

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 546**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2008 PCT/GB2008/002066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008 WO08155533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2008 E 08762390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2167095**

54 Título: **Compuestos de fenotiazina para tratar el deterioro cognitivo leve**

30 Prioridad:

19.06.2007 US 945006 P

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

31.01.2020

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;
HARBARAN, DOMINIC VENAY;
RIEDEL, GERNOT;
DEIANA, SERENA;
GOATMAN, ELIZABETH ANNE;
WISCHIK, DAMON JUDE;
MURRAY, ALISON DOROTHY y
STAFF, ROGER TODD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 739 546 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

Compuestos de fenotiazina para tratar el deterioro cognitivo leve

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a métodos y materiales para uso en el tratamiento de deterioro cognitivo leve (MCI).

10 Técnica antecedente

El deterioro cognitivo leve (MCI) es un subconjunto de una entidad clínica más amplia denominada "deterioro cognitivo no demencia", o CIND.

15 Hay muchas causas potenciales de CIND incluyendo: depresión, uso de alcohol/drogas, enfermedad psiquiátrica, delirios, retraso mental, causas vasculares, enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis múltiple, factores sociales, y deterioro sensorial.

20 Los sujetos de MCI no son dementes, pero están en riesgo de desarrollar demencia como Enfermedad de Alzheimer (AD) (Larieu, S. et al. (2002) Incidence and outcome of mild cognitive impairment in a population-based prospective cohort. *Neurology*, 59: 1594-1599; Bennett, D.A. et al. (2002) Natural history of mild cognitive impairment in older persons. *Neurology*, 59: 198-205. De hecho se ha estimado que el 10 % de las personas con MCI se convierten a AD (Bruscoli and Lovestone (2004), Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. *Int Psychogeriat.* 16:2, 129-140).

25 MCI ha sido reconocido por la FDA como un objetivo de tratamiento válido (FDA (2001) http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3724s1_6_grundman/).

30 Esto ha llevado a la aparición de una serie de ensayos clínicos para MCI (por ejemplo, Thal et al., (2005), A randomized double-blind study of Rofecoxib in patients with Mild Cognitive Impairment, *Neuropsychopharm.*, 30:1204-1215).

Divulgación de la invención

35 Se puede ver que la provisión de modalidades de tratamiento alternativas para MCI con el fin de aliviar el MCI o los síntomas de MCI proporcionaría una contribución a la técnica.

40 Ahora se ha encontrado inesperadamente por los presentes inventores que los compuestos de diaminofenotiazina (DAPTZ) pueden usarse para proporcionar alivio sintomático del deterioro cognitivo independientemente de la presencia de cualquier patología subyacente de tipo AD. La memoria de referencia espacial mejorada se ha demostrado en un modelo que compara ratones jóvenes y ancianos, y también ratones normales y tratados con escopolamina.

45 Esto representa una modalidad de tratamiento alternativa a los tratamientos MCI existentes.

Usos previos de los compuestos de diaminofenotiazina

50 Se ha demostrado previamente que las diaminofenotiazinas inhiben la agregación de la proteína tau y alteran la estructura de los PHF, y revierten la estabilidad proteolítica del núcleo de PHF (véase el documento WO96/30766, F Hoffman-La Roche). Tales compuestos se describieron para su uso en el tratamiento y profilaxis de diversas enfermedades, incluyendo AD y la Enfermedad de Cuerpo de Lewy.

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

El documento WO 2005/030676 (El Tribunal Universitario de la Universidad de Aberdeen) discute las fenotiazinas radiomarcadas, y su uso en el diagnóstico y la terapia por ejemplo de tauopatías.

60 Dickey et al. ("Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression". *Mol. Neurodegener.* 2006, 1:6) investigó los efectos de una serie de compuestos y productos naturales disponibles comercialmente en los niveles de proteína tau total utilizando un enfoque basado en células que permite la medición de cambios en la expresión de proteínas. Los autores informan que los compuestos conducen a una reducción en los niveles de proteína tau y también observan una disminución selectiva en la expresión de ARNm de proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT).

65

El documento WO 2006/032879 (TauRx Therapeutics Pte. Ltd.) describe métodos para sintetizar y purificar ciertos compuestos de diaminofenotiazinio, Cloruro de Metilionina incluido. También se describen los compuestos resultantes, composiciones que los comprenden y su uso en métodos de tratamiento y diagnóstico médico.

- 5 El documento WO 2007/110630 (WisTa Laboratories Ltd.) describe procesos, usos, métodos y materiales que utilizan compuestos de diaminofenotiazinio en particular y describe sus usos como fármacos en el tratamiento de las taupatías, tal como la enfermedad de Alzheimer.

En contraste con lo anterior, la presente invención se refiere al tratamiento de MCI específicamente.

- 10 Varios estudios han propuesto que sería deseable que los medicamentos (como cloruro de metil tioninio (MTC), también conocido como azul de metileno) tuvo efectos en la memoria que podrían estar mediados por la mejora de la respiración mitocondrial (p. ej., Callaway et al., 2002; Callaway et al., 2004; Riha et al., 2005). Ninguno de estos, sin embargo, revelan el uso de MTC en el tratamiento sintomático de MCI.

- 15 Martínez et al. ("Methylene blue alters retention of inhibitory avoidance responses". *Physiol Psychol* 1978, 6:387-390) investigó los efectos del MTC en una tarea paso a paso para evitar la inhibición en un ensayo. Los autores concluyen que el azul de metileno tiene un efecto amnésico (es decir, causa amnesia) y un efecto de mejora de la memoria dentro del marco conceptual del documento. Afirman que los diferentes efectos se ven a diferentes dosis, efecto amnésico en pre-entrenamiento de altas dosis, y efecto de mejora del aprendizaje post-entrenamiento en baja dosis. La conclusión clave del documento es que la manipulación de la vía de fosfato pentoso puede actuar para modular los procesos de almacenamiento de memoria.

- 25 Callaway et al. ("Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats". *Neurosci. Lett.* 2002, 332:83-86) propusieron que MB corrigió las alteraciones del comportamiento inducidas por un agente inhibidor mitocondrial (azida sódica). Sin embargo, una revisión objetiva de la divulgación técnica muestra que no hay evidencia de que MB haya corregido un defecto de aprendizaje producido por la azida sódica, y también que la interpretación de los datos que sugieren que, sin embargo, hay un efecto selectivo en la memoria sin un efecto en el aprendizaje es inverosímil en vista de los defectos en el diseño experimental. Específicamente, El diseño experimental no controló el cambio en la tarea desde la detección de señales olfativas durante la fase de entrenamiento a una tarea diferente durante la fase de prueba del experimento.

- 30 No obstante lo anterior, los autores presentan la inferencia de que: "Los resultados de este estudio sugieren que MB tiene el potencial de afectar positivamente en el resultado clínico de las dificultades de retención de memoria en los trastornos neurodegenerativos asociados a la disfunción mitocondrial." Sin embargo ni los datos ni los autores sugirieron que el uso de MB podría actuar como un potenciador cognitivo en ausencia de disfunción mitocondrial.

- 35 Gonzalez-Lima F y Bruchey AK ("Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue". *Learning and Memory*, 2004 11 (5):633-640) examinó la administración de MTC después de la extinción para determinar si MTC podría mejorar la retención de una respuesta condicionada extinguida. Los autores dibujan la inferencia: "La administración de MB junto con la extinción de la terapia conductual en humanos puede ser un agente terapéutico útil para facilitar la retención de la extinción del miedo condicionado u otros recuerdos traumáticos." Esto es, los autores abogan por un uso dirigido de MTC para lograr un efecto amnésico en ciertas circunstancias específicas.

- 45 Callaway et al. ("Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats *Pharmacol.* Biochem. Behav. 2004, 77:175-181) usó el mismo paradigma de comportamiento que en Callaway et al. (2002). Sin embargo una revisión objetiva del contenido técnico del documento no revela evidencia de que MB haya mejorado el aprendizaje en animales que de otra manera no han sido afectados. La interpretación de los datos que sugieren que existe un efecto selectivo en la memoria sin un efecto en el aprendizaje es inverosímil en vista de defectos en el diseño experimental. Específicamente, El diseño experimental no controló el cambio en la tarea desde la detección de señales olfativas durante la fase de entrenamiento a una tarea diferente durante la fase de prueba del experimento. Por lo tanto, no hay evidencia de que MB haya mejorado la memoria en animales que de otra manera no han sido afectados. Los autores también demostraron que la actividad de la citocromo oxidasa c aumentó en tejidos cerebrales obtenidos las 24 h, pero no 1 h o 2 h, después de una dosis única de 1 mg/kg, y que MB introducido *in vitro* en una preparación de citocromo c y tejido cerebral aumentó la oxidación del citocromo c. Sin embargo, como se discutió en el Ejemplo 3, los niveles cerebrales de MB son máximos a 1 - 4 h después de la administración, y por lo tanto es poco probable argumentar que MB produce efectos específicos de la citocromo oxidasa de MB a las 24 h pero no a 1 h o 2 h. De estos hallazgos los autores sacan la conclusión de que "el mecanismo de acción de MB en la retención de memoria puede estar relacionado con la mejora de la oxidación del citocromo c".

- 65 Riha et al. ("Memory facilitation by methylene blue: Dose-dependent effect on behaviour and brain oxygen consumption". *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 511:151-158) informan que las ratas tratadas con 1 - 4 mg/kg de MB no fueron diferentes de las ratas tratadas con solución salina en locomoción o comportamiento alimentario, pero que la dosis de 4 mg/kg mejoró la habituación conductual y el reconocimiento de la memoria del objeto. Sin embargo, una

revisión objetiva de la divulgación técnica no proporciona apoyo para la afirmación de que existe un efecto específico en la habituación conductual a diferencia de los efectos no específicos en la locomoción. Además, los resultados no demuestran que MB mejore la detección de un objeto familiar en relación con el tratamiento con solución salina medida por la reducción de la exploración en la vecindad del objeto familiar. Por lo tanto, no hay evidencia de
 5 facilitación de la memoria en ratas que de otra manera no serían dañadas. También informaron que bajas concentraciones de MB aumentaron el consumo de oxígeno en el cerebro *in vitro* y 24 h después de administración *in vivo*, pero no en 1 h o 2 h después de la administración. A partir de esto, concluyeron que "las dosis de azul de metileno que aumentan el consumo de oxígeno en el cerebro también facilitan la retención de memoria." De esto sacan la siguiente inferencia: "Basado en nuestros hallazgos, es posible que el azul de metileno también pueda ser
 10 útil como potenciador de la memoria en humanos con metabolismo oxidativo cerebral reducido, tales como individuos con Alzheimer y demencia vascular."

Wrubel et al. (2007) ("Methylene blue facilitates the extinction of fear in an animal model of susceptibility of learned helplessness." *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007, 87:209-217) examinan el efecto sobre el azul de metileno en la extinción condicionada del miedo en ratas hembras congénitamente indefensas. Los autores encontraron que el azul de metileno no mejoraba la retención de la memoria de la extinción si se administraba durante la adquisición de extinción. Esto es, MB no tuvo un efecto en el aprendizaje de extinción. No obstante, los autores informaron que MB mejoró el olvido de estímulos previamente traumáticos. Sacaron la inferencia de que "el azul de metileno puede facilitar la extinción del miedo como un complemento de la terapia de exposición." Esto es, los autores nuevamente abogan por el uso de MTC para lograr un efecto **amnésico** en determinadas circunstancias específicas.
 15
 20

Callaway et al. (2002), Riha et al. (2005) y Callaway et al. (2004) usan aproximadamente la misma forma de palabras para articular el siguiente mecanismo general: "Si bien los tratamientos farmacológicos tradicionales para mejorar la memoria se centran en transmisores sinápticos específicos, los potenciadores metabólicos como el azul de metileno pueden mejorar la producción global de energía cerebral y la retención de memoria al dirigirse al metabolismo oxidativo mitocondrial, sin producir efectos secundarios asociados a la modificación de un sistema de neurotransmisores en particular" (Callaway et al., 2002). Así las condiciones clínicas para las cuales sugieren el uso de azul de metileno son: "trastornos neurodegenerativos asociados a disfunción mitocondrial", enumerados más específicamente como enfermedad de Leigh y enfermedad de Alzheimer (Callaway et al., 2002), o "humanos con metabolismo oxidativo cerebral reducido, tales como individuos con Alzheimer y demencia vascular" (Riha et al., 2005).
 25
 30

Ninguno de los estudios enumerados ha sacado la inferencia, ni han proporcionado motivos para hacer la inferencia, de que MTC podría ser utilizado sintomáticamente en el tratamiento de MCI.
 35

Sin embargo en los Ejemplos a continuación, el uso de una diaminofenotiazina (ejemplificado por MTC) se ha demostrado en modelos de deterioro cognitivo discreto, incluyendo ratones de tipo silvestre envejecidos, en que no hay patología tau, trastornos neurodegenerativos, demencia vascular, enfermedad de consumo deficiente de oxígeno, o existiría defecto mitocondrial, y por lo tanto es totalmente inesperado en vista de sus efectos conocidos de la técnica anterior en estos contextos. Específicamente, se ha demostrado que las diaminofenotiazinas (ejemplificadas por MTC) mejoran la memoria en situaciones donde no hay expectativa de disfunción mitocondrial, reducción del metabolismo oxidativo cerebral o deterioro vascular.
 40

Presente invención

Este descubrimiento inesperado por lo tanto tiene implicaciones para proporcionar alivio sintomático de MCI, para lo cual (como se mencionó anteriormente) existe una necesidad significativa de tratamientos nuevos.
 45

Así en diversos aspectos la invención proporciona:

50 i) El uso de un compuesto DAPTZ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de MCI en un paciente que lo sufre, tal como se define en las reivindicaciones. Dicho medicamento así preparado o fabricado incluirá el compuesto DAPTZ como el principio activo o uno de ellos.

55 ii) Un compuesto DAPTZ para uso en el tratamiento de MCI en un paciente, cuyo método comprende administrar una cantidad eficaz de compuesto DAPTZ, tal como se define en las reivindicaciones.

En el presente documento también se desvela un compuesto para uso en un método de tratamiento de MCI en un paciente, cuyo método comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto DAPTZ. Los compuestos de DAPTZ preferentes se discuten con más detalle a continuación.
 60

La administración de la cantidad eficaz será tal que beneficie al paciente por ejemplo la mejora de los síntomas amnésicos.

65 Las diaminofenotiazinas se pueden administrar solas, o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial.

De forma interesante, ya que la acción de MTC en los siguientes Ejemplos fue específica para las mejoras dentro de la sesión y también hubo una tendencia hacia las mejoras de memoria entre sesiones, se cree que la reversión del deterioro de la memoria por los compuestos DAPTZ no es a través de una acción sobre el sistema colinérgico. Por lo tanto el tratamiento puede ser tal que proporcione un beneficio a través de un mecanismo no colinérgico. Análogamente, el tratamiento puede ser tal que proporcione beneficio a través de un mecanismo de inhibición de agregación no tau.

De forma interesante, MTC no solo mostró un mejor índice terapéutico que la rivastigmina cuando los fármacos se administraron individualmente, sino que la coadministración de dosis subeficaces tanto de rivastigmina como de MTC actuó de forma sinérgica para revertir los déficits de aprendizaje y las deficiencias de la memoria inducidas por escopolamina. Así, cuando se combina con la terapia ChEI, el efecto de MTC parece amplificarse lo que apoya el hecho de que esta terapia de combinación podría mejorar no solo los síntomas sino también contribuir de manera beneficiosa al metabolismo neuronal lo que permite el uso de dosis más bajas de medicamentos que podrían minimizar el riesgo de efectos secundarios.

El uso de compuestos DAPTZ tales como MTC en combinación con medicamentos colinérgicos (p. ej., aquellos que mejoran o imitan la acción de la acetilcolina) para el tratamiento sintomático de MCI es una realización de la presente invención.

Así en una realización, el tratamiento puede ser opcionalmente en combinación con uno o más agentes, por ejemplo, uno o más inhibidores de la colinesterasa (como donepezil (también conocido como Aricept™), rivastigmina (también conocida como Exelon™), galantamina (también conocida como Reminyl™), antagonistas del receptor de NMDA (como memantina (también conocida como Ebixa™, Namenda™), agonistas de receptores muscarínicos y/o inhibidores del procesamiento de proteínas precursoras de amiloide que conducen a una generación mejorada de beta-amiloide.

Evaluación y Diagnóstico de MCI

Si bien todavía existe una discusión en la bibliografía sobre la naturaleza del concepto de MCI (ver Gauthier S. et al., Mild Cognitive Impairment, Lancet, 2006; 367: 1262-1270; Petersen RC et al. Neuropathological features of amnesic mild cognitive impairment. Arch Neurol 2006; 63: 665-672) MCI está reconocido como un objetivo de enfermedad válido por la FDA. Se define por tener un grado menor de deterioro cognitivo que aún no cumple los criterios clínicos para un diagnóstico de demencia.

Los criterios representativos para MCI sindrómico incluyen las siguientes características:

A. El paciente no es ni normal ni demente.

B. Hay evidencia de deterioro cognitivo que se muestra por el declive medido objetivamente a lo largo del tiempo y/o el informe subjetivo de declive por parte de uno mismo y/o informante junto con pruebas cognitivas objetivas (p. ej., ensayos secundarios si hay memoria).

C. Se conservan actividades de la vida diaria y las funciones instrumentales complejas están intactas o tienen un impedimento mínimo.

(Ver también Winblad, B. et al. (2004) Mild cognitive impairment - beyond controversies, towards a consensus: Informe del Grupo de Trabajo Internacional sobre Deterioro Cognitivo Leve. J. Intern. Med. 256:240-246).

Como se ha usado anteriormente, el término "demencia" se refiere a una afección psiquiátrica en su sentido más amplio, como se define en la American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, cuarta edición, Washington, D.C., 1994 ("DSM-IV"). El DSM-IV define la "demencia" como caracterizada por múltiples déficits cognitivos que incluyen deficiencias de memoria y enumera diversas demencias según la presunta etiología. El DSM-IV establece un estándar generalmente aceptado para dicho diagnóstico, categorización y tratamiento de demencia y trastornos psiquiátricos asociados.

El MCI puede ser "amnésico".

Por una definición preferente, los individuos con MCI amnésico tienen medidas cognitivas generales dentro de 0,5 desviaciones estándar de los sujetos de control y también tienen un rendimiento de memoria de 1,5 desviaciones estándar debajo de los sujetos de control. Un objetivo, la disminución documentada de la memoria es útil para determinar que individuos tienen MCI.

"MCI-no amnésico" o "MCI-otro" se pueden definir como déficits en dos o más áreas de cognición superiores a 1,5 desviaciones estándar por debajo de la media, corregido por edad y educación.

Grupos de pacientes preferentes

El paciente será generalmente uno diagnosticado con MCI, pero será uno no diagnosticado con AD (es decir, no mostrará demencia). El paciente se beneficiará del alivio sintomático descrito anteriormente.

5 El paciente puede, por ejemplo, ser mayor de 45, 50, 55 años.

El paciente puede ser uno que cumpla con uno o todos los siguientes criterios con respecto a: (i) etapa Braak; (ii) puntuación MMSE.

10 (i) *etapa Braak*

En el esquema de etapa Braak, la progresión de la enfermedad se divide en 7 etapas (etapa 0 de Braak (en el presente documento designada como "BST 0" o "B0") a la etapa 6 de Braak ("BST 6" o "B6")). El sistema se basa en la progresión neuroanatómica característica de la patología neurofibrilar de AD (Braak y Braak (Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol (Berl). 1991;82(4):239-59).

Los métodos para evaluar la degeneración neurofibrilar se desvelan en el documento WO02/075318.

20 En una realización el grupo de pacientes con MCI que se desea tratar mediante los métodos de la presente invención está en BST 3 o menos, BST 2 o menos, más preferentemente 1 o menos, más preferentemente 0. El grupo de pacientes preferentes tendrá una probabilidad relativamente baja de demencia clínica y una probabilidad relativamente baja de representar etapas tempranas de AD, pero sin embargo todavía sufren MCI.

25 (ii) *Puntuación MMSE*

Los pacientes pueden demostrar un deterioro cognitivo estable o en disminución característico de MCI (junto con las características clínicas relevantes adicionales) en un momento determinado.

30 El Mini-Examen de Estado Mental (MMSE) es un ensayo estandarizado que se propuso como un método simple y de administración rápida para calificar la función cognitiva (Folstein MF, Folstein SE y McHugh PR. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. Journal of Psychiatric Research 1975 12 189-198.). El MMSE es el instrumento de detección cognitiva más usado para la detección de disfunción cognitiva debida a la demencia en pacientes geriátricos y psiquiátricos (Tombaugh TN y McIntyre NJ. The mini-mental state examination: a comprehensive review. Journal of the American Geriatric Society 1992 40 922-935). El MMSE evalúa la orientación, memoria, atención y funciones de lenguaje.

35 Los pacientes para los cuales la presente invención se puede usar preferentemente pueden ser aquellos con menos de o igual a MMSE 24, 25, 26, 27, 28 o 29, más preferentemente menor o igual a MMSE 24, 25, 26, lo más preferentemente menor o igual a MMSE 24 o 25.

Beneficio y tratamiento

45 Por "tratamiento de" o "con beneficio para" el paciente se entiende la mejora de una afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como moderación; remisión; disminución de síntomas; desaceleración de la tasa de degeneración o disminución.

50 El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen neuropsiquiátrico, y/o una evaluación psiquiátrica, p. ej., la mejora del rendimiento de las pruebas de tareas de memoria que demuestren un alivio de la pérdida o deterioro leve de la memoria y/o el alivio de otro déficit cognitivo leve.

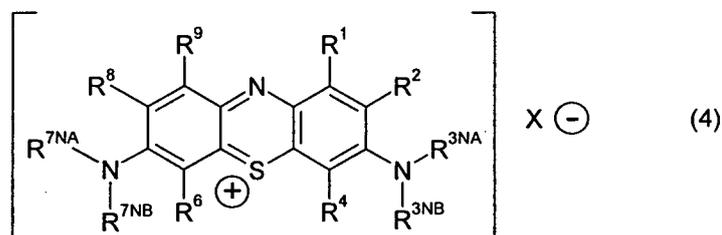
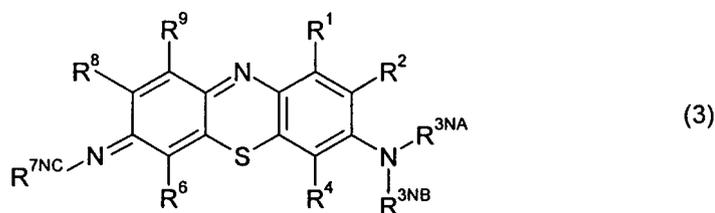
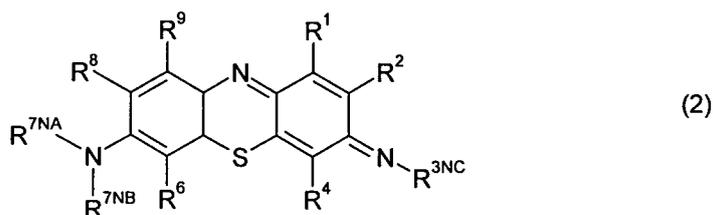
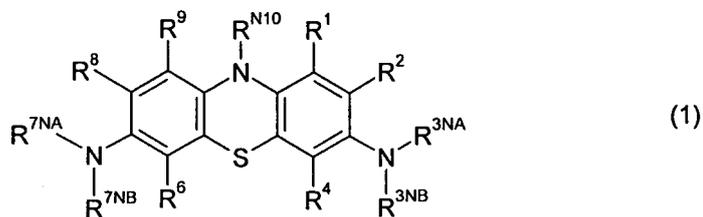
Productos y kits

55 En el presente documento se desvela un producto farmacológico para el tratamiento de MCI en un paciente que lo padece, que comprende un envase etiquetado o acompañado por una etiqueta que indica que el medicamento es para el tratamiento de MCI, el recipiente conteniendo una o más unidades de dosificación cada una de las cuales comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y, como principio activo, un compuesto DAPTZ puro aislado seleccionado entre los descritos en el presente documento.

60 Además en el presente documento se desvela un kit para tratar MCI en un ser humano que incluye un compuesto DAPTZ y material de instrucciones que enseña las indicaciones, dosificación y horario de administración del MTC para el tratamiento de MCI.

65 *Compuestos de diaminofenotiazina (DAPTZ)*

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



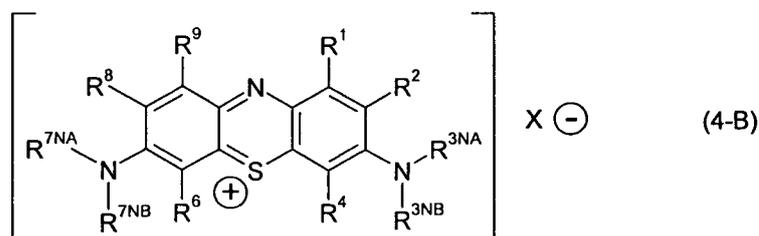
La fórmula (1) representa compuestos en una forma reducida, mientras que cada una de las Fórmulas (2), (3), y (4) representa compuestos en una forma oxidada.

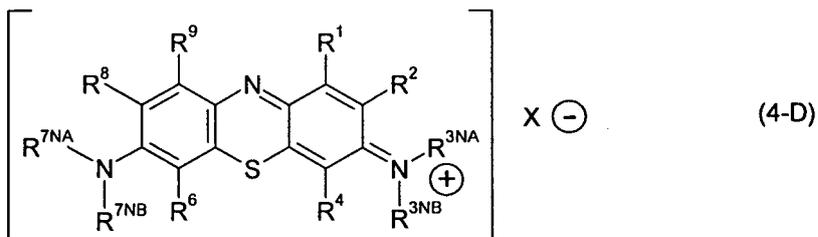
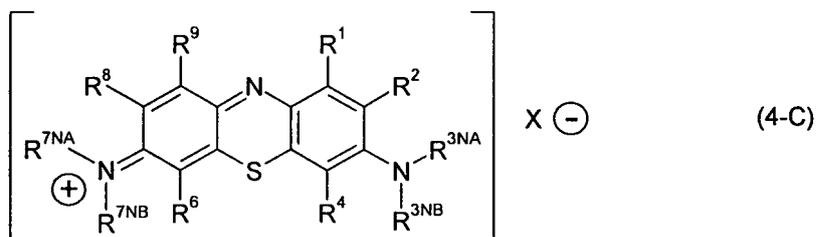
En una realización, los compuestos se seleccionan entre compuestos de fórmula (1), y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos.

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

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

Cada una de las estructuras anteriores es solo una de las muchas estructuras de resonancia equivalentes, y todas están destinadas a esta incluidas en esa estructura representativa. Por ejemplo, la estructura (4) es solo una de las muchas estructuras de resonancia equivalentes, algunas de los cuales se muestran a continuación, y todas los cuales están destinadas a ser incluidas en la estructura (4):





5 *Sustituyentes del átomo de anillo de carbono*

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

- 10
15
20
- 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 donde cada R se selecciona independientemente entre:

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

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

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

- 40
45
- H;
 - F; -Cl; -Br; -I;
 - OH; -OR;
 - C(=O)OH; -C(=O)OR;
 - R.

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

- 50
- H;
 - R.

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

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

- 5 En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de:
alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.
- 10 En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de: -Me, -Et, -nPr, e -iPr.
En una realización, cada R se ha seleccionado independientemente de: -Me y -Et.
En una realización, el grupo alquilo C₁₋₆ es un grupo alquilo C₁₋₄.
- 15 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.
- 20 Ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido incluyen: metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, *terc*-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, etc.
Ejemplos de grupos alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido incluyen: propen-1-ilo, propen-2-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, etc.
- 25 Ejemplos de grupos cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido incluyen: ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.
En una realización, el grupo carboarilo C₆₋₁₀ es un grupo carboarilo C₆.
- 30 En una realización, el grupo heteroarilo C₅₋₁₀ es un grupo heteroarilo C₅₋₆.
En una realización, el grupo carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ es un grupo carboaril C₆-alquilo C₁₋₂.
- 35 Ejemplos de grupos de carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido incluyen: fenilo, naftilo.
Ejemplos de grupos heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido incluyen: pirrolilo, tienilo, furilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo.
- 40 Ejemplos de grupos carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ no sustituido incluyen: bencilo, feniletilo.
En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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:
- 45 -F; -Cl; -Br; -I;
-OH; -OR';
-SH; -SR';
-NO₂;
-C(=O)R';
-C(=O)OH; -C(=O)OR';
- 50 -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 en donde cada R' se selecciona independientemente entre:
- 60 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido; en donde, en cada grupo -NR'^{N1}R'^{N2}, independientemente, R'^{N1} y R'^{N2} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- 65 En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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;
5 -C(=O)OH; -C(=O)OR';
-R'.

