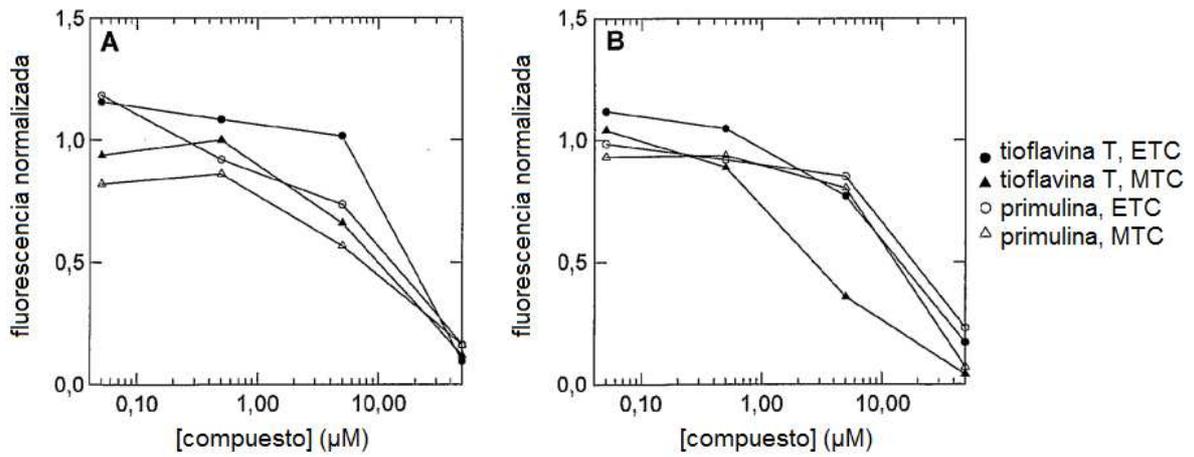


Figura 7

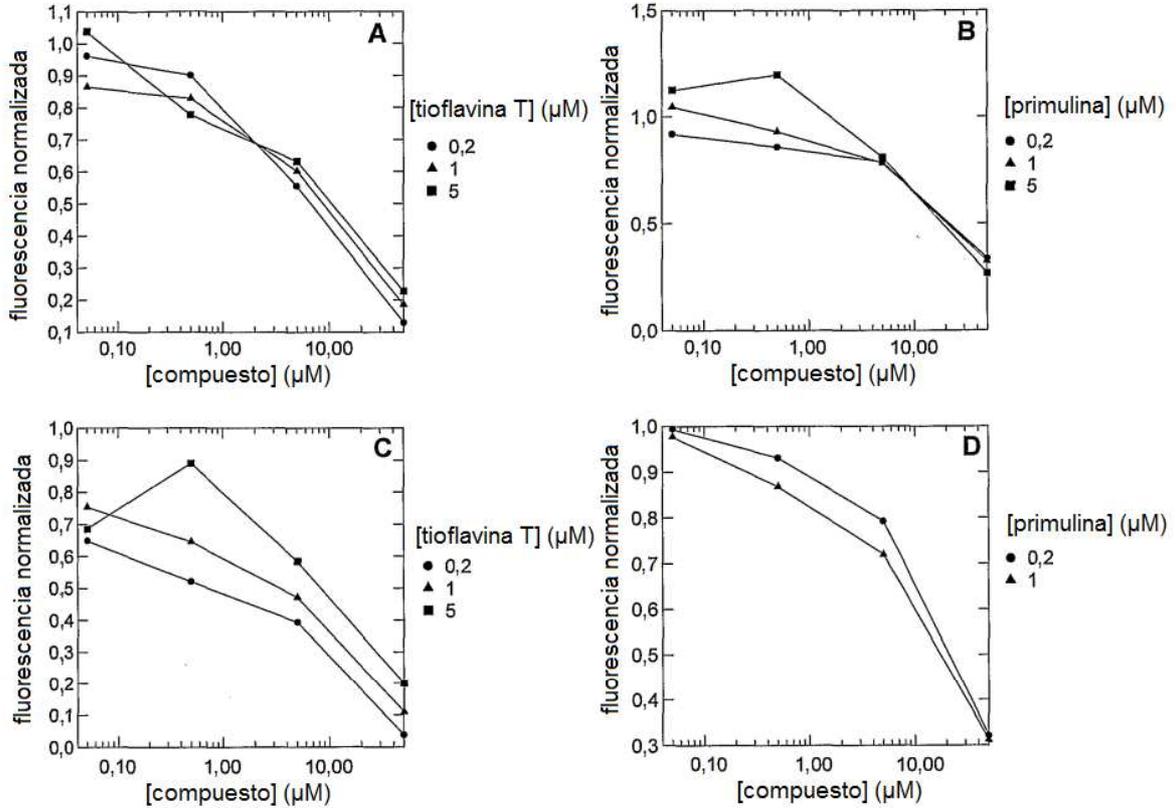


Figura 8

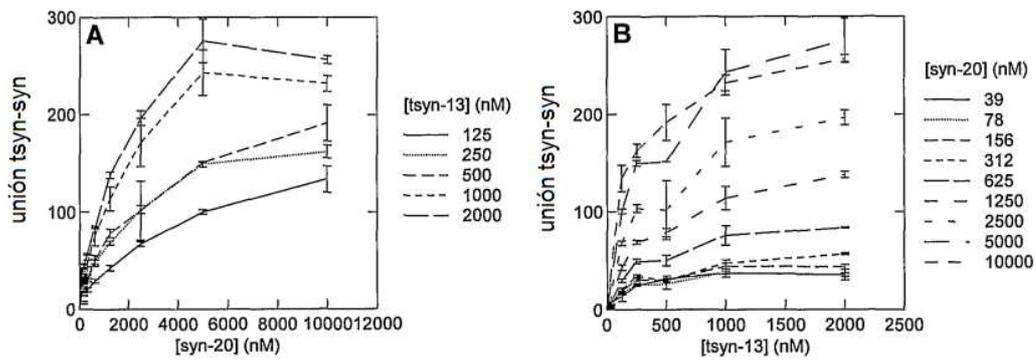


