Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICI
PATENTE DE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-187439- -00014-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 124

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-222430- -00000-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 124

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** METODOS Y PRODUCTOS DE FARMACO PARA TRATAR ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC. y TAKEDA PHARMACEUTICAL COM PANY LIMITED

DOMICILIO DURHAM, CAROLINA DEL NORTE, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA y OSAKA, JAPON, respectivamente

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-222430- -00000-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 124

DIRECCIÓN DE NUEVAS [illegible]
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUS[illegible]

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-187439- -00014-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 124

1. Identificación del Tramite

☐ **Conversión** ☒ **Divisi[illegible]**

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC. y TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número_____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América y Japón Respectivamente	One Science Drive, Durham, North Carolina 27708, Estados Unidos de América y 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka 541-0045, Japón Respectivamente	Durham y Osaka Respecticvamente

Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia	C.C. 35.456.344	T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____	Expediente : **13.187.439**	Expediente_____
De: _____	De: _____	De: _____
A: _____	A: _____	A: _____

5. Comprobante de Pago No. 15-102274 **Fecha :** 2015/09/17
Comprobante de Pago No. 15-102271 **Fecha :** 2015/09/17

6. Anexos

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por $478.000.
- [x] Comprobante de pago por 40 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $1.280.000
- [x] Poderes de **ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC. y TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**
- [x] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [ ] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma Luz Clemencia de Páez
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

CPT\SDC\ID-AF283082\WPC20376

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. **13.187.439.** La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de la decisión proferida por ese Despacho por medio de la resolución No. **39046** notificada por fijación en lista del 04 de agosto de 2015. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto 06 de agosto de 2013 y la prioridad que allí se reivindica el 10 de enero de 2011.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. **13.187.439**

MÉTODOS Y PRODUCTOS DE FÁRMACO PARA TRATAR ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Solicitudes Relacionadas

La presente solicitud reclama el beneficio de acuerdo con 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional Norteamericana No. 61/431,370, presentada el 10 de enero del 2011.

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método y producto de fármaco para tratar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la Invención

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, y la causa más común de demencia. Esta enfermedad se manifiesta como una disminución gradual, aunque progresiva, en la memoria, habilidades de pensamiento y comportamiento, que se acelera en forma relativa al envejecimiento normal (Reitz et al. 2011 Nat Rev Neurol 7: 137-152). Eventualmente, los pacientes no tienen la capacidad de reconocer a los familiares o a llevar a cabo las tareas más simples. La enfermedad de Alzheimer, en estos tiempos, es la sexta causa principal de muerte en los Estados Unidos de América (E.U.A.).

Existen dos formas predominantes de la enfermedad: enfermedad de Alzheimer familiar, que es originada normalmente por mutaciones dominantes en uno de los tres genes (APP, PSEN1 o PSEN2). Esta forma de la enfermedad es una enfermedad rara y devastadora, en donde su desarrollo comienza en una edad mediana. La segunda y más común forma de la enfermedad, es la enfermedad de Alzheimer de desarrollo Esporádico o Tardío (en lo sucesivo llamada "enfermedad de Alzheimer" o "AD"). El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer normalmente ocurre después de la edad de 62 años.

Conforme incrementa la longevidad humana y de la población a nivel mundial, de igual manera incrementan los números de personas afectadas globalmente por la enfermedad de Alzheimer. Los costos estimados a nivel mundial de demencia, de la cual la enfermedad de Alzheimer abarca hasta el 80% de los casos, fue de $604 billones de dólares en los Estados Unidos de América en el 2010, lo cual es mayor al 1% del GDP E.U.A. (Wimo and Prince 2010 World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia 1-93). El costo de los cuidados para pacientes con Alzheimer en los Estados Unidos de América, se espera que incremente de $172 millones de dólares en los Estados Unidos en el 2010, a $1.07 Trillones de dólares en los Estados Unidos de América en el 2050 (Alzheimer's Association. "Changing the Trajectory of Alzheimer's Disease: A National Imperative (2010)").

