

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 633**

51 Int. Cl.:

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2016 PCT/EP2016/052376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16124688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2016 E 16703289 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3253378**

54 Título: **Sistema terapéutico transdérmico que contiene valentonina y su uso como medicamento**

30 Prioridad:

04.02.2015 EP 15305161

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

24.01.2020

73 Titular/es:

**SOEUR JOSEFA MENEDEZ (100.0%)
3 Boulevard de Verdun
86000 Poitiers, FR**

72 Inventor/es:

**FOURTILLAN, JEAN-BERNARD y
FOURTILLAN, MARIANNE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 738 633 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

Sistema terapéutico transdérmico que contiene valentonina y su uso como medicamento

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un sistema terapéutico transdérmico adhesivo que contiene como principio activo una combinación de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH).

10 La presente invención se refiere más particularmente al sistema terapéutico transdérmico adhesivo reivindicado para su uso destinado a la prevención y/o al tratamiento de trastornos del sueño e insomnio primario, depresiones nerviosas, psicosis, así como enfermedades de Parkinson y Alzheimer.

Estado de la técnica

15 Se recordará que existen dos tipos de sueño: el sueño fisiológico y el sueño anestésico. Solamente, el sueño fisiológico, reconocible por su patrón de EEG, es reparador para el organismo.

20 El sueño fisiológico es reconocible por los patrones de EEG característicos. Incluye el sueño profundo de ondas lentas, reparador, y el sueño paradójico que parece importante para la memoria.

El sueño fisiológico ocurre cuando el nivel de vigilancia cae por debajo de un cierto umbral, con pérdida de conciencia. Para el ser humano y los animales con sueño nocturno, y en condiciones normales, por ejemplo, en ausencia de depresión, durante el ciclo nictemeral, este fenómeno se produce cuando las concentraciones de valentonina (VLT), la hormona del sueño, son superiores a las de 6-metoxi-harmalan (6-MH), la hormona de la vigilia. Esta prevalencia de VLT sobre 6-MH existe durante la fase de oscuridad nocturna, en Francia generalmente entre las 22 h y las 6 h, independientemente de la temporada (Fourtillan JB, Brisson A.M., Gobin P., Fourtillan M., Ingrand I., Decourt J.Ph. & Girault J., Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 280, E11-E22 (2001)). Durante este periodo de descanso, esta prevalencia de VLT, en comparación con 6-MH, resulta de las propiedades farmacocinéticas de estas dos hormonas. En perros, fue posible determinar los parámetros farmacocinéticos de VLT y 6-MH.

35 A continuación se presentan los valores medios (+ desviaciones típicas) de los principales parámetros característicos de la cinética de distribución y eliminación de las dos hormonas:

Valentonina:

$$T_{1/2z} = 0,70 (\pm 0,17) \text{ h}$$

$$40 \quad TMR = 0,49 (\pm 0,16) \text{ h}$$

$$V_{dss} = 40 (\pm 21) \text{ litros}$$

$$45 \quad Cl = 79,0 (\pm 19,9) \text{ litros/horas.}$$

6-metoxi-harmalan

$$T_{1/2z} = 2,27 (\pm 0,91) \text{ h}$$

$$50 \quad TMR = 1,31 (\pm 0,45) \text{ h}$$

$$V_{dss} = 120 (\pm 51) \text{ litros}$$

$$55 \quad Cl = 89,19 (\pm 22,9) \text{ litros/horas.}$$

Es muy probable que los valores de los parámetros farmacocinéticos, tanto para la cinética de eliminación ($T_{1/2z}$ y Cl) de VLT y 6-MH como para su cinética de distribución (TMR y V_{dss}), sean idénticos para el ser humano y todos los animales de sueño nocturno, como el perro.

60 Durante el periodo de prevalencia de VLT, sobre 6-MH, el sueño resulta de la activación alostérica de los receptores de serotonérgicos 5-HT_{2c} por VLT. Además, durante el sueño nocturno, la VLT activa, por modulación alostérica,

los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos centrales, lo que reduce la PA y la FC durante el periodo de descanso, así como los receptores D_1 y/o D_2 dopaminérgicos, con relajación muscular. Es probable que tengan lugar otras activaciones alostéricas selectivas durante la noche.

- 5 Al final de las secreciones, hacia las 6 h, las concentraciones de 6-metoxi-harmalan se vuelven rápidamente más altas que las de valentonina, en particular por que la eliminación de 6-MH es mucho más lenta ($T_{1/2Z} = 2,27$ h) que la de VLT ($T_{1/2Z} = 0,70$ h). Por lo tanto, la prevalencia de 6-MH sobre VLT tiene como consecuencia el bloqueo de los receptores serotoninérgicos $5-HT_{2C}$, entre las 6 h y las 22 h, y el despertar se produce cuando la vigilancia supera un cierto umbral apropiado para cada individuo. El bloqueo selectivo de los receptores serotoninérgicos $5-HT_{2C}$, $\alpha 2$ adrenérgicos, así como D_1 y/o D_2 dopaminérgicos permite así aumentar el nivel de vigilancia, por ende, asegurar el despertar, aumentar la PA y la FC, e incrementar el tono muscular.

15 El sueño artificial o anestésico es totalmente diferente del sueño natural o fisiológico. Su patrón de EEG implica principalmente sueño ligero, de ondas rápidas, no reparador para el organismo, sueño poco profundo. Se observa un colapso de proporciones del sueño paradójico, en relación con los efectos secundarios de la amnesia anterógrada, observados en los pacientes.

20 El sueño artificial o anestésico, por ejemplo, es inducido por benzodiazepinas (Diazepam, etc.) y relacionados (Zolpidem, Zopiclone). Todos estos compuestos comparten las siguientes propiedades farmacológicas:

- son activadores por modulación alostérica de los receptores $GABA_A$ -érgicos cuya activación produce efectos neuroinhibitorios. Esto resulta en una disminución de la vigilancia en forma de anestesia, y
- al mismo tiempo, son antagonistas de la serotonina en los receptores serotoninérgicos $5-HT_{2C}$. Bloquean estos receptores, al igual que 6-metoxi-harmalan, la hormona de la vigilia, y el LSD. El motivo de esta acción es simple: poseen en sus estructuras químicas las características de los farmacóforos de 6-MH.

Por consiguiente, desafortunadamente, estos compuestos tienen dos acciones farmacológicas contradictorias:

- por su estimulación $GABA_A$ -érgica, producen un mal sueño, es decir, sueño poco profundo, y colapso del sueño paradójico, y;
- por el bloqueo de los receptores serotoninérgicos $5-HT_{2C}$, se oponen al sueño fisiológico, actuando como hormona de la vigilia, 6-MH. Por lo tanto, tienen efectos depresiogénicos y ansiogénicos; por lo tanto, se oponen a los efectos ansiolíticos que resultan de sus acciones $GABA_A$ -érgicas, así como a los efectos de los medicamentos antidepressivos.

40 Se ha descubierto previamente (documento FR 2 898 358) que durante el tiempo de sueño nocturno (entre las 22 h, comienzo de la secreción, y las 6 h al final de la secreción), e independientemente de la temporada, la melatonina producida por la glándula pineal, después de una primera acetilación de serotonina, facilitada por las N-acetiltransferasas, se somete, a partir de su producción, a una segunda etapa de la acetilación enzimática por las N-acetiltransferasas, dando sucesivamente dos derivados de beta-carbolina, a saber, 6-metoxi-1-metil-3,4-dihidro-beta-carbolina, denominada 6-metoxi-harmalan (6-MH), y 2-acetil-6-metoxi-1-metilen-3,4-dihidro-beta-carbolina, denominada valentonina (VLT).

45 Así, el sistema de vigilia-sueño funciona con estas tres hormonas: melatonina (MLT), valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH). La melatonina es el precursor de la VLT y de la 6-MH, y también es el marcador. Así, al medir las concentraciones plasmáticas de MLT, se puede conocer el estado del sistema en los sujetos. Estudios farmacocinéticos de la secreción pineal (Am. J. Physiol. Endocrinol. metab., 280, E11-E22) en 12 sujetos jóvenes voluntarios y 12 adultos mayores voluntarios, mostraron una gran variabilidad en las velocidades de secreción, y por lo tanto, en las cantidades secretadas, de MLT en proporciones de 1 a 10, según los sujetos. Sin duda, esta gran variabilidad es el origen de los muchos trastornos de origen neurológico observados en el ser humano, tales como insomnio primario, trastornos del sueño, depresiones reactivas y endógenas, afecciones neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), y trastornos psicóticos.