En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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 definen anteriormente, excepto que cada R' se selecciona independientemente entre:

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

En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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 definen anteriormente, excepto que cada R' se selecciona independientemente entre:

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

En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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 definen anteriormente, excepto que cada R' se selecciona independientemente entre:

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

En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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 definen anteriormente, excepto que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

En una realización, sustituyentes opcionales (p. ej., 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 definen anteriormente, excepto que cada R' se selecciona independientemente entre: -Me y -Et.

En una realización, cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸, y R⁹ se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr, e -iPr.

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.

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

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

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

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

55 Grupos amino

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

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

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

- H;
alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
- 5 cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;
- 10 o R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- Por ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:
- 15 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
20 carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido; carboarilo C₆₋₁₀ sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido; heteroarilo C₅₋₁₀ sustituido;
carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ no sustituido; carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ sustituido;
- o r^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- 25 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:
- H;
- 30 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
- o R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- 35 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:
- 40 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido; alqueno C₂₋₆ alifático sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido; cicloalquilo C₃₋₆ sustituido;
- o R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- 45 En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:
- 50 -H;
alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;
- 55 o R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.
- En otro ejemplo, en una realización, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente, cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:
- 60 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C₂₋₆ alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;
- 65 o R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo.

ES 2 739 546 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

independientemente entre:

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

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

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

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

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

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

En analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, en cada grupo =NR^{7NC}, si está presente, R^{7NC} es independientemente como se define anteriormente para R^{3NC}.

Sustituyente del átomo de anillo de nitrógeno

Asimismo, en analogía precisa, en cada una de las fórmulas anteriores, R^{N10}, si está presente, es independientemente como se define anteriormente para R^{3NC} (o R^{7NC}).

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

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

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

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

Contraión

X⁻, si está presente, Es uno o más contraiones aniónicos para conseguir la neutralidad eléctrica.

Los ejemplos de contraiones aniónicos adecuados se discuten a continuación bajo el título "Sales".

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

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

En una realización, X⁻ es independientemente Cl⁻.

En una realización, X⁻ es independientemente NO₃⁻.

Combinaciones

Todas las combinaciones plausibles de las realizaciones descritas anteriormente se desvelan en el presente documento como si cada combinación fuera recitada individual y explícitamente.

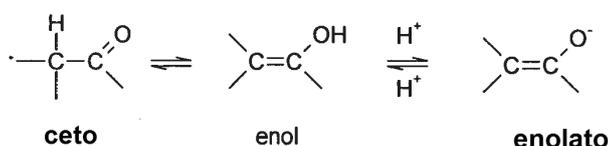
Isómeros

Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas especiales, propiedades ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β; formas axiales y ecuatoriales; formas barco, silla, torsión, sobre, y media silla; y

combinaciones de los mismos, en lo sucesivo denominados colectivamente "isómeros" (o "formas isoméricas").

Cabe destacar que, excepto como se analiza a continuación para formas tautómeras, excluido específicamente del término "isómeros" como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Del mismo modo, una referencia a ortoclorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir formas estructuralmente isoméricas que caigan dentro de esa clase (p. ej., 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 se refiere a formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hidroxiazo, y nitro/aci-nitro.



Tenga en cuenta 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, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

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

30 Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Se tratan ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge *et al.*, 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 (p. ej., $-\text{COOH}$ puede ser $-\text{COO}^-$), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, iones de metal alcalino, tales como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes como Al_3^+ . Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ion de amonio (es decir, NH_4^+) e iones de amonio sustituido (p. ej., NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son aquellos derivados 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 (p. ej., $-\text{NH}_2$ puede ser $-\text{NH}_3^+$), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los ácidos inorgánicos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los ácidos orgánicos siguientes: 2-acetioxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalencarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos a partir de los ácidos poliméricos siguientes: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

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 cinc y cloruro de metil-tioninio (MTZ) es una sal mixta de cloruro de metiltioninio (MTC), una sal de cloruro y otra sal, cloruro de cinc. Se pretende que tales sales mixtas estén abarcadas por el término "y sus sales farmacéuticamente aceptables".

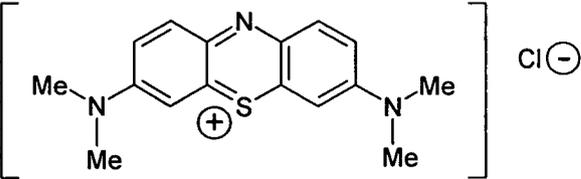
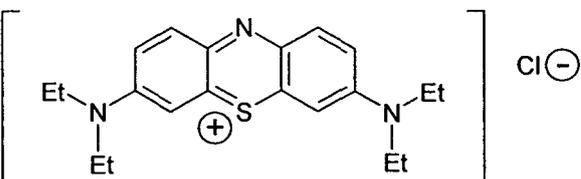
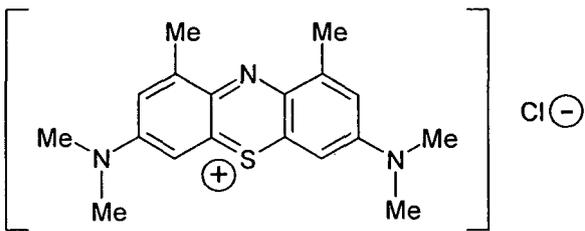
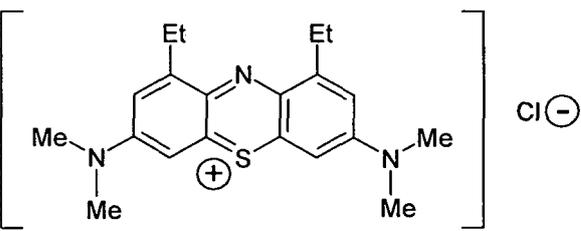
- 5 A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas del mismo.

Hidratos y solvatos

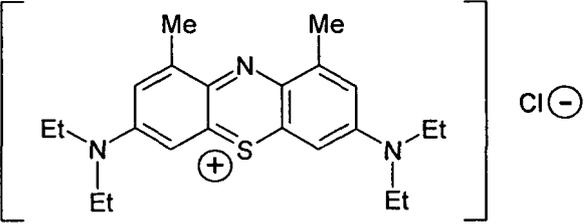
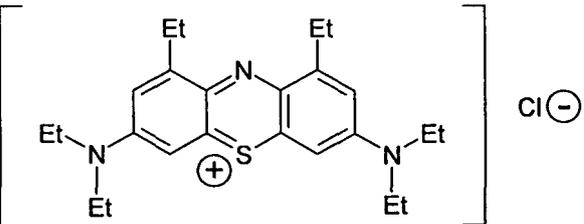
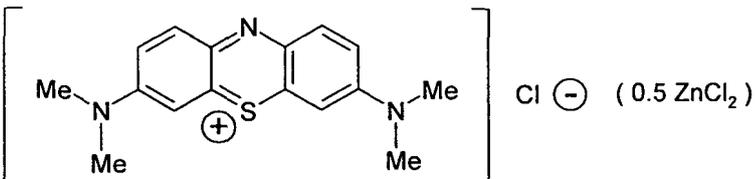
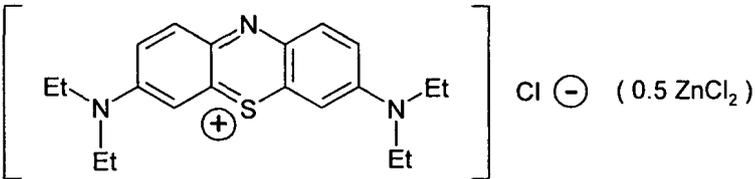
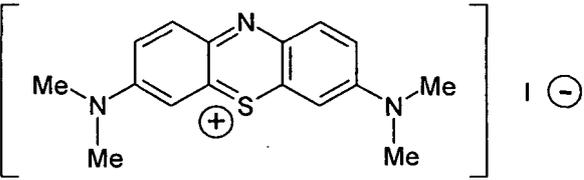
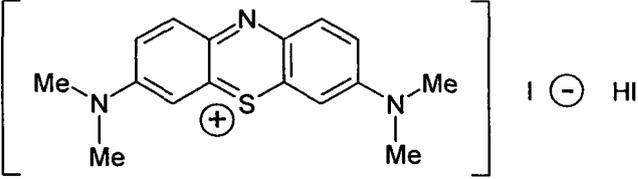
- 10 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (p. ej., compuesto, sal del compuesto) y solvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede definir oportunamente como un hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.
- 15 A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular también incluye formas de solvato del mismo.

Algunos ejemplos preferentes

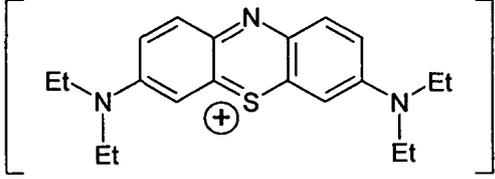
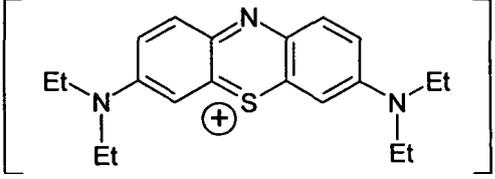
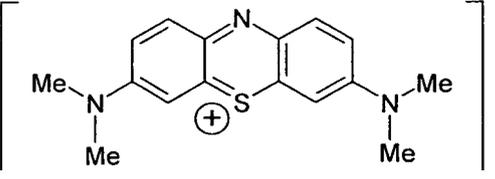
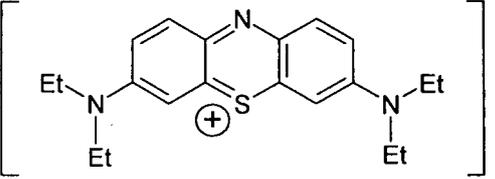
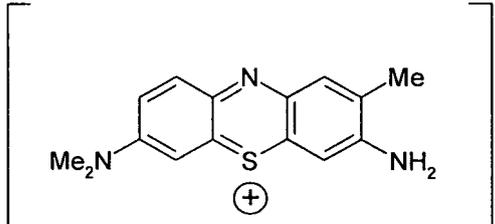
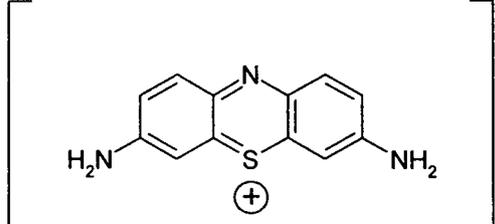
- 20 Algunas diaminofenotiazinas preferentes incluyen las siguientes, y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de los mismos:

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 style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dietil-metil-tioninio</p>

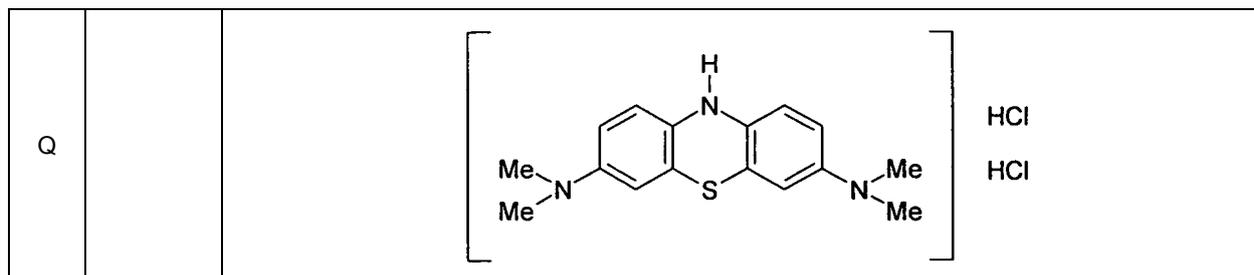
(continuación)

E	DMETC	 <p>cloruro de 1,9-dimetil-etil-tioninio</p>
F	DEETC	 <p>cloruro de 1,9-di-etil-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	 <p>sal mixta de yoduro de hidrógeno y yoduro de metil-tioninio</p>

(continuación)

K	ETI	 <p style="text-align: center;">yoduro de etil-tioninio</p>
L	ETI.HI	 <p style="text-align: center;">sal mixta de yoduro de hidrógeno y yoduro de etil-tioninio</p>
M	MTN	 <p style="text-align: center;">nitrato de metil-tioninio</p>
N	ETN	 <p style="text-align: center;">nitrato de etil-tioninio</p>
O		 <p style="text-align: center;">cloruro de tonio</p>
P		 <p style="text-align: center;">Tionina</p>

(continuación)



En una realización, La diaminofenotiazina se selecciona entre: MTC, ETC, DEMTC, DEETC, Tionina, y cloruro de tolonio (también conocido como azul de toluidina O), y el Ejemplo de compuesto 'Q anterior. El compuesto Q se puede preparar como se describe en las solicitudes en tramitación basadas en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 60/786.690, presentada el 29 de marzo de 2006, titulada "3,7-Diamino-10H-Phenothiazine Salts and Their Use" (Wischik et al., Publicado como WO2007-110627).

Unidades de dosificación, y formulación y administración de compuestos

10 La administración de compuestos, composiciones o medicamentos como se describen en el presente documento están preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", esto siendo suficiente para mostrar beneficio para el individuo como se discutió anteriormente.

15 Para medicamentos, la cantidad real administrada y la velocidad y el tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y severidad del MCI que se está tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno ha tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos.

20 Ejemplos de fenotiazinas de la presente invención son conocidos en la técnica y pueden fabricarse mediante los procesos a los que se hace referencia en textos convencionales (p. ej., 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 tengan las propiedades definidas en los ensayos provistos, podrían usarse como medicamentos después de pruebas adicionales de toxicidad (p. ej., en forma de preparaciones farmacéuticas).

30 Se ha descrito el uso farmacéutico previo del azul de metileno en una amplia gama de indicaciones médicas, incluyendo el tratamiento de la metahemoglobinemia y la profilaxis de la psicosis maniaca depresiva (Naylor (1986) Biol. Psychiatry 21,915-920), y se ha descrito la penetración en SNC después de la administración sistémica (Muller (1992) Acta Anat., 144, 39-44). La producción de Azure A y B se produce como productos de degradación metabólica normal del azul de metileno (Di Santo y Wagner (1972a) J. Pharm. Sci. 61, 598-602; Di Santo y Wagner (1972 b) J. Pharm. Sci. 61 1086-1094). La administración de productos farmacéuticos puede efectuarse por vía parenteral tal como por vía oral, en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones), nasalmente (p. ej., en forma de aerosoles nasales) o rectalmente (p. ej., en forma de supositorios). Sin embargo, La administración también puede efectuarse por vía parenteral, tal como por vía intramuscular o intravenosa (p. ej., en forma de soluciones inyectables).

40 Las composiciones pueden incluir, además de los constituyentes anteriores, excipientes farmacéuticamente aceptables, agentes conservantes, solubilizantes, sustancias que aumentan la viscosidad, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, o agentes de recubrimiento. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración. Se pueden encontrar ejemplos de técnicas y protocolos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, Osol, A. (ed.), 1980.

45 Cuando la composición se formula en una composición farmacéutica, su administración puede efectuarse por vía parenteral tal como por vía oral, en forma de polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas acuosas, nasalmente (p. ej., en forma de aerosoles nasales) o rectalmente (p. ej., en forma de supositorios). Sin embargo, La administración también puede efectuarse por vía parenteral tal como por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía cutánea, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal (p. ej., en forma de soluciones para inyección).

50 Así, por ejemplo, donde la composición farmacéutica está en forma de comprimido, puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Para la fabricación de comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas

de gelatina dura, los compuestos activos y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden procesarse con productos farmacéuticamente inertes, excipientes inorgánicos u orgánicos. lactosa, maíz, almidón o sus derivados, talco, puede utilizarse ácido esteárico o sus sales, etc., por ejemplo, como tales excipientes para comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Los excipientes adecuados para las 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, generalmente incluirá un portador líquido como el agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, también se puede incluir propilenglicol o polietilenglicol. Otros excipientes adecuados para la fabricación de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, trehalosa, etc. Los excipientes adecuados para soluciones de inyección son, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, etc. Por vía intravenosa, inyección cutánea o subcutánea, o infusión intracatéter en el cerebro, el principio activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH adecuado, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, se pueden incluir tampones y/u otros aditivos, según sea necesario.

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

Por lo tanto, en los aspectos de la invención en donde se usa una diaminofenotiazina (por ejemplo, MTC) en un método de tratamiento o terapia del cuerpo humano o animal, ese método preferentemente implicará la administración oral de la cantidad efectiva de diaminofenotiazina.

Preferentemente, el medicamento está adaptado para administración oral, y preferentemente está en forma de unidad de dosificación sólida.

Preferentemente la dosis se administrará por vía oral. Preferentemente, será menor o igual a 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, el tratamiento se continúa durante al menos 2, 3 o 4 semanas.

Las instrucciones con respecto a estas dosis se pueden incluir en forma escrita en o dentro del envase de un producto farmacéutico de la invención.

Cuando la administración es por vía intravenosa, se prefiere que la diaminofenotiazina no sea MTC.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1: Efecto de los fármacos en la tarea de memoria de referencia espacial. La ordenada representa la longitud del camino diaria (valores medios de 6 ensayos \pm SE) para todos los grupos de fármacos.

Figura 2: Efecto de los fármacos en la tigmotaxis, expresado como fracción del tiempo pasado en el área externa del 10 % de la piscina; valores medios diarios \pm SE.

Figura 3: Efecto de los fármacos en la velocidad de nado de los animales en el laberinto de agua. Valores medios \pm SE.

Figura 4: Diagrama de supervivencia del estado de nado de los animales en la fase de aprendizaje de la tarea del laberinto de agua.

El eje vertical muestra la probabilidad de seguir siendo un nadador (es decir, no haber encontrado la plataforma) frente a la longitud del camino (es decir, la distancia nadada) para diferentes grupos de tratamiento.

Figura 5: Después de que los efectos del tratamiento se hayan normalizado utilizando los parámetros determinados a partir del análisis de riesgo proporcional de Cox, la distribución residual muestra que la longitud del camino está muy cerca de una función exponencial subyacente predicha.

Figura 6: En la gráfica, se representa una medida que representa la longitud del camino para cada grupo de tratamiento durante días, con las diferencias generales de tratamiento (promedio a lo largo de los días)

mostradas sobre el encabezado "MEDIA". Se dan los valores de p correspondientes a las diferencias entre ciertos grupos de tratamiento.

5 **Figura 7:** Se traza una medida que representa la latencia para cada grupo de tratamiento durante días, con las diferencias generales de tratamiento (promedio a lo largo de los días) mostradas sobre el encabezado "MEDIA". Se dan los valores de p correspondientes a las diferencias entre ciertos grupos de tratamiento.

10 **Figura 8:** Fracción del tiempo pasado en el cuadrante objetivo después de la eliminación de la plataforma. Los días 4 y 5 representan el rendimiento 1,5 horas y 24 horas después de completar la fase de aprendizaje, respectivamente. Los valores de p para la significación estadística de la diferencia entre los grupos de tratamiento y el nivel de probabilidad del 25 % se muestran tanto en el día como en general en un promedio de días ("MEDIA").

15 **Figura 9:** "Localización" calculada, un parámetro compuesto basado en: número de visitas a la ubicación de la plataforma anterior; el número de visitas al área circundante definida como un área que dobla el diámetro de la plataforma; tiempo en esta zona circundante; y el tiempo en el cuadrante objetivo. El día 4 representa el rendimiento 1,5 horas después de completar la fase de aprendizaje. El día 5 representa 24 horas después de la finalización de la fase de aprendizaje. Se muestran los valores de p para la significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento tanto diurnos como generales en un promedio de días ("MEDIA").

20 **Figura 10:** "Latencia" calculada, un parámetro compuesto basado en el tiempo necesario para alcanzar el área de la plataforma y el tiempo necesario para alcanzar un área definida como el doble del diámetro de la plataforma. El día 4 representa el rendimiento 1,5 horas después de completar la fase de aprendizaje. El día 5 representa 24 horas después de la finalización de la fase de aprendizaje. Se muestran los valores de p para la significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento tanto diurnos como generales en un promedio de días ("MEDIA").

25 **Figura 11:** Fracción del tiempo transcurrido en la zona de tigmotaxis (definida como el 10 % exterior del área de la piscina) en el Día 4 (1,5 horas después de completar la fase de aprendizaje) y en el Día 5 (24 horas después de completar la fase de aprendizaje), se muestran los valores de p para la significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento, tanto diurnos como generales en un promedio de días ("MEDIA"). Un animal que muestra menos comportamiento tigmotáxico está menos ansioso.

30 **Figura 12:** Cambios generales en la longitud del camino (cm), latencia (segundos), velocidad (cm/s) y tigmotaxis (fracción del tiempo empleado en la zona) con la edad (meses). Los datos se han promediado durante los 4 días de la fase de aprendizaje del experimento, ignorando los efectos de techo en trayectoria para aquellos ratones que no logran alcanzar la plataforma. Se dan barras de error estándar.

35 **Figura 13:** Variación en los promedios diarios de la longitud del camino (cm), latencia (segundos), velocidad (cm/s) y tigmotaxis (fracción de tiempo en la zona) con la edad (meses). Se ignoran los efectos de techo en longitud del camino para aquellos ratones que no logran alcanzar la plataforma. Se dan barras de error estándar.

40 **Figura 14:** Diagrama de supervivencia para el estado de nado de los animales en la fase de aprendizaje de la tarea del laberinto de agua. El eje vertical muestra la probabilidad de seguir siendo un nadador (es decir, no haber encontrado la plataforma) frente a la longitud del camino (es decir, la distancia nadada) para diferentes grupos de tratamiento.

45 **Figura 15:** Después de que los efectos del tratamiento se hayan normalizado utilizando los parámetros determinados a partir del análisis de riesgo proporcional de Cox, la distribución residual muestra que la longitud del camino está muy cerca de una función exponencial subyacente predicha.

50 **Figura 16:** En la gráfica, se representa una medida que representa la longitud del camino para cada grupo de tratamiento sobre la edad, por cada día y por un promedio de días. Se dan los valores de p correspondientes a las diferencias entre los grupos de tratamiento.

55 **Figura 17:** En la gráfica, se representa una medida que representa la latencia para cada grupo de tratamiento sobre la edad, por cada día y por un promedio de días. Se dan los valores de p correspondientes a las diferencias entre los grupos de tratamiento.

60 **Figura 18:** Fracción del tiempo pasado en el cuadrante objetivo después de la eliminación de la plataforma. Los días 4 y 5 se muestran para cada grupo de edad (2,5, 6 y 13 meses) y representan el rendimiento 1,5 horas y 24 horas después de completar la fase de aprendizaje, respectivamente. Se muestran los valores de p para la significación estadística de la diferencia entre los grupos de tratamiento y el nivel de probabilidad del 25 %.

65 **Figura 19:** Rutas de natación representativas de un ratón en diferentes grupos de edad y tratamiento (T identifica el cuadrante objetivo).

Figura 20: "Localización" calculada, un parámetro compuesto basado en: número de visitas a la ubicación de la plataforma anterior; el número de visitas al área circundante definida como un área que dobla el diámetro de la plataforma; tiempo en esta zona circundante; y el tiempo en el cuadrante objetivo. Se muestran dos puntos de tiempo de evaluación (1,5 horas y 24 horas después de completar la fase de aprendizaje) para cada grupo de edad (2,5, 6 y 13 meses). Los valores de p dados son para la significación estadística de las diferencias diarias.

Figura 21: Coadministración de dosis sub-eficaces de fármacos en comparación con los controles: las figuras muestran la comparación de los cuatro grupos en la medida de la longitud del camino (A y B); reducción en la longitud del recorrido (C); velocidad de nado (D) tigmotaxis (E) y memoria espacial (F).

Ejemplos

Ejemplo 1 - efecto de MTC y escopolamina en la cognición

1) Objetivo y antecedentes del estudio

El objetivo era investigar si el MTC puede revertir los déficits cognitivos inducidos por las inyecciones agudas del antagonista muscarínico escopolamina. Las deficiencias de memoria inducidas por la escopolamina son ampliamente utilizadas para imitar la amnesia, como las que se pueden encontrar en MCI o demencia.

Deterioro de la memoria inducido por la escopolamina

El bloqueo farmacológico de los receptores muscarínicos centrales produce una respuesta amnésica a corto plazo en una amplia variedad de modelos animales que realizan varias tareas que desafían el aprendizaje y el recuerdo (Flood, T. y A. Cherkin, Scopolamine effects on memory retention on mice: A model of dementia? Behav. Neurol. Biol. 45 (1981), pp. 169-184). La escopolamina es particularmente eficaz cuando se administra justo antes del entrenamiento de la tarea.

Laberinto de agua de Morris

Uno de los paradigmas más utilizados para evaluar la memoria de trabajo en roedores es la tarea de navegación espacial en el laberinto de agua de Morris (Morris, R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in rat. J. Neurosci. Methods 11 (1984), pp. 47-60).

Se ha demostrado que la administración de dosis bajas de escopolamina interfiere eficazmente con el desempeño de la tarea. Los efectos de la escopolamina en el rendimiento de los laberintos se pueden revertir mediante la administración de agonistas de receptores muscarínicos clásicos (de acción central), particularmente inhibidores de la acetilcolinesterasa (Shannon, HE y Peters SC) A comparison of effects of cholinergic and dopaminergic agents on scopolamine-induced hyperactivity in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255 (1990), pp. 549-553).

2) Materiales y métodos

Compuestos de ensayo

Los siguientes compuestos de ensayo se elaboraron en un vehículo que consistía en solución salina (NaCl al 0,9 %): MTC (Simpsons, Reino Unido); hidrobromuro de escopolamina, un antagonista muscarínico no específico comprado en Sigma; y tartrato de rivastigmina, se utiliza como control positivo.

La rivastigmina es un inhibidor de la acetilcolinesterasa vendido por Novartis como Exelon®. Donepezilo, galantamina, y rivastigmina son inhibidores similares que han sido aprobados en muchos países para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, a pesar de su eficacia, a corto plazo, es modesto, sintomático, y evidente solo en un subgrupo de pacientes.

Los ratones NMRI hembra de 3-4 meses de edad eran de Harlan, Reino Unido.

Los ratones se alojaron en grupo (7-9 por jaula) y se mantuvieron con luz de 7 am-7 pm y los experimentos se realizaron en la fase de luz. Había 82 ratones en total, de los cuales 12 fueron excluidos del estudio por comportamiento en circuito durante el ensayo del laberinto de agua. Fueron separados en 6 grupos para recibir las administraciones de medicamentos de la siguiente manera:

Grupo	Numero de ratones	Tratamiento 1	Tratamiento 2
1	13	solución salina	solución salina

(continuación)

Grupo	Numero de ratones	Tratamiento 1	Tratamiento 2
2	12	Escopolamina (0,5 mg/g)	MTC (1 mg/kg)
3	11	Escopolamina (0,5 mg/g)	MTC (4 mg/kg)
4	11	solución salina	MTC (4 mg/kg)
5	12	Escopolamina (0,5 mg/g)	solución salina
6	11	Escopolamina (0,5 mg/g)	Rivastigmina (0,5 mg/kg)

Los animales recibieron dos inyecciones, el primero (solución salina o escopolamina) 35 minutos antes del ensayo y el segundo (solución salina, rivastigmina o una de las dos dosis diferentes de MTC) 5 minutos después de la primera inyección de modo que la MTC siempre se inyectara 30 minutos antes del ensayo. El volumen de inyección para fármacos fue de 0,2 ml por 30 g de peso animal y se inyectaron por vía intraperitoneal. Las dosis fueron las indicadas anteriormente.