En la actualidad, los pocos fármacos que son aprobados para el tratamiento de esta enfermedad proporcionan cierta liberación sintomática, aunque esto normalmente es de duración relativamente corta, y las terapias no alteran el curso del progreso de la enfermedad ((Alzheimer's Association. "Changing the Trajectory de Alzheimer's Disease: A National Imperative (2010)"). Se necesitan urgentemente terapias que retrasen el desarrollo de la enfermedad, reduzcan el rango del progreso de la enfermedad o que puedan hacer las dos cosas. Las terapias que pueden lograr cualquiera de estas metas, reducirán el número de

individuos con la enfermedad, o reducirán el número de individuos con las etapas de la enfermedad más avanzadas y debilitantes (Brookmeyer et al. 2007 Alzheimers Dement 3: 186-191). Está proyectado que si el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es retardado 5 años debido a la disponibilidad de una terapia de gran avance en el 2015, el 43% de los 13.5 millones de ciudadanos Norteamericanos que se espera tengan la condición en 2050, pueden no tener la enfermedad, y habrá menos personas con la enfermedad avanzada.

El factor de riesgo principal para la enfermedad de Alzheimer es la edad, y la prevalencia de la enfermedad incrementa con la edad (aproximadamente el 10% de los individuos de aproximadamente 65 años, y aproximadamente el 50% de los individuos de aproximadamente 85 años). La incidencia de la enfermedad se duplica cada 5 años después de los 65 años de edad, con el diagnóstico de aproximadamente 1275 nuevos casos por año por 100,000 personas mayores a 65 años de edad (Querfurth et al., 2010 NEJM 362:4). Tanto hombres como mujeres son afectados por la enfermedad de Alzheimer, aunque las mujeres generalmente representan un mayor porcentaje en los casos en general (rigurosamente del 60% al 40%), posiblemente debido a la mayor longevidad. Las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer tienden a vivir en promedio de aproximadamente 3 a 9 años después del diagnóstico.

El alelo de épsilon 4 de APOE, ha sido asociado previamente con el riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. (Pericak-Vance et al. 1991 Am J Hum Genet 48: 1034-1050; Martin et al. 2000 Am J Hum Genet 67: 383-394; Patentes Norteamericanas Nos. 6,027,896 y 5,716,828 de Roses et al.). La relación es el número de copias dependientes (Yoshizawa et al. 1994 Ann Neurol 36: 656-659). Es decir, un transportador de dos alelos APOE4 es más probable que desarrolle enfermedad de Alzheimer de desarrollo tardío (LOAD) que un transportador únicamente un alelo APOE4, y en una etapa más temprana (Corder et al. 1993 Science 261, 921-3).

Sin embargo, los alelos APOE4 únicamente abarcan rigurosamente el 50% del riesgo heredado del desarrollo tardío de la enfermedad de Alzheimer. Una explicación es que APOE4 está sirviendo meramente como un marcador sustituto para algo en el desequilibrio de ligadura cercano. Alternativamente, considerando el reciente descubrimiento de un papel mecánico para APOE4 en la toxicidad mitocondrial, los efectos negativos de APOE4 pueden ser abrogados o exacerbados por otro producto de gen que puede ser codificado en forma cercana (Chang et al. 2005 Proc Natl Acad Sci U S A 102: 18694-18699).

Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer están marcados principalmente por déficit cognitivos incluyendo daño a la memoria, disfunción de lenguaje, y habilidades visuoespaciales; daño funcional que puede abarcar aspectos ocupacionales y sociales (por ejemplo actividades de la vida diaria); y síntomas de comportamiento que incluyen depresión, ansiedad, agresión y psicosis, los cuales, también pueden aparecer conforme la enfermedad progresa en severidad.