Figura 9

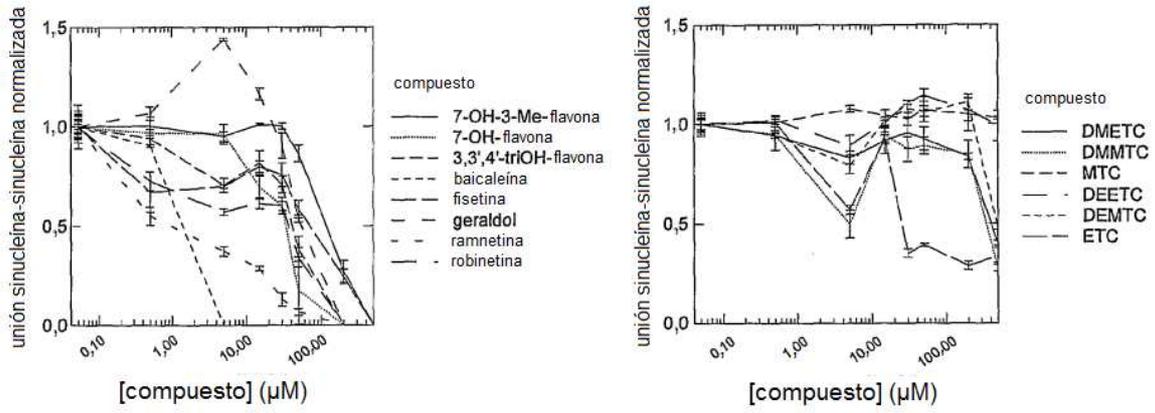


Figura 10

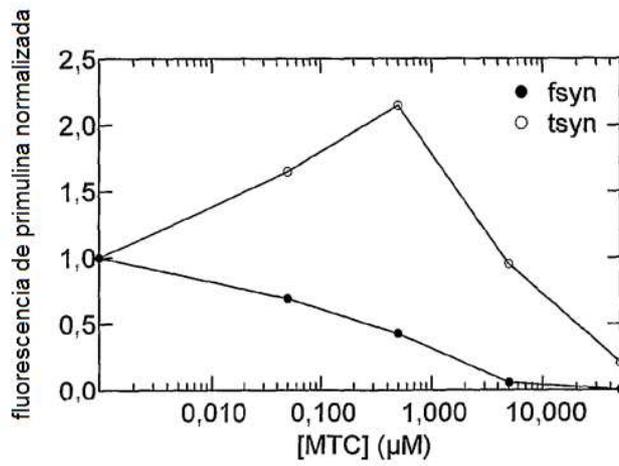


Figura 11