Los ensayos de comportamiento se realizaron utilizando la tarea de navegación espacial de laberinto de agua de Morris (Morris, 1984). El laberinto de agua consistía en una piscina llena de agua (1,5 m de diámetro; 20 ± 2 °C) en donde una plataforma sumergida a 1 cm por debajo de la superficie del agua era el único medio de escape. Los ratones fueron liberados de 4 sitios cardinales (Sur, West, Norte y Este) que se enfrentan al muro de la piscina de manera aleatoria y por lo tanto tuvieron que adquirir un conocimiento espacial de la ubicación exacta de la plataforma mediante procedimientos de mapeo espacial utilizando señales distales.

Cada animal recibió 6 ensayos/día y se le permitió nadar por un tiempo máximo de 60 segundos y permanecer 30 segundos en la plataforma. Si el animal no encontraba la plataforma durante el período de tiempo asignado (60 segundos) el experimentador lo guió hasta la plataforma. Se dio un intervalo entre ensayos de 10-20 minutos. Los animales fueron entrenados durante 4 días consecutivos y recibieron ensayos de prueba (natación libre durante 60 segundos sin plataforma en la piscina) aproximadamente 1,5 y 24 horas después del entrenamiento para evaluar la memoria a corto y largo plazo, respectivamente. El comportamiento de los animales se registró a través de una cámara superior y los datos se transmitieron al PC para su almacenamiento y análisis en línea (versión básica de EthoVision 3.0.8). Noldus Information Technology, Países Bajos). El software se configuró de la siguiente manera: área de piscina, 150 cm de diámetro (240 píxeles); zona de tigmotaxis, 141 cm de diámetro (el 10 % exterior del área de la piscina; 225 píxeles); plataforma, 12 cm de diámetro (19 píxeles) y área de mostrador, 24 cm de diámetro (38 píxeles).

3) Resultados

Los resultados de la fase de aprendizaje se presentan en dos análisis, convencionales y avanzados. El análisis convencional sigue la metodología estadística comúnmente practicada en el campo de la neurofarmacología conductual, haciendo uso del análisis de varianza (ANOVA) que se basa en el supuesto de que el análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados de datos distribuidos normalmente es apropiado. El análisis avanzado desarrolla un modelo basado en las propiedades inherentes de los datos y realiza las comparaciones estadísticas correspondientes. En general se llegan a conclusiones similares, pero la metodología del análisis avanzado es estadísticamente más robusta.

3.1 - Fase de aprendizaje - Analisis convencional

La longitud del recorrido de natación durante cuatro días de entrenamiento se agrupó como un promedio diario por grupo y los resultados se muestran en la Figura 1.

Los ratones tratados con escopolamina, seguido de solución salina, no aprendieron la tarea; la longitud del camino de nado no disminuyó durante los 4 días, confirmando un deterioro del aprendizaje inducido por fármacos; no hubo efecto día ($F(3,33) = 2,004$; $p = 0,1325$) para el grupo de escopolamina. Un análisis por ANOVA de dos vías, con tratamiento farmacológico y día como factores, produjo un efecto global del fármaco ($F(5,192) = 9,305$; $p < 0,0001$). Este efecto se debió principalmente al grupo [solución salina + escopolamina], ya que la omisión de este grupo en el análisis confirmó que todos los grupos presentaron excelentes curvas de aprendizaje y mostraron un fuerte efecto diurno ($F(3,159) = 36,97$; $p < 0,0001$) y ningún efecto farmacológico ($F < 1$). Esto indica que tanto MTC como rivastigmina revirtieron el déficit de aprendizaje inducido por escopolamina. Además, En contradicción con los hallazgos de Callaway et al. (2004), MTC (4 mg/kg) no tuvo ningún efecto en este paradigma de memoria de referencia espacial cuando se administró solo, es decir, a animales no afectados de otro modo.

Las dos dosis de MTC revirtieron completamente el déficit de aprendizaje inducido por la escopolamina (1 mg/kg

($F(1,66) = 13,65$; $p = 0,0013$); 4 mg/kg ($F(1,63) = 22,18$; $p = 0,0001$) en relación con el grupo [solución salina + escopolamina]. La rivastigmina también revirtió completamente el déficit de aprendizaje inducido por la escopolamina ($F(1,63) = 17,55$; $p = 0,0004$).

5 El comportamiento de abrazos de pared (tigmotaxis) de los ratones se muestra en la Figura 2. La tigmotaxis generalmente se toma como un índice de ansiedad y se define como la fracción del tiempo pasado en el 10 % externo de la piscina. Generalmente durante el primer día de entrenamiento, La tigmotaxis es alta ya que el animal es ingenuo para la tarea y tiene una tendencia natural a tratar de escapar a lo largo del borde de la piscina.

10 Un análisis ANOVA de dos vías de los datos de tigmotaxis, con tratamiento farmacológico y día como factores, reveló efectos principales del fármaco ($F(5,192) = 5,954$; $p = 0,0001$) y día ($F(3,192) = 51,70$; $p < 0,0001$). El grupo tratado con [escopolamina + solución salina], mostró la mayor actividad tigmotaxica en toda la fase de entrenamiento y esto no disminuyó con el tiempo. Por el contrario se observó una disminución de la tigmotaxis a lo largo de los días en todos los otros grupos. Por lo tanto, tanto MTC como rivastigmina revirtieron los efectos inductores de ansiedad de la escopolamina.

15 Cuando se analizó la velocidad de los ratones, un fármaco ($F(5,192) = 4,438$; $p = 0,0016$) y día ($F(3,192) = 6,261$; $p = 0,0004$) se encontró efecto (Figura 3). Esto se debió principalmente al grupo [escopolamina + rivastigmina], en donde la velocidad disminuyó en los últimos dos días de entrenamiento. Esto, sin embargo, no afectó su capacidad para aprender y realizar esta tarea espacial. Todos los demás grupos presentaron velocidades de natación similares ($F < 1,4$).

3.2 - Fase de aprendizaje - Análisis avanzado

25 Los datos del camino de todos los animales y los tratamientos se analizaron utilizando un paradigma de análisis de supervivencia, en donde la distancia de nado es la variable considerada como el parámetro de supervivencia. Esto es, se considera que los animales "sobreviven" en el estado de nadador hasta que llegan a la plataforma. Los resultados de este gráfico de supervivencia se muestran en la Figura 4. Tal como se puede observar, la probabilidad de que un animal permanezca como nadador disminuye a aproximadamente el 20 % a medida que la distancia de nado aumenta a más de 1500 cm. Es decir, los animales tienen una probabilidad cada vez mayor de encontrar la plataforma a mayor distancia nadada.

30 Los efectos del tratamiento se pueden modelar formalmente utilizando la metodología de riesgo proporcional de Cox. Una vez que los efectos del tratamiento han sido explicados por las diferentes probabilidades de supervivencia en la natación, la distribución residual es muy similar a la de una función exponencial subyacente, tal como se muestra en la Figura 5. El hecho de que la distribución subyacente de los datos de longitud de ruta sea exponencial tiene la siguiente interpretación de comportamiento. Parece que cualquier animal dado nada al azar hasta que hay un momento en que el animal reconoce una pista espacial en cuanto a dónde está la plataforma. Una vez que el animal ha reconocido esta señal, luego nada directamente por la plataforma. Las diferencias en los parámetros determinados a partir del análisis de riesgo proporcional de Cox requerido para normalizar los datos reflejan las diferencias asociadas a los diversos tratamientos que impactan en la probabilidad de que en un momento dado un animal reconozca una señal requerida para resolver el problema del laberinto de agua.

45 Reconociendo la distribución exponencial subyacente de los datos, se realizó un análisis estadístico para determinar las diferencias de tratamiento en términos de una transformada logarítmica de la longitud del camino. Estos se representan en la Figura 6, con los valores de p correspondientes a las diferencias de condición de tratamiento en cada día y en un promedio de días. Tal como se puede observar, todos los tratamientos tienen el efecto de revertir el déficit de aprendizaje inducido por la escopolamina en el día 4. En particular, rivastigmina y MTC revierten el déficit, devolviendo el rendimiento de los animales a un nivel indistinguible de los controles. Por lo tanto, MTC es al menos equivalente a rivastigmina para revertir el déficit de aprendizaje de escopolamina. Sin embargo, como se puede ver en las representaciones de la Figura 6, no hay evidencia de que MTC mejore el aprendizaje sobre los ratones tratados con solución salina. Por lo tanto, en contradicción con Callaway et al. (2004), MTC no mejora el aprendizaje en ratones por lo demás no afectados.

55 Se puede ver un patrón esencialmente idéntico en el análisis de tiempo-latencia para encontrar la plataforma, tal como se muestra en la Figura 7.

3.3 Ensayos de memoria

60 En general, el comportamiento en el ensayo de prueba el día 4 (es decir, la memoria probada a las 1,5 horas) y el día 5 (es decir, la memoria probada a las 24 horas) fue esencialmente similar para los parámetros que se describen a continuación. Por lo tanto las conclusiones se basan en los datos agrupados de los días 4 y 5, aunque las comparaciones individuales por día se muestran en todas las representaciones.

65 El parámetro primario analizado fue la proporción de tiempo que pasaba el animal en el cuadrante en donde se había ubicado la plataforma durante la fase de aprendizaje del experimento. El análisis se muestra en la Figura 8. El

- modelo utilizado para el análisis estadístico fue un modelo lineal de efectos mixtos, permitiendo el tratamiento y la interacción diurna y la variabilidad por sujeto (es decir, algunos ratones pueden desempeñarse de manera diferente en la tarea de memoria independientemente del grupo de tratamiento). Se encontró que los ratones tratados con escopolamina no se desempeñaban mejor que el azar (es decir, el tiempo empleado en el cuadrante objetivo no era significativamente diferente del 25 %). El tratamiento con rivastigmina no revirtió el déficit de escopolamina. Por el contrario, El MTC a dosis de 1 mg/kg y 4 mg/kg revirtió el defecto de memoria producido por la escopolamina y devolvió a los animales a niveles de rendimiento indistinguibles de los controles tratados con solución salina. El MTC solo no tuvo un efecto perceptible en la memoria en relación con los ratones de control tratados con solución salina.
- Se calculó un parámetro compuesto, la "localización", basándose en: el número de visitas a la zona en que se ubicó la plataforma; número de visitas a la zona circundante, definida como un área el doble del diámetro de la plataforma; tiempo en esta zona circundante; y el tiempo en el cuadrante objetivo. Estos parámetros son todos similares en principio, en el sentido de que todos reflejan la precisión espacial del comportamiento de búsqueda del animal en el área en donde se habría esperado la plataforma desde la fase de aprendizaje. En la figura 9 se muestran los resultados. El MTC a dosis de 1 mg/kg y 4 mg/kg produjo diferencias significativas con respecto a la escopolamina. Así el efecto del MTC fue revertir el déficit de escopolamina, mientras que rivastigmina no pudo revertir el déficit. MTC solo no tuvo un efecto discernible en la precisión espacial en relación con los animales de control tratados con solución salina.
- Otro parámetro medido fue la "latencia". Este es un parámetro compuesto calculado basado en la latencia al área de la plataforma y la latencia a un área definida como el doble del diámetro de la plataforma. Una latencia más corta refleja la precisión en el dominio del tiempo y mide la cantidad de tiempo que pasa el animal antes de llegar al área donde se habría esperado la plataforma desde la fase de aprendizaje del experimento. En la figura 10 se muestran los resultados. Cuando se promedia en días, existe una diferencia altamente significativa entre [escopolamina + MTC] y escopolamina sola o [escopolamina + rivastigmina]. Aunque el déficit producido por la escopolamina no alcanzó significación estadística en relación con los animales tratados con solución salina, MTC logró mejorar significativamente el déficit. La rivastigmina no tuvo ningún efecto en absoluto sobre el déficit. MTC solo no tuvo un efecto perceptible en la precisión temporal en relación con los animales control tratados con solución salina.
- La tigmotaxis también se examinó durante la fase de memoria del experimento. El tiempo pasado en la zona de tigmotaxis (definido como el 10 % exterior del área de la piscina) es una medida de ansiedad. Como puede observarse a partir de la figura 11, la escopolamina aumentó la tigmotaxis en relación con los controles tratados con solución salina (aunque esta diferencia no es significativa). Sin embargo el tratamiento con [escopolamina + MTC] y MTC solo reduce significativamente el comportamiento tigmotáxico en comparación con el grupo tratado con escopolamina. Los ratones tratados con rivastigmina no son significativamente diferentes de escopolamina o solución salina.

4 Conclusiones del Ejemplo 1

- Los resultados confirman que se puede producir un defecto de aprendizaje en ratones mediante el tratamiento con el inhibidor colinérgico escopolamina. Como cabía esperar, rivastigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa que produce más acetilcolina en los terminales nerviosos, es capaz de revertir el defecto de aprendizaje producido por la escopolamina. La rivastigmina es uno de los medicamentos inhibidores de la acetilcolinesterasa utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y las demencias relacionadas. La rivastigmina y los fármacos relacionados también se usan en el tratamiento sintomático de la MCI y pueden producir beneficios mensurables en esta afección (véase, p. ej., Feldman, H.H., Ferris, S., Winblad, B., Sfikas, N., Mancione, L., He, Y., Tekin, S., Burns, A., Cummings, J., del Ser, T., Inzitari, D., Orgogozo, J.-M., Sauer, H., Scheltens, P., Scarpini, E., Herrmann, N., Farlow, M., Potkin, S., Charles, H.C., Fox, N.C. y Lane, R. (2007) Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEX study. *Lancet Neurology* 6, 501-512; Grundman, M., Petersen, R.C., Ferris, S.H., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Bennett, D.A., Foster, N.L., Jack, C. R., Jr, Galasko, D.R., Doody, R., Kaye, J., Sano, M., Mohs, R., Gauthier, S., Kim, H.T., Jin, S., Schultz, A.N., Schafer, K., Mulnard, R., van Dyck, C.H., Mintzer, J., Zamrini, E.Y., Cahn-Weiner, D. y Thal, L.J. (2004) Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Archives of Neurology* 61,59-66.
- Aunque la rivastigmina revirtió el déficit de aprendizaje, esto no dejó rastro discernible en la memoria de los animales. Esto se puede ver a partir del análisis de la fase de memoria del experimento observando un intervalo de parámetros. El parámetro específico, tiempo en el cuadrante objetivo, no fue diferente del 25 % esperado al azar visto con escopolamina sola o después del tratamiento con rivastigmina. También se observó un resultado similar utilizando el parámetro compuesto más amplio "localización", que mide la precisión espacial del comportamiento del animal en la búsqueda del área donde se habría esperado la plataforma. La rivastigmina no revirtió la pérdida de precisión espacial producida por la escopolamina. Análogamente, rivastigmina no revirtió la pérdida de precisión temporal, medida por el parámetro compuesto "latencia". Sin embargo, hubo una sugerencia de que la rivastigmina puede tener cierta influencia calmante en ratones tratados con escopolamina según lo determinado por el comportamiento de tigmotaxis.
- La capacidad de la rivastigmina para revertir el déficit de aprendizaje inducido por la escopolamina es ampliamente

compatible con la idea generalizada de que la mejora de la actividad colinérgica conduce a mejoras en la atención durante la fase de aprendizaje de la tarea. Esto es, los ratones con deficiencia de escopolamina pueden hacer un mejor uso de las señales de aprendizaje durante la tarea de la fase de aprendizaje, y esta mejora persiste de un día para otro, en que hay evidencia de restauración de la mejoría diaria después del tratamiento con rivastigmina que había sido abolida por escopolamina. Sin embargo, este efecto de rivastigmina en el aprendizaje no deja rastro aparente cuando se prueba específicamente como un efecto en la memoria. Ninguna evidencia de memoria para la ubicación de la plataforma puede ser detectada por cualquiera de una amplia gama de medidas ya sea en 1,5 o 24 horas después de completar el aprendizaje. Por lo tanto, rivastigmina no mejora la memoria a corto o largo plazo, aunque mejora la memoria operativa o de rendimiento durante la fase de adquisición de la tarea.

MTC tenía una capacidad equivalente para restaurar el rendimiento durante la fase de aprendizaje del experimento, en que la capacidad de revertir el déficit inducido por escopolamina era indistinguible de los controles. La marcada diferencia entre MTC y rivastigmina surgió solo durante la fase de memoria del experimento. En esta ocasión, hubo evidencia de retención de memoria en una amplia gama de parámetros. Específicamente, el tiempo pasado en el cuadrante objetivo fue significativamente más alto que el nivel de probabilidad, es decir, el 25 %, después del tratamiento con 1 mg/kg o 4 mg/kg. El parámetro de localización más amplio también mostró la restauración de los animales tratados con escopolamina hasta el nivel de rendimiento de control. Análogamente, hubo restauración del rendimiento medido por la exactitud temporal. Por último, El MTC produjo una reversión completa del deterioro severo en la capacidad para escapar de la zona de tigmotaxis producida por la escopolamina.

Por lo tanto, MTC es sustancialmente mejor para revertir los déficits inducidos por la escopolamina que la rivastigmina, un medicamento colinérgico. Aunque es bastante similar en términos de rendimiento operativo durante la fase de aprendizaje del experimento, las diferencias cualitativas entre rivastigmina y MTC surgen durante la fase de memoria del experimento. Considerando que rivastigmina no produjo evidencia de retención de memoria de la tarea aprendida en ninguno de los parámetros medidos, MTC mostró evidencia de retención de memoria. El efecto MTC no fue dependiente de la dosis, en que no hubo diferencias entre el MTC administrado a 1 mg/kg o 4 mg/kg. Tampoco hubo diferencias de tiempo significativas, en esa evidencia de la retención de la memoria se pudo demostrar en 1,5 y 24 horas después de la finalización de la fase de aprendizaje del experimento.

Es improbable en vista de los resultados obtenidos que MTC actúa a través de un mecanismo colinérgico, ya que la rivastigmina incluso a dosis más altas (datos no mostrados) no pudo revertir el efecto amnésico de la escopolamina. Por lo tanto, La MTC actúa a través de un mecanismo cualitativamente distinto para revertir el efecto amnésico de la escopolamina. La naturaleza de este mecanismo es desconocida. Dado que los déficits observados en MCI amnésicos se encuentran principalmente en el dominio de la memoria, se deduce que la MTC representa un tratamiento sintomático candidato de la MCI, formas particularmente amnésicas de MCI.

La rivastigmina ya se usa en el tratamiento sintomático de la MCI. Basado en los resultados del presente documento, los beneficios potenciales de la rivastigmina dependen en gran medida de los efectos en la atención durante la adquisición de tareas y no en la memoria, se deduce que un medicamento como MTC, que tiene efectos que se pueden demostrar tanto durante la adquisición de tareas como en la memoria, se esperaría que tuviera una eficacia superior a la rivastigmina y otros fármacos que mejoran la colinérgica en el tratamiento de la MCI amnésica.

Un reciente consenso de opinión internacional ha formulado dos formas de MCI: amnésica y no amnésica (Winblad, B., Palmer, K., Kivipelto, M., Jelic, V., Fratiglioni, L., Wahlgund, L.O., Nordberg, A., Backman, L., Albert, M., Almkvist, O., Arai, H., Basun, H., Blennow, K., deLeon, M., De Carli, C., Erkinjuntti, T., Giacobini, E., Graff, C., Hardy, J., Jack, C., Jorm, A., Ritchie, K., van Duijn, C., Visser, P. y Petersen, R. C. (2004) Mild cognitive impairment - beyond controversies, towards a consensus: Informe del Grupo de Trabajo Internacional sobre Deterioro Cognitivo Leve. Journal of Internal Medicine 256, 240-246). Dado que los déficits operacionales en dominios no cognitivos son elementos característicos de formas no amnésicas de MCI, se esperaría que MTC representara un posible tratamiento sintomático de las formas no amnésicas de MCI. Específicamente, MTC ejerce un fuerte efecto sobre la tigmotaxis inducida por la escopolamina, que generalmente se toma como un índice de ansiedad. Sin embargo, la rivastigmina no exhibió significativamente esta acción. Por lo tanto, es probable que el MTC pueda tener efectos beneficiosos sobre la ansiedad y otros componentes no cognitivos del MCI, como apatía, aislamiento social, pérdida de confianza y capacidad de decisión, así como compromiso social general.

Ejemplo 2 - Efectos de MTC en el aprendizaje de laberinto de agua en ratones NMRI jóvenes y de edad avanzada

1) Objetivo y antecedentes del estudio

Este estudio se diseñó para evaluar los efectos de MTC en el rendimiento cognitivo en una tarea de aprendizaje espacial de referencia y laberinto de agua con memoria en ratones NMRI en tres edades diferentes: 2-3, 6 y 13 meses.

2) Métodos

MTC (Simpsons, Reino Unido) se disolvió en agua. Ratones NMRI hembra de 2-3 años, 6 y 13 meses se agruparon después de excluir cualquier animal con comportamiento anormal de natación en la tarea del laberinto de agua. Se administró MTC (1 mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) a 5 ml/kg. El número de animales al final del estudio fue el siguiente.

5

Tratamiento grupal	Edad (meses)		
	2-3	6	13
solución salina	10	6	7
MTC (1 mg/kg)	10	5	8

El ensayo de comportamiento se realizó utilizando la tarea de navegación espacial de laberinto de agua de Morris (Morris, 1984) [como se describe en el Ejemplo 1]. Los ratones se habituaron por primera vez al laberinto de agua antes del tratamiento y el entrenamiento de la memoria de referencia. Los ratones se trataron con MTC o vehículo 30 minutos antes del ensayo 1 de cada sesión diaria. Los ensayos de prueba al final de la capacitación evaluaron la memoria a corto y largo plazo (1,5 y 24 horas, respectivamente).

10

3. Resultados

3.1 - Fase de aprendizaje - Analisis convencional

15

Las figuras 12 y 13 muestran las longitudes de trayectoria, latencia, velocidad y tigmotaxis a lo largo de los días y promediados en días para ratones de 2-3, 6 y 13 meses tratados con solución salina o MTC (1 mg/kg). Los ratones envejecidos se vieron perjudicados al adquirir la tarea de laberinto de agua con memoria de referencia. Examinando solo los datos de los ratones de control (tratados con solución salina) en los tres grupos de edad, los ratones de 13 meses de edad se vieron afectados en la tarea en relación con los ratones de 2-3 meses de edad. Los ratones más viejos tenían largos recorridos a lo largo de todos los días. Las longitudes de la trayectoria de escape de los ratones de 6 meses de edad no fueron diferentes de las de los ratones de 2-3 o 13 meses de edad.

20

Los ratones de 13 meses, tratados con MTC tenían trayectorias significativamente más cortas que los ratones tratados con solución salina de 13 meses. No hubo diferencias significativas entre los ratones tratados con MTC de 2-3 meses de edad - y los tratados con solución salina, ni los dos grupos tratados con MTC fueron diferentes con respecto a sus longitudes de trayectoria de escape. El grupo tratado con solución salina de 13 meses de edad no mejoró (disminuyendo la longitud de las rutas) en los días de entrenamiento; los otros grupos habían adquirido la tarea de laberinto de agua con memoria de referencia. Todos los grupos comenzaron en el mismo nivel que las longitudes de ruta en la prueba 1 no difirieron.

25

30

El parámetro de velocidad de nado permitió evaluar el rendimiento del motor entre los dos grupos de edad y determinar si el tratamiento con MTC produjo un efecto motor en la tarea. Los ratones NMRI envejecidos nadaron consistentemente más lentamente que los ratones jóvenes, y este rasgo fue independiente del tratamiento.

35

En ratones de 13 meses de edad, el tratamiento con MTC no alteró la velocidad de nado; sin embargo, en ratones de 2-3 meses de edad, aquellos tratados con MTC nadaron más lentamente que los controles emparejados por edad durante sesiones de entrenamiento posteriores.

40

El comportamiento de abrazos en la pared (tigmotaxis) fue evidente en todos los ratones al comienzo del entrenamiento, pero todos los grupos mostraron una disminución progresiva con sesiones de entrenamiento sucesivas.

45 Fase de aprendizaje - Análisis avanzado

Los cambios relacionados con la edad se examinaron como en el Ejemplo 1 en términos de la longitud de los parámetros, latencia, velocidad y tigmotaxis, comparando animales tratados con solución salina o MTC a 1 mg/kg. Estos se resumen en la Figura 12. Examinando los medios brutos, existe un deterioro general en las cuatro cantidades con la edad. MTC tiene un efecto de tratamiento beneficioso solo en los ratones de 13 meses, y solo con respecto a la longitud del camino y la latencia. En caso de tigmotaxis, MTC causa un empeoramiento a los 2-3 meses y 6 meses, y no tiene beneficios a los 13 meses.

50

Los cambios diarios se representan en la Figura 13. Los ratones más jóvenes mejoran más desde el día 1 hasta el día 4 que los ratones más viejos. No está claro si MTC tiene algún impacto sistemático en el aprendizaje, aunque hay una sugerencia de que MTC mejora el cambio diario en ratones más viejos.

55

Como en el Ejemplo 1, Los datos de longitud de ruta y latencia se analizaron utilizando un modelo de supervivencia. Como anteriormente, el análisis de supervivencia calcula la probabilidad de supervivencia en el estado de "nadador"

con respecto a la longitud del camino. Las gráficas de supervivencia de los datos de longitud de trayectoria se muestran en la Figura 14. Los ratones tratados con solución salina de 13 meses de edad alcanzan solo un 56 % de probabilidad de encontrar la plataforma incluso después de nadar 1500 cm. Cuando los datos se normalizaron para eliminar las diferencias debidas al tratamiento, La distribución residual fue muy cercana a la exponencial (véase

Figura 15). En ratones más jóvenes, se encontró relativamente más probabilidad de masa en valores bajos de longitud de camino. Esto se puede interpretar de la siguiente manera. Los ratones más viejos nadan al azar hasta que detectan una señal espacial, tras lo cual nadan directamente a la plataforma. Es más probable que los ratones más jóvenes ya hayan reconocido una señal muy temprano, por lo que pasan menos del período inicial nadando al azar antes de nadar directamente a la plataforma.

Las curvas de supervivencia se parametrizaron utilizando las estimaciones de riesgos proporcionales de Cox. Estos se muestran como múltiplos de longitud de trayectoria de registro en la Figura 16. Se observa un fuerte efecto de envejecimiento en los animales tratados con solución salina. No hay efecto de MTC en ratones más jóvenes. El efecto de MTC en los ratones de 13 meses es reducir sustancialmente la longitud total del camino, llevando el rendimiento de los ratones más viejos a un nivel de rendimiento observado con ratones de 6 meses de edad. La diferencia global se acerca a la significación estadística ($p = 0,074$). Se realizó un análisis similar para los datos de latencia. Los resultados para la latencia son esencialmente idénticos a los de la longitud de trayectoria (Figura 17). Como se puede ver en las figuras 16 y 17, los efectos se acercan a la significación estadística para los ratones de 13 meses de edad en el día 4 tanto para la longitud del camino como para la latencia (valores de p de 0,059 y 0,085 respectivamente).

3.2 Ensayos de memoria

Como en el Ejemplo 1, los animales se analizaron a las 1,5 horas después de completar la fase de aprendizaje ("Día 4") o 24 horas después de completar la fase de aprendizaje ("Día 5").

El primer parámetro analizado es el tiempo empleado en el cuadrante objetivo. Esto se muestra para los días 4 y 5 con y sin tratamiento con MTC en la Figura 18. Como en el Ejemplo 1, El análisis estadístico utilizó un modelo lineal de efectos mixtos, permitiendo el tratamiento y la interacción diurna y la variabilidad por sujeto (es decir, algunos ratones pueden desempeñarse mejor en la tarea de memoria independientemente del grupo de tratamiento).

Tal como puede observarse en la figura 18, Los ratones tratados con solución salina de 2-3 meses y 6 meses pudieron recordar la ubicación de la plataforma a las 1,5 horas. En el punto de tiempo de 24 horas, su tiempo en el cuadrante objetivo no fue significativamente diferente del nivel de probabilidad (25 %). Parece poco probable que esto se deba a la falta de memoria, como no hubo evidencia de recuperación a las 24 horas en el Ejemplo 1. En cambio, esto puede reflejar la extinción del comportamiento de búsqueda en el cuadrante objetivo debido a la presentación a 1,5 horas de no tener plataforma en el cuadrante objetivo. Los animales más jóvenes pueden aprender más eficientemente que ya no hay una plataforma en lo que era anteriormente el cuadrante objetivo, y modificar su estrategia de búsqueda en consecuencia. No hay efecto de MTC a las 1,5 horas en los ratones de 2-3 meses (es decir, pasan mucho más del 25 % de tiempo en el cuadrante objetivo, como el grupo salino). En los ratones de 6 meses, MTC parece producir un deterioro de la recuperación en este momento.