En la actualidad, el diagnóstico ambiguo de la enfermedad de Alzheimer requiere descubrimientos clínicos de déficits cognitivos consistentes con AD, y la identificación post-mortem de las patologías del cerebro consistentes con AD. El término demencia AD se utiliza para describir la demencia que se debe a las patofisiologías de la enfermedad de Alzheimer. El término

"enfermedad de Alzheimer probable" se utiliza en la vida, cuando un sujeto demuestra características clínicas de la enfermedad de Alzheimer, y cuando se excluyen otras posibles causas biológicas de demencia (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o ataque).

Actualmente existe una variedad de métodos aceptados en la técnica para el probable diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Normalmente, estos métodos son utilizados en combinación. Estos métodos incluyen determinar la capacidad que tiene un individuo de llevar a cabo las actividades diarias e identificar los cambios en comportamiento y en personalidad. La demencia del tipo AD, también está caracterizada normalmente por una presentación amnésica (déficit de memoria) o déficit en la función de lenguaje, visuoespaciales o ejecutiva. La capacidad/daño cognitivo pueden determinarse a través de métodos bien aceptados en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, instrumentos validados que evalúan la cognición global (por ejemplo la Mini Revisión de Estado Mental Modificado (Modified Mini Mental State Examination) (3MS-E)), y dominios específicos tales como memoria visual y verbal (Revisado) (por ejemplo, Brief Visuospatial Memory Test (BVMT-R) y la Prueba de Aprendizaje Verbal de Hopkins (Hopkins Verbal Learning Test) (Revisado) (HVLT-R), respectivamente), lenguaje (por ejemplo la prueba de Fluidez Verbal Generativa (Generative Verbal Fluency Test) (GVFT)) y la función y atención ejecutiva (por ejemplo, la Prueba de Duración de Dígito (the Digit Span Test) (DST)). La demencia debido a AD también es definida por el desarrollo insidioso y un historial de empeoramiento en el desempeño cognitivo. Los criterios para la "probable enfermedad de Alzheimer", fueron actualizados recientemente por un grupo de trabajo del National Institute de Aging-Alzheimer's Association (McKhann et al. 2011 Alzheimers Dement 7: 263-269). Este grupo de trabajo recomendó que, para personas que presentan primero las características clínicas centrales de demencia de enfermedad de Alzheimer, la evidencia de biomarcadores asociados con la enfermedad puede incrementar la certeza del diagnóstico.

En virtud del hecho de que más de 4.5 millones de personas en los Estados Unidos de América solamente, padecen de enfermedad de Alzheimer (y este número continuará creciendo conforme envejece la población, la naturaleza degenerativa y debilitante cruel e implacable de la enfermedad de Alzheimer conforme se desarrolla, y los altos costos asociados con el cuidado de las personas que padecen de la enfermedad de Alzheimer, existe una necesidad real e inmediata de una terapia médica efectiva que pueda retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Breve Descripción de la Invención

Aquí se proporcionan composiciones que incluyen pioglitasona de baja dosis, en donde las composiciones son útiles para tratar daño cognitivo leve (por ejemplo, daño cognitivo del tipo de Alzheimer). En algunas modalidades, el tratamiento incluye retardar el desarrollo del daño cognitivo leve. En algunas modalidades, el tratamiento incluye retardar el desarrollo del daño cognitivo leve en un sujeto cognitivamente normal. En algunas modalidades, el retraso incluye retardar el desarrollo del daño en la memoria de episodios.

En algunas modalidades, el tratamiento incluye retardar el desarrollo de daño cognitivo leve en un sujeto humano que tiene riesgo incrementado de desarrollar daño cognitivo en los siguientes 5 a 7 años, en donde el daño está basado en la edad

del sujeto, o basado en la edad del sujeto y el genotipo TOMM40 rs10524523.

En algunas modalidades, la pioglitazona de dosis bajas se administra en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo que tiene de 0.5, 1, 1.5 o 2, a 6, 8, 10 o 12 miligramos de pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona el uso de pioglitazona de dosis baja en la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de daño cognitivo leve (por ejemplo, daño cognitivo del tipo Alzheimer). En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es una tableta. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es una cápsula. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es una pastilla. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es un líquido. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica es un sólido o semi-sólido.