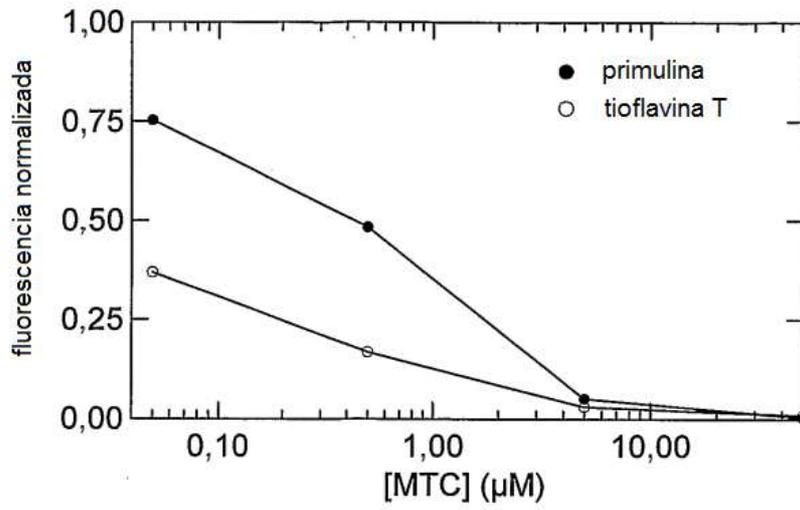


Figura 12

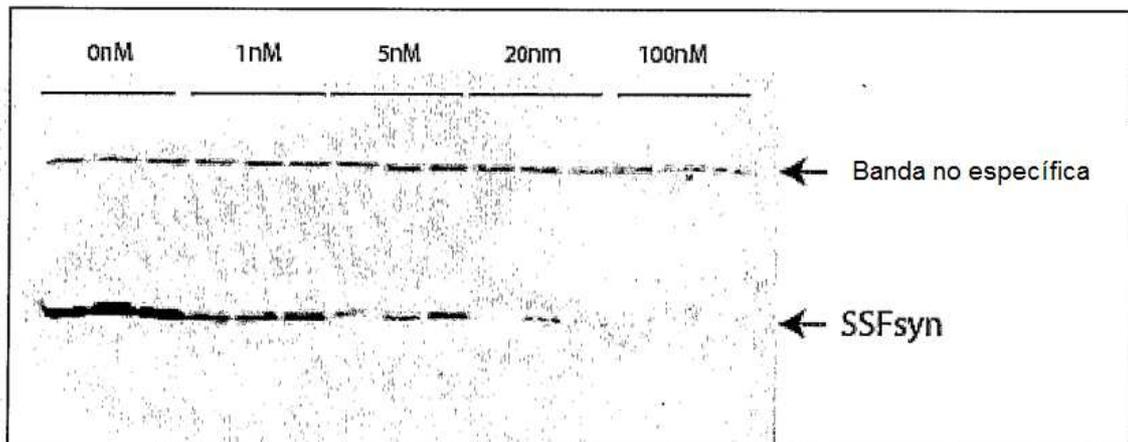


Figura 13

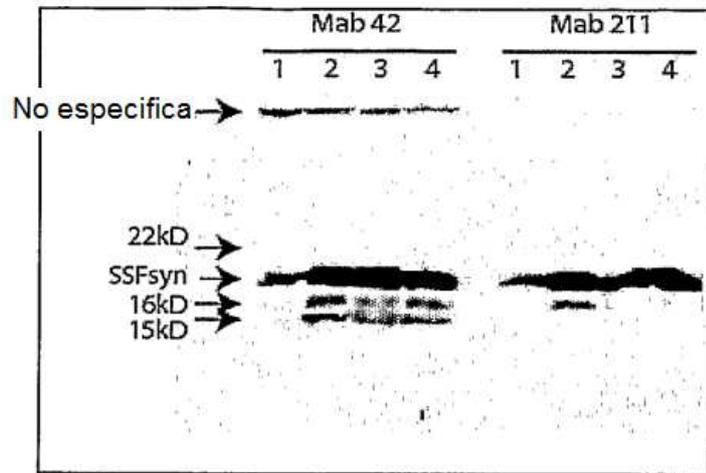


Figura 14