Los ratones tratados con solución salina a los 13 meses muestran una incompetencia completa tanto a las 1,5 como a las 24 horas. El tratamiento con MTC restaura el recuerdo a las 1,5 horas. No es posible determinar a partir de este experimento si el MTC no pudo restaurar la recuperación a las 24 horas, o si el MTC produjo una extinción más eficiente en los ratones de 13 meses en comparación con los ratones de 2-3 meses y 6 meses tratados con solución salina. Las rutas de natación representativas que se muestran en la Figura 19 muestran una restitución completa de la direccionalidad de la ruta de natación en un ratón de 13 meses de edad después del tratamiento con MTC.

Se realizó un análisis de localización, que se muestra en la Figura 20. Como en el Ejemplo 1, "localización" es un parámetro compuesto que refleja la precisión espacial de la búsqueda, calculado a partir de: número de visitas a la ubicación de la plataforma anterior; el número de visitas al área circundante definida como un área que dobla el diámetro de la plataforma; tiempo en esta zona circundante; y el tiempo en el cuadrante objetivo. Como puede observarse a partir de la figura 20, La localización mejora significativamente por MTC en ratones de 13 meses de edad a la hora de la sonda de 1,5 horas. No hay otras diferencias significativas, aunque direccionalmente, MTC parece afectar la localización a las 1,5 horas en ratones de 6 meses de edad.

Un análisis similar de latencia no reveló ningún efecto significativo de la MTC.

4 Conclusiones del Ejemplo 2

Este estudio ha demostrado un deterioro del aprendizaje espacial relacionado con la edad en ratones NMRI. Esto se puede demostrar a partir de los datos para la longitud de ruta y la latencia. En la tarea de memoria de referencia laberinto de agua, los ratones de 13 meses no pudieron adquirir la tarea. Además, no mostraron evidencia de recordar la tarea a las 1,5 horas después de completar el cuarto día de aprendizaje. Por lo tanto, a los 13 meses de edad, los ratones NMRI muestran déficits cognitivos significativos. También hay alguna evidencia de empeoramiento

del parámetro no cognitivo, tigmotaxis, con el envejecimiento. Esto se toma como una medida de ansiedad. Sin embargo, no fue posible establecer un ajuste de modelo a este conjunto de datos mediante la parametrización proporcional de riesgos de Cox porque la variabilidad entre sujetos superó los efectos del tratamiento en el análisis.

5 Como en los datos del Ejemplo 1, MTC no mostró evidencia de mejoría en la función cognitiva en animales de 2-3 meses y 6 meses de edad. Específicamente, no hubo mejoría en la parametrización del riesgo proporcional de Cox de la longitud de recorrido o la latencia. El análisis de los datos de tigmotaxis no fue concluyente. De manera similar, MTC no produjo ninguna evidencia de mejoría ya sea a las 1,5 o 24 horas en la fase de memoria del experimento. Por lo tanto estos hallazgos reiteran los del Ejemplo 1 al no confirmar las afirmaciones hechas por Callaway et al. (2004) y Riha et al. (2005) que MTC puede mejorar la función de la memoria en ausencia de un deterioro preexistente.

15 De hecho, MTC afectó el rendimiento de la memoria según lo medido por tiempo en el cuadrante objetivo y la localización a las 1,5 horas en animales de 6 meses. Este patrón es bastante diferente del observado a los 2-3 meses, cuando MTC no tuvo ningún efecto en la memoria. También hay una sugerencia en los datos de que MTC afectó al aprendizaje según lo medido por el parámetro de localización en los días 4 y 5. Por lo tanto, MTC puede afectar tanto el aprendizaje como la memoria en ratones adultos.

20 El efecto más sorprendente de MTC fue producir una mejora en el rendimiento durante la fase de memoria del experimento. Esto podría verse particularmente en el análisis del tiempo en el cuadrante objetivo. A los 13 meses, los animales tratados con solución salina eran completamente incompetentes y no mostraron evidencia de haber adquirido discriminación en el cuadrante objetivo cuando se probaron solo 1,5 horas después de completar el aprendizaje. Después del tratamiento con MTC, el tiempo en el cuadrante objetivo fue indistinguible del desempeño observado a los 2-3 meses. Análogamente, la localización de los parámetros compuestos mostró una restauración del rendimiento esencialmente completa a la observada en animales tratados con solución salina a los 2-3 meses de edad en el ensayo con sonda de 1,5 horas. Del mismo modo, durante la fase de adquisición, los efectos positivos de MTC se acercaron a la importancia en el día 4 en ratones de 13 meses de edad para los parámetros de longitud de ruta y latencia.

30 Los defectos relacionados con la edad que se observan a los 13 meses en estos animales pueden tomarse como un modelo para el MCI y el deterioro cognitivo relacionado con la edad en humanos. La capacidad de MTC para restaurar la función cognitiva en este modelo indica que la MTC puede ser útil terapéuticamente en el tratamiento del deterioro cognitivo relacionado con la edad y los síndromes de MCI.

35 **Ejemplo 3: Conclusiones generales**

Como se muestra en el Ejemplo 1, MTC puede restaurar el rendimiento en un modelo de déficit inducido por escopolamina tanto en la fase de aprendizaje como en la fase de memoria del experimento. Adicionalmente, El MTC produjo una reversión completa del deterioro severo en la capacidad para escapar de la zona de tigmotaxis producida por la escopolamina.

45 Como se muestra en el Ejemplo 2, MTC pudo producir una mejora en el rendimiento durante la fase de memoria del experimento. Los defectos relacionados con la edad que se observan a los 13 meses en estos animales pueden tomarse como un modelo para el MCI y el deterioro cognitivo relacionado con la edad en humanos.

La capacidad del MTC para restablecer la función cognitiva en estos modelos indica que el MTC puede ser útil terapéuticamente en el tratamiento del deterioro cognitivo relacionado con la edad y los síndromes de MCI.

50 Sin embargo tanto en el Ejemplo 1 como en el Ejemplo 2, MTC no mostró evidencia de mejoría en la función cognitiva en animales no deteriorados.

Se afirma en dos de los estudios enumerados (Callaway et al., 2004; Riha et al., 2005) que la consolidación de la memoria puede mejorarse en animales no dañados de otra manera. Esto es, se afirma que de lo contrario, se puede hacer que los animales no deteriorados tengan una memoria mejor que la esperada por el tratamiento con MTC.

55 Los presentes hallazgos por lo tanto no confirman las afirmaciones hechas por Callaway et al. (2004) y Riha et al. (2005) que MTC puede mejorar la función de la memoria en ausencia de un deterioro preexistente. Esto es, el tratamiento repetido con MTC a las dosis propuestas (es decir, 1 mg/kg y 4 mg/kg) no produjo una mejora del aprendizaje y la memoria en animales que, por lo demás, no estaban afectados en un paradigma de comportamiento de la memoria de referencia espacial bien validado, a saber el laberinto de agua de Morris.

65 Además, se muestra en el Ejemplo 2 que en ciertas circunstancias, el tratamiento repetido con MTC puede dificultar el aprendizaje en animales que de otra manera no serían afectados. Por lo tanto, no se puede aceptar que los estudios enumerados proporcionan una base para el tratamiento de trastornos de la memoria debido a que MTC tiene propiedades de mejora de la memoria intrínsecas y universalmente aplicables.

Hay más ambigüedades en estos estudios anteriores. Por ejemplo, en general no sugieren, y de hecho argumentan específicamente en contra de la propuesta, que MTC podría ser utilizado para mejorar el aprendizaje, como sostienen los autores los efectos de MTC se limitan específicamente a la consolidación de la memoria y no al aprendizaje. Sin embargo, sería de esperar que los supuestos efectos de consolidación de la memoria también se produzcan en el curso del aprendizaje, ya que el fármaco se administra repetidamente durante un tiempo prolongado en los experimentos descritos.

Además, hay contradicciones en cuanto al tiempo de administración requerido para producir supuestos efectos de memoria. Específicamente, Al parecer MTC no tuvo efecto si se administra antes del entrenamiento, pero solo después del entrenamiento. Sin embargo, es difícil conciliar la forma en que un medicamento podría tener utilidad para el tratamiento de trastornos de la memoria si dicha administración se restringiera solo a momentos posteriores a aquellos para los que se desea una memoria mejorada. Este conjunto de circunstancias solo podría contemplarse en el contexto de regímenes de formación específicos, como la extinción del miedo condicionado como un complemento a la terapia de exposición. No habría ninguna expectativa de la enseñanza habilitada por los estudios enumerados que el MTC podría usarse para mejorar el aprendizaje y la memoria de manera más general, sin referencia al momento de las dosis.

Por lo tanto estos estudios anteriores no enseñan de forma creíble si el MTC, o cualquiera de los compuestos de diaminofenotiazina desvelados en el presente documento, son agentes que podrían mejorar el aprendizaje y la memoria mediante mecanismos distintos a los sistemas de neurotransmisores específicos, y específicamente a través de la mejora del metabolismo mitocondrial. Además no enseñan si MTC podría tener una utilidad más general, aparte de si se administra en momentos específicos con respecto a las tareas de entrenamiento, y si se administra a ciertas dosis específicas.

Por el contrario, se muestra en el Ejemplo 1 que MTC es capaz de rectificar defectos de aprendizaje y memoria en un modelo que no está relacionado con el metabolismo de la energía mitocondrial. Por lo tanto, No se puede aceptar que los efectos de la MTC tengan algo que ver con la rectificación de defectos en el metabolismo de la energía mitocondrial. Además, la utilidad potencial de la MTC no está circunscrita ni restringida por la presencia o ausencia de trastornos del metabolismo energético mitocondrial. En cambio, MTC puede demostrar efectos positivos en el aprendizaje de una memoria cuando existen déficits demostrables producidos de cualquier manera e independientemente de cualquier presunción en cuanto al mecanismo subyacente del defecto.

Ejemplo 4: terapia de combinación de MTC y ChEI

Como se ha señalado anteriormente, se cree que el tratamiento de MCI con compuestos DAPTZ no actúa a través de una acción en el sistema colinérgico.

Se realizó un experimento adicional para demostrar la utilidad de los compuestos DAPTZ junto con la terapia ChEI.

Los materiales y métodos (fármacos, y aparatos de comportamiento y protocolo de prueba) fueron generalmente como se describe en los Ejemplos anteriores.

El diseño experimental fue el siguiente:

El presente estudio se realizó en 8 repeticiones. En estas, los grupos de tratamiento múltiple estaban presentes y el número de animales de cada grupo era pequeño. Por cuestiones de claridad, aquí dividimos el análisis en tres grupos:

Exp. 1 confirmó la capacidad y la relación dosis-respuesta de diferentes dosis de rivastigmina para revertir los déficits cognitivos inducidos por la escopolamina;

Exp. 2 estableció si y a qué dosis MTC revirtió efectivamente los déficits cognitivos inducidos por la escopolamina; y

Exp. 3 probó los efectos de la administración conjunta de dosis sub-eficaces de rivastigmina y MTC para revertir los efectos de la escopolamina.

Los datos del Exp. 1 y 2. se basan en parte en lo descrito en el Ejemplo 1 anterior, pero se establecen de nuevo y se vuelven a analizar para facilitar la comparación con el modelo utilizado en el Exp. 3.

Los animales se asignaron al azar a uno de los grupos de tratamiento como se resume en la Tabla 4-1. Los sujetos recibieron la primera inyección i.p. 35 minutos antes del ensayo; esta inyección consistió en solución salina o escopolamina y fue seguida 5 minutos después por una segunda y/o en algunos grupos, inyecciones i.p. de vehículo, rivastigmina y/o MTC.

MTC se inyectó 5 minutos después de la escopolamina y 30 minutos antes del ensayo. El momento y la dosis de

escopolamina se eligieron para permitir la ocupación farmacológica de los receptores muscarínicos de ACh antes de la reversión del tratamiento, basándose en su farmacocinética. La escopolamina tiene un T_{máx} de 20-40 minutos después de la administración i.p. (Kim et al., 2006; Janas et al., 2005). Los experimentos iniciales en nuestros laboratorios establecieron niveles cerebrales máximos para MTC 30-60 minutos después de la administración i.p. (datos no publicados). MTC se inyectó después de la escopolamina con la intención de actuar como un agente de reversión en una condición preexistente de alteración colinérgica. Después de la administración del fármaco, Los animales se mantuvieron en su jaula de alojamiento hasta el ensayo de comportamiento.

Una dosis baja de escopolamina (0,5 mg/kg) sin efectos secundarios sensoriales (Robinson et al., 2004), pero conocida por inducir un déficit de memoria espacial cuando se inyecta i.p. (Steckler y Holsboer, 2001; Noda et al., 1991; Roloff et al., 2007) se usó, y se administró rivastigmina a 0,5 mg/kg como se describió anteriormente (Bejar et al., 1999). Las dosis activas para MTC se basaron en la bibliografía (Callaway et al., 2004, mencionado antes) y la eficacia para la reversión de agregación tau *in vitro* (Wischik et al., 1996). El perfil de efectos secundarios se realizó solo con las dosis más altas efectivas y seguras de MTC (4 mg/kg) y rivastigmina (0,125 mg/kg) en ratones tratados con solución salina para reducir el número de animales utilizados. Los estudios iniciales con rivastigmina a dosis de 0,5 y 0,25 mg/kg, en ausencia de tratamiento con escopolamina se suspendieron debido a efectos adversos graves en ratones (problemas de coordinación motora, ataxia, breves episodios de convulsiones).

El análisis de datos fue el siguiente:

Los datos de comportamiento del aprendizaje de adquisición se analizaron mediante estadísticas convencionales (Graph Pad Prism versión 4.01) utilizando análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas factoriales con tratamiento entre sujetos y día/ensayo como factor dentro del sujeto seguido de comparaciones planificadas entre los grupos seleccionados. Los datos de los ensayos de sondas se analizaron mediante ANOVA de una vía y se realizaron los ensayos post-hoc apropiados (ensayo de comparación múltiple de Bonferroni o Newman Keuls) para determinar la fuente de un efecto o interacción principal importante. Los análisis se realizaron con dos vías y la hipótesis nula se aceptó a niveles de probabilidad del 5 % ($p < 0,05$). Solo los términos para las diferencias confiables se mencionan en el texto para simplificar.

Resultados:

Exp. 1: La rivastigmina revierte los déficits de aprendizaje espacial inducidos por escopolamina

Aprendizaje de adquisición

La rivastigmina se administró en un intervalo de dosis de 0,1-0,5 mg/kg para establecer su eficacia para revertir el deterioro cognitivo inducido por la escopolamina. Además, la dosis de 0,125 mg/kg se administró después de la solución salina para realizar el perfilado de efectos secundarios del fármaco. El análisis de la longitud del camino de nado (datos no mostrados) reveló un efecto principal del tratamiento ($F(6,207) = 7,408$; $p < 0,0001$), un efecto diario total ($F(3,207) = 25,6$; $p < 0,001$), pero sin interacción ($F < 1$). El rendimiento logrado en el ensayo uno también se analizó y se encontró un efecto general del tratamiento farmacológico ($p = 0,0067$), sin embargo, el análisis post hoc mostró que ninguno de los grupos de tratamiento difería de los controles.

Esto respalda claramente la opinión de que el tratamiento con escopolamina afectaba el aprendizaje durante todo el período de entrenamiento y que la rivastigmina puede revertir este déficit. Otras comparaciones planificadas de grupos individuales apoyaron esta impresión de una reversión relacionada con la dosis. La rivastigmina a dosis de 0,5 y 0,125 mg/kg revirtió completamente el déficit de aprendizaje (F 's $> 2,5$; $p < 0,05$ en comparación con la escopolamina, no hay diferencia con la solución salina); por el contrario, 0,1 mg/kg de rivastigmina fue ineficaz (no diferente de la escopolamina, $F(3,63) = 9,6$; $p = 0,003$ en relación con la solución salina).

Extrañamente, la reversión del grupo de 0,25 mg/kg fue solo parcial ya que el curso del tiempo difería de ambos escopolamina ($F(3,60) = 5,2$; $p = 0,035$) y solución salina ($F(3,63) = 4,9$; $p=0,039$). La inspección cercana de las actuaciones individuales, sin embargo, reveló que esto probablemente se debió a un animal en el grupo, que no mostró ningún aprendizaje en absoluto. La omisión de este individuo confirmó la reversión total de esta dosis de rivastigmina.

Por último, La rivastigmina sola no alteró el aprendizaje espacial en esta tarea. Se observaron resultados similares para el aprendizaje general entre los días 1 y 4. Esto se expresa como una reducción general en la longitud del camino y mostró mejoras significativas en todos los grupos (valores de $t > 2,3$; valores de $p < 0,05$), aparte de la escopolamina ($t = 1,2$) y el grupo de rivastigmina + escopolamina 0,25 mg/kg ($t = 2,1$; $p=0,07$). El mismo ratón identificado anteriormente fue nuevamente un valor atípico en el último grupo. De forma interesante, los animales tratados con 0,1 mg/kg de rivastigmina presentaron una mejora general sustancial a pesar de la falta de inversión para el rendimiento diario en general. Esto se debió principalmente a la falta de aprendizaje el primer día en este grupo. La velocidad de la natación también se modificó en función del tratamiento farmacológico ($F(6,207) = 8,395$; $p < 0,0001$). Relativo al control, las dosis bajas de rivastigmina (0,125 mg/kg solo o 0,1 mg/kg junto con escopolamina) difirieron significativamente de los controles (valores $F > 7$; valores de $p < 0,02$). En contraste con la velocidad de

nado, el principal efecto del tratamiento farmacológico para la tigmotaxis ($F(6,207) = 4,059$; $p = 0,0015$) se debió principalmente al grupo de escopolamina sola, que difería de los controles ($F(3,69) = 9,2$; $p=0,006$). Aunque todos los otros grupos comenzaron con una alta proporción de abrazos en la pared el primer día, este progresivo declinó y no fue diferente de los controles.

5

Memoria espacial

La memoria a corto plazo se registró 1,5 horas después del último ensayo de entrenamiento como tiempo pasado en el cuadrante objetivo (datos no mostrados). Se estableció un sesgo espacial para los controles y los ratones tratados con 0,125 mg/kg de escopolamina + rivastigmina (valores de $p < 0,5$ con respecto al 25 % de probabilidad); todos los otros grupos no pudieron mostrar esta preferencia. La comparación con los controles confirmó el déficit de memoria en los grupos de escopolamina, así como escopolamina + rivastigmina 0,5 mg/kg y 0,25 mg/kg (valores de $p < 0,05$; Ensayo t de Student).

15 Exp. 2: MTC revierte los déficits cognitivos inducidos por la escopolamina en una forma relacionada con la dosis

Aprendizaje de adquisición

Como se describe en el Ejemplo 1 anterior, el análisis de la longitud del camino de natación reveló un efecto general del tratamiento farmacológico ($F(7,240) = 6,531$; $p < 0,0001$), un efecto de día ($F(3,240) = 32$; $p < 0,0001$) y una interacción ($F(21,240) = 1,7$; $p=0,03$). El ensayo uno se analizó por separado y no se encontraron diferencias entre los grupos (no se muestran los datos). Las comparaciones planificadas de grupos confirmaron un déficit de aprendizaje en ratones tratados con escopolamina en relación con los controles ($F(3,69) = 24$; $p < 0,0001$). MTC revirtió este déficit de aprendizaje de una manera relacionada con la dosis: 4 y 1 mg/kg de MTC lograron una reversión total (valores de $F > 13,6$; valores de $p < 0,002$ en comparación con el grupo de escopolamina sola, no significativo en comparación con la solución salina); 0,5 mg/kg produjo una reversión parcial ($F(1,60) = 4,8$; $p = 0,04$ en comparación con la escopolamina, $F(1,63) = 4,6$; $p = 0,04$ en comparación con la solución salina); 0,25 y 0,15 mg/kg no pudieron revertir los déficits de escopolamina (no significativos con escopolamina, valores de $F > 8$; valores de $p < 0,01$ en comparación con la solución salina). MTC 4 mg/kg también se administró junto con solución salina, pero no afectó el aprendizaje de adquisición normal. El aprendizaje global calculado como la reducción del camino de nado durante días confirmó estos datos.

No hubo mejoría general en los grupos de escopolamina y escopolamina + MTC 0.15 y 0,25 mg/kg, mientras que todos los otros grupos de tratamiento (incluida la escopolamina con dosis más altas de MTC) mostraron un aprendizaje confiable (todos los valores de $t > 2,2$; valores de $p < 0,05$). La velocidad de natación no difirió entre los grupos ($p > 0,05$). Por el contrario, la tigmotaxis fue mayor en el grupo con escopolamina pero se revirtió con el tratamiento de MTC independientemente de la dosis.

El análisis factorial global confirmó un efecto principal del tratamiento ($F(7,243) = 3,9$; $p = 0,001$), un efecto día ($F(3,243) = 60$; $p < 0,0001$), y un día por interacción de tratamiento ($F(21,243) = 2,096$; $p=0,0042$). Solo el grupo de escopolamina se deterioró en relación con la solución salina ($F(1,69) = 9,2$; $p = 0,006$), todos los demás grupos no lo fueron.

Memoria espacial

La memoria espacial a corto plazo se evaluó mediante el ensayo de prueba 1,5 horas después del entrenamiento. En cuanto a la adquisición de aprendizaje, los controles y las dos dosis altas de MTC junto con la formación de memoria soportada por escopolamina y los ratones pasaron de manera confiable más que la posibilidad en el cuadrante objetivo (valores de $t > 2,3$; valores de $p < 0,05$). La escopolamina sola y las dosis más bajas de MTC no fueron eficaces.

Exp. 3: Coadministración de dosis sub-eficaces de rivastigmina y MTC

Según lo establecido en Exp. 1 y 2, rivastigmina y MTC invirtieron de forma dependiente de la dosis el deterioro cognitivo inducido por la escopolamina. Dado que el mecanismo de acción para MTC *in vivo* difiere de la rivastigmina, razonamos que las dosis sub-eficaces de ambos compuestos pueden actuar de manera adicional incluso de manera sinérgica lo que lleva a una reversión total de los déficits. Las dosis para rivastigmina y MTC fueron 0,1 mg/kg y 0,15 mg/kg respectivamente.

Aprendizaje de adquisición

La comparación de los cuatro grupos en la medida de la longitud del camino (Fig. 21A y B). reveló un efecto general del tratamiento ($F(3,132) = 15,52$; $p < 0,0001$), del día ($F(3,132) = 22$; $p < 0,0001$) y una interacción de estos factores ($F(9,132) = 2,3$; $p=0,02$).

El tratamiento combinado de rivastigmina y MTC mejoró significativamente el déficit de aprendizaje espacial inducido

por la escopolamina (valores de $F > 4$, valores de $p < 0,09$ para el análisis con el tratamiento como factor) y aunque la adquisición pareció más lenta que en los controles, esto no fue confiable (valores de $F < 4$; valores de $p > 0,05$ con tratamiento como factor). Del mismo modo, La rivastigmina y el MTC administrados en conjunto no mejoraron significativamente los controles lo que sugiere que la combinación de los dos medicamentos no mejoró los animales normales. Cuando se calcula como ahorro (reducción en la longitud del camino desde el día 1 hasta el día 4; Fig. 21C), solo el grupo de escopolamina sola no había mejorado, mientras que todos los otros tratamientos aprendieron la tarea espacial (valores de $t > 3,4$; $p < 0,005$). Si bien la velocidad de nado (Fig. 21D) no se vio afectada por ninguna administración de medicamentos, la terapia de combinación revirtió completamente el aumento dependiente de escopolamina en la tigitaxis (Fig. 21E) (valores de $F > 4$; Los valores de $p < 0,0031$ para el análisis global con tratamiento como factor; $F(1,69) = 9,2$; $p = 0,006$ para escopolamina frente a solución salina, los demás grupos no son diferentes de la solución salina.

Memoria espacial

La rivastigmina y el MTC también revirtieron el déficit de memoria inducido por la escopolamina ($t = 2,5$; $p = 0,02$ en comparación con escopolamina; no es significativo para la solución salina), pero la administración combinada no alteró la memoria espacial normal per se (Fig. 21F). Todos los grupos excepto los ratones tratados con escopolamina presentaron un sesgo espacial (valores de $t > 2,7$; valores de $p < 0,02$) que confirman que la reversión del déficit de aprendizaje también se transformó en memoria a corto plazo.

Discusión del Ejemplo 4

La escopolamina se ha usado ampliamente en modelos animales para imitar el declive muscarínico característico del envejecimiento y la demencia (Drachman y Leavitt, 1974).

Como se describe en los ejemplos anteriores, MTC proporciona una inversión dependiente de la dosis de los déficits cognitivos de nuestro modelo de escopolamina. También fue eficaz cuando se administró en una dosis sub-eficaz junto con una dosis sub-eficaz de rivastigmina lo que sugiere que puede ser útil en una terapia de combinación. Esto hace que el MTC sea un fármaco para mejorar la cognición y un tratamiento potencial para el MCI. Un resumen detallado de los resultados se presenta en la Tabla 4-1.

MTC y rivastigmina revierten diferencialmente los déficits cognitivos inducidos por escopolamina en la tarea del laberinto de agua

El trabajo espacial y la memoria a corto plazo son particularmente sensibles al bloqueo de la transmisión colinérgica (Buxton et al., 1994; Han et al., 2000; Ballard y McAllister, 1999) lo que lleva a una incapacidad para almacenar información temporalmente. Esto fue fácilmente obvio en nuestra tarea ya que los ratones tratados con escopolamina mostraron niveles persistentemente altos de tigitaxis posibles debido a un deterioro del filtrado sensorial y una mayor ansiedad (Smythe et al., 1996). Además, nadar lejos del borde de la piscina requiere memoria de procedimiento y de hecho activación colinérgica del cuerpo estriado (Blokland, 1998). Esto parece estar comprometido en ratones tratados con escopolamina y particularmente relevante durante las primeras etapas del entrenamiento espacial. Por lo tanto sugerimos que tanto rivastigmina como MTC pueden actuar sobre la reversión de la memoria de procedimiento a corto plazo inicialmente para restaurar la capacidad del animal para conocer la ubicación de la plataforma oculta. No se observaron efectos motores no específicos inducidos por la escopolamina, ya que no hubo diferencias en la velocidad de nado, y anteriormente hemos excluido las deficiencias visuales para dosis bajas de escopolamina (Robinson et al., 2004).

La rivastigmina a dosis bajas revirtió fácilmente los déficits de memoria a corto plazo espaciales inducidos por escopolamina (Bejar et al., 1999; este estudio). Este efecto depende de la dosis y las dosis requeridas $> 0,125$ mg/kg se administran de forma aguda para restablecer completamente el aprendizaje espacial y esta es la primera demostración de tal efecto en ratones NMRI; el tratamiento crónico puede ser eficaz en concentraciones más bajas. Nuestros datos ofrecen la interpretación de que las ChEI mejoran la atención (Lindner et al., 2006), reducen la ansiedad (van der Zee y Luiten, 1999; reducción de la tigitaxis en el presente documento), y afectan en cierta medida al aprendizaje de procedimientos o la función cognitiva, es decir, la memoria a corto plazo.

Nuestro trabajo anterior sugiere que la actividad muscarínica es crítica para todos estos parámetros (von Linstow Roloff et al. 2007) y que se pueden disociar mediante modificaciones de diseños experimentales que consumen mucho tiempo. En esta ocasión, Solo estábamos interesados en el efecto neto del tratamiento farmacológico. Dado que la mejoría cognitiva inducida por rivastigmina coincidió con una reducción de la tigitaxis indica que la ansiedad, el aprendizaje procedimental y la cognición espacial están estrechamente vinculados (Micheau et al., 2004) y, de hecho, pueden estar regulados por la actividad colinérgica en el sistema hipocampo-cortical (Niewiadomska et al., 2008).