También se proporciona una composición que incluye pioglitazona de dosis baja para utilizarse en el tratamiento de disminución cognitiva.

Se proporcionan además métodos para tratar daño cognitivo leve (por ejemplo, daño cognitivo del tipo de Alzheimer) en un sujeto humano que necesita del mismo, en donde los métodos comprenden administrar al sujeto pioglitazona de dosis baja. En algunas modalidades, el tratamiento incluye retardar el desarrollo de daño cognitivo leve. En algunas modalidades, el tratamiento incluye retardar el desarrollo de daño cognitivo leve en un sujeto cognitivamente normal. En algunas modalidades, el retraso incluye retardar el desarrollo de daño en la memoria de episodios.

En algunas modalidades, el sujeto está en riesgo incrementado de desarrollar daño cognitivo del tipo Alzheimer en los siguientes 5 a 7 años, estando basado el riesgo en la edad del sujeto, o basado en la edad del sujeto y el genotipo rs10524523 ('523).

En algunas modalidades, el sujeto tiene al menos 50, 55, 60, 62, 68, o 70 años de edad.

En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto Caucásico. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto no Caucásico.

En algunas modalidades, el sujeto no tiene uno o dos alelos APOE2.

En algunas modalidades, se administra pioglitazona de dosis baja en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, teniendo de 0.5, 1, 1.5 o 2, a 6, 8, 10 o 12 miligramos de pioglitazona. En algunas modalidades, la administración es una vez al día.

En algunas modalidades, la pioglitazona se proporciona como, o se administra en una dosificación que proporciona una AUC de aproximadamente 0.15 µg•h/mL hasta aproximadamente 3.6 µg•h/mL. En algunas modalidades, la pioglitazona se proporciona en la forma de, o se administra en una dosificación que proporciona una AUC de 0.12 µg•h/mL a 4.5 µg•h/mL. En algunas modalidades, la pioglitazona se proporciona en la forma de, o se administra en una dosificación que proporciona una AUC de 0.12 µg•h/mL a 3.4 µg•h/mL.

También se proporcionan métodos para tratar la disminución cognitiva en un sujeto humano que necesita de los mismos, que incluyen administrar al sujeto pioglitazona de dosis baja.

Se proporcionan aún además métodos para determinar el riesgo incrementado de desarrollar daño cognitivo del tipo Alzheimer en un sujeto humano, en una edad o rango de edad predeterminado que incluye:

detectar de una muestra biológica del sujeto el genotipo '523 del sujeto, en donde cada alelo de '523 es asignado como:

(a) corto (S, menos de 19 residuos T);

(b) largo (L, 19 a 29 residuos); o

(c) muy largo (VL, 30 o más residuos); y

determinar a partir del genotipo '523, si el sujeto está en un riesgo incrementado en desarrollar daño cognitivo del tipo de Alzheimer en la edad o rango de edad predeterminada, en donde:

(1) edad mayor a aproximadamente 62 y L,L o L,VL indica riesgo incrementado;

(2) edad mayor a aproximadamente 62 y VL,VL no indica riesgo incrementado;

(3) edad mayor a aproximadamente 74 y S,L indica riesgo incrementado;

(4) edad mayor a aproximadamente 77 y S,S indica riesgo incrementado; y

(5) edad mayor a aproximadamente 76 y S,VL indica riesgo incrementado.

En algunas modalidades, la determinación incluye además detectar a partir de una muestra biológica de del sujeto, el genotipo APOE del sujeto, en donde la presencia de un alelo APOE2 en el genotipo indica que el sujeto no está en riesgo incrementado.