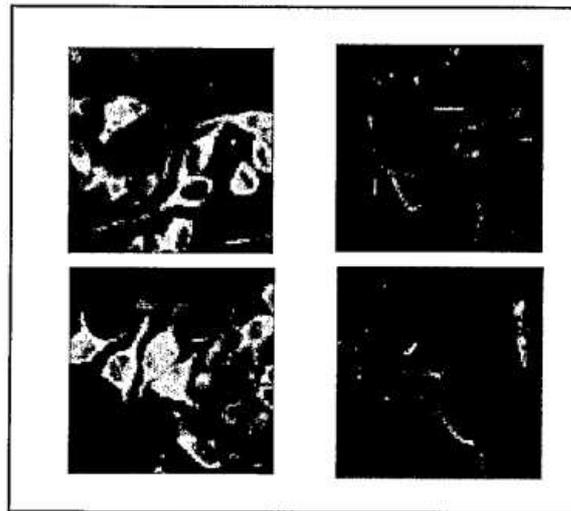


Figura 15

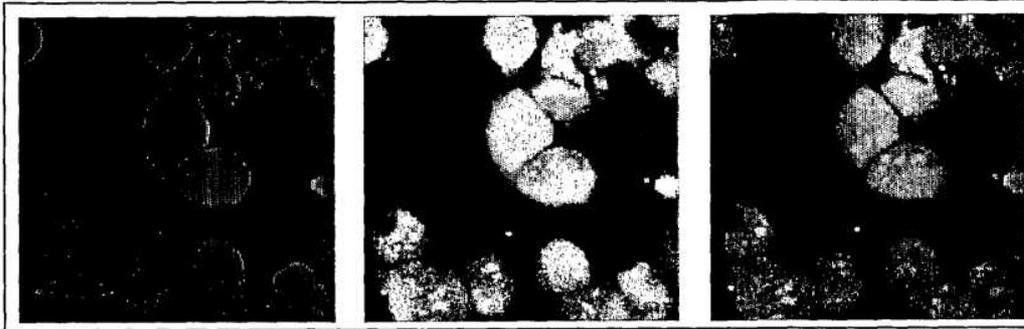


Figura 16

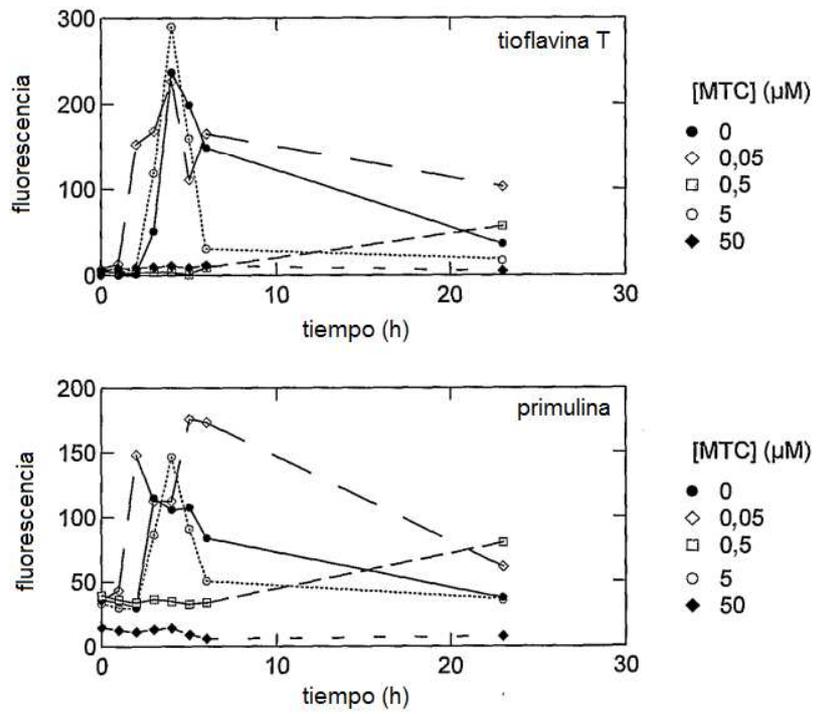