Si la normalización del aprendizaje procedimental conduce a la reversión de los déficits cognitivos, o viceversa queda sin explorar. De acuerdo con informes anteriores, sin embargo, es la observación de que la sobreestimulación del sistema colinérgico por altas dosis de ChEI es perjudicial para la formación de memoria tanto en modelos

preclínicos como en humanos (Bejar et al., 1999; Milivojevic et al., 2001, Beglinger et al., 2004, 2005; Van Dam et al., 2005), posiblemente debido a la hiperestimulación de los autorreceptores muscarínicos M2 (Braida et al., 1996). Esto explica la estrecha ventana terapéutica y posiblemente los efectos de corta duración del tratamiento con ChEI en la demencia.

5
MTC

10 En contraste con la rivastigmina, MTC presentó un perfil farmacológico y psicológico diferente y se mostró seguro y sin efectos secundarios observables incluso en dosis de hasta 4 mg/kg o más (no se muestra). Esto ofrece una ventana terapéutica más amplia y también puede resultar más seguro para los regímenes de tratamiento continuo. La relación dosis-respuesta para el aprendizaje y la formación de la memoria fue lineal con saturación a aproximadamente 4 mg/kg. Esto puede originarse a partir de diferentes propiedades del MTC que incluyen inhibición de la colinesterasa (Pfaffendorf et al., 1997), actividad antioxidante, agregación anti-tau, inhibición de NOS y activación de COX (Salaris et al., 1991; Martin et al., 1985; Mayer et al., 1993a, b; Volke et al., 1999; Callaway et al., 15 2004, citado anteriormente; Wischik et al., 1996). Estos mecanismos fallan en diferentes formas de demencia y enfermedades neurodegenerativas, por lo que el MTC puede convertirse en un nuevo potenciador cognitivo para su tratamiento. De hecho, la escopolamina puede desencadenar la producción de radicales libres (Fan et al., 2005) y aumentar el estrés oxidativo cerebral (El-Sherbiny et al., 2003).

20 Por consiguiente, varios antioxidantes como el acteosido (extracto de *Callicarpa dichotoma*, Lee et al., 2006), cadena de azúcar de oligosacárido ácido (Fan et al., 2005), ácido ascórbico, (de Angelis y Furlan, 1995; Parle y Dhingra, 2003), y oroxilina A, (Kim et al., 2007), invirtió los déficits cognitivos inducidos por escopolamina.

25 Este experimento por lo tanto muestra que MTC también mejora la formación de memoria en sujetos hipocolinérgicos. La actividad de la COX disminuye en la demencia (González-Lima et al., 1997; Kish et al., 1992; Valla et al., 2001) y en ratas transectadas con fimbria/fornix con tono colinérgico disminuido en el hipocampo (Krugel et al., 2001). Asimismo, la COX disminuye significativamente después de la administración de ChEI (Ito et al., 1989) lo que explica algunas de las diferencias farmacológicas entre el MTC y la rivastigmina. Un corolario de la actividad COX mejorada es el metabolismo de la glucosa mejorado es decir la producción de ATP.

30 Por lo tanto es posible que el MTC sea un potenciador cognitivo más global debido a su aumento universal de la glucosa cerebral y la generación de ATP según los hallazgos de que la administración de glucosa puede mejorar la cognición en modelos de escopolamina (Parsons y Gold, 1992; Micheau et al., 1995; Parkes y White, 2000).

35 En general, MTC presenta un perfil farmacológico que difiere de los ChEI comúnmente recetados y puede proporcionar un enfoque novedoso para el tratamiento de trastornos cognitivos en enfermedades neurodegenerativas.

40 *Coadministración de MTC y rivastigmina*

La combinación de dosis sub-eficaces de dos o más fármacos puede llevar a un resultado terapéutico aditivo o sinérgico que coincida con menos efectos adversos.

45 Para la combinación de rivastigmina y MTC, observamos una inversión sinérgica dado que cada constituyente contribuyó al efecto final por encima de su propia potencia. Observamos una reversión total del déficit inducido por escopolamina con inicio tardío (después del día 2 de entrenamiento) mientras que los efectos aditivos de dosis equivalentes de ambos fármacos solo darían lugar a una reversión parcial (rivastigmina) o no a una reversión (MTC). Una normalización del aprendizaje relacionada con el tiempo, sin embargo, también ocurrió cuando rivastigmina y MTC se administraron individualmente en dosis cognitivamente eficaces y no se pueden atribuir a los efectos combinados de los fármacos. Un punto importante a destacar aquí es que la sinergia de rivastigmina y MTC podría surgir de sus acciones celulares diferenciales. Mientras que la rivastigmina en dosis bajas puede contribuir a la normalización del tono colinérgico, MTC podría proporcionar de manera más global nutrientes y energía para las neuronas que se activan de manera dependiente de la tarea. Si este fuera el caso, uno esperaría un resultado beneficioso de la terapia de combinación a largo plazo. El tratamiento conjunto de MTC también puede ampliar la 55 ventana terapéutica de rivastigmina al tiempo que reduce la toxicidad.

Tabla 4-1:

Inyección 1	Inyección 2	Inyección 2	n	Aprendizaje	Velocidad de nado	Tigrotaxis	Memoria S-T
solución salina	vehículo		13	-	-	-	-
escopolamina (0,5)	vehículo		12	↓	-	↓	↓

(continuación)

<i>Inyección 1</i>	<i>Inyección 2</i>	<i>Inyección 2</i>	<i>n</i>	<i>Aprendizaje</i>	<i>Velocidad de nado</i>	<i>Tigmtaxis</i>	<i>Memoria S-T</i>
escopolamina (0,5)	MTC (4)		11	↑	-	↑	↑
escopolamina (0,5)	MTC (1)		12	↑	-	↑	↑
escopolamina (0,5)	MTC (0,5)		10	↑↓	-	↑	↓
escopolamina (0,5)	MTC (0,25)		10	↑	-	↑	↓
escopolamina (0,5)	MTC (0,15)		10	↑	-	↑	↓
solución salina	MTC (4)		11	-	-	-	-
escopolamina (0,5)	Rivast (0,5)		11	↑	-	↑	i
escopolamina (0,5)	Rivast (0,25)		10	↑	-	↓	↓
escopolamina (0,5)	Rivast (0,125)		10	↑↓	-	↑	↑
escopolamina (0,5)	Rivast (0,1)		10	↑	↑	↓	↓
solución salina	Rivast (0,125)		10	-	↓	-	↑↓
escopolamina (0,5)	MTC (0,15)	Rivast (0,1)	14	↑	-	↑	↑
solución salina	MTC (0,15)	Rivast (0,1)	9	-	-	-	-

Referencias para el Ejemplo 4

2. Ballard TM, McAllister KH, (1999). El inhibidor de la acetilcolinesterasa, ENA 713 (Exelon), atenúa el deterioro de la memoria de trabajo inducida por escopolamina en una tarea operativa de DNMTTP en ratas. *Psychopharmacology (Berl)*, 146(1): 10-18
4. Beglinger LJ, Gaydos BL, Kareken DA, Tangphao-Daniels O, Siemers ER, Mohs RC, (2004). Ensayo neuropsicológico en voluntarios sanos antes y después de la administración de donepezilo. *J Psychopharmacol*, 18(1): 102-108
5. Beglinger LJ, Tangphao-Daniels O, Kareken DA, Zhang L, Mohs R, Siemers ER, (2005). Neuropsychological test performance in healthy elderly volunteers before and after donepezil administration: a randomized, controlled study. *J Clin Psychopharmacol*, 25(2): 159-165
6. Bejar C, Wang RH, Weinstock M, (1999). Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol*, 383(3): 231-40
9. Blokland A, (1998). Involvement of striatal cholinergic receptors in reaction time and fixed interval responding in rats. *Brain Res Bull*, **45:21-25**
10. Braida D, Paladini E, Griffini P, Lamperti M, Maggi A, Sala M, (1996). An inverted U-shaped curve for heptylphysostigmine on radial maze performance in rats: comparison with other cholinesterase inhibitors. *Eur J Pharmacol*, **302:13-20**
11. Buxton A, Callan OA, Blatt EJ, Wong EH, Fontana DJ, (1994). Cholinergic agents and delay-dependent performance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 49(4): 1067-1073
16. de Angelis L, Furlan C, (1995). The effects of ascorbic acid and oxiracetam on scopolamine-induced amnesia in a habituation test in aged mice. *Neurobiol Learn Mem*, 64(2): 119-124
21. Drachman DA, Leavitt J, (1974). Human memory and the cholinergic system: a relationship to aging? *Arch Neurol*, **30:113-121**
22. El-Sherbiny D A, Khalifa A E, Attia A S, Eldenshary Eel D, (2003). *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of

- scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav*, **76:525-533**
26. Fan Y, Hu J, Li J, Yang Z, Xin X, Wang J, Ding J, Geng M, (2005). Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neurosci Lett*, 374:222-226
- 5 28. González-Lima F, Valla J, Matos-Collazo S, (1997). Quantitative cytochemistry of cytochrome oxidase and cellular morphometry of the human inferior colliculus in control and Alzheimer's patients. *Brain Res*, 752:117-126
30. Han CJ, Pierre-Louis J, Scheff A, Robinson JK, (2000). A performance-dependent adjustment of the retention interval in a delayed non-matching-to-position paradigm differentiates effects of amnesic drugs in rats. *Eur J Pharmacol*, 403(1-2):87-93
32. Ito T, Akiyama N, Ogawa T, Satake T, Kato T, Sugiyama S, Ozawa T, (1989). Changes in myocardial mitochondrial electron transport activity in rats administered with acetylcholinesterase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(3): 997-1002
- 10 33. Janas AM, Cunningham SC, Duffy KB, Devan BD, Greig NH, Holloway HW, Yu QS, Markowska AL, Ingram DK, Spangler EL, (2005). The cholinesterase inhibitor, phenserine, improves Morris water maze performance of scopolamine-treated rats. *Life Sci*, 76(10):1073-1081
- 15 35. Kim DH, Hung TM, Bae KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, Cheong JH, Ko KH, Ryu JH, (2006). Gomisin A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur J Pharmacol*, 542(1-3):129-135
36. Kim DH, Jeon SJ, Son KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, Lee JJ, Cho YW, Cheong JH, Ko KH, Ryu JH, (2007). The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 87(4): 536-546
- 20 37. Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo f, Chang LJ, Wilson JM, DiStefano LM, Nobrega JN, (1992). Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **59:776-779**
39. Krugel U, Bigl V, Eschrich K, Bigl M, (2001). Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*, 19(3): 263-277
45. Lee JH, Park SY, Shin YW, Kim CD, Lee WS, Hong KW, (2007). Concurrent administration of cilostazol with donepezil effectively improves cognitive dysfunction with increased neuroprotection after chronic cerebral hypoperfusion in rats *Brain Res*, **1185:246-255**
- 25 46. Lee KY, Jeong EJ, Lee HS, Kim YC, (2006). Acteoside of *Callicarpa dichotoma* attenuates scopolamine-induced memory impairments. *Biol Pharm Bull*, 29(1): 71-4
47. Lindner MD, Hogan JB, Hodges DB Jr, Orie AF, Chen P, Corsa JA, Leet JE, Gillman KW, Rose GM, Jones KM, Gribkoff VK, (2006). Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. *Psychopharmacology (Berl)*, 188(4): 629-640
- 30 49. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF, (1985). Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 232(3):708-716
51. Mayer B, Brunner F, Schmidt K, (1993a). Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol*, 45(2): 367-374
52. Mayer B, Brunner F, Schmidt K, (1993b). Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J*, 14(1): 22-26
53. Micheau J, Messier C, Jaffard R, (1995). Glucose enhancement of scopolamine-induced increase of hippocampal high-affinity choline uptake in mice: relation to plasma glucose levels. *Brain Res*, 685(1-2):99-104
- 40 54. Micheau J, Riedel G, Roloff EL, Inglis J, Morris RG, (2004) Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci*; 118(5):1022-32.
55. Miliwojevic N, Babic K, Milatovic D, Dettbarn WD, Sket D, Zivin M, (2001). *N-tert-butyl-alpha-phenylnitron*, a free radical scavenger with anticholinesterase activity does not improve the cognitive performance of scopolamine-challenged rats *Int. J Dev Neurosci*, 19(3): 319-325
- 45 58. Noda Y, Ochi Y, Shimada E, Oka M (1991) Involvement of central cholinergic mechanism in RU-24969-induced behavioral deficits *Pharmacol Biochem Behav*, 38(2): 441-6
60. Parkes M, White KG, (2000). Glucose attenuation of memory impairments. *Behav Neurosci*, 114(2): 307-319
61. Parle M, Dhingra D, (2003). Ascorbic Acid: a promising memory-enhancer in mice. *J Pharmacol Sci*, 93(2): 129-135
- 50 62. Parsons MW, Gold PE, (1992). Scopolamine-induced deficits in spontaneous alternation performance: attenuation with lateral ventricle injections of glucose. *Behav Neural Biol*, 57(1): 90-92
64. Pfaffendorf M, Bruning TA, Batnik HD, van Zwieten PA, (1997). The interaction between methylene blue and the cholinergic system. *Br J Pharmacol*, 122(1): 95-98
69. Robinson L, Harbaran D, Riedel G, (2004). Visual acuity in the water maze: sensitivity to muscarinic receptor blockade in rats and mice. *Behav Brain Res*, 151(1-2):277-286
- 55 70. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD 3, (1991). Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase A potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*, 42(3): 499-506
71. Scarpini E, Scheltens P, Feldman H, (2003). Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol*, **2:539-547**
- 60 72. Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Rosas AD, Barrio JR, Phelps ME, (2000). Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 6037-6042
- 65 73. Smythe JW, Murphy D, Bhatnagar S, Timothy C, Costall B, (1996). Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1): 57-63

74. Steckler T, Holsboer F, (2001). Interaction between the cholinergic system and CRH in the modulation of spatial discrimination learning in mice. *Brain Res*, 906(1-2):46-59

78. Valla J, Berndt JD, González-Lima F, (2001). Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J Neurosci*, **21:4923-4930**

79. Van Dam D, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PP, (2005). Symptomatic effect of donepezil, rivastigmina, galantamina y memantina sobre los déficits cognitivos en el modelo APP23. *Psychopharmacology (Berl)*, 180(1):177-190 81. Van der Zee EA, Luiten PG, (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: A review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*, **58:409-471**

84. Volke V, Wegener G, Vasar E, Rosenberg R, (1999). Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity *in vivo*. *Brain Res*, 826(2): 303-305

85. von Linstow Roloff E, Harbaran D, Micheau J, Platt B, Riedel G, (2007). Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neuroscience*, 146, (3):875-889

86. Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR, (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20): 11213-11218

Ejemplo 5: Más evidencia de la eficacia de los compuestos de DAPTZ en el tratamiento del deterioro cognitivo

Los ejemplos anteriores se han referido a la capacidad de la MTC para restaurar rápidamente la función cognitiva en varios modelos basados en el aprendizaje y la memoria en ratones deteriorados. Estos incluían ratones de tipo silvestre envejecidos, en que no hay patología tau, trastornos neurodegenerativos, demencia vascular, enfermedad por deterioro del consumo de oxígeno, o defecto mitocondrial existiría.

Esto indica que MTC puede ser útil terapéuticamente en el tratamiento del deterioro cognitivo relacionado con la edad y los síndromes de MCI independientemente de los mecanismos para esos descensos o el diagnóstico preciso.

Este hallazgo se ve corroborado por los resultados de ensayo controlado con placebo de fase 2, exploratorio de 24 semanas, de hallazgo de intervalo de dosis, doble ciego, de monoterapia MTC. El objetivo del estudio fue determinar si esta terapia retrasaba el deterioro cognitivo en EA leve o moderada (utilizando el cambio ADAS-cog como medida de resultado primaria).

Sin embargo el estudio también empleó FDG-PET (tomografía por emisión de positrones con Fluoro-Desoxi Glucosa) y ^{99m}Tc^m HMPAO-SPECT (Tomografía por Emisión de Fotón Único de Hexametil-Propileno-Amina-Oxima) como una medida de resultado secundaria. Se sabe que la función neuronal (y por lo tanto el rendimiento cognitivo) está estrechamente relacionada con el flujo sanguíneo y la utilización de la glucosa que puede medirse mediante SPECT y PET, respectivamente.

Se demostró que estos métodos de obtención de imágenes son particularmente útiles para evaluar la eficacia de los productos farmacéuticos para su uso en el tratamiento de trastornos cognitivos (véase el documento provisional de Estados Unidos 60/996.177 (Wischik) presentado el 5 de noviembre de 2007, cuyos contenidos se incorporan específicamente en el presente documento como referencia).

De manera importante, el estudio se estratificó para permitir el análisis del impacto del diagnóstico de imágenes moleculares de referencia (es decir presencia de más características "similares a AD" frente a características más similares a vasculares) en la eficacia terapéutica. En el estudio no hubo pruebas de una diferencia en el efecto del tratamiento entre estas diferentes patologías subyacentes. Más bien la sugerencia fue que la terapia con DAPTZ puede ser beneficiosa en el envejecimiento de la población para retardar o detener la degeneración neurofibrilar independientemente de la etapa de Braak, factores de riesgo y subtipos diagnósticos estrictamente definidos.

Los resultados del estudio se resumen a continuación:

las imágenes moleculares del cerebro se incluyeron en el ensayo, tanto como una variable de estratificación de referencia como un marcador de eficacia sustituto. Había 138 sujetos en la cohorte de SPECT que tenían imágenes tanto al inicio como en la visita 4 (18 semanas) como respuesta al tratamiento con MTC y 20 sujetos en la cohorte de TEP que tenían imágenes apareadas.

Cuando se usa para diagnóstico, SPECT y PET revelan un defecto temporoparietal bilateral característico. Sin embargo, los mecanismos biológicos subyacentes de acción de estas modalidades de imagen difieren. SPECT informa una imagen de flujo sanguíneo cerebral obtenida de "primer paso" después de la inyección intravenosa. PET informa una imagen de la captación de glucosa durante un período de 3 horas después de la inyección. Ambas informan la función neuronal de diferentes maneras. SPECT depende del flujo sanguíneo local durante un corto período de tiempo y por lo tanto proporciona una medida indirecta de la función neuronal, dado que la demanda de oxígeno neuronal está estrechamente relacionada con el flujo sanguíneo cerebral. PET mide la función metabólica más directamente, pero integra la captación de glucosa en un curso de tiempo más largo.

Resultados de SPECT

El análisis de los datos de SPECT mostró que MTC en todas las dosis previene la disminución de la perfusión en las regiones neocorticales afectadas característicamente que pueden medirse objetivamente en la DA sin tratar durante un período de 6 meses. La diferencia entre sujetos tratados con placebo y activos fue altamente significativa por los análisis de la Región de interés ("ROI") y del Mapa estadístico paramétrico ("SPM"). También hubo una sugerencia de *mejora* en perfusión en sujetos con CDR-leve al inicio del tratamiento tratados con MTC a 60 mg tid, pero esta mejora (es decir la diferencia en la puntuación de cambio de cero) no alcanzó significación estadística, aunque la diferencia con respecto al placebo fue altamente significativa en la mayoría de las regiones del cerebro.

Resultados de PET

La disminución de la captación de glucosa no alcanzó significación estadística en ninguna región del cerebro en sujetos tratados con placebo.

A diferencia de, sin embargo, en sujetos tratados con MTC, hubo una región de *aumento* significativo de la captación de glucosa desde la imagen de referencia hasta la segunda exploración PET en la visita 4 (18 semanas) (corrigiendo las comparaciones múltiples en toda la cabeza). Este aumento se localizó en el lóbulo temporal medial izquierdo (hipocampo y corteza entorrinal). Cuando los datos fueron reanalizados, suponiendo que se esperaban cambios solo en el lóbulo temporal medial (es decir una pequeña corrección de volumen para comparaciones múltiples), el aumento de la captación de FDG fue significativo en las estructuras de MTL bilateralmente.

Discusión

Los datos de PET ahora muestran que el tratamiento con MTC ejerce su efecto metabólico más fuerte en las estructuras del lóbulo temporal medio (MTL). Se espera que esto produzca un aumento correspondiente en la actividad funcional medida por el aumento en la captación de glucosa. El hecho de que se pueda demostrar un efecto estadísticamente significativo con un número tan pequeño de casos indica que el tamaño del efecto es grande en relación con la variabilidad inherente de los datos, y lleva a la expectativa de que el efecto es robusto y será fácilmente demostrable en grandes cantidades. series de casos.

Se requiere un análisis adicional para determinar si los cambios en la perfusión de la exploración SPECT también se pueden demostrar en las estructuras de MTL. Aunque las exploraciones con SPECT tienen una resolución más baja, puede ser posible determinar si hay cambios en el flujo sanguíneo de MTL correspondientes al alterar los planos en donde se realizan la reconstrucción y el registro de la imagen. Como se discute más adelante, es posible que las dos modalidades de imagen no proporcionen los mismos resultados ya que dependen de diferentes mecanismos de acción de la imagen molecular.

Las relaciones entre la pérdida regional de materia gris (medida por MRI), pérdida de perfusión (medida por SPECT) y pérdida de la función cognitiva en dominios específicos son complejas. Existe una fuerte correlación entre el deterioro cognitivo y la disminución en el flujo sanguíneo cerebral, particularmente para los lóbulos frontales y menos para los lóbulos temporales (Brown et al., 1996). Además, generalmente se reconoce que existe una propagación posterior a la anterior de los defectos de perfusión con el avance de la enfermedad (Matsuda et al., 2002).

Sin embargo no existe una relación simplista entre las regiones de perfusión reducida y las regiones de pérdida de funciones cognitivas específicas tradicionalmente localizadas en esas regiones del cerebro. Además, no hay una relación simplista entre las regiones de atrofia, medida por MRI, y defectos de perfusión por SPECT. Así, en las zonas afectadas, generalmente hay una mayor reducción en el volumen que en el flujo sanguíneo cerebral, y de hecho puede haber reducciones en el volumen sin la correspondiente pérdida de flujo sanguíneo cerebral (p. ej., en el hipocampo) en MCI/EA leve (Ibanez et al., 1998). Matsuda et al. (2002) encontraron en un estudio longitudinal que había discordancia entre las áreas de atrofia regional y las áreas de disminución del flujo sanguíneo. Las explicaciones ofrecidas son que la disminución observada en el flujo sanguíneo en el neocórtex se explica en parte por lesiones remotas (p. ej., en la corteza entorrinal) y, en segundo lugar, en las regiones de daño primario, tales como la corteza entorrinal, la pérdida de axones induce el brote de las fibras nerviosas restantes sustituyendo las conexiones perdidas y manteniendo la actividad sináptica y, por lo tanto, el flujo sanguíneo.

A pesar de estas complejidades potenciales, el descubrimiento actual de que las estructuras de MTL son metabólicamente altamente sensibles a la terapia de MTC es un hallazgo importante.

La evidencia actual de que es posible demostrar una mejora metabólica selectiva dentro de las estructuras de MTL plantea la posibilidad de realizar un ensayo para demostrar la eficacia en MCI en donde el uso de PET como un punto final sustituto juega un papel importante.

Brown DRP, Hunter R, Wyper DJ, Patterson J, Kelly RC, Montaldi D, et al. Longitudinal changes in cognitive function and regional cerebral function in Alzheimer's disease: A SPECT blood flow study. J Psychiatr Res 1996; 30: 109-26.

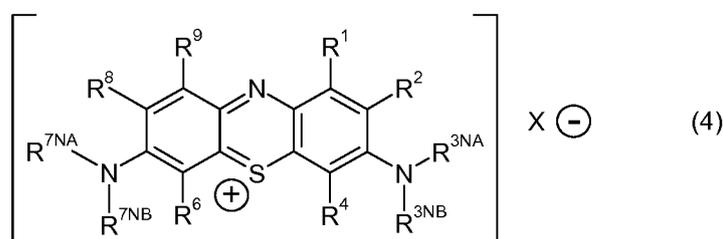
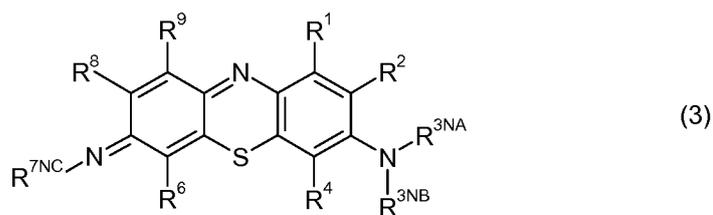
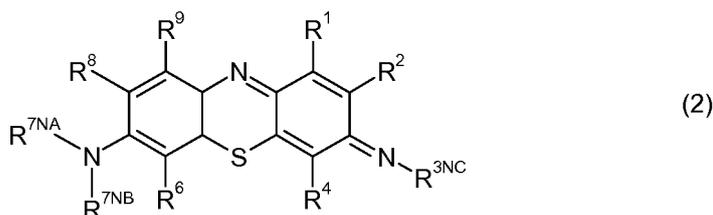
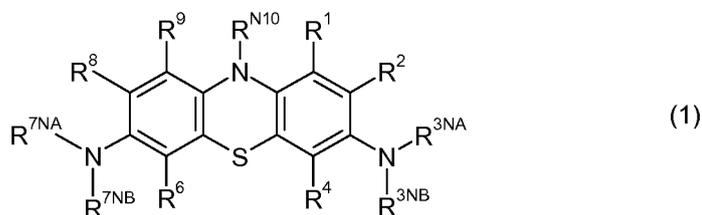
Matsuda H, Kitayama N, Ohnishi T, Asada T, Nakano S, Sakamoto S, et al. Longitudinal evaluation of both morphologic and functional changes in the same individuals with Alzheimer's disease. *J Nuc Med* 2002; 43: 304-11.

5 Ibanez, V., Pietrini, P., Alexander, G.E. et al. (1998) Regional glucose metabolic abnormalities are not the result of atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology* 50, 1585-1593)

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de diaminofenotiazina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del deterioro cognitivo leve (MCI) en un paciente que lo padece,

5 en donde dicho compuesto se selecciona entre compuestos de las siguientes fórmulas:



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

- H;
- F; -Cl; -Br; -I;
- OH; -OR;
- 20 -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};
- 25 -NH₂; -NHR; -NR₂; -NR^{N1}R^{N2};
- NHC(=O)H; -NRC(=O)H; -NHC(=O)R; -NRC(=O)R;
- R;

30 en donde cada R se selecciona independientemente entre:

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

en donde, en cada grupo $-NR^{N1}R^{N2}$, independientemente, R^{N1} y R^{N2} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo;
y en donde, en cada grupo $-NR^{3NA}R^{3NB}$, si está presente:

5 cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre:

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

15 o: R^{3NA} y R^{3NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo;
y en donde, en cada grupo $=NR^{3NC}$, si está presente, R^{3NC} se selecciona independientemente entre:

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

y en donde, en cada grupo $-NR^{7NA}R^{7NB}$, si está presente:

30 cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre:

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

40 o: R^{7NA} y R^{7NB} junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo;
y en donde, en cada grupo $=NR^{7NC}$, si está presente, R^{7NC} se selecciona independientemente entre:

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

y en donde R^{N10} , si está presente, se selecciona independientemente entre:

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

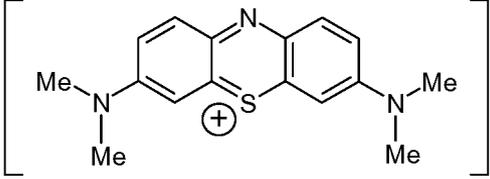
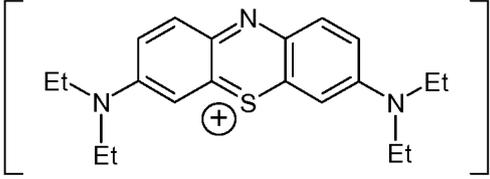
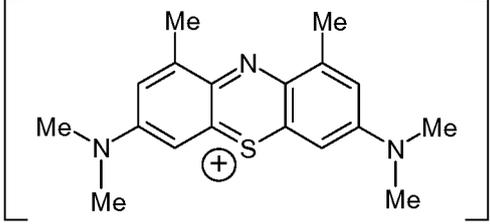
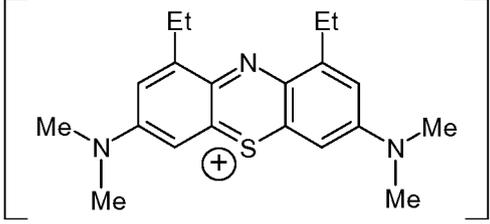
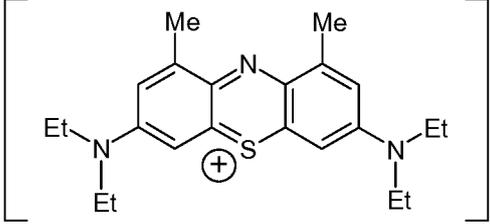
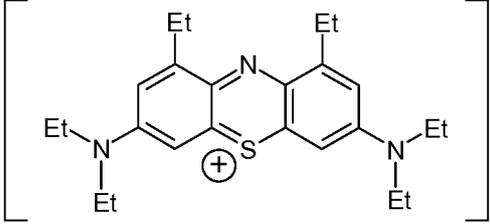
y en donde X⁻, si está presente, es uno o más contraiones aniónicos para conseguir la neutralidad eléctrica; y sales farmacéuticamente aceptables, sales mixtas, hidratos, y solvatos de los mismos.