55 El tratamiento de la depresión, estados psicóticos, enfermedad de Parkinson, y enfermedad de Alzheimer debe implicar la comprensión de este mismo sistema de vigilia-sueño. Las explicaciones de los mecanismos de estos trastornos, así como los modos de acción de sus nuevos tratamientos no conocían el mecanismo del sueño fisiológico. De hecho, se pensaba que un exceso de dopamina era la causa de la psicosis, mientras que se acaba de descubrir que es un exceso de 6-metoxi-harmalan, la hormona de la vigilia, que es el origen de los estados psicóticos. La depresión, al menos reactiva, no es una enfermedad incurable, ya que siempre se cura, fortaleciendo el sistema de vigilia-sueño. Las causas de las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, proceden en realidad de un déficit cuantitativo del sistema de vigilia-sueño.

65 Por lo tanto, estas enfermedades probablemente podrán prevenirse y detenerse en su progresión. En la enfermedad de Alzheimer, el sueño y la cognición podrán restablecerse mediante la administración de un valentónérgico y 6-metoxi-harmalan.

El sistema [(VLT)-(6-MH)] desempeña así un papel vital asegurando la regulación de las vidas psíquica y vegetativa del organismo durante las 24 horas del ciclo nictemeral.

5 El buen funcionamiento de este sistema está directamente vinculado a:

- 10 • las estructuras químicas de las hormonas del sueño (VLT) y de la vigilia (6-MH), que les permiten estimular (VLT), durante el periodo de descanso nocturno, o bloquear selectivamente (6-MH), los receptores involucrados en la regulación de órganos y procesos fisiológicos que funcionan de manera diferente durante los periodos de descanso y actividad;
- 15 • las propiedades farmacocinéticas de valentonina y 6-metoxi-harmalan, que permiten asegurar la prevalencia de VLT, durante las 8 horas del periodo de sueño, entre las 22 h y las 6 h, y la prevalencia de 6-MH, durante el periodo de vigilia o actividad, entre las 6 h y las 22 h;
- cambios en las concentraciones de VLT y 6-MH, correspondientes a una infusión a una velocidad constante en el torrente sanguíneo, durante las 8 horas de secreción de las dos hormonas por la glándula pineal.

20 El solicitante, por lo tanto, ha buscado implementar, con el sistema terapéutico transdérmico reivindicado, su uso destinado a una terapia de reemplazo hormonal a base de VLT, en combinación con 6-MH, con el objetivo de regular el funcionamiento del organismo de acuerdo con el perfil de cada sujeto que puede determinarse mediante un método de dosificación de concentraciones plasmáticas de melatonina en una muestra sanguínea extraída entre las 22 h y las 6 h de la mañana, preferentemente a partir de las 1 h de la mañana.

25 La valentonina no puede, como la mayoría de los compuestos endógenos, administrarse por vía oral, la presente invención se refiere a un sistema terapéutico transdérmico de una o las dos hormonas mencionadas anteriormente, ventajosamente en forma de parches que incluyen uno o dos reservorios para tratar las afecciones de origen neurológico, que resultan de un déficit o de un exceso cuantitativo del sistema [(VLT)-(6-MH)].

30 **Objeto de la invención**

Por lo tanto, la invención se refiere a un sistema terapéutico transdérmico que contiene como principio activo una combinación de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH), que puede presentarse de una manera conocida per se, bajo la forma de un parche de tipo reservorio con uno o dos compartimentos o bien de tipo matricial.

35 Preferentemente, la invención se refiere a un sistema terapéutico transdérmico adhesivo que contiene una combinación de una carga de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6- MH) apta para administrar valentonina y 6-metoxi-harmalan en el torrente sanguíneo en una proporción másica [VLT]/[6-MH] igual a 4 durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante aproximadamente 8 h a 10 h.

40 La realización práctica de los parches será determinada por los expertos en la materia en la aplicación de sus conocimientos generales en la materia para obtener una administración sistémica controlada y prolongada de valentonina y 6-metoxi-harmalan, durante todo el periodo de aplicación del parche, es decir, durante un periodo de aproximadamente 8 h a 10 h.

45 En general, haciendo uso de su conocimiento general en la materia, el experto en la materia puede integrar los dos principios activos en dos parches independientes, mezclar los dos principios tanto en la misma matriz como en las matrices superpuestas, o incluso en matrices montadas de forma adyacente en una misma película protectora. Por supuesto, la valentonina y 6-metoxi-harmalan también pueden estar presentes en otro tipo de parches con dos reservorios independientes.

50 En general, se recordará que existen dos clases principales de sistemas terapéuticos transdérmicos o parches, que están constituidos por:

- 55 • una capa externa impermeable,
- un compartimento que contiene el principio activo,
- un elemento de control para la liberación del o de los principios activos,
- una pieza adhesiva que permite el mantenimiento del parche en la zona de aplicación de la piel, así como
- 60 • un soporte de protección que debe retirarse justo antes de la aplicación del parche.

El parche de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, podrá llevarse a cabo con una conformación, ya sea del tipo reservorio o del tipo matricial.

65 El tipo de parche reservorio incluirá uno o dos reservorios separados que contienen el o los principios activos en solución o en suspensión en la matriz polimérica que entran en contacto con la piel a través de una membrana

polimérica semipermeable que permite ajustar la velocidad de liberación del o de los principios activos.

5 El parche de tipo matricial incluirá una masa polimérica en el interior de la cual el o los principios activos se disolverán o dispersarán en las proporciones adecuadas. La liberación de estos principios activos se realiza por difusión a través de las cadenas poliméricas de dicha matriz.

10 De acuerdo con una realización particular de este tipo de parche, el adhesivo cubre la totalidad de la superficie de liberación de la matriz y forma parte integral de esta última. Por lo tanto, se encuentra en presencia de un parche de tipo adhesivo activo bien conocido por los expertos en la materia que es de fabricación simplificada y que permite la realización de parches de pequeño espesor y flexibilidad apropiada que permite una aplicación cómoda en la piel del paciente.

15 En un modo de realización ventajosa de la presente invención, la valentonina y el 6-metoxi-harmalan están dispuestos en reservorios distintos uno del otro, lo que permite eliminar cualquier problema de estabilidad o cualquier otro riesgo de interacciones que pueden alterar el flujo de difusión de los principios activos entre sí cuando se mezclan en una misma matriz.

20 En un modo de realización particular de la invención de un parche de dos compartimentos, cada compartimento del parche puede contener una matriz polimérica que contiene de forma aislada cada uno de los dos principios activos. Para garantizar una buena infusión de estos principios activos en el torrente sanguíneo a la dosis adecuada, los expertos en la materia pueden establecer fácilmente los siguientes parámetros:

- la relación de las superficies y volúmenes de cada uno de los compartimentos del parche;
- la posible adición de un aditivo hidrófilo;
- 25 • la posible adición de un promotor de la absorción, y;
- de manera más general, cualquier tipo de aditivo bien conocido por los expertos en la materia para controlar los flujos de valentonina y 6-metoxi-harmalan.

30 De una manera conocida per se, dicho parche comprende una película protectora desprendible que está destinada a preservar la cara adhesiva que se aplicará a la piel después de la fabricación del parche y durante todo su periodo de almacenamiento. De una manera conocida per se, los expertos en la materia emplearán, por ejemplo, películas de poliéster, donde una de las caras puede tratarse con siliconas antiadhesivas.

35 La matriz polimérica adhesiva que contiene valentonina y 6-metoxi-harmalan puede ser de tipo polímero o copolímero, por ejemplo de tipo poliisobutileno o poliacrílico, copolímero de etileno y acetato de vinilo o incluso de tipo polímero de silicona.

40 Las resinas acrílicas de autorreticulación, por ejemplo del tipo Duro-Tak® comercializadas por la sociedad Henkel, se utilizarán de manera habitual.

Como se ha indicado anteriormente, los promotores de la absorción se pueden usar de una manera conocida per se. A modo de ejemplo de dichos aditivos, se mencionarán los éteres monoalquílicos de dietilenglicol, los glicéridos poliglicolizados saturados, el 1,2-propanodiol o el etanol.

45 Dado que la valentonina y el 6-metoxi-harmalan tienen un carácter lipófilo, también puede ser necesario introducir en la matriz polimérica aditivos hidrófilos, como polímeros naturales o sintéticos, tales como gomas guar, goma xantana o polivinilpirrolidona.

50 De acuerdo con un modo de realización particular de la presente invención, la capa adhesiva que contiene los principios activos, objeto de la presente invención contiene uno o más copolímeros a base de alquil(met)acrilato y en particular etil metacrilato, n-octil metacrilato y dodecil metacrilato. Se pueden añadir otros monómeros a este copolímero de alquil(met)acrilato y, en particular, monómeros de acrilonitrilo, vinilacetato, vinilpropionato o 1-vinil-2-pirrolidona.