Figura 17

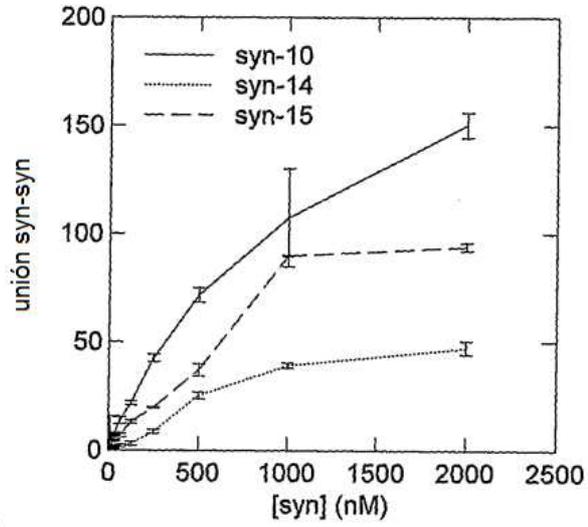


Figura 18

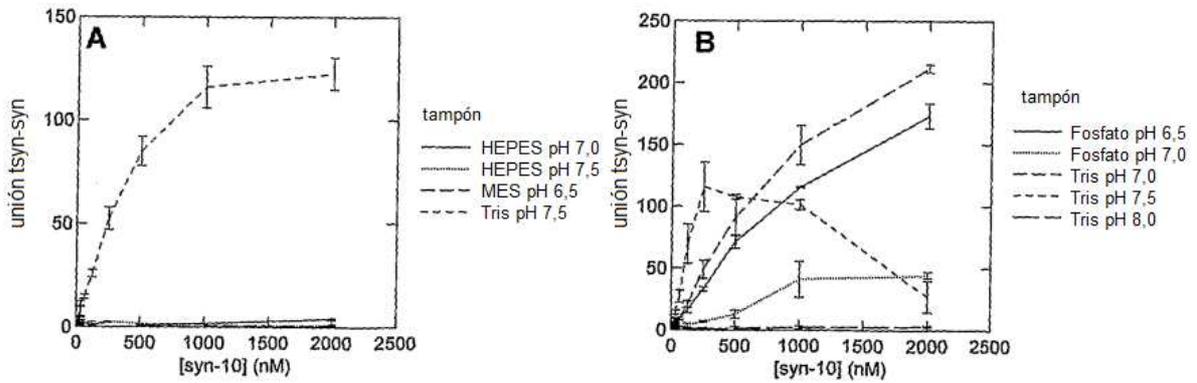


Figura 19