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

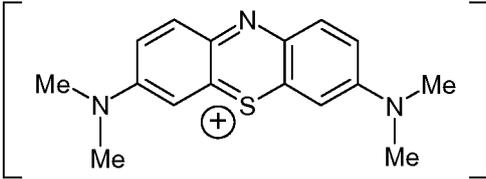
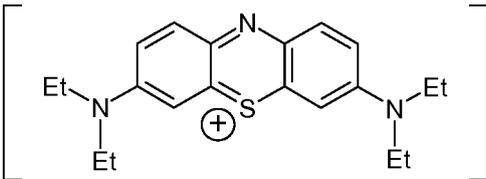
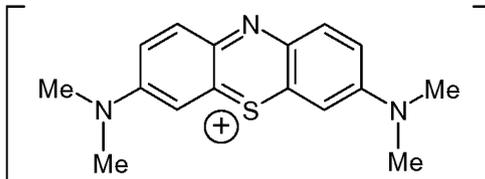
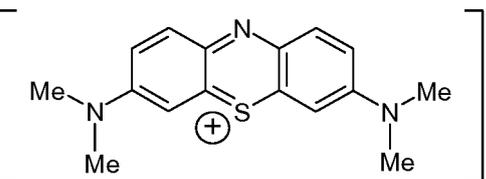
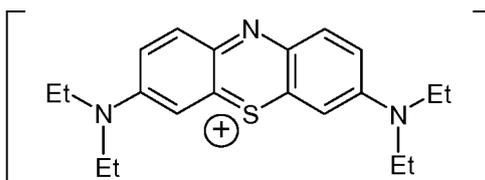
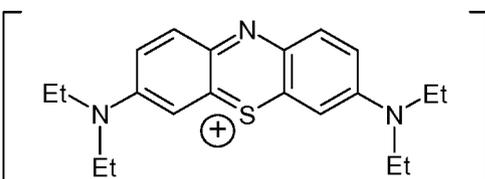
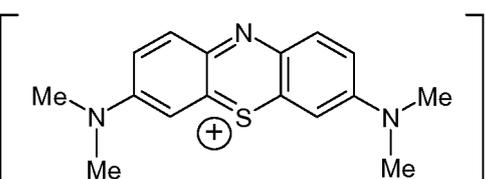
65

-H;
-R.

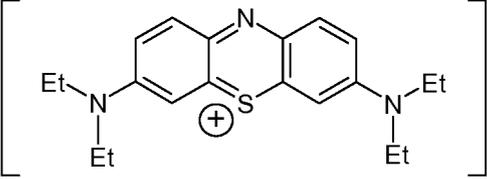
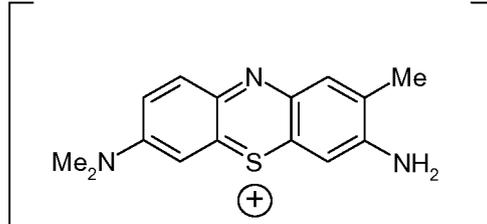
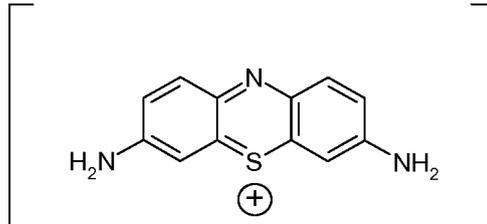
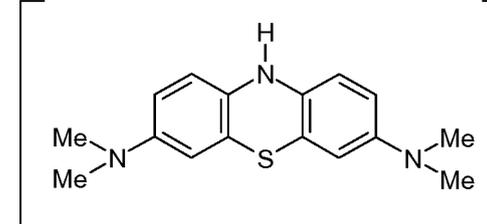
3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde cada R se selecciona independientemente entre:
5 alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido; alquilo C₁₋₆ alifático sustituido.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los sustituyentes en R, si está presente, se seleccionan independientemente entre:
- 10 -F; -Cl; -Br; -I;
-OH; -OR;
-C(=O)OH; -C(=O)OR';
-R'
- 15 en donde cada R' se selecciona independientemente entre:
- alquilo C₁₋₆ alifático no sustituido;
alqueno C_{2,6} alifático no sustituido;
cicloalquilo C₃₋₆ no sustituido;
20 carboarilo C₆₋₁₀ no sustituido;
heteroarilo C₅₋₁₀ no sustituido;
carboaril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₄ no sustituido.
5. El uso según la reivindicación 1, en donde cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ se selecciona independientemente
25 entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.
6. El uso según la reivindicación 1, en donde cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ se selecciona independientemente
entre: -H y -Me.
- 30 7. El uso según la reivindicación 1, en donde cada uno de R¹, R², R⁴, R⁶, R⁸ y R⁹ es -H.
8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente,
cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.
- 35 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, en cada grupo -NR^{3NA}R^{3NB}, si está presente,
cada uno de R^{3NA} y R^{3NB} se selecciona independientemente entre: -H y -Me.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, en cada grupo =NR^{3NC}, si está presente,
R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.
40
11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde, en cada grupo =NR^{3NC}, si está presente,
R^{3NC} se selecciona independientemente entre: -H y -Me.
12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde, en cada grupo -NR^{7NA}R^{7NB}, si está
45 presente, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.
13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde, en cada grupo -NR^{7NA}R^{7NB}, si está
presente, cada uno de R^{7NA} y R^{7NB} se selecciona independientemente entre: -H y -Me.
- 50 14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde, en cada grupo =NR^{7NC}, si está presente,
R^{7NC} se selecciona independientemente entre: -H, -Me, -Et, -nPr e -iPr.
15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde, en cada grupo =NR^{7NC}, si está presente,
R^{7NC} se selecciona independientemente entre: -H y -Me.
55
16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde R^{N10}, si está presente, se selecciona
independientemente entre: -H, -Me y -Et.
17. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde R^{N10}, si está presente, es
60 independientemente -H.
18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde X⁻, si está presente, es uno o más
contraiones aniónicos para conseguir la neutralidad eléctrica, opcionalmente seleccionado entre Cl⁻, Br⁻ o I⁻.
- 65 19. El uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona entre los siguientes compuestos, y sales
farmacéuticamente aceptables, sales mixtas, hidratos, y solvatos de los mismos:

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	DEBTC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dietil-metil-tioninio</p>
E	DMETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dimetil-etil-tioninio</p>
F	DEETC	 <p style="text-align: center;">cloruro de 1,9-dietil-etil-tioninio</p>

(continuación)

G	MTZ	 $\text{Cl}^- \quad (0.5 \text{ ZnCl}_2)$ sal mixta de cloruro de metil-tioninio y cloruro de cinc
H	ETZ	 $\text{Cl}^- \quad (0.5 \text{ ZnCl}_2)$ sal mixta de cloruro de etil-tioninio y cloruro de cinc
I	MTI	 I^- yoduro de metil-tioninio
J	MTI.HI	 $\text{I}^- \quad \text{HI}$ sal mixta de yoduro de hidrógeno y yoduro de metil-tioninio
K	ETI	 I^- yoduro de etil-tioninio
L	ETI.HI	 $\text{I}^- \quad \text{HI}$ sal mixta de yoduro de hidrógeno y yoduro de etil-tioninio
M	MTN	 NO_3^- nitrato de metil-tioninio

(continuación)

N	ETN	<div style="text-align: center;">  <p>nitrato de etil-tioninio</p> </div>
O		<div style="text-align: center;">  <p>cloruro de tolonio</p> </div>
P		<div style="text-align: center;">  <p>Tionina</p> </div>
Q		<div style="text-align: center;">  <p>HCl HCl</p> </div>

20. Un compuesto de diaminofenotiazina como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para uso en un método de tratamiento del deterioro cognitivo leve (MCI) en un paciente que lo sufre, método que comprende administrar una cantidad eficaz de dicho compuesto de diaminofenotiazina.

5 21. El uso o el compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 en donde el MCI es amnésico y el tratamiento es para alivio sintomático mediante la mejora de los síntomas amnésicos.

10 22. El uso o el compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 en donde dicho paciente se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 15 (i) pacientes no diagnosticados con enfermedad de Alzheimer y/o que no tienen demencia;
 (ii) pacientes que tienen una puntuación en el Mini-Examen de Estado Mental inferior o igual a MMSE 24, 25, 26, 27, 28 o 29; y
 (iii) pacientes que no sufren un defecto del metabolismo de la energía mitocondrial.

23. El uso o el compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho compuesto de diaminofenotiazina en combinación con un fármaco colinérgico que:

- 20 (i) mejora o imita la acción de la acetilcolina, o
 (ii) es un inhibidor de la colinesterasa.