55 Para garantizar la estabilidad de los principios activos en la matriz del parche y, en particular, para evitar cualquier riesgo de degradación por oxidación durante el almacenamiento, se añadirán ventajosamente pequeñas proporciones de un agente antioxidante como α -tocoferol y palmitato de ascorbilo.

Descripción detallada de la invención

60 En el contexto de la presente invención, el solicitante ha podido determinar que las indicaciones principales de la administración de valentonina sola o en combinación con 6-MH se pueden clasificar en dos categorías principales:

65 A) Afecciones resultantes de un déficit cuantitativo del sistema [(VLT)-(6-MH)]:

- insomnio primario;

- trastornos del sueño;
- depresiones endógenas y reactivas, y;
- afecciones neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, etc.).

5 Está claro que las enfermedades debidas a un déficit del sistema [(VLT)-(6-MH)] pueden tratarse mediante una combinación de valentonina biodisponible para la vía de administración elegida, y 6-metoxi-harmalan.

10 Las propiedades farmacocinéticas de valentonina y 6-MH, y en particular, sus biodisponibilidades, para la vía de administración elegida, deberían permitir, ya que se trata de una terapia de reemplazo hormonal, que incluye dos hormonas, reproducir, en la medida de lo posible, las curvas de cambios de las concentraciones plasmáticas de las dos hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)], durante 24 h.

15 Para un tratamiento de reemplazo hormonal, que incluye dos hormonas (VLT y 6-MH), una de las cuales, la valentonina es inestable ya que está completamente hidrolizada en un medio gástrico ácido, la vía de administración seleccionada en el contexto de la presente invención es la vía transdérmica por las siguientes razones:

20 1) Al igual que la vía intravenosa (que es demasiado restrictiva puesto que, para reproducir las curvas fisiológicas de los cambios en los niveles plasmáticos de las dos hormonas, se requeriría una perfusión intravenosa, mezclando las dos hormonas, durante las 8 horas de descanso nocturno, entre las 22 h y las 6 h), la vía transdérmica permite la administración simultánea de las dos hormonas naturales, valentonina y 6-metoxi-harmalan, como un único parche transdérmico. Para el tratamiento de afecciones resultantes de un déficit cuantitativo del sistema [(VLT)-(6-MH)], se puede prever aplicar un parche durante las 8 horas del periodo de secreción pineal de las dos hormonas entre las 22 h y las 6 h, en las proporciones apropiadas.

25 2) Además, el uso de parches con dos reservorios distintos (un reservorio para cada hormona) debería permitir controlar por separado las liberaciones de las dos hormonas; sin interferir, uno sobre el otro, en su biodisponibilidad y en su labilidad de la combinación de los dos productos puestos en contacto.

30 En el caso de la aplicación al insomnio primario y afecciones similares, se observa una carencia de la secreción de valentonina (VLT) y, al mismo tiempo, de 6-metoxi-harmalan (6-MH), que son consecutivas a una secreción pineal de la melatonina demasiado pequeña. En tal caso, una dosificación de melatonina, como marcador de las dos hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)] en el plasma, durante la noche, permitirá determinar cuantitativamente el déficit, y en consecuencia, adaptar las dosificaciones de valentonina y 6-MH en la combinación.

35 Para otras indicaciones, como trastornos del sueño, depresión, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), también parece necesario administrar combinaciones de valentonina y 6-metoxi-harmalan. Estas patologías corresponden a un déficit cuantitativo del sistema VLT/6-MH. La importancia de este déficit varía con la afección. Se puede evaluar mediante la dosificación de melatonina que se realizará en la meseta antes de las 6 h de la mañana como un marcador del sistema [(VLT)-(6-MH)].

40 Conviene recordar que, en condiciones fisiológicas, las dos hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)] y la melatonina son administradas por la glándula pineal al torrente sanguíneo durante 8 horas, entre las 22 h y las 6 h, de acuerdo con una perfusión intravenosa a velocidad constante, es decir, con una cinética de orden 0. La evolución de las concentraciones de las dos hormonas en el plasma sanguíneo depende de sus propiedades farmacocinéticas y, en particular, de su cinética de eliminación caracterizada por sus tiempos de semivida de eliminación terminal $T_{1/2Z}$. Por
45 lo tanto, para cada hormona (VLT y 6-MH) secretada por la glándula pineal de forma variable para cada sujeto, la evolución de las concentraciones plasmáticas depende de:

- la velocidad de secreción, que refleja, para cada sujeto, y desde un punto de vista cuantitativo, el nivel de su sistema [(VLT)-(6-MH)]. Este dato es específico para cada sujeto. El valor de estos datos individuales varía con
50 la afección neurológica de la que es víctima cada paciente, y;
- características farmacocinéticas de las dos hormonas. De hecho, es muy probable que la cinética de las eliminaciones y distribuciones sea idéntica en los humanos y en todos los animales de sueño nocturno, como el perro para el que las semividas $T_{1/2Z}$ son respectivamente iguales a 0,70 h y 2,27 h, para valentonina y 6-metoxi-harmalan, así como los volúmenes de distribución son respectivamente iguales a 5 litros/kg y 15 litros/kg para
55 VLT y 6-MH.

Por lo tanto se puede prever, para el tratamiento de afecciones que surgen de un déficit del sistema [(VLT)-(6-MH)], dosificaciones de valentonina y 6-metoxi-harmalan diferentes, en los dos reservorios de parches, dependiendo del tipo de afección y los niveles de melatonina observados en los pacientes.

60 B) La invención también abarca el tratamiento de afecciones resultantes de un exceso cuantitativo del sistema [(VLT)-(6-MH)]; se trata en particular de estados psicóticos.

65 El tratamiento de los trastornos psicóticos, debido a un exceso de 6-metoxi-harmalan, entre las 6 h y las 22 h, durante el día, se puede prever mediante el desplazamiento del exceso de 6-MH, por valentonina, durante este periodo.

En el contexto de la presente invención, se determinaron las dosis de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH) en las combinaciones de las dos hormonas, administradas por vía transdérmica.

5 Las afecciones de origen neurológico más comunes (insomnio primario, trastornos del sueño, depresiones nerviosas reactivas y endógenas, y afecciones neurodegenerativas de tipo Parkinson y Alzheimer) se deben a déficits cuantitativos del sistema [(VLT)-(6-MH)] que tendrá que ser restablecido.

10 La presente invención, por lo tanto, tiene como objetivo un sistema terapéutico transdérmico adhesivo, de acuerdo con las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de afecciones como consecuencia de déficits cuantitativos de las hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)].

15 Para asegurar y mantener, de manera armoniosa, y de manera idéntica a la fisiología, una buena regulación de las vidas psíquica y vegetativa del organismo, durante las 24 h del ciclo nictemeral, es imperativo administrar la combinación (VLT+6-MH) en una forma que pueda reproducir la secreción pineal de las dos hormonas entre las 22 h (o cuando se acuesta el paciente) y las 6 h (o cuando se levanta el paciente). Esto impone respetar los siguientes imperativos:

20 1. Administración de las hormonas fisiológicas, valentonina y 6-metoxi-harmalan, y no sus sustitutos sintéticos. De hecho, los sustitutos sintéticos tienen propiedades farmacocinéticas diferentes que harían imposible alternar los periodos de prevalencia de cada hormona, en los momentos precisos del final de los periodos de descanso (6 h, u hora de levantarse) o de actividad (22 h, u hora de acostarse). Este imperativo requiere perfiles farmacocinéticos muy precisos y concordantes para las dos hormonas naturales (VLT y 6-MH). Esto es especialmente cierto ya que estas prevalencias de concentraciones deben existir durante los dos periodos, no solo a nivel plasmático, sino también en los niveles de los sitios de acción de las dos hormonas (receptores 5-HT_{2C/α2}, D₁ y D₂, etc.).

25 2. El método de administración debe reproducir una infusión de las dos hormonas a velocidad constante y durante 8 horas (entre las 22 h, al acostarse, y las 6 h, al levantarse). Una perfusión endovenosa, durante 8 horas es demasiado restrictiva, y la VLT está completamente degradada en un medio gástrico ácido, la vía extravascular susceptible de realizar dicha infusión en el contexto de la presente invención es la vía transdérmica, en forma de parches de dos reservorios, aplicados durante 8 horas, a la hora de acostarse y a la hora de levantarse.

30 3. Los cálculos de las dosis de VLT y 6-MH, biodisponibles que deben liberarse en el organismo a partir del parche, pueden realizarse para cada afección que se esté tratando, a partir de los valores de los niveles plasmáticos de melatonina medidos entre las 1 h y las 6 h de la mañana en los pacientes a tratar.