También se proporcionan métodos para determinar si se administra pioglitazona de dosis baja a un sujeto humano para el tratamiento de daño cognitivo del tipo de Alzheimer, que incluye:

detectar a partir de una muestra biológica del sujeto el genotipo '523 del sujeto, en donde cada alelo es asignado:

(a) corto (S, menos de 19 residuos T);

(b) largo (L, 19-29 residuos); o

(c) muy largo (VL, 30 o más residuos); y

determinar a partir del genotipo '523 y de la edad del sujeto humano, si se administra pioglitazona de dosis baja al sujeto para el tratamiento de daño cognitivo del tipo de Alzheimer, en donde:

(1) la edad mayor a aproximadamente 62 y L,L o L,VL indica tratamiento;

(2) la edad mayor a aproximadamente 62 y VL.VL no indica tratamiento;

(3) la edad mayor a aproximadamente 74 y S,L indica tratamiento;

(4) la edad mayor a aproximadamente 77 y S,S indica tratamiento; y

(5) la edad mayor a aproximadamente 76 y S,VL indica tratamiento.

En algunas modalidades, la determinación incluye además detectar a partir de la muestra biológica del sujeto, el genotipo APOE del sujeto, en donde la presencia de un alelo APOE2 en el genotipo no indica tratamiento.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos o composiciones anteriores, el sujeto tiene una cognición normal.

Aún además se proporcionan métodos para retardar el desarrollo de enfermedad de Alzheimer, en donde el método comprende (a) detectar una variante para el gen TOMM40 en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, y (b) administrar un producto de fármaco que contiene pioglitazona de dosis baja o sal de pioglitazona efectiva, al sujeto en riesgo detectado con la variante TOMM40 para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, la presente invención contempla (a) detectar una variante del gen de

TOMM40, tal como el alelo poli-T largo (más de 19 residuos de Timidina), en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, y (b) administrar una cantidad efectiva de una pioglitazona de dosis baja o un producto de fármaco de sal de pioglitazona al sujeto que está en riesgo detectado con la variante del alelo poli-T del gen de TOMM40, quien por ejemplo, puede estar en un estado cognitivo normal, para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

También se proporcionan métodos para retardar el desarrollo de una o más etapas de progreso a la enfermedad de Alzheimer, tal como la etapa de daño cognitivo leve, la etapa de daño cognitivo leve amnésico, la etapa de enfermedad de Alzheimer preclínica y/o la etapa de enfermedad de Alzheimer prodromal, en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, en donde el método comprende: (a) detectar en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer una variante del gen TOMM40, tal como un alelo poli-T largo (más de 19 residuos de Timidina); y (b) administrar un producto de fármaco que contiene una cantidad efectiva de pioglitazona de dosis baja o una sal de pioglitazona al sujeto en riesgo, en quien se ha detectado que la variante TOMM40 retarda el desarrollo de una o más de las etapas que progresan a la enfermedad de Alzheimer, incluyendo cualquier daño cognitivo u otra etapa, para retardar el desarrollo de enfermedad de Alzheimer en el sujeto en riesgo. Deberá quedar entendido, que de acuerdo con este método de la presente invención, el sujeto en riesgo, al momento de la detección de la variante y/o tratamiento TOMM40, puede estar en una etapa cognitiva normal o en cualquiera de las etapas que progresan a la enfermedad de Alzheimer.

El resumen anterior no está proyectado para describir cada modalidad descrita o cada implementación de la presente invención. La descripción que se encuentra a continuación, ejemplifica de manera más particular modalidades ilustrativas. En diversos lugares a lo largo de la solicitud, se proporciona guía a través de listas de ejemplos, en donde los ejemplos pueden ser utilizados en varias combinaciones. En cada caso, la lista mencionada ha sido únicamente como un grupo representativo y no debe ser interpretada como una lista exclusiva.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1, presenta imágenes fMRI de cerebro de rata en múltiples dosis de PIO relativas al control de vehículo. El panel superior muestra la señal fMRI promedio del grupo en la línea de base; el panel inferior ilustra la señal fMRI promedio del grupo en el día 7 del tratamiento. Este análisis muestra que la HCl de pioglitazona en dosis tan bajas como 0.04 mg/kg/día, induce un cambio en el metabolismo en la estructura subcortical profunda de cerebro de rata.