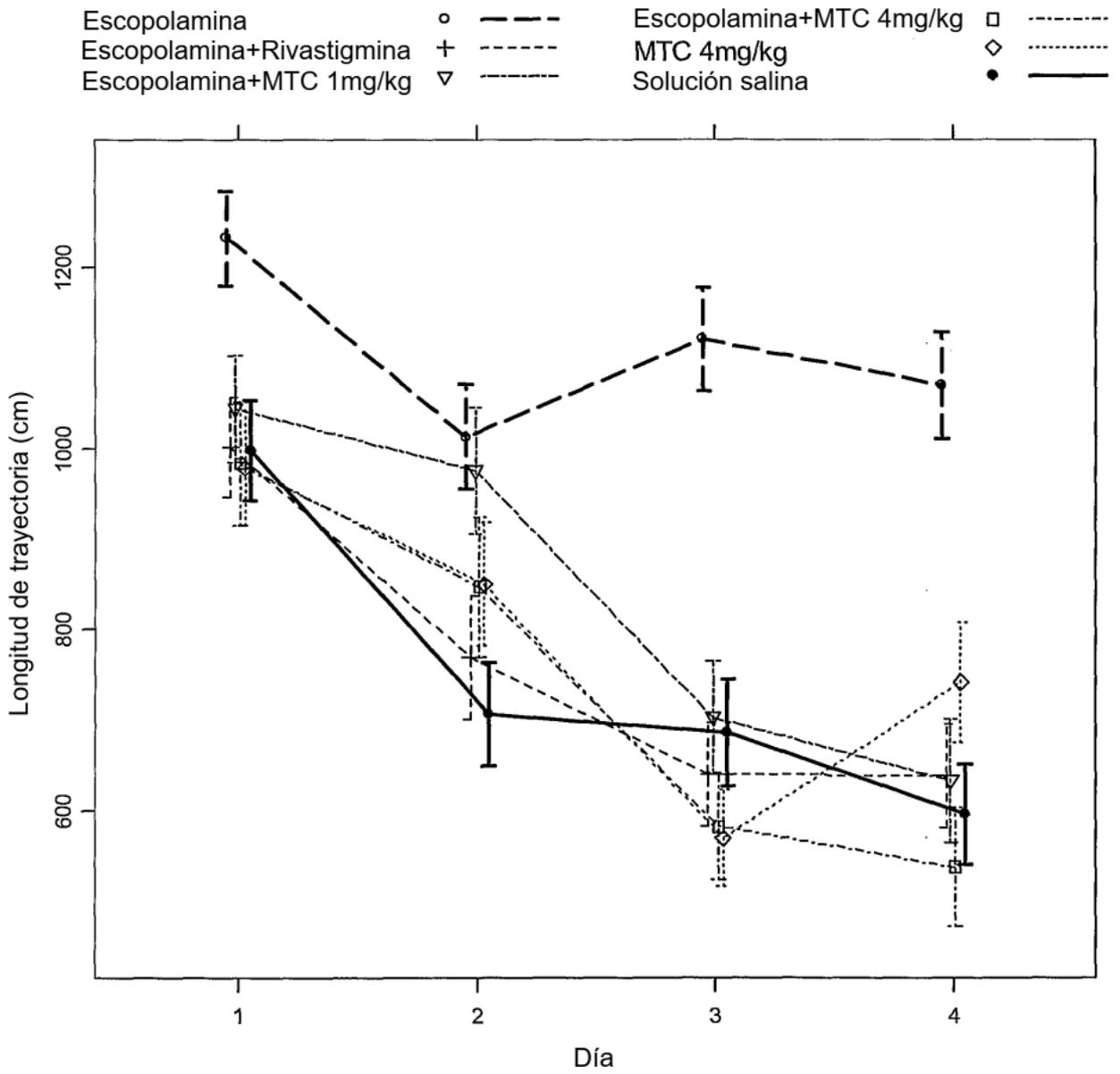


Figura 1

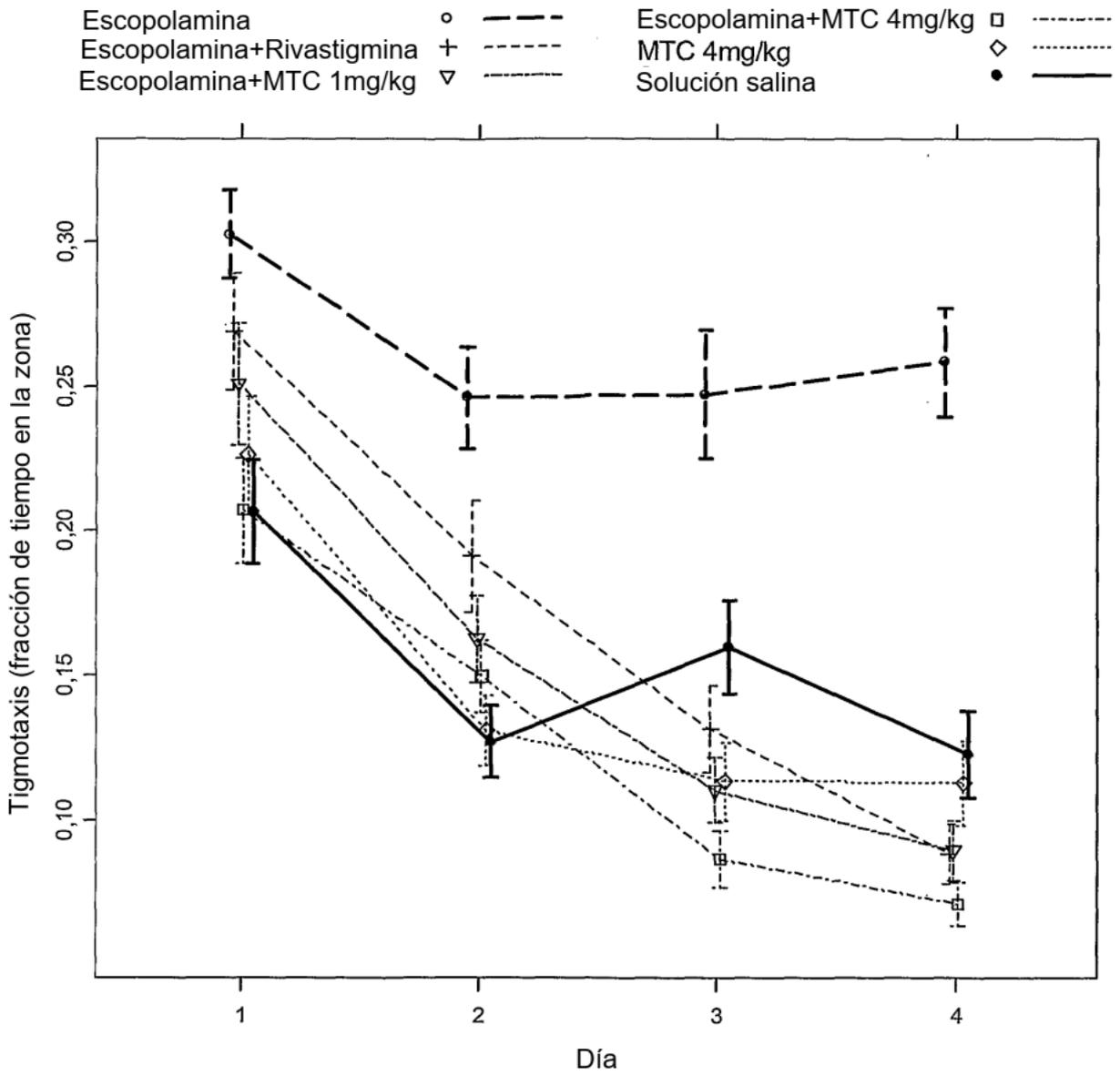


Figura 2

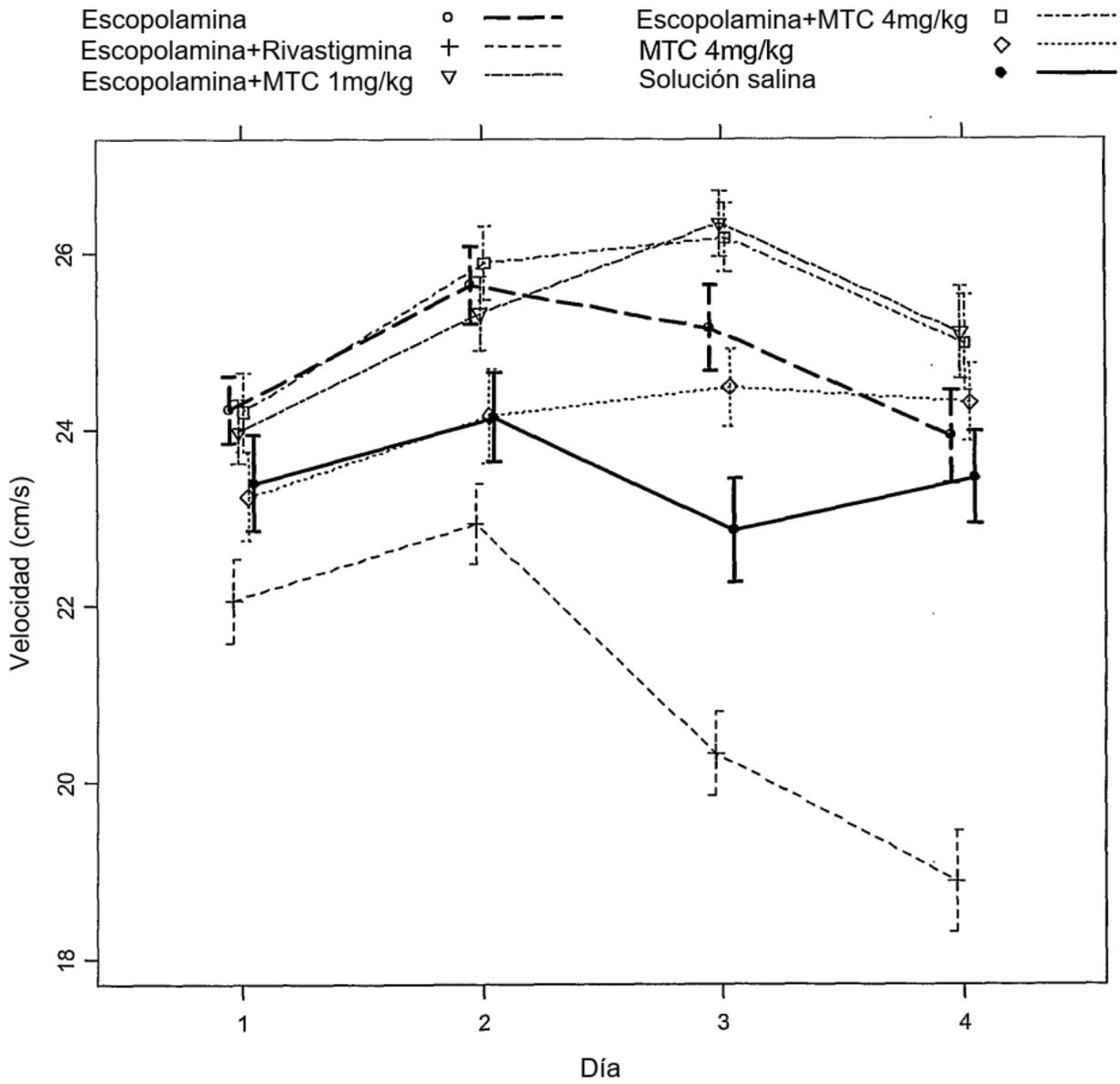


Figura 3

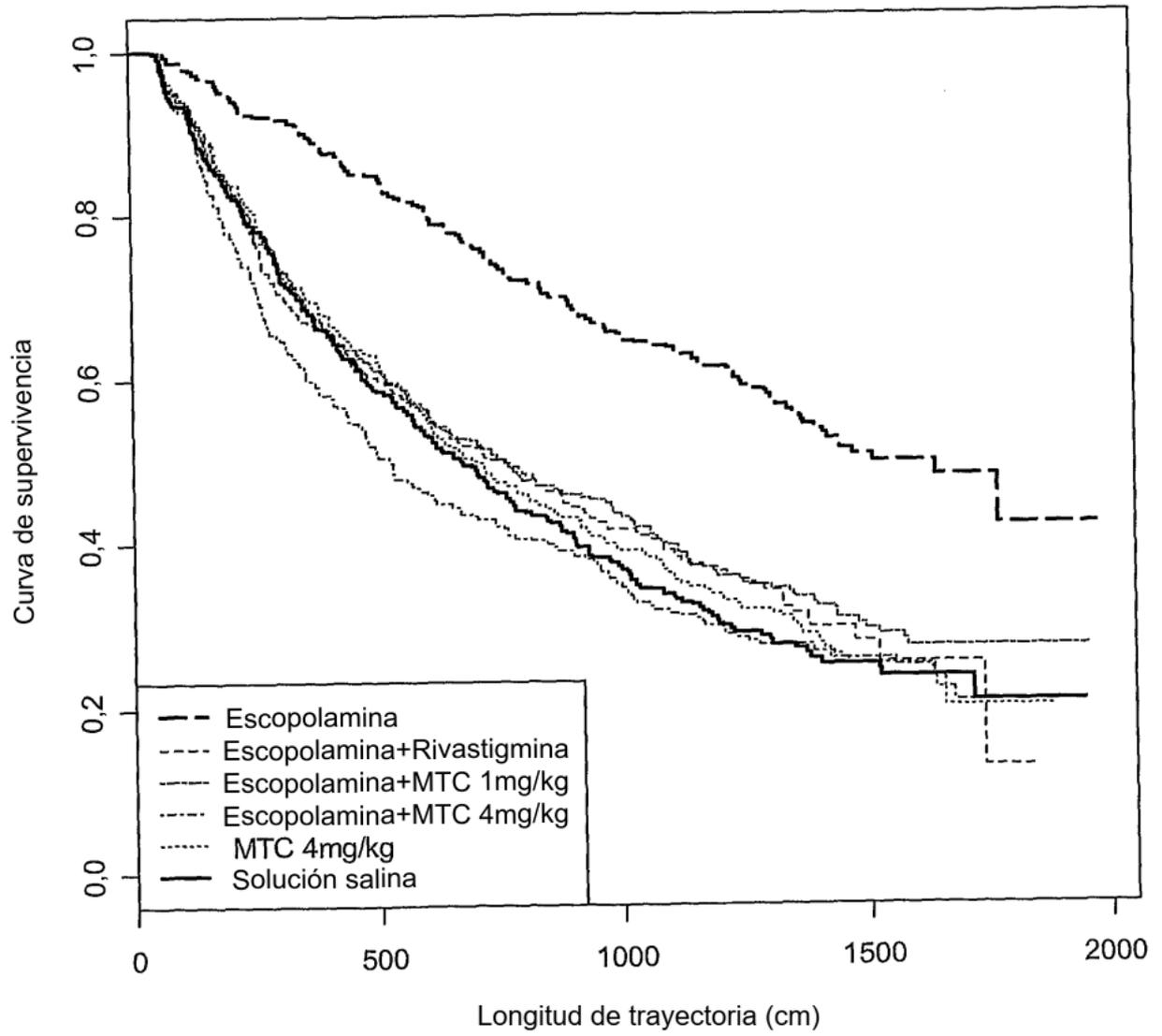


Figura 4

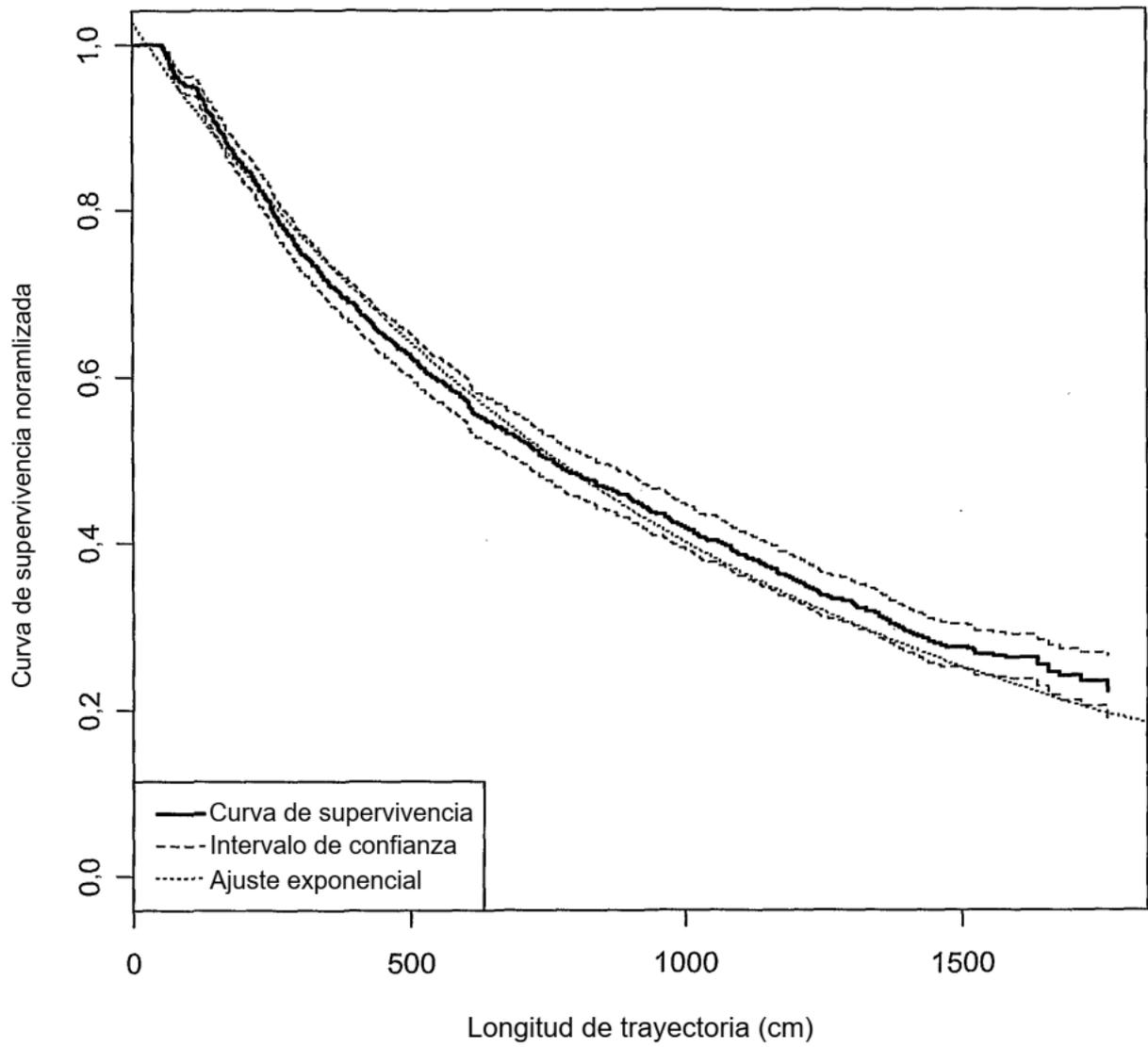


Figura 5

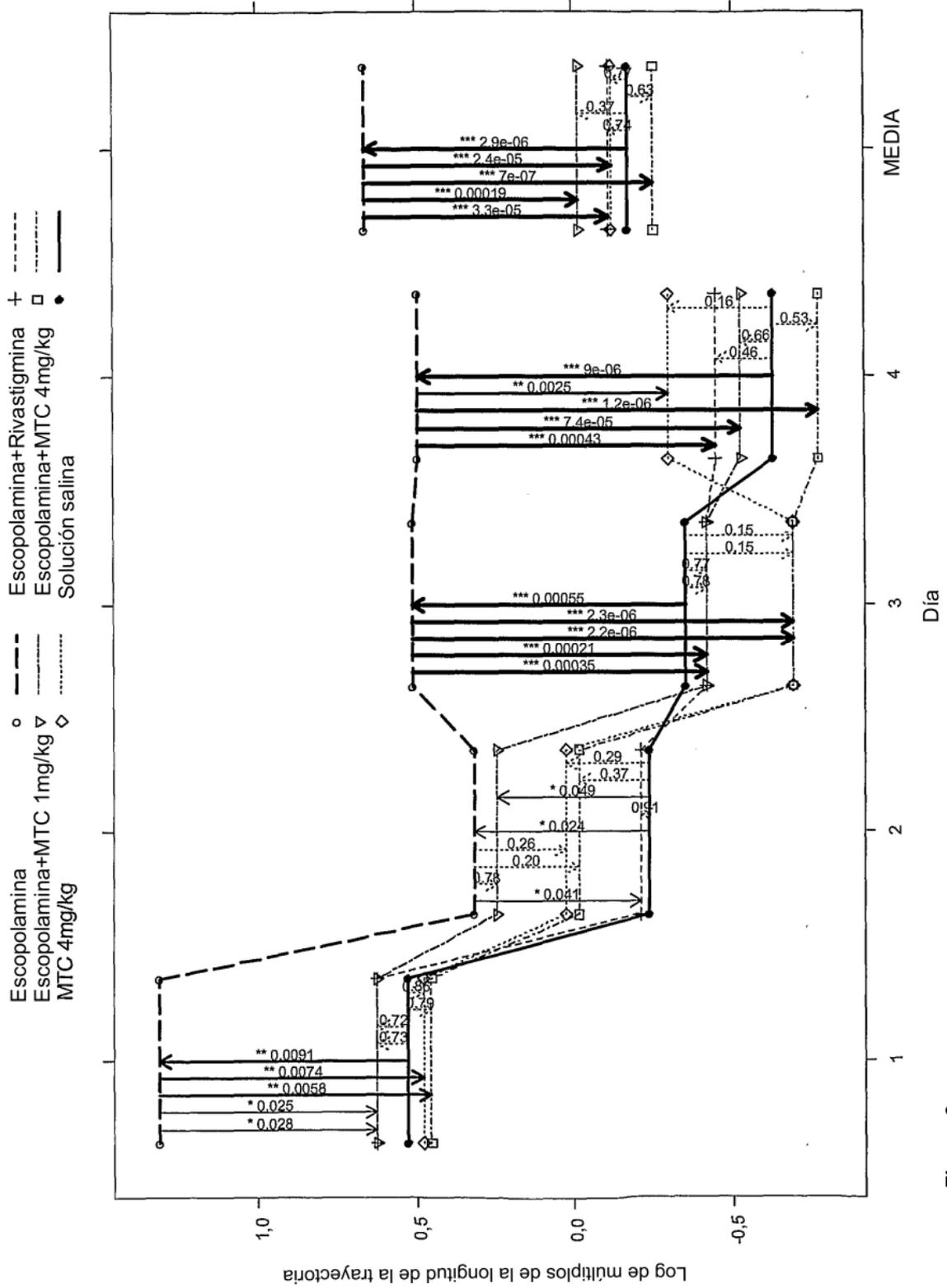


Figura 6

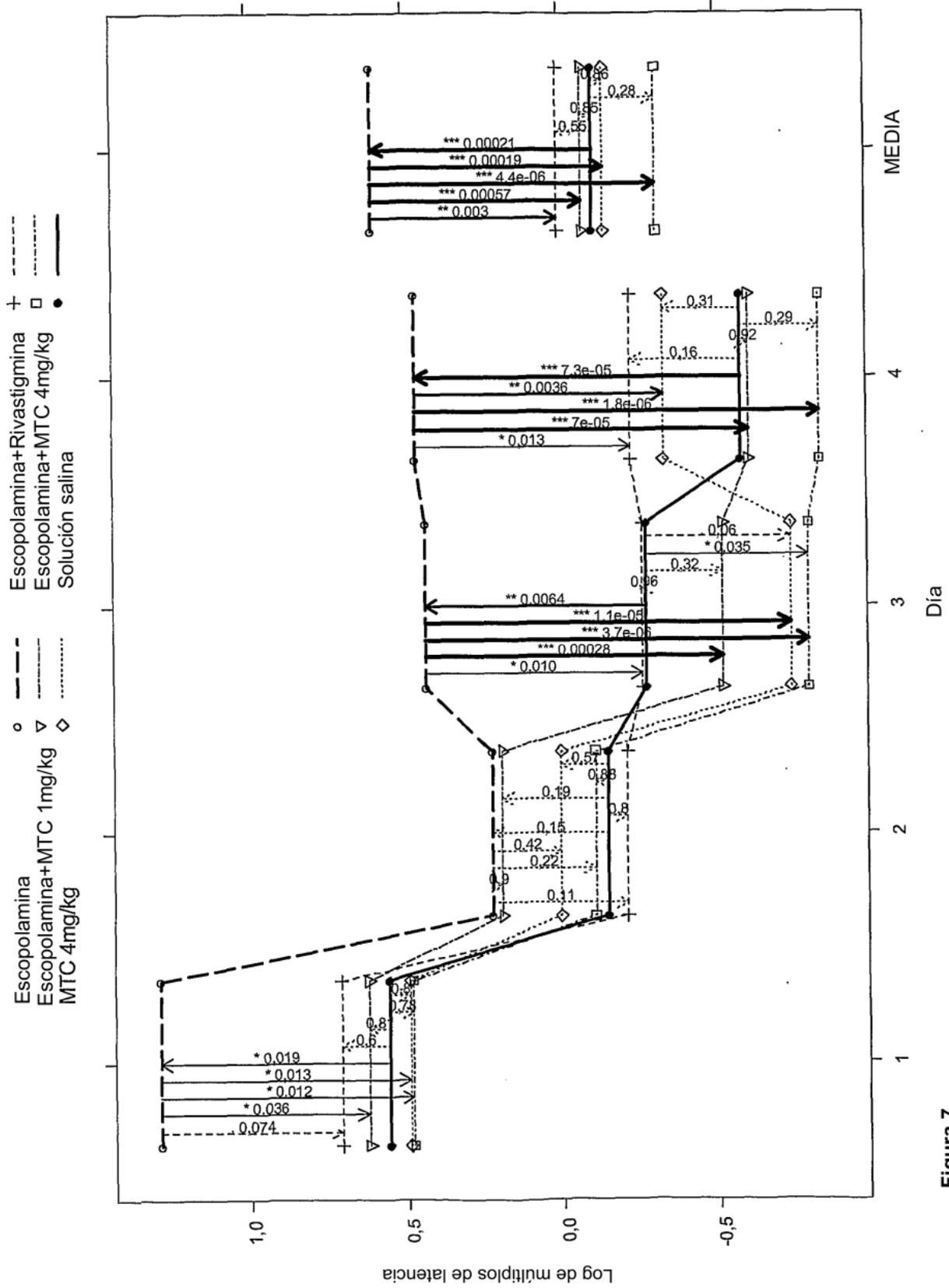


Figura 7

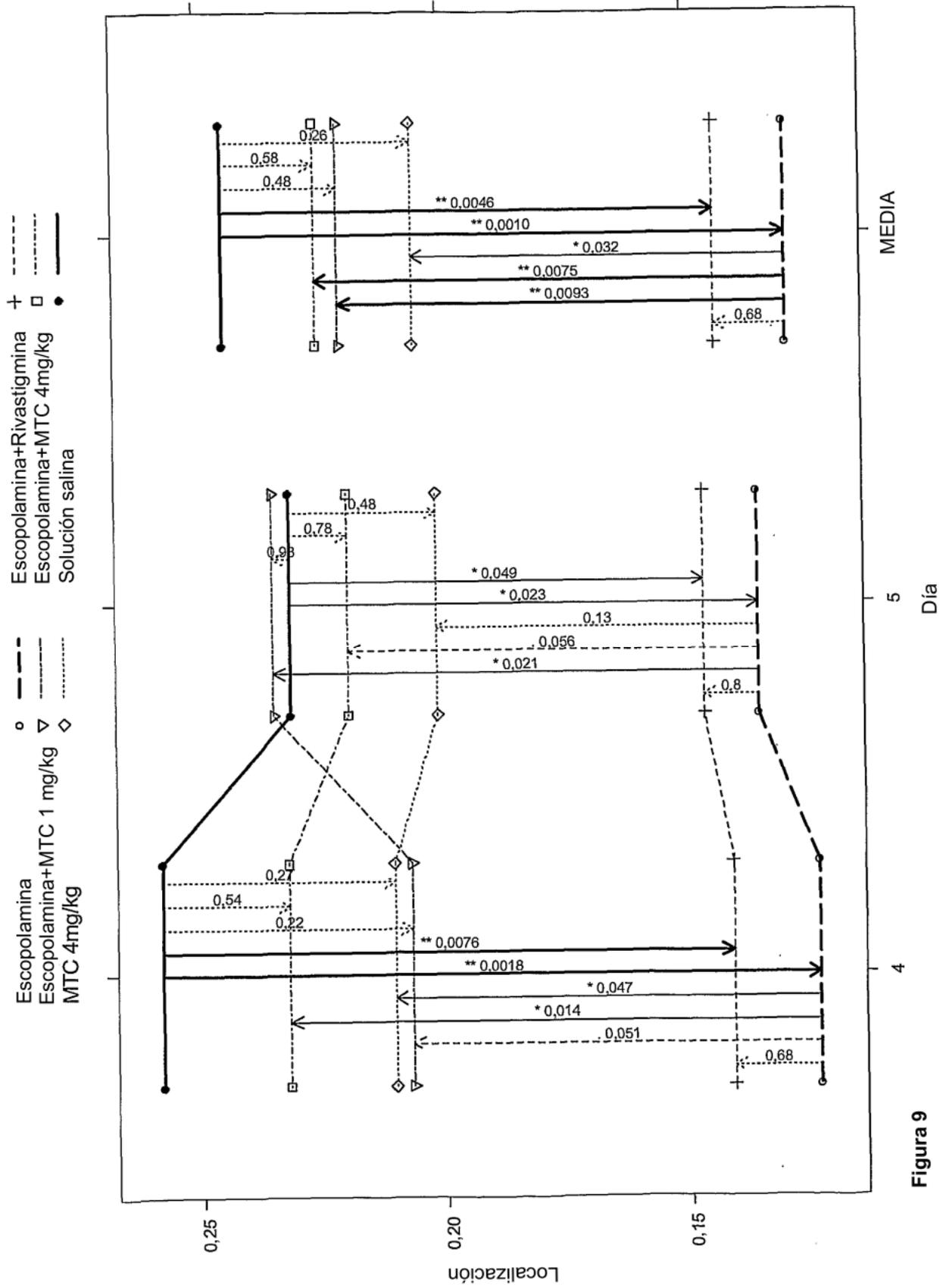


Figura 9

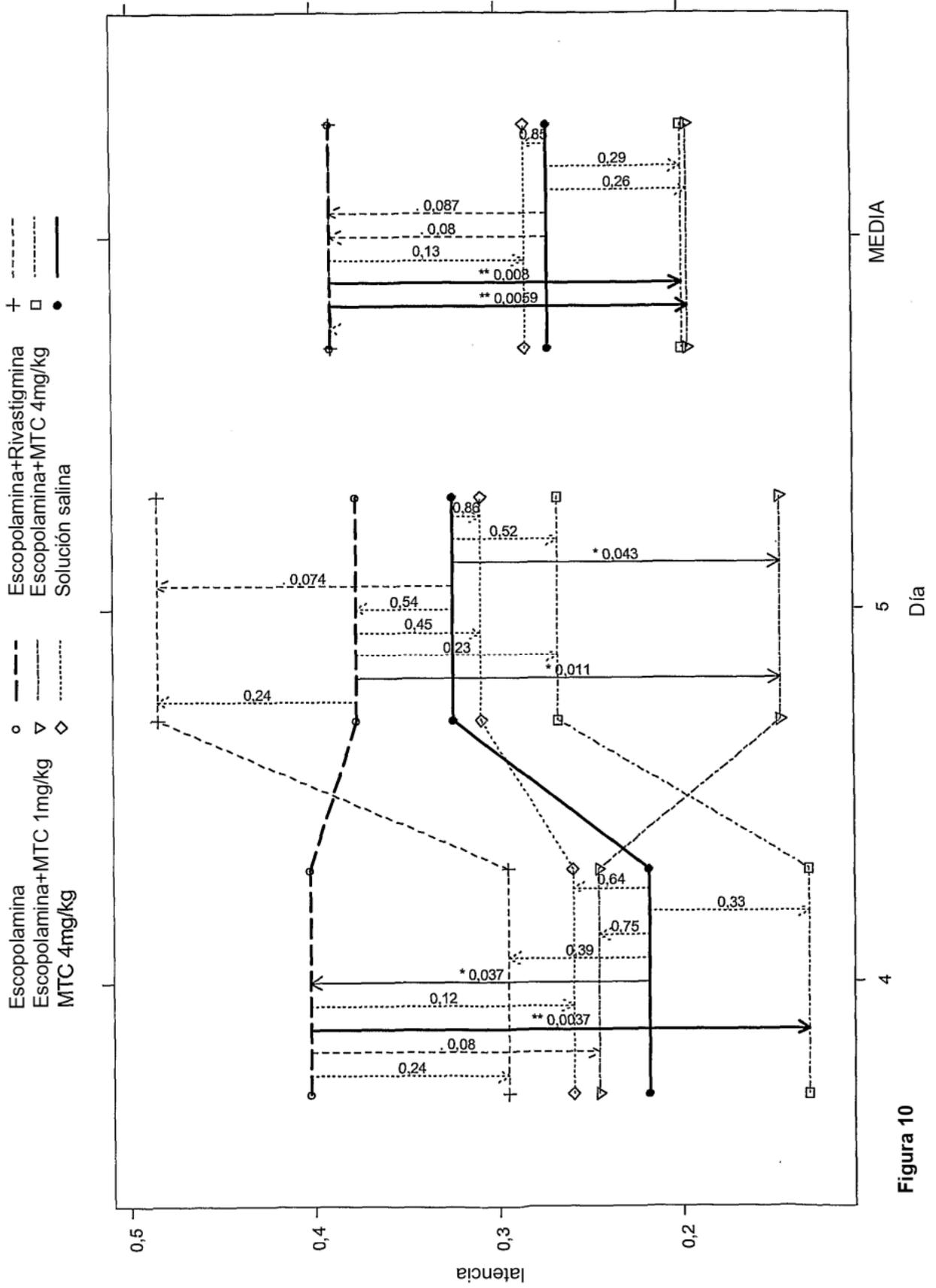


Figura 10

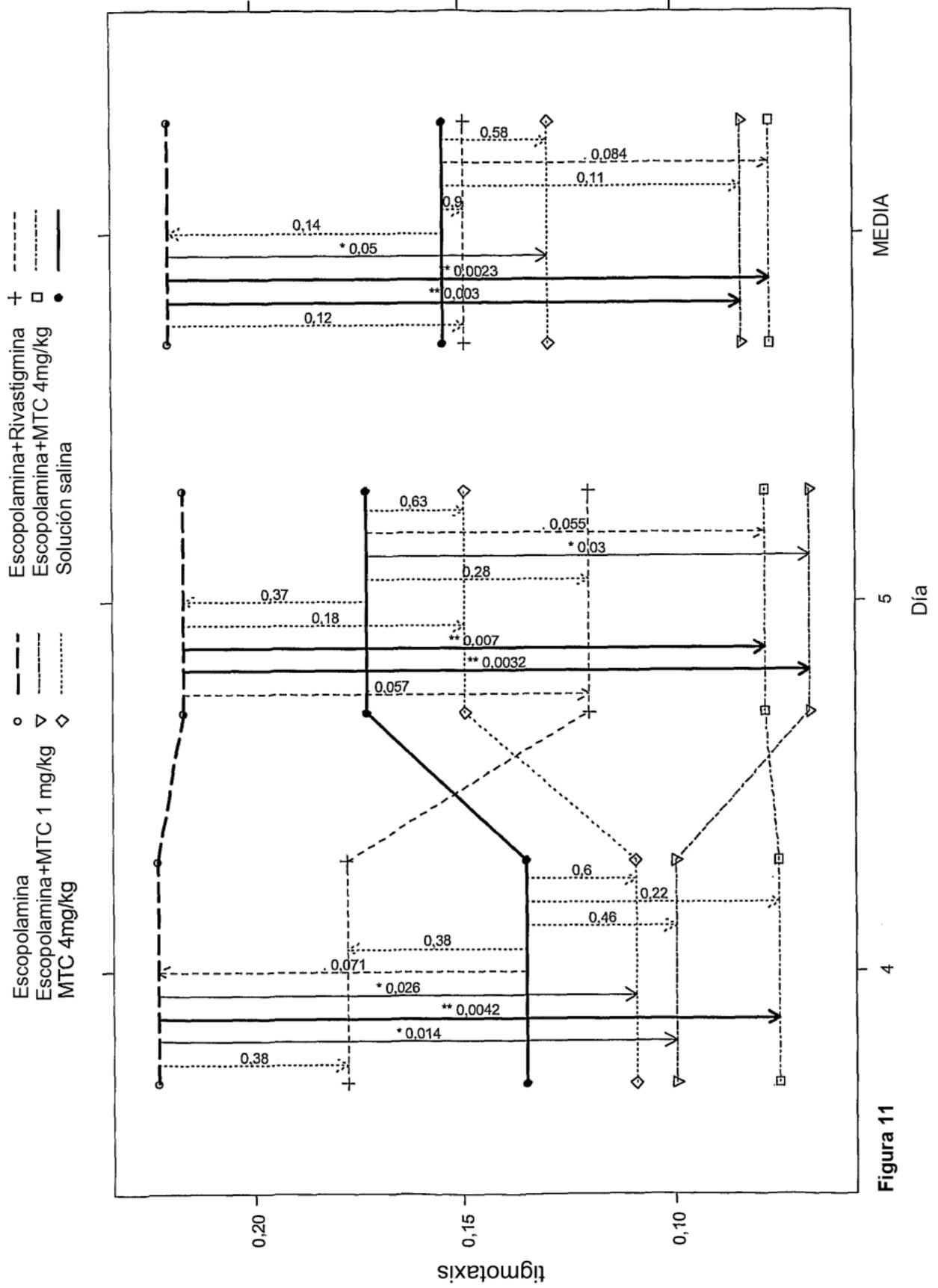


Figura 11

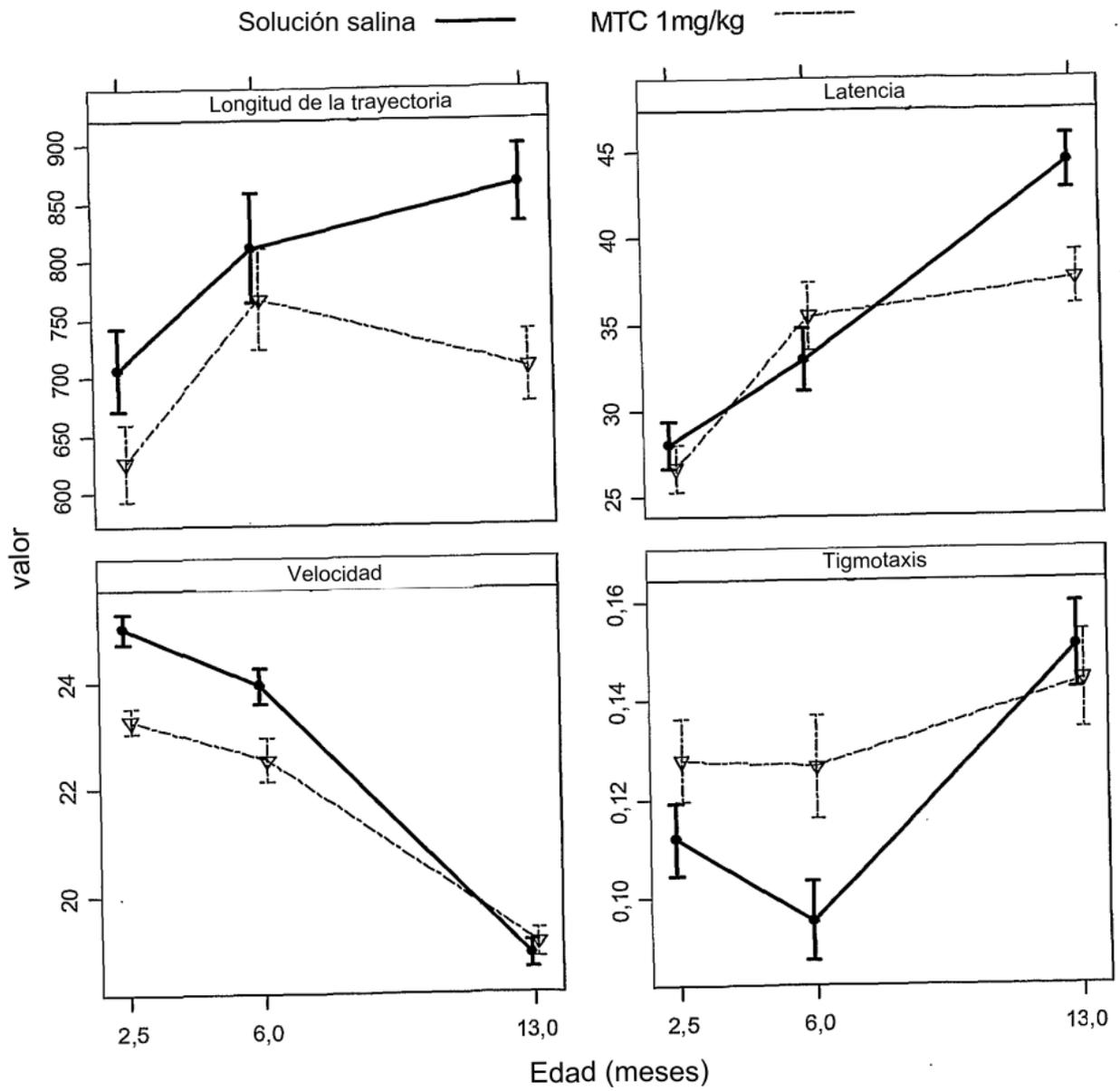


Figura 12

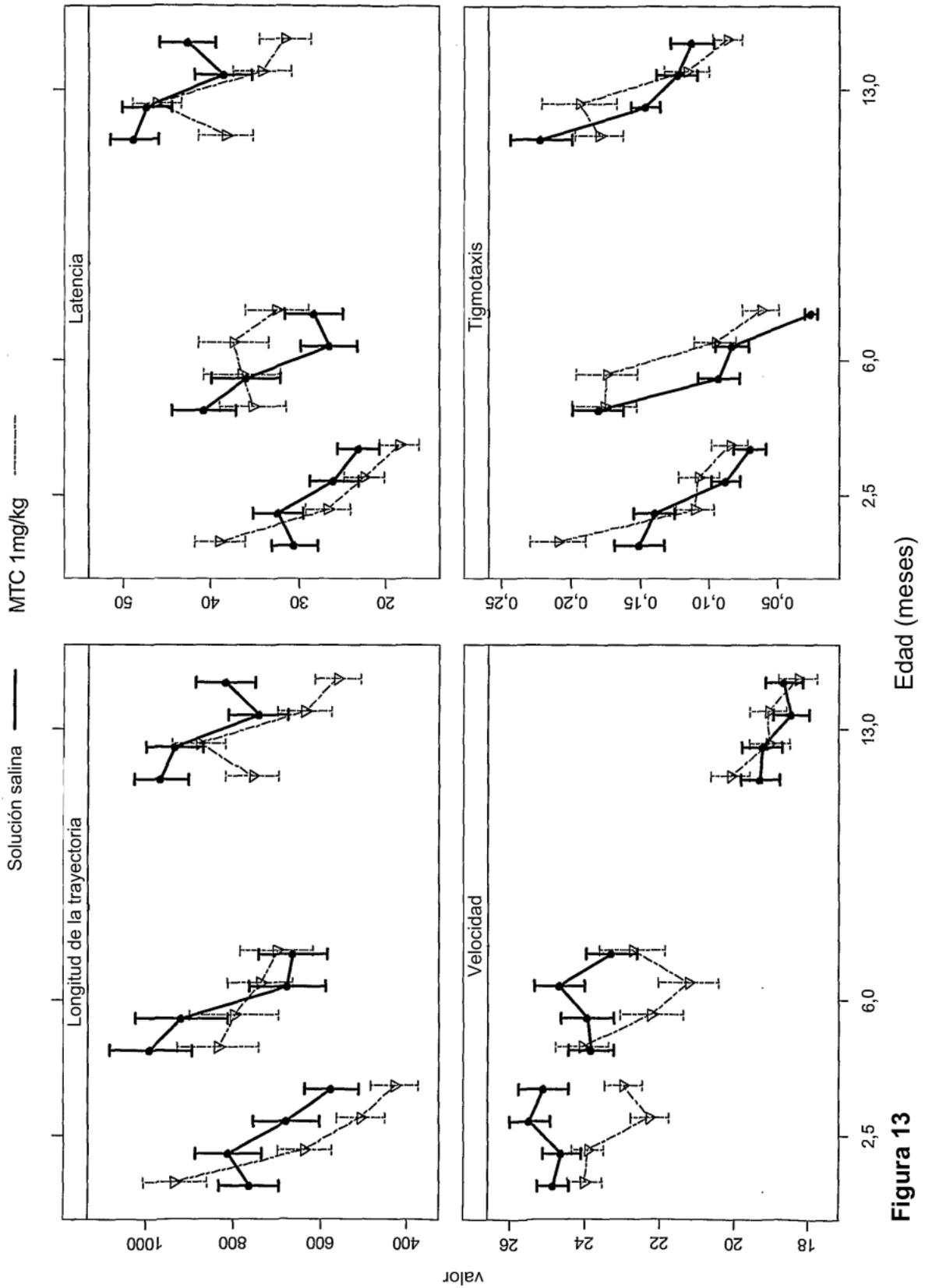


Figura 13