35 En un estudio de la cinética de la secreción de melatonina por la glándula pineal realizado en humanos, en dos grupos de 12 sujetos voluntarios sanos de ambos sexos, jóvenes y mayores ((Fourtillan JB, Brisson A.M., Gobin P., Fourtillan M., Ingrand I., Decourt J.Ph. & Girault J., Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. Am, J. Physiol. Endocrinol. Metab., 280, E11-E22 (2001)), fue posible medir las cantidades totales de melatonina (MLT) secretadas durante la noche (entre las 22 h y las 6 h). Se observó una variabilidad interindividual significativa (1 a 10) en los 24 sujetos. Este estudio mostró que la cantidad total de MLT secretada, durante las 8 h de la noche promedió 28,7 µg (35,7 µg en hombres jóvenes adultos sanos con un peso medio igual a 74 kg, o 0,48 µg por kg; y 21,6 µg en mujeres jóvenes adultas sanas con un peso medio de 54 kg o 0,40 µg por kg) para un peso medio igual a 64 kg, es decir, una secreción total de MLT igual a 0,44 µg por kg. Además, en estos 12 sujetos jóvenes, las cantidades totales de MLT secretadas durante la noche varían de 10 a 60 µg, correspondientes a las concentraciones plasmáticas máximas, observadas desde la 1 h de la mañana, comprendidas entre 19 y 93,7 picogramos por ml, con un valor medio igual a 54,5 picogramos por ml. En los 12 sujetos mayores, las concentraciones plasmáticas máximas observadas desde la 1 h de la mañana, estaban comprendidas entre 9,6 y 124,7 picogramos por ml, con un valor medio igual a 45,6 picogramos por ml. En promedio, las concentraciones plasmáticas máximas de MLT son más bajas en las personas de edad avanzada, aunque el valor límite máximo (124,7 pg/ml) se observa en una persona de edad avanzada.

40 Este estudio permite situar el nivel medio de la cantidad total de melatonina, secretada por la glándula pineal durante la noche (duración media igual a 8 horas, independientemente de la temporada), a aproximadamente 30 µg, es decir, 0,5 µg por kg, en sujetos jóvenes adultos sanos de ambos sexos. No se debe olvidar que existe una variabilidad interindividual muy importante para este parámetro biológico. De hecho, esta secreción varía de 10 a 60 µg en la muestra de 12 sujetos voluntarios jóvenes adultos sanos (6 hombres, 6 mujeres) correspondientes a las concentraciones plasmáticas máximas observadas desde la 1 h de la mañana comprendidas entre 19 y 93,7 picogramos por ml.

50 No es posible medir las secreciones pineales nocturnas de MLT en los pacientes, pero este estudio, realizado en personas jóvenes y mayores, muestra que en los 24 sujetos estudiados, las concentraciones plasmáticas máximas de melatonina observadas a partir de las 1 h de la mañana, varían de 9,6 a 124,7 picogramos por ml. Estos niveles reflejan las secreciones pineales totales de MLT.

60 Lo importante de este estudio es que la secreción pineal total de melatonina tiene un promedio de 30 a 100 µg con

valores comprendidos entre 10 y 60 μg en sujetos jóvenes adultos sanos. Estas secreciones corresponden a concentraciones plasmáticas máximas, observadas desde las 1 h de la mañana, comprendidas entre 19 a 94 picogramos por ml. Extrapolando esta correlación entre las secreciones pineales totales y las concentraciones plasmáticas máximas de melatonina a los sujetos de edad avanzada del estudio, se pueden señalar las siguientes conclusiones:

- Las secreciones totales de melatonina por la glándula pineal, durante la noche (duración 8 h, entre 22 h y 6 h) varían de 5 μg a 100 μg ;
- Las concentraciones plasmáticas máximas de melatonina observadas desde las 1 h de la mañana, reflejan esta secreción; varían entre 10 y 125 picogramos de melatonina, alrededor de un valor medio cercano a 50 picogramos por ml;
- La medición de las concentraciones plasmáticas de melatonina, a partir de las 1 h de la mañana en los pacientes, permitirá conocer la importancia de su secreción pineal de MLT y, en consecuencia, el estado del sistema [(VLT)-(6-MH)], en estos pacientes, ya que la MLT es el bioprecursor de las dos hormonas, valentonina y 6-metoxi-harmalan.

3.1 Correlaciones entre las secreciones de melatonina y las afecciones de origen neurológico como consecuencia de un déficit del sistema [(VLT)-(6-MH)].

A pesar de la ausencia en la literatura científica y por razones técnicas, de datos sobre la importancia de la secreción pineal de melatonina durante las diversas afecciones de origen neurológico, que parecen estar relacionadas con la misma, es posible establecer una correlación entre las secreciones pineales de MLT y estas afecciones. La evaluación de la secreción pineal de MLT se puede realizar, como se acaba de mostrar, mediante una dosificación de la concentración plasmática máxima de melatonina a partir de las 1 h de la mañana, en los pacientes. Se pueden dictar las siguientes correspondencias:

- las concentraciones plasmáticas máximas de MLT inferiores a 10 pg/ml , correspondientes a las secreciones pineales de MLT inferiores a 5 μg , se observan en el insomnio primario, y en las afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. En el caso particular de la enfermedad de Alzheimer, los pocos estudios que se han realizado muestran un colapso de la secreción pineal de MLT, con concentraciones de MLT en medios biológicos por debajo de los límites de detección de las técnicas de análisis de MLT;
- concentraciones plasmáticas máximas de MLT comprendidas entre 10 pg/ml y 50 pg/ml , correspondientes a las secreciones pineales de MLT comprendidas entre 5 μg y 25 μg , se observan en trastornos del sueño, así como en depresiones nerviosas endógenas y reactivas.

Por lo tanto, el valor de la concentración plasmática máxima de MLT, reflejo de la importancia de la secreción pineal de MLT, y en consecuencia de las secreciones pineales de las dos hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)], puede completar el diagnóstico clínico de la afección neurológica, y sirve como base para establecer las dosificaciones de las hormonas en la combinación (VLT+6-MH) que se administrarán por vía transdérmica.

Productos químicos

La melatonina fue sintetizada por Cerillant y comprada en Promochem (Molsheim, Francia) y el patrón interno, D₄-melatonina, fue sintetizada por CDN Isotopes y comprada en C.I.L (Sainte-Foix-La-Grande, Francia). Los cartuchos para SPE Oasis® HLB, 1 ml, 30 mg se adquirieron en Waters (Milford, MA, EE. UU.). El metanol HPLC Analyzed, el agua HPLC Analyzed, el ácido fórmico al 98-100 % Analyzed, el acetonitrilo de grado ultra gradiente HPLC Analyzed, el cloruro de metileno HPLC Analyzed, la solución de hidróxido de sodio 2N, y el acetato de sodio se obtuvieron de Merck AG (Darmstadt, Alemania). Todos los disolventes tuvieron una alta pureza y se usaron sin purificación adicional. Para evitar cualquier contaminación posterior de las muestras: se utilizaron para este análisis se tubos de vidrio desechables de 3,5 ml, 10 ml y tubos de vidrio desechables de 10 ml con tapones de teflón.

Curvas de calibración

Se prepararon soluciones madre de melatonina y el patrón interno disolviendo cada uno de los compuestos de referencia puros en metanol a fin de obtener una concentración primaria de 1000 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Estas soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las soluciones de trabajo de los patrones, preparadas para el análisis, se obtuvieron mediante diluciones apropiadas de soluciones madre en metanol. Se almacenaron a menos de 20 °C hasta su uso.

Se sometieron a ensayo diferentes juegos de plasma de control para determinar las concentraciones de melatonina endógena.

Se preparó diariamente una curva de calibración de 9 puntos cargando alícuotas (1 ml) de plasma humano exento de sustancia farmacológica con 40 μl de la solución de patrón interno de 5 $\text{pg}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ (200 pg de D₄-melatonina) y varias cantidades de melatonina situadas en el intervalo de 1 a 200 μg . Las muestras en blanco se prepararon de

forma similar cargando 1 ml de plasma de control únicamente con la solución de patrón interno.

Extracción a partir de muestras de plasma

5 Extracción en fase sólida

10 Todos los experimentos de SPE se realizaron utilizando una columna Waters Oasis® HLB de 1 ml, 30 mg. La columna se acondicionó con 1 ml de metanol, seguido de 2 ml de agua. El plasma (1 ml), reforzado como se ha indicado anteriormente con la solución de D4-melatonina, se colocó en un tubo de vidrio de 3,5 ml y se diluyó con 1 ml de agua. Después de una breve agitación usando un mezclador tipo vórtex, la muestra diluida se cargó en la columna. Después de lavar la columna con 1 ml de agua, los componentes se eluyeron con 1 ml de metanol. Las muestras se evaporaron a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno y se disolvieron en 1 ml de hidróxido de sodio 0,002N en agua.