La figura 2, presenta una gráfica de la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo Alzheimer para cada uno de los genotipos TOMM40 523. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin daño cognitivo, en tanto que el eje X representa la edad. Los datos fueron obtenidos de los sujetos del cohorte Duke Bryan ADRC N = 438, 106 diagnosticados con daño cognitivo leve, 332 cognitivamente normales. N para cada genotipo: L,L:23; L,VL:54; S,L:72; S,S:100; S,VL:138; VL,VL:51.

La figura 3, presenta la curva que muestra la edad del desarrollo de daño cognitivo leve del tipo Alzheimer para individuos que poseen el genotipo S,L 523. El eje Y muestra el

porcentaje de supervivencia sin daño cognitivo en tanto que el eje X representa la edad. La curva muestra una pendiente pronunciada que comienza en la edad de 74 (línea vertical). Los individuos que ingresan a la prueba en, o con una edad superior a 74 que poseen el genotipo S,L 523, están el alto riesgo de desarrollar daño cognitivo leve durante los siguientes 5 años. Los datos se obtienen del cohorte Duke Bryan ADRC, N=72 sujetos, 23 diagnosticados con daño cognitivo, 49 cognitivamente normales.

La figura 4, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo Alzheimer del genotipo 523 L,L. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Los datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=23 sujetos, 11 fueron diagnosticados con CI, 12 cognitivamente normales.

La figura 5, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo de Alzheimer para el genotipo 523 L,VL. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=54 sujetos, 24 diagnosticados con CI, 30 cognitivamente normales.

La figura 6, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo de Alzheimer para el genotipo 523 S,L. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=72 sujetos, 23 diagnosticados con CI, 49 cognitivamente normales.

La figura 7, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo de Alzheimer para el genotipo 523 S,S. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=100 sujetos, 20 diagnosticados con CI, 80 cognitivamente normales.

La figura 8, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo de daño cognitivo del tipo de Alzheimer para el genotipo 523 S,VL. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=138 sujetos, 22 diagnosticados con CI, 116 cognitivamente normales.

La figura 9, presenta la curva que muestra la edad en el desarrollo del daño cognitivo del tipo de Alzheimer para el genotipo 523 VL.VL. El eje Y muestra el porcentaje de supervivencia sin CI, en tanto que el eje X representa la edad. Datos obtenidos del cohorte Duke Bryan ADRC N=51 sujetos, 6 diagnosticados con CI, 45 cognitivamente normales.

Descripción Detallada de la Invención

A manera de ilustración y para proporcionar una apreciación más completa de la presente invención y muchas de las ventajas de la misma, se proporcionan la siguiente descripción detallada y en los ejemplos con respecto a los métodos y composiciones novedosas.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, es decir, un producto de fármaco, que comprende pioglitazona de dosis baja o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para administración a un sujeto, tal como un paciente humano que necesita de tratamiento para retardar el desarrollo de, o de otra manera tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente. Aunque la presente invención se

describen diversas modalidades específicas con la comprensión de que la presente descripción será considerada únicamente como una ejemplificación de los principios de la presente invención, y no está proyectada para limitar la invención a las modalidades descritas o ilustradas.

I. Definiciones

Tal como se utiliza en la descripción de la presente invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una", "el, la", se utilizan de manera intercambiable y están proyectadas para incluir las formas plurales, así como estár dentro de cada significado, a menos que el texto indique claramente lo contrario. Asimismo, tal como se utiliza en la presente invención, "y/o" se refiere a y comprende cualquiera y todas las posibles combinaciones de uno o más de los artículos descritos, así como la carencia de combinaciones cuando se interpretan en la alternativa ("o").

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "al menos uno" está proyectado para significar "uno o más" de los elementos descritos.

Las formas de palabras singulares están proyectadas para incluir formas de palabras plurales, y de igual manera se utilizan de manera intercambiable en la presente invención, cuando es adecuado, y están dentro de cada significado, a menos que se manifieste expresamente lo contrario.