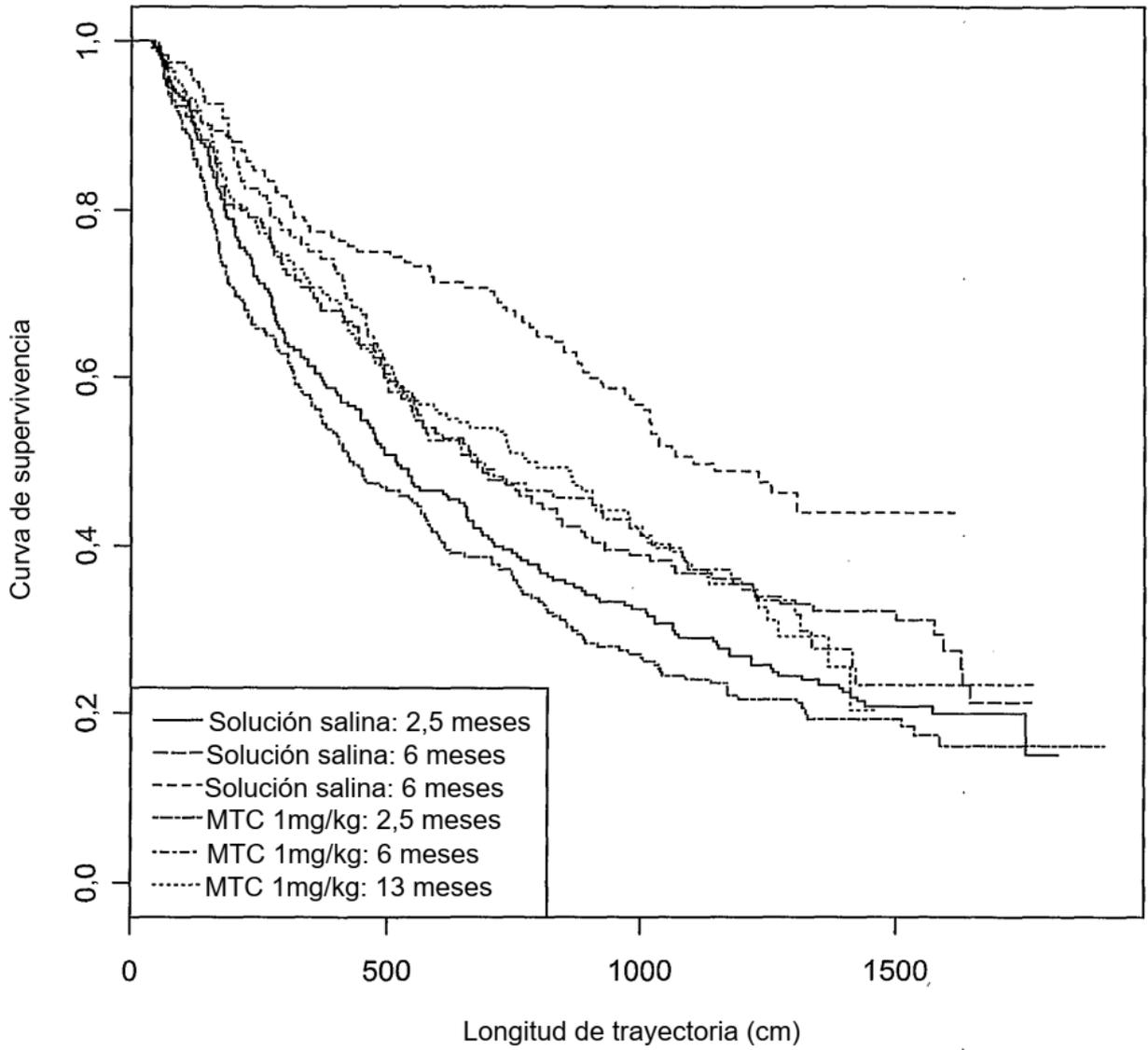


Figura 14

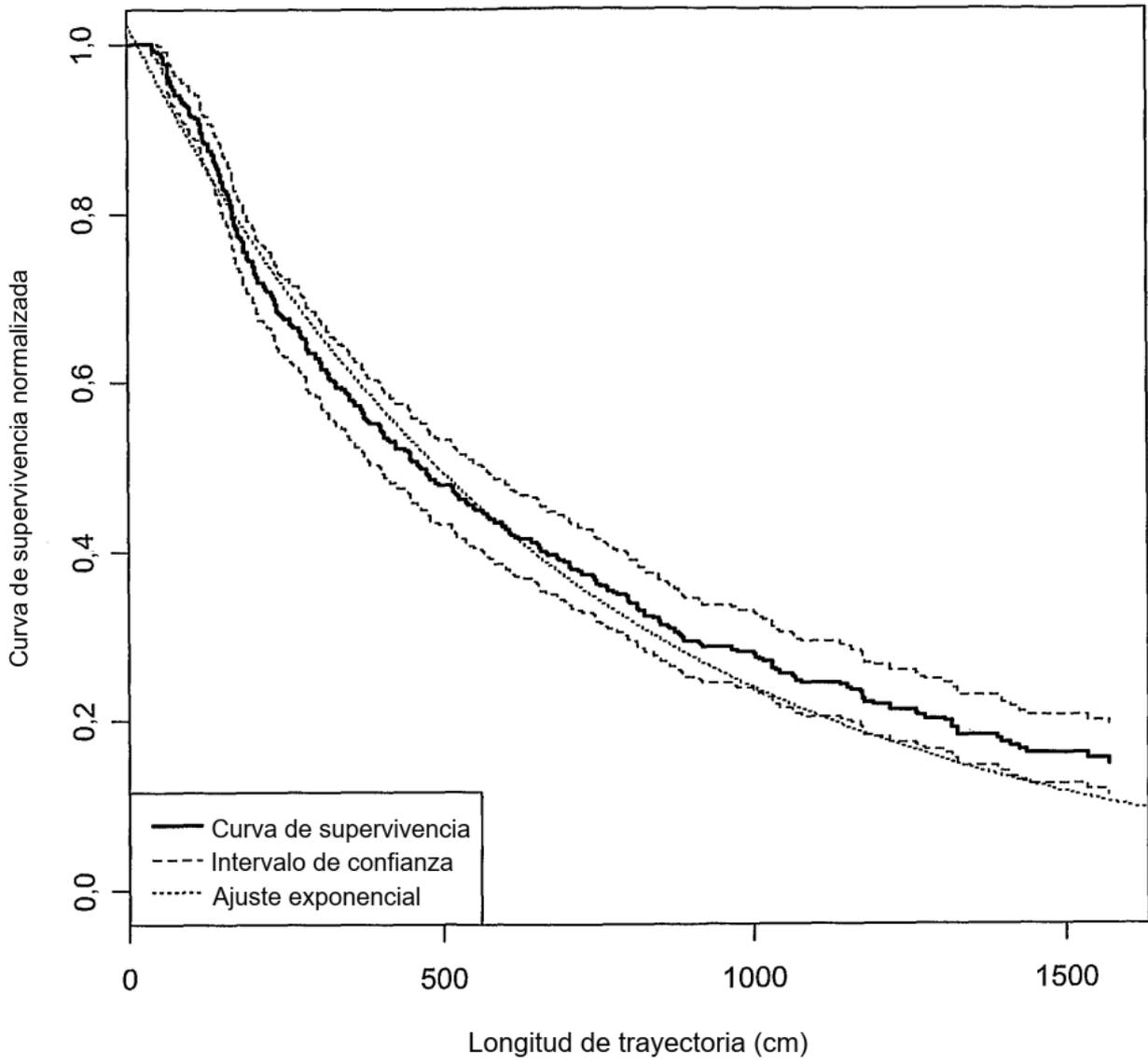


Figura 15

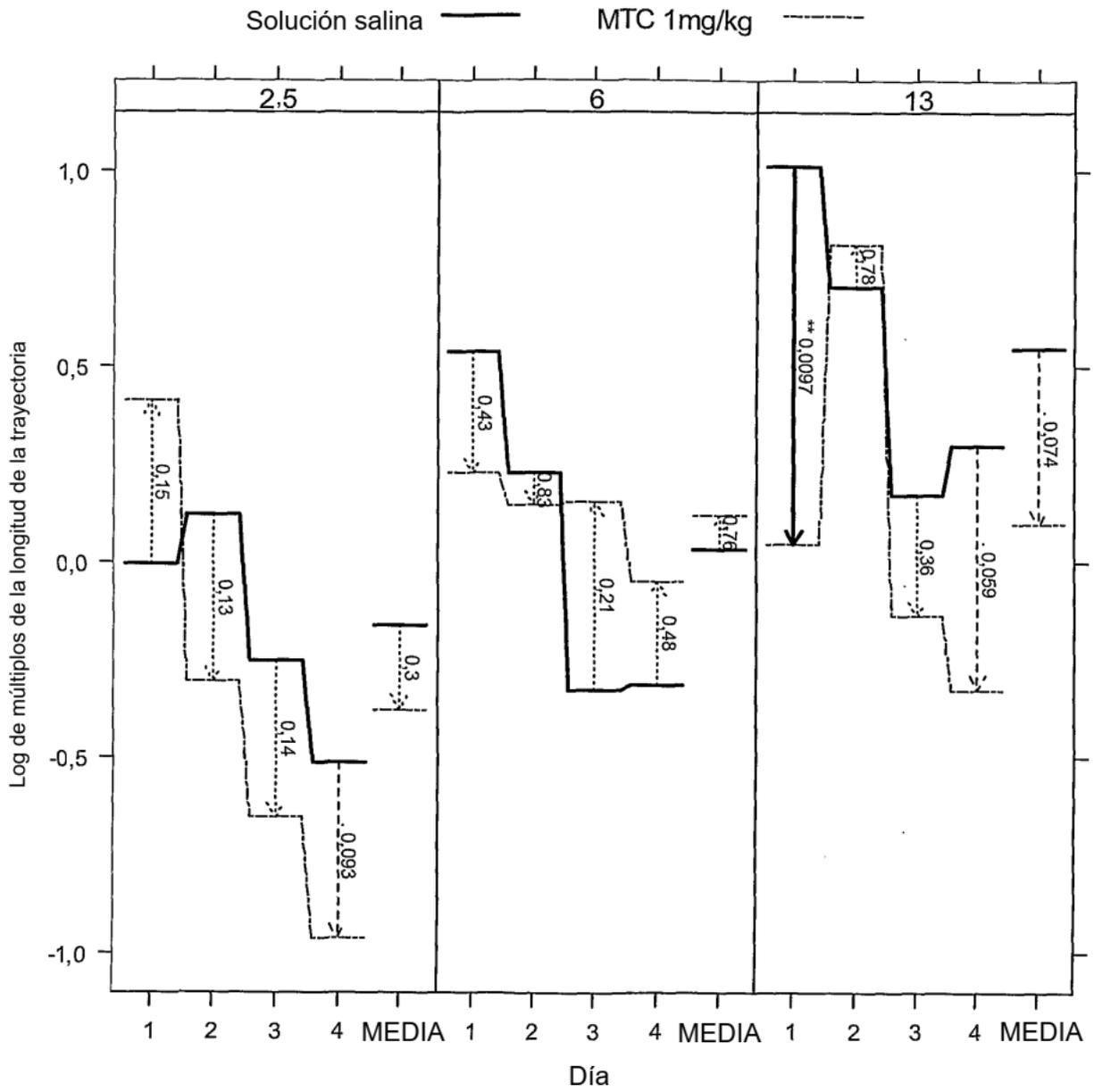


Figura 16

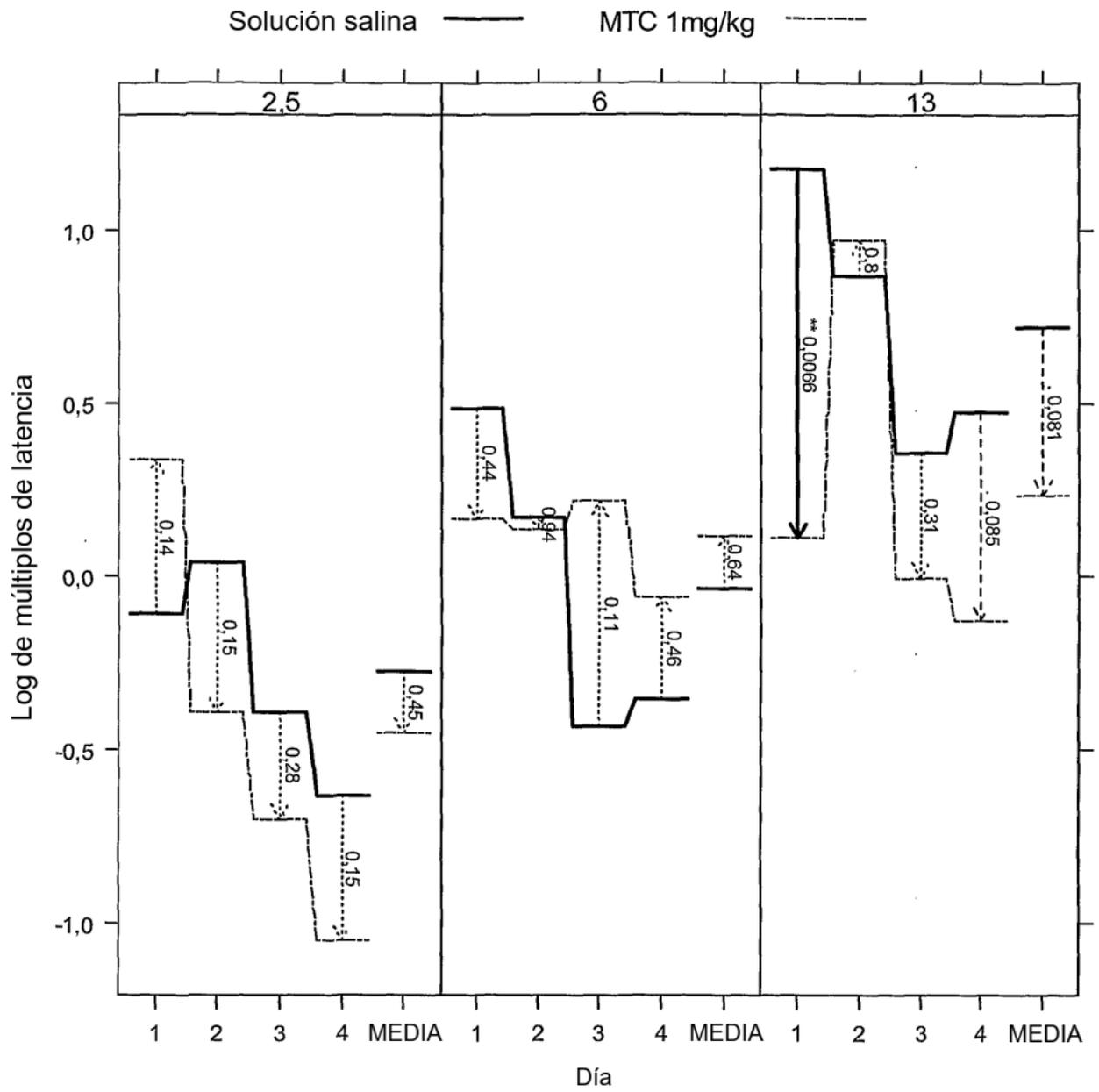


Figura 17

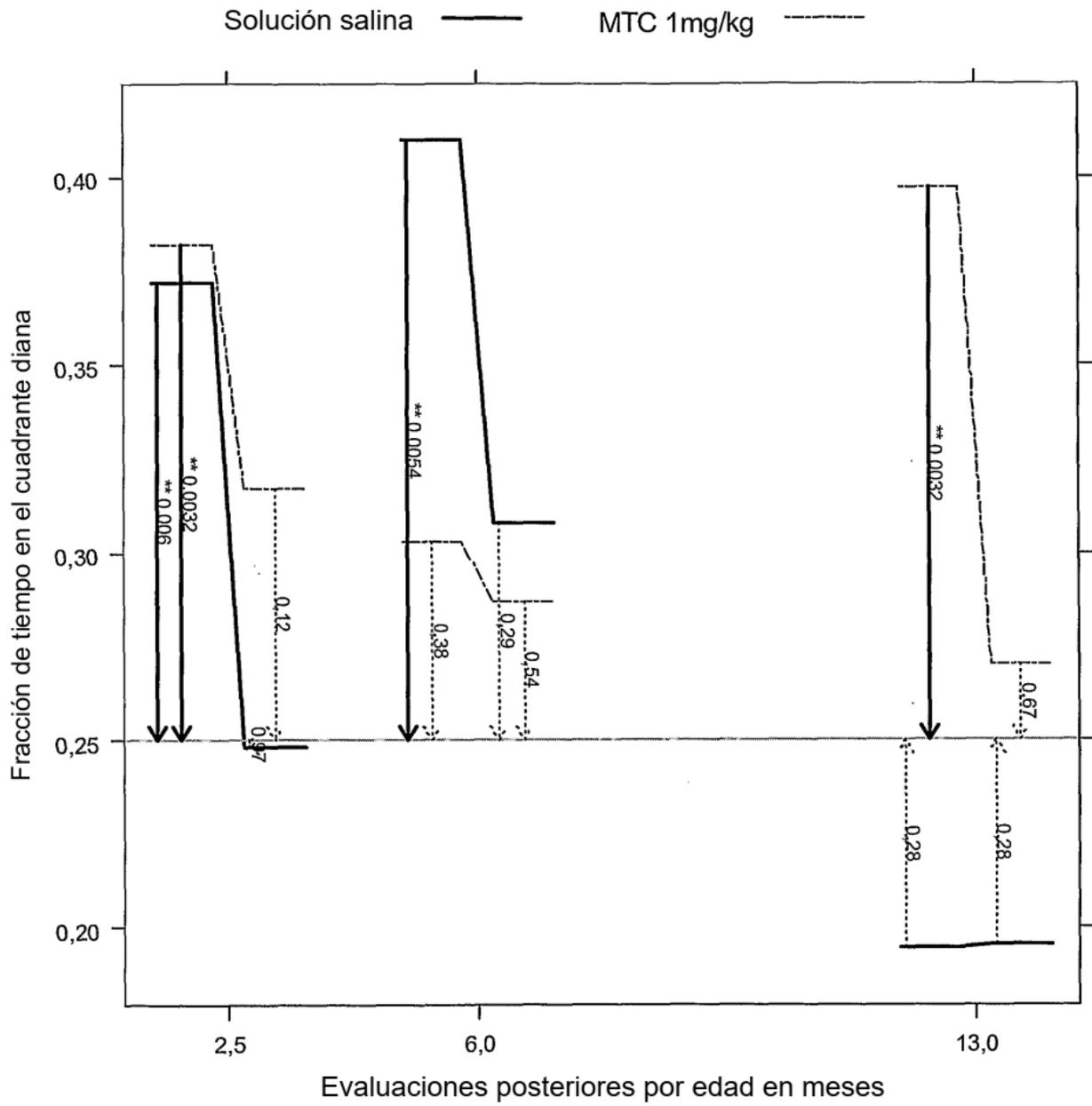
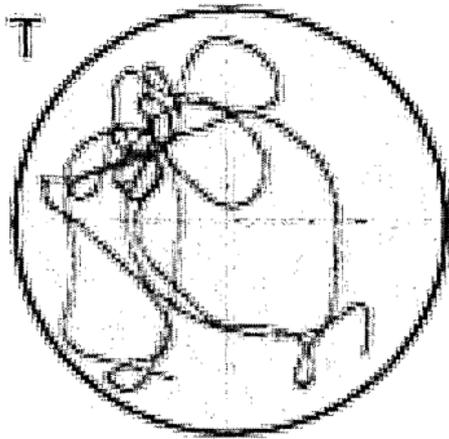
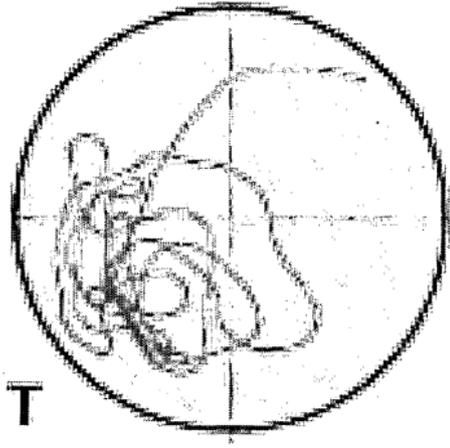


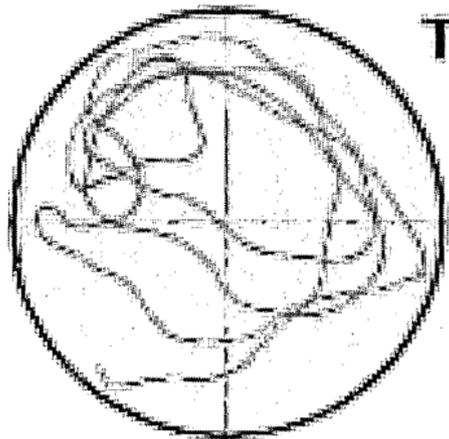
Figura 18



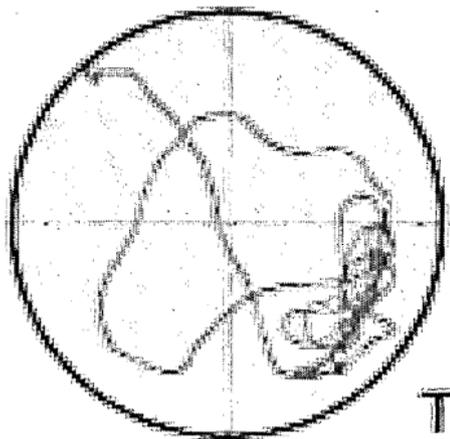
Solución salina 2-3 meses



MTC 1 mg/kg 2-3 meses



Solución salina 13 meses



MTC 1 mg/kg 13 meses

Figura 19

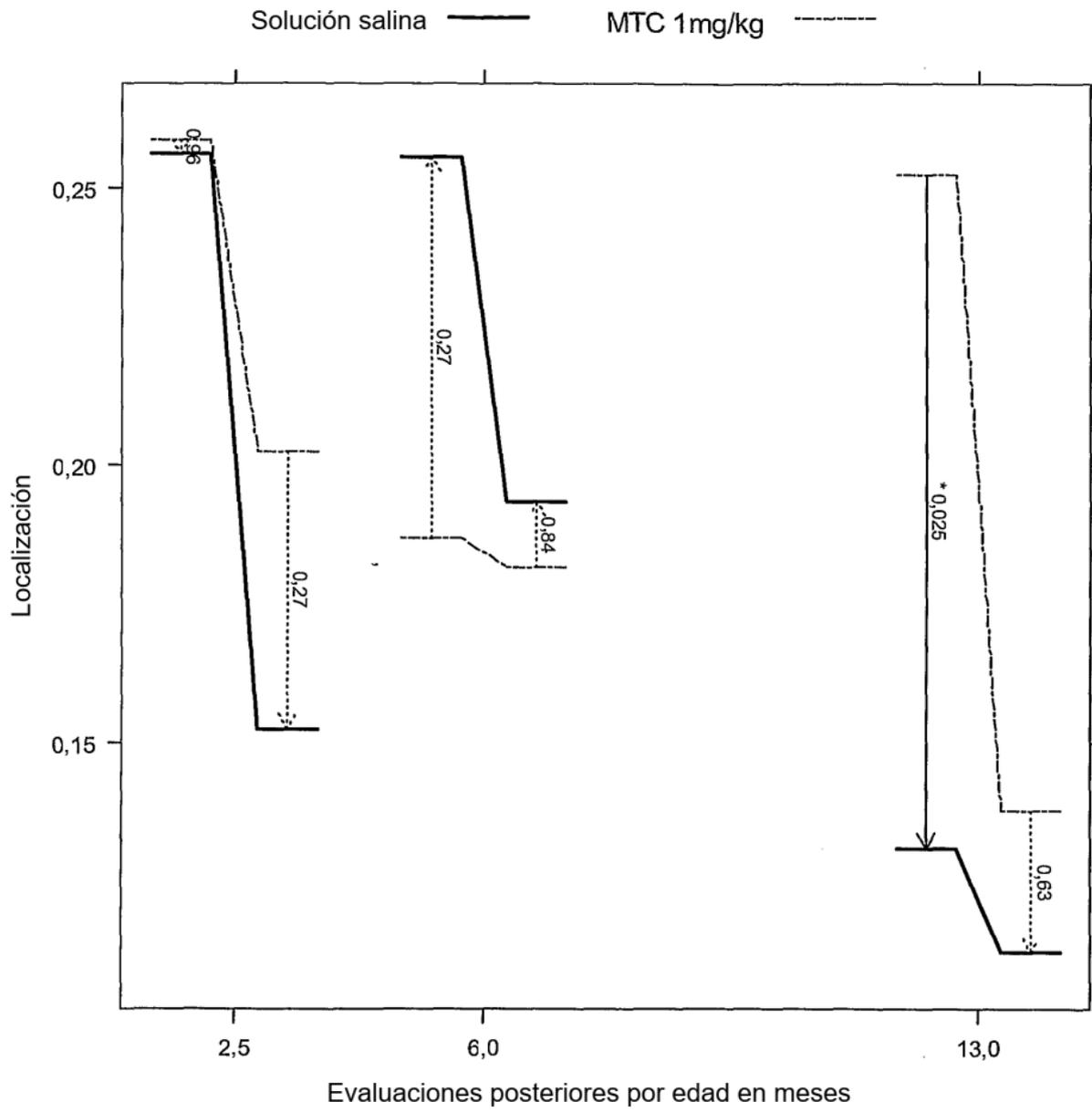


Figura 20

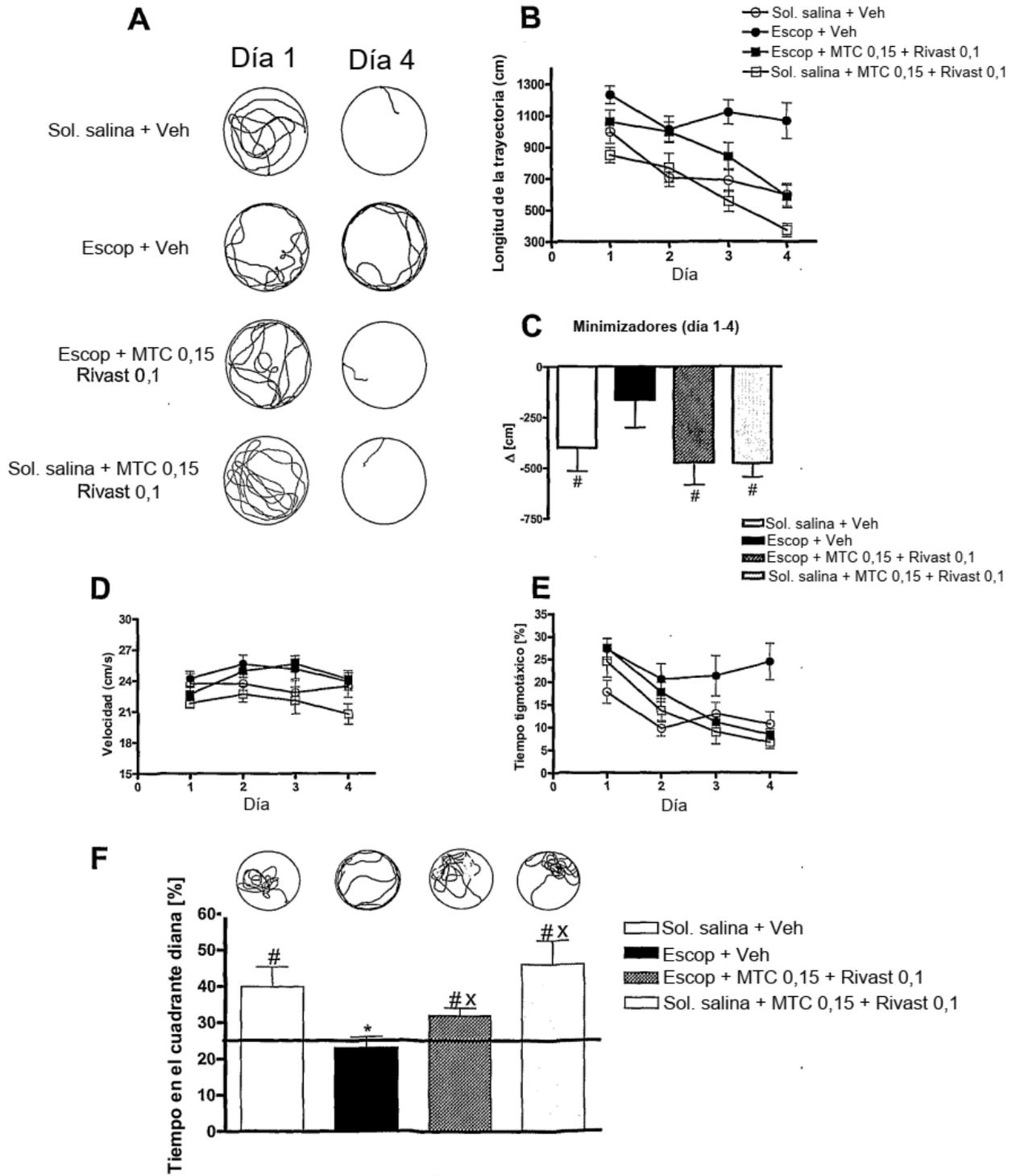


Figura 21