15 Extracción en fase líquida

20 Después de una breve agitación usando un vórtex, se agregaron 6 ml de cloruro de metileno. El procedimiento de extracción se llevó a cabo durante un periodo de 10 minutos utilizando un agitador alternativo. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. La capa acuosa superior se eliminó completamente y la fase orgánica restante se transfirió a un tubo de vidrio de 10 ml y se evaporó hasta sequedad a 40 °C bajo una suave corriente de nitrógeno. El residuo seco se volvió a disolver en 200 µl de agua y se mantuvo a +4 °C antes de la inyección. Se inyectó un volumen fijo de 75 µl en el sistema de LC-MS/S.

Procedimiento de validación

25 Durante este procedimiento de validación, el mismo analista preparó y ejecutó tres curvas de calibración de plasma el mismo día. Los parámetros de regresión se calcularon para evaluar la linealidad y reproducibilidad de la técnica. Además, para estimar la precisión y la exactitud durante el mismo día y día a día del procedimiento, se realizaron pruebas de repetibilidad a diferentes concentraciones (1, 2, 25 y 200 pg.ml⁻¹) en tres días distintos. Las muestras de plasma cargadas se analizaron durante un periodo de 1 semana por dos operadores diferentes y, para cada concentración, se calcularon la desviación típica relativa y el porcentaje promedio de error.

35 El límite de cuantificación (LLQ), que debe determinarse con un nivel de confianza indicado, se definió como la concentración detectable más baja que produce una señal significativamente más alta que la señal media medida en muestras de control representativas. Primero, para calcular el LLQ del procedimiento, se realizó una prueba de repetibilidad con 5 muestras de plasma, los blancos, exentos de sustancia farmacológica. La señal media (Ybl) observada en el tiempo de retención de melatonina y la desviación típica asociada (Sbl) se utilizaron para calcular un valor teórico (Yth) del límite de cuantificación. Luego, se realizó una prueba de repetibilidad con 5 réplicas de muestras de plasma cargadas con una concentración de melatonina cerca de este límite de cuantificación teórica. El valor promedio de la señal (Yloq) se comparó estadísticamente con la señal promedio (Ybl) obtenida con las muestras de control. Después de probar la homogeneidad de la varianza ($p < 0,05$), se usó una prueba de t de Student o una prueba de Welch para demostrar que Yloq era significativamente superior a Ybl en el nivel de probabilidad del 97,5 %.

45 Para determinar la estabilidad de la melatonina en el plasma humano congelado, se agregaron soluciones de trabajo a un lote de plasma humano, blanco, y luego se almacenaron por debajo de la temperatura de congelación de -20 °C. Se extraerán y analizarán seis muestras de plasma cargadas con 2 y 200 pg.ml⁻¹ de melatonina antes y después de dos y tres ciclos de congelación/descongelación. Entre cada ciclo, las muestras se mantendrán en condiciones de temperatura de almacenamiento idénticas (aproximadamente -20 °C) a las utilizadas para un análisis normal de las muestras.

50 Los extractos de plasma se analizarán repetidamente durante el periodo de validación para verificar la posible degradación de los compuestos cuando se almacenan en el disolvente a aproximadamente +4 °C. La evaluación de la estabilidad se basa en concentraciones retrocalculadas que deben situarse en ± 15 % (excepto para LLQ ± 20 %) y una forma de pico cromatográfico aceptable.

60 Para calcular la recuperación general del procedimiento, se preparará y analizará una curva de calibración de plasma (desde el límite inferior de cuantificación hasta el límite superior de cuantificación). Al mismo tiempo, se extraerán y analizarán seis (6) muestras cargadas con 2, 25 y 200 pg.ml⁻¹ de melatonina. Los valores medios de respuesta se calcularán y compararán con los obtenidos con extractos de plasma blancos (n = 6) preparados y cargados con el patrón puro de concentraciones equivalentes al final del tratamiento de la muestra. La recuperación del patrón interno también se determinará a la concentración utilizada para cargar las muestras.

Análisis por LC-MS/MS

65 Instrumento

El sistema de HPLC consistió en un sistema de la serie 1100 de Agilent con una bomba binaria y un automuestreador termostático.

- 5 El sistema de LC-MS/MS estaba constituido por un espectrómetro de masas en modo tándem triple cuadrupolo API 4000 (APPLIED BIOSYSTEMS) que funciona en modo de ionización positiva Turbo IonSpray. Este sistema se acopló a la salida de la columna de HPLC utilizando una longitud de tubo PEEK.

Condiciones cromatográficas

- 10 La cromatografía se realizó en una columna C18 (3,5 µm, 50 x 2,1 mm de D.I., XBridge™ Waters, Milford, MA, EE.UU.). La fase móvil fue: acetonitrilo-acetato de amonio acuoso 5 mM-ácido fórmico (25/75/0,01). El caudal fue de 0,2 ml/min.

Condiciones del espectrómetro de masas

- 15 El espectrómetro de masas funcionó en modo de ionización positiva Turbo IonSpray a 500 °C. Las muestras se analizaron por el seguimiento de las reacciones seleccionadas (SRM) empleando la transición del ion precursor [M + H]⁺ al ion del producto para el analito y el patrón interno. Los iones seguidos en el modo de seguimiento de las reacciones (MRM) fueron m/z 233,18 (ion del precursor: [M+H]⁺) a 174,10 (ion del producto) para la melatonina y m/z 237,22 (ion del precursor: [M+H]⁺) a 178,10 (ion del producto) para la D₄-melatonina (E.I.). Los iones de los productos formados se obtienen por la pérdida del fragmento [NH-CO-CH₃].

- La tensión de la ionización se ajustó a + 4,8 KV.
- El gas nebulizador de TIS (gas 1) se ajustó a 40.
- 25 ➤ El gas del dispositivo de calentamiento de TIS (gas 2) se ajustó a 50.
- El gas de cortina se ajustó a 12.
- El gas de disociación inducido por colisión (CAD) se ajustó a 10.
- Los valores de DP, EP, CE y CXP se ajustaron, respectivamente, a 50, 10, 17 y 10.
- El tiempo de espera se ajustó a 500 ms para cada compuesto.

30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pretratamiento y análisis de muestras

- 35 El análisis cuantitativo de un compuesto presente a una concentración muy baja del orden del femtogramo en un líquido biológico complejo representa un desafío colosal para el analista a cargo de un gran lote de muestras que se analizarán diariamente. Primero, las muestras plasmáticas deben estar libres de la mayoría de las sustancias endógenas que pueden interferir durante la determinación de la melatonina.

- 40 Se observó que un procedimiento de extracción sólido-líquido seguido de un procedimiento de extracción líquido-líquido, usando un solvente de alta pureza como el cloruro de metileno en una fase acuosa alcalina, dio lugar a un residuo limpio sin la mayoría de las impurezas. El procedimiento de extracción resultó en un ahorro considerable de tiempo, por lo que el caudal del laboratorio se incrementó en más de 100 muestras plasmáticas por día. El residuo disuelto en agua, que es muy protector para la columna, hizo posible tratar una gran cantidad de inyecciones
- 45 diariamente gracias a un corto tiempo de ejecución cromatográfica (4,5 min). Utilizando nuestras condiciones analíticas, el tiempo de retención de melatonina y D₄-melatonina fue de aproximadamente 2,3 minutos. Ambos picos cromatográficos tenían una forma gaussiana y el ancho del pico en la base de cada analito era inferior a 30 s. El ancho del pico calculado a media altura fue de aproximadamente 5 s. Un tiempo de espera de 500 ms por intervalo
- 50 de masas llevó a un mínimo de 20 puntos de datos para la medición de cada compuesto, teniendo en cuenta el tiempo total de inactividad del sistema.

Recuperación

- 55 La eficacia de extracción fue de aproximadamente un 80 % y estos resultados se confirmaron posteriormente durante el procedimiento de validación de HPLC-MS/MS.