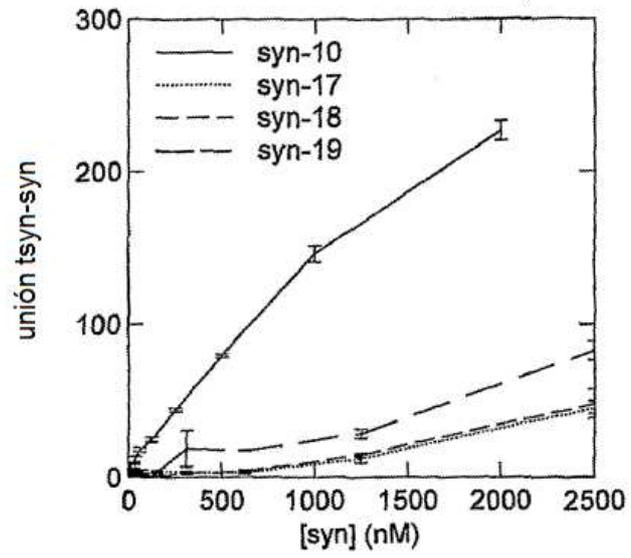


Figura 20

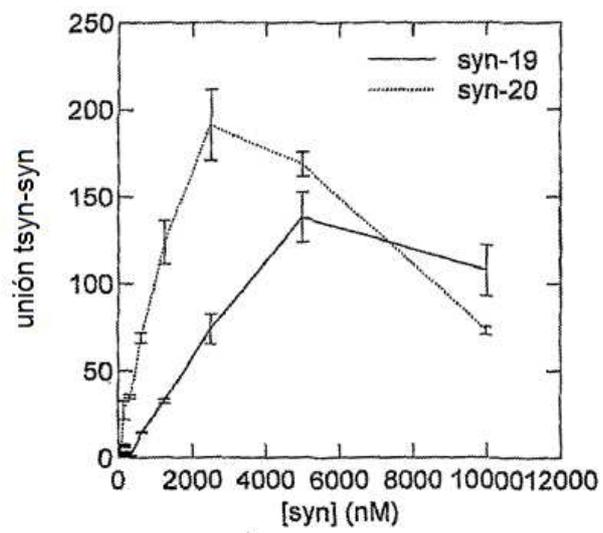


Figura 21

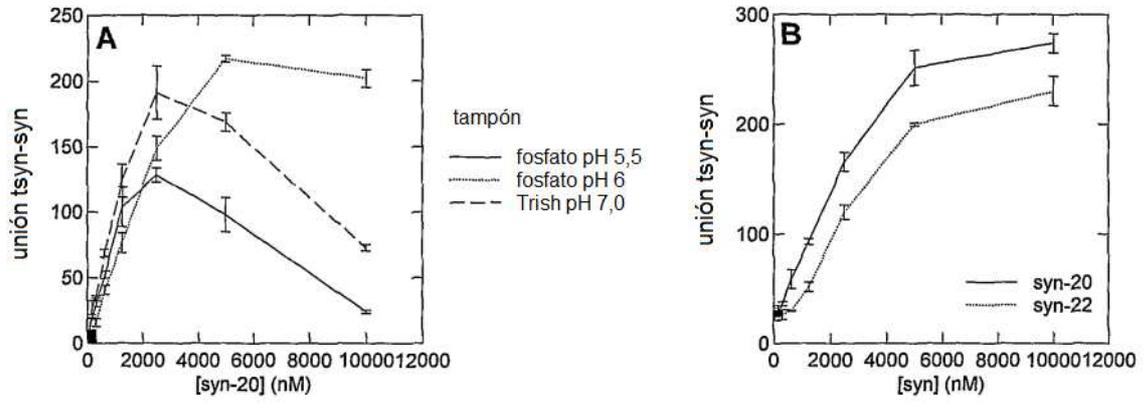


Figura 22