Recuperación global calculada a partir de los resultados obtenidos después del análisis de las réplicas de un extracto de matriz biológica y un patrón no tratado cargadas con 200 (pg.ml⁻¹) de melatonina:

Muestra n.º	Relación de superficie del pico del extracto de matriz biológica	Patrón no tratado
1	1,407	1,761
2	1,433	1,793
3	1,442	1,748
4	1,404	1,754
5	1,499	1,698

6	1,346	1,796
Media	1,422	1,758
DT	0,050	0,036
n	6	6
DTR (%)	3,55 %	2,03 %
Valor mínimo	1,346	1,698
Valor máximo	1,499	1,796
Recuperación total = 80,85 %		

Recuperación global calculada a partir de los resultados obtenidos después del análisis de las réplicas de un extracto de matriz biológica y un patrón no tratado cargadas con 25 (pg.ml⁻¹) de melatonina:

Muestra n.º	Relación de superficie del pico del extracto de matriz biológica	Patrón no tratado
1	0,169	0,221
2	0,173	0,208
3	0,173	0,213
4	0,187	0,210
5	0,179	0,211
6	0,169	0,211
Media	0,175	0,212
DT	0,007	0,005
n	6	6
DTR (%)	3,95 %	2,22 %
Valor mínimo	0,169	0,208
Valor máximo	0,187	0,221
Recuperación total = 82,47 %		

5 Recuperación global calculada a partir de los resultados obtenidos después del análisis de las réplicas de un extracto de matriz biológica y un patrón no tratado cargadas con 2 (pg.ml⁻¹) de melatonina:

Muestra n.º	Relación de superficie del pico del extracto de matriz biológica	Patrón no tratado
1	0,016	0,020
2	0,019	0,019
3	0,015	0,020
4	0,018	0,021
5	0,018	0,020
6	0,018	0,019
Media	0,017	0,020
DT	0,002	0,001
n	6	6
DTR (%)	8,90 %	3,82 %
Valor mínimo	0,015	0,019
Valor máximo	0,019	0,021
Recuperación total = 87,86 %		

10 Linealidad de las curvas de calibración

Las tres curvas de calibración de plasma, obtenidas el mismo día al trazar las relaciones de las superficies de los picos de melatonina/D₄-melatonina en función de las concentraciones de melatonina conocidas, eran líneas rectas (coeficientes medios de correlación ± DT 0,9973 ± 0,023) en el intervalo de concentraciones de 1 a 200 pg.ml⁻¹. El análisis de regresión intersectó cerca del origen un valor promedio de ordenada igual a 0,0035 para n = 3 determinaciones (tabla 1). En el tercer y quinto conjunto de muestras de control de plasma en la prueba de selectividad y especificidad, la señal promedio observada en las muestras en blanco fue equivalente a 8,38 y 1,47 pg.ml⁻¹ de melatonina. Debido a este alto nivel de melatonina endógena, estos conjuntos de muestras de control de plasma no se utilizaron para el procedimiento de validación posterior. El valor de ETR (1,96 %) calculado a partir de la pendiente media y la desviación estándar asociada (0,0068 ± 0,0001) demuestra la reproducibilidad de la técnica durante el mismo día. La linealidad y la reproducibilidad del día a día se evaluaron utilizando los parámetros de regresión de 5 curvas de calibración preparadas y ejecutadas durante un periodo de 1 semana por dos analistas diferentes. Estas curvas de calibración se realizaron con el mismo conjunto de plasmas de control. Como se muestra en la tabla 2, el valor promedio de la pendiente (0,0069 ± 0,0001) estuvo cerca de la "prueba de linealidad" en un día y hubo muy poca dispersión de los 5 puntos de calibración a lo largo de los trazos de regresión (tabla 2).

Tabla 1: Parámetros de la curva de calibración para el mismo día obtenidos durante la "prueba de linealidad" en un día

Curva		Pendiente	Ordenada en el origen	Factor de determinación
1		0,0069	3,3500E-03	0,9995
2		0,0067	3,1700E-03	0,9992
3		0,0069	4,0800E-03	0,9997
	Media	0,0068	0,0035	0,9995
	DT	0,0001	0,0006	0,0004
	n	2	2	2
	DTR (%)	1,96 %	*	0,04 %
	Valor mínimo	0,0067	3,1700E-03	0,9992
	Valor máximo	0,0069	4,0800E-03	0,9997

Tabla 2: Linealidad y reproducibilidad de un día a otro de 5 curvas de calibración de plasma preparadas y ejecutadas durante un periodo de 1 semana

Curva		Pendiente	Ordenada en el origen	Factor de determinación
Serie 2		0,0070	3,7900E-03	0,9973
Serie 3		0,0068	4,8000E-03	0,9972
Serie 4-1		0,0069	3,3500E-03	0,9995
Serie 4-2		0,0067	3,1700E-03	0,9992
Serie 4-3		0,0069	4,1000E-03	0,9997
	Media	0,0069	0,0038	0,9986
	DT	0,0001	0,0006	0,0012
	n	5	5	5
	DTR (%)	1,66 %	*	0,12 %
	Valor mínimo	0,0067	0,0032	0,9972
	Valor máximo	0,0070	0,0048	0,9995

5
Precisión y exactitud

Todas las fuentes de variabilidad se redujeron considerablemente mediante el uso de un análogo de isótopo estable puro como patrón interno. Las desviaciones típicas relativas de las diferentes pruebas de repetibilidad de plasmas calculadas a lo largo de tres días distintos fueron inferiores al 15,2 % y los porcentajes promedios de error estuvieron en el intervalo de -9,71 % a +4,61 % (tablas 3).

Tabla 3.1. Precisión y exactitud en el mismo día del procedimiento de HPLC-MS/MS calculadas en tres días diferentes

Concentración teórica (pg.ml ⁻¹)	n	Concentración experimental (pg.ml ⁻¹)	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo (%)
1	6	0,875 1,096 0,834 0,968 1,179 1,143	1,016	0,145	14,23	1,58
2	6	1,993 1,830 1,634 1,949 1,789 1,641	1,806	0,150	8,33	-9,71
25	6	24,586 24,378 23,413 24,168 24,356 23,706	24,101	0,450	1,87	-3,60
200	6	213,318 209,294 213,664 205,029 208,338 205,633	209,213	3,681	1,76	4,61

Tabla 3.2. Precisión y exactitud en el mismo día del procedimiento de HPLC-MS/MS calculadas en tres días diferentes

Concentración teórica (pg.ml ⁻¹)	n	Concentración experimental (pg.ml ⁻¹)	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo (%)
1	6	1,101 1,292 0,932 0,960 0,897 1,028	1,035	0,146	14,07	3,50
2	6	1,751 2,225 1,602 1,973 2,029 1,974	1,926	0,219	11,39	-3,71
25	6	23,465 24,003 24,109 26,021 24,938 23,496	24,339	0,983	4,04	-2,64
200	6	199,391 203,061 204,356 198,973 212,388 190,702	201,479	7,163	3,56	0,74

5

Tabla 3.3. Precisión y exactitud en el mismo día del procedimiento de HPLC-MS/MS calculadas en tres días diferentes

Concentración teórica (pg.ml ⁻¹)	n	Concentración experimental (pg.ml ⁻¹)	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo (%)
1	6	1,040 0,887 1,171 1,159 0,796 0,938	0,998	0,151	15,15	-0,18
2	6	1,825 1,730 1,810 *2,883 1,921 2,242	1,906	0,200	10,50	-4,72
25	6	23,994 24,003 24,221 25,139 24,361 24,827	24,424	0,465	1,90	-2,30
200	6	201,641 208,259 206,438 207,900 206,162 208,489	206,482	2,559	1,24	3,24

10 Los resultados de los análisis de repetibilidad de un día a otro fueron bastante similares a los obtenidos durante el análisis en el mismo día: las DTR fueron inferiores a 13,68 % y el porcentaje promedio de error estuvo en el intervalo de -6,13 a + 2,86 % para las concentraciones de melatonina probadas de 1 a 200 pg.ml⁻¹ (tabla 4).

Tabla 4: Precisión y exactitud de un día a otro del procedimiento de HPLC-MS/MS calculadas en un periodo de 1 semana durante los análisis de repetibilidad

Concentración teórica (pg.ml ⁻¹)	n	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo (%)	DTR media (%)
1	18	1,016	0,139	13,68	1,64	14,48
2	17	1,877	0,188	9,99	-6,13	10,08
25	18	24,288	0,653	2,69	-2,85	2,60
200	18	205,724	5,645	2,74	2,86	2,18

5 Límites de cuantificación

Una relación señal a ruido > 3 es un valor que aún utilizan muchos autores como criterio para una respuesta significativa. Desafortunadamente, incluso si el ruido electrónico es relativamente constante de un día para otro, esto no siempre es cierto para el ruido de fondo químico, que a veces es drásticamente diferente de una determinación a otra. Esto se debe principalmente a la muestra, a los disolventes, al material de extracción y al sistema cromatográfico. Para tener en cuenta todas estas fuentes de variabilidad, se utilizó una determinación estadística del límite de cuantificación. El LOQ teórico, basado en los resultados obtenidos después del análisis por HPLC-MS/MS de cinco muestras de control diferentes, se calculó para que fuera igual a $Y_{th} = 0,25 \text{ pg.ml}^{-1}$.

15 Debido a la presencia de melatonina endógena en las muestras en blanco, se realizó un análisis de repetibilidad a una tasa superior igual $1 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. Se aplicó la prueba t de Student para demostrar que el valor medio de la señal $Y_{LOQ} \pm DT$ ($1,069\text{E-}02 \pm 7,405\text{E-}04$) calculado a partir del análisis de repetibilidad realizado a 1 pg.ml^{-1} fue significativamente diferente del (Y_{bl}) observada con las 5 muestras en blanco ($2,663\text{E-}03 \pm 2,760\text{E-}04$). El $t_{cal} = -22,5$, desviación típica = $0,563\text{E-}03$ para $n = 8$ grados de libertad. La probabilidad del resultado, suponiendo que la hipótesis nula es igual a 0,00. Debido a la DTR (1,16 %) y al porcentaje medio de error (-0,40 %) muy bajas, esta concentración se validó obviamente como el límite de cuantificación del procedimiento (tabla 5).

Se registró un cromatograma de masas tipo después del análisis de HPLC-MS/MS de un plasma de control. La melatonina endógena estaba presente en esta muestra a una concentración inferior a $0,25 \text{ pg.ml}^{-1}$. Se obtuvieron los cromatogramas de masa de las muestras de control cargadas con 1 (LLQ) y 200 pg.ml^{-1} de melatonina. Cuando se analizó un extracto de plasma correspondiente a LLQ del procedimiento, la señal medida en el tiempo de retención de melatonina fue equivalente a aproximadamente 375 fg inyectados en el sistema de HPLC-MS/MS. La melatonina endógena, medida en las muestras de control, genera una señal. Está claro que las concentraciones de melatonina por debajo de $0,25 \text{ pg.ml}^{-1}$ se pueden cuantificar durante el ensayo clínico con una precisión y exactitud elevadas como lo demuestran los resultados del análisis de repetibilidad (DTR = 10,36 %) realizada con las 5 muestras en blanco.

Tabla 5: Procedimiento de validación para la determinación de LOQ en pg.ml^{-1}

Muestra n.º	Relación de las superficies del pico del extracto de las muestras en blanco	Relación de las superficies del pico del extracto de las muestras de LLQ	Concentración retrocalculada en pg.ml^{-1} del extracto de las muestras de LLQ
1	2,29E-03	1,08E-02	0,990
2	3,06E-03	1,08E-02	1,009
3	2,59E-03	1,02E-02	1,000
4	2,68E-03	9,76E-03	0,979
5	2,70E-03	1,10E-02	1,002
Media	$Y_{bl} = 2,663\text{E-}03$	$Y_{loq} = 1,069\text{E-}02$	0,996
DT	2,760E-04	7,405E-04	0,012
n	5	5	5
DTR (%)	10,36 %	6,93 %	1,16 %
Valor mínimo	2,29E-03	9,76E-03	0,979
Valor máximo	3,06E-03	1,17E-02	1,009

35 Reproducibilidad de la inyección

La reproducibilidad de la etapa de inyección también se estudió a una concentración (200 pg.ml^{-1}) y los resultados de esta prueba se resumen en la tabla 6. Cuando se inyectó repetidamente el mismo extracto de plasma ($n = 100$), los valores de DTR fueron inferiores al 1,0 %, lo que demuestra que el procedimiento era adecuado para un análisis exacto de la melatonina. Además, no se observó ningún efecto de memoria en la muestra en blanco analizada después de la inyección del extracto de plasma que contenía 200 pg.ml^{-1} de melatonina.

Tabla 6: Reproducibilidad de la inyección

Muestra n.º	Tiempo de espera de melatonina	Superficie de pico de melatonina	Tiempo de espera de E.I.	Superficie de pico de E.I.	Relación de las superficies de pico
Media	2,33	232940	2,29	370240	0,63
DT	0,01	5344	0,01	10734	0,01
DTR (%)	0,49 %	2,29 %	0,49 %	2,90 %	0,99 %
n	100	100	100	100	100
Valor mínimo	2,31	221000	2,28	348000	0,62
Valor máximo	2,36	241000	2,33	385000	0,64

Prueba de estabilidad

Estabilidad durante los ciclos de congelación/descongelación

5

Los resultados de esta prueba de estabilidad (tablas 7 y 8) demostraron claramente que los ciclos de congelación-descongelación no tienen ningún efecto sobre la estabilidad de la melatonina en muestras de plasma humano almacenadas a aproximadamente -20 °C.

10

Tabla 7:

Concentración de referencia (pg.ml ⁻¹)	n	Concentración experimental (pg.ml ⁻¹)	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo en función de la concentración teórica (%)
1,806	6	1,862 1,957 2,044 1,812 1,833 1,880	1,898	0,087	4,59	5,10
209,213	6	208,926 211,252 209,417 219,452 212,865 204,588	211,083	4,957	2,35	0,89

Tabla 8: Análisis de la estabilidad de la melatonina después de los ciclos de congelación/descongelación: precisión y sesgo de las mediciones de la matriz biológica de la melatonina después de 3 ciclos de congelación/descongelación

Concentración de referencia (pg.ml ⁻¹)	n	Concentración experimental (pg.ml ⁻¹)	Media (pg.ml ⁻¹)	DT	DTR (%)	Sesgo en función de la concentración teórica (%)
1,806	5	1,889 1,743 1,776 *48,99 2,108 1,960	1,895	0,147	7,78	4,96
209,213	6	207,575 211,163 203,999 205,980 207,232 212,067	208,003	3,079	1,48	-0,58

15 Estabilidad del extracto de plasma

Los resultados notificados en la tabla 9 muestran que los extractos de las muestras fueron estables en el disolvente de inyección cuando los viales de inyección se almacenaron a aproximadamente +4 °C durante al menos 24 horas después de la primera inyección de melatonina. No se observó disminución alguna de la intensidad de la señal ni cambios en los trazos cromatográficos.

20

Tabla 9: Estabilidad post-preparatoria. Los CQ cargados con melatonina en dos concentraciones (2 y 200 pg.ml⁻¹) se almacenaron en un automuestreador y se volvieron a analizar (condiciones de trabajo del análisis)

Día	2 pg.ml ⁻¹	200 pg.ml ⁻¹
T0 (serie 2)	1,751	199,391
	2,225	203,061
	1,602	204,356
	1,973	198,973
	2,029	212,388
	1,974	190,702
Media	1,926	201,479
T0 + 24 h (serie 3)	1,817	201,388
	1,908	213,337
	1,800	205,171
	2,560	207,755
	1,806	208,103
	1,854	213,387
Media	1,958	208,190
Desviación T0 + 24 h/T0	1,65 %	3,33 %

3.2 Cálculo de la relación de las dosis de VLT y 6-MH administradas en la combinación, durante 8 horas, a partir de las 22 h (o a la hora de acostarse), lo que garantiza la prevalencia de las concentraciones de VLT en el organismo durante el periodo de descanso (entre 22 h y 6 h), luego la prevalencia de las concentraciones de 6-MH a partir de las 6 h (o a la hora de levantarse) durante el periodo de actividad hasta las 22 h.

Con el fin de garantizar la prevalencia de las concentraciones de VLT en el organismo, durante el periodo de descanso entre las 22 h (o a la hora de acostarse) y las 6 h (o a la hora de levantarse), la 6-MH durante el periodo de actividad, entre la hora de levantarse y la hora de acostarse, deben inyectarse en el organismo, durante la duración de la aplicación del parche, dosis de VLT y 6-MH, cuyos valores deben estar en una relación Dosis biodisponible de VLT/Dosis biodisponible de 6-MH, que asegura prevalencias y su alternancia durante toda la duración del ciclo nictemeral. El cálculo de esta relación entre las dosis biodisponibles se puede realizar a partir de sus parámetros farmacocinéticos, como se indica a continuación.

Al fijar una dosis biodisponible igual a 40 µg de VLT, una dosis mediana que parece adecuada para el tratamiento del insomnio primario y las afecciones neurodegenerativas del tipo Parkinson, correspondiente a una secreción pineal de MLT baja (secreción inferior a 5 µg de MLT, y concentración plasmática de MLT a partir de las 1 h de la mañana inferior a 10 pg/ml), se puede calcular la dosis biodisponible de 6-MH para la coadministración a fin de garantizar la prevalencia de ambas hormonas y su alternancia durante los periodos de descanso y actividad.

Durante una infusión de VLT (o 6-MH) a velocidad constante (orden 0 en farmacocinética) en el torrente sanguíneo, las concentraciones plasmáticas de VLT aumentan progresivamente hasta que alcanzan una meseta, cuando la velocidad de eliminación llega a ser igual a la velocidad de infusión. Por lo tanto, las entradas de VLT son iguales a las salidas; y las concentraciones plasmáticas se mantienen en un valor constante. Este es el estado de "meseta". Si la cantidad infundida de VLT, durante un periodo de 8 horas, es igual a 40 µg, se puede escribir en estado de meseta:

Relación 1:

$$\text{Velocidad de infusión (de VLT)} = 40 \mu\text{g}/8 \text{ h} = \text{Velocidad de eliminación (de VLT)} = \text{CL} \times \text{C}_{\text{ss}}$$

relación en la que CL es el aclaramiento total (o aclaramiento plasmático, expresado en litros por hora, l/h); con $\text{CL} = (0,693/T_{1/2z}) \times V_{d\text{ss}}$,

relación en la que $V_{d\text{ss}}$ es el volumen de distribución en estado de equilibrio (*steady state*: ss), que corresponde al estado de meseta, a partir del cual las concentraciones plasmáticas de VLT ya no aumentan (a partir de las 1 h de la mañana), permanecen en meseta (*steady state*), en su valor máximo C_{ss} .

El estudio farmacocinético de VLT y 6-MH realizado en perros después de la administración intravenosa de una combinación de VLT (3 mg/kg) y 6-MH (1 mg/kg) se utilizó para determinar los valores de los parámetros farmacocinéticos, presentados a continuación:

VLT:

$$T_{1/2z} = 0,70 \text{ h}$$

$$V_{d\text{ss}} = 5 \text{ litros/kg de peso corporal, es decir, } 3201 \text{ para un peso corporal de } 64 \text{ kg en humanos.}$$

6-MH:

$$T_{1/2z} = 2,27 \text{ h}$$

ES 2 738 633 T3

$V_{dss} = 15$ litros/kg de peso corporal, es decir, 960 l para un peso corporal de 64 kg en humanos.

Como los perfiles farmacocinéticos, es decir, los valores de los parámetros farmacocinéticos, son idénticos en humanos y en perros, como en todos los animales de sueño nocturno, es posible extrapolar a humanos los valores de los parámetros PK observados en perros.

Las prevalencias y las alternancias de las concentraciones de las dos hormonas durante los periodos de descanso y actividad deben asegurarse no solo a nivel de la sangre (concentraciones plasmáticas), sino también en su lugar de acción (sitios receptores 5-HT_{2C}, α_2 , D₁ y D₂, etc.). Por lo tanto, es necesario tener en cuenta los valores de volumen de distribución (V_{dss}) de las dos hormonas, que vinculan las concentraciones plasmáticas de hormonas a sus concentraciones en sus sitios de acción.

Cálculo de la concentración plasmática máxima (C_{ss}) de VLT para una cantidad infundida de VLT igual a 40 μ g en humanos. De acuerdo con la relación 1, anteriormente establecida, ha sido posible escribir:

$$C_{ss} (\text{VLT}) = \frac{40 \mu\text{g} \cdot 0,70 \text{ h}}{0,693 \cdot 8 \text{ h} \cdot 320 \text{ l}} = 15,8 \text{ picogramos por ml, para VLT.}$$

Para 6-MH que tiene un volumen de distribución 3 veces más elevado que el de VLT, las concentraciones plasmáticas máximas de C_{ss} deben mantenerse a valores 3 veces más pequeños que los de VLT, para mantener la prevalencia de concentraciones de 6-MH, durante el periodo de descanso, tanto en el plasma como en el nivel periférico de los sitios receptores. A tal fin, la dosis infundida de 6-MH, combinada con una dosis infundida de 40 μ g de VLT no debe exceder de 10 μ g. De hecho, para una dosis infundida de 10 μ g, se tiene:

$$C_{ss} (6\text{-MH}) = \frac{10 \mu\text{g} \cdot 2,27 \text{ h}}{0,693 \cdot 8 \text{ h} \cdot 960 \text{ l}} = 4,3 \text{ picogramos por ml, para 6-MH.}$$

Dado un volumen de distribución 3 veces mayor que el de VLT, las concentraciones máximas de 6-MH cerca de los receptores siempre serán más pequeñas que las de VLT, durante el periodo de descanso.

En conclusión, para garantizar la prevalencia de ambas hormonas (VLT y 6-MH) y sus alternancias, es necesario infundir en el torrente sanguíneo dosis de VLT al menos cuatro veces más elevadas a las de 6-MH.

De acuerdo con otro aspecto particular de la presente invención, el sistema terapéutico transdérmico adhesivo contiene una combinación de una carga de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH) susceptible de administrar en el torrente sanguíneo una combinación de valentonina y 6-metoxi-harmalan en una proporción molar [VLT]/[6-MH] al menos igual a 4 durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante alrededor de 8 h a 10 h.

En cuanto al nivel, es decir, el orden de cantidad de dosis, se basa en los valores de las secreciones pineales de melatonina medida en humanos.

Para el tratamiento de trastornos del sueño, así como depresiones nerviosas endógenas y reactivas, afecciones caracterizadas por concentraciones plasmáticas máximas de MLT, medidas en pacientes desde las 1 h de la mañana entre 10 pg/ml y 50 pg/ml, se recomienda aplicar un parche a la hora de acostarse (hacia las 22 h o más tarde, según la costumbre), con una carga de VLT y 6-MH que permite administrar al organismo dosis iguales a 20 μ g de VLT y 5 μ g de 6-MH, durante la duración de la aplicación del parche, comprendida entre 8 h y 10 h, según la hora de levantarse, a la que se debe quitar el parche.

De acuerdo con otro aspecto particular de la invención, el sistema terapéutico transdérmico adhesivo contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar en el torrente sanguíneo una dosis de al menos 20 μ g de VLT y al menos 5 μ g de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente de aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso en el tratamiento de trastornos del sueño y depresiones nerviosas.

Se recomienda aplicar un parche a la hora de acostarse (alrededor de las 22 h, o más tarde, según la costumbre), con una carga de VLT y 6-MH que permite administrar al organismo dosis iguales a 40 μ g de VLT y 10 μ g de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, comprendida entre las 8 h y las 10 h, según la hora de levantarse, a la que se debe quitar el parche, para su uso en el tratamiento del insomnio primario y afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, afecciones caracterizadas por concentraciones plasmáticas máximas de MLT, medidas en pacientes a partir de las 1 h de la mañana, inferiores a 10 pg/ml.

De acuerdo con otra característica de la invención, el sistema terapéutico transdérmico adhesivo contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar en el torrente sanguíneo una dosis de al menos 40 μ g de VLT y al menos 10 μ g de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente de aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso en el tratamiento del insomnio primario y/o afecciones del tipo enfermedad de Parkinson.

Se recomienda aplicar un parche a la hora de acostarse (alrededor de las 22 h, o más tarde, según la costumbre),

con una carga de VLT y 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, comprendida entre las 8 h y las 10 h, según la hora de levantarse, a la que se debe quitar el parche, para su uso en el tratamiento de afecciones neurodegenerativas del tipo enfermedad de Parkinson, afecciones caracterizadas por concentraciones plasmáticas máximas de MLT, medidas en pacientes a partir de las 1 h de la mañana, inferiores a 1 pg/ml, incluso no medibles.

5 De acuerdo con aspecto particular de la invención, el sistema terapéutico transdérmico adhesivo contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar en el torrente sanguíneo una dosis de al menos 60 µg de VLT y de al menos 15 µg de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente de aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso destinado a la prevención y/o al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10 Como ya se ha indicado anteriormente, la presente invención también abarca el tratamiento para su uso destinado a la prevención y/o al tratamiento de afecciones consecuencia de una secreción pineal excesiva de hormonas del sistema [(VLT)-(6-MH)]. El caso particular de su uso destinado al tratamiento de las psicosis es aplicar, durante el periodo de actividad, un parche cargado únicamente de valentonina. La VLT debe permitir desplazar el exceso de 6-metoxi-harmalan secretada en pacientes psicóticos.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo, **caracterizado por que** contiene, como principio activo, una combinación de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH).
- 10 2. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado por que** contiene una combinación de una carga de valentonina (VLT) y 6-metoxi-harmalan (6-MH) apta para administrar, en el torrente sanguíneo, valentonina y 6-metoxi-harmalan en una proporción másica [VLT]/[6-MH] al menos igual a 4 durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante aproximadamente 8 h a 10 h.
- 15 3. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 para uso como medicamento.
- 20 4. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 que contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar, en el torrente sanguíneo, una dosis de al menos 20 µg de VLT y de al menos 5 µg de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso en el tratamiento de trastornos del sueño y depresiones nerviosas.
- 25 5. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 que contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar, en el torrente sanguíneo, una dosis de al menos 40 µg de VLT y de al menos 10 µg de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso en el tratamiento del insomnio primario y/o afecciones del tipo enfermedad de Parkinson.
6. Sistema terapéutico transdérmico adhesivo, de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 que contiene una carga de VLT y 6-MH que permite administrar, en el torrente sanguíneo, una dosis de al menos 60 µg de VLT y de al menos 15 µg de 6-MH durante la duración de la aplicación del parche, preferentemente durante aproximadamente 8 h a 10 h, para su uso destinado a la prevención y/o al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.