Excepto cuando se indica de otra manera, las formas con mayúsculas y sin mayúsculas de todos los términos están dentro de cada significado.

A menos que se indique de otra manera, quedará entendido que todos los números que expresan cantidades, proporciones y propiedades numéricas de ingredientes, condiciones de reacción, etc., utilizadas en la especificación y reivindicaciones, están contempladas para tener la capacidad de ser modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente".

Todas las partes porcentajes, proporciones, etc., en la presente invención, están en peso a menos que se indique lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "bioequivalencia" o "bioequivalente", se refieren a formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco que son farmacéuticamente equivalentes, y sus biodisponibilidades (rango y grado de absorción) después de la administración en la misma dosificación o cantidad molar, son similares hasta el grado en que sus efectos terapéuticos, por seguridad y eficacia, sean esencialmente los mismos. En otras palabras, los términos bioequivalencia o bioequivalente, significan la ausencia de una diferencia significativa en el rango y grado en el cual la pioglitazona se vuelve disponible a partir de dichas formulaciones en el sitio de la acción de pioglitazona, cuando se administran en la misma dosis molar bajo condiciones similares, por ejemplo, rango en el cual la pioglitazona puede permanecer en la formulación, y el rango en el cual la pioglitazona puede ser absorbida y/o queda disponible en el sitio de acción para afectar la enfermedad de Alzheimer. En otras palabras, existe un alto grado de similitud en las biodisponibilidades de dos productos farmacéuticos en pioglitazona (de la misma forma galénica) de la misma dosis molar, ya que no es probable que produzcan diferencias clínicamente relevantes en los efectos terapéuticos, o reacciones adversas, o ambos. Los términos "bioequivalencia", así como "equivalencia farmacéutica" y "equivalencia terapéutica"

también se utilizan en la presente invención tal como se define y/o lo utiliza (a) la United States Food y Drug Administration (FDA), (b) the Code de Federal Regulations ("C. F.R."), Título 21, (c) Health Canada, (d) European Medicines Agency (EMEA), y/o (e) the Japanese Ministry de Health y Welfare. Por lo tanto, deberá quedar entendido que la presente invención contempla formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco que pueden ser bioequivalentes a otras formulaciones de pioglitazona de dosis baja, o productos de fármaco de la presente invención. A manera de ejemplo, un primera formulación de pioglitazona de dosis baja o producto de fármaco, es bioequivalente a una segunda formulación de pioglitazona de dosis baja o producto de fármaco, de acuerdo con la presente invención, cuando la medida de al menos un parámetro(s) farmacocinético, tal como Cmax, Tmax, AUC, etc., de la primera formulación de pioglitazona de dosis baja o producto de fármaco, varía en no más de aproximadamente ±25%, cuando se compara con la medida del mismo parámetro farmacocinético de la segunda formulación de pioglitazona de dosis baja o producto de fármaco.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "biodisponibilidad" o "biodisponible" significan de manera general el rango y grado de absorción de pioglitazona en la circulación sistémica, y más específicamente, el rango o medidas proyectadas para reflejar el rango y grado al cual la pioglitazona queda disponible en el sitio de acción absorbida de un producto de fármaco, y queda disponible en el sitio de acción. En otras palabras y a manera de ejemplo, el grado y rango de absorción de pioglitazona de una formulación con menor intensidad de dosificación de la presente invención, tal como se refleja a través de una curva de pioglitazona de tiempo-concentración en la circulación sistémica.

A manera de ejemplo adicional, la biodisponibilidad es una medida del grado que tiene un fármaco terapéuticamente activo de alcanzar la circulación sistémica, y quedar disponible en el sitio de acción. Se expresa como la letra F.

Con respecto a la biodisponibilidad absoluta, la biodisponibilidad absoluta compara la biodisponibilidad (estimada como un área bajo la curva, o AUC) del fármaco activo en la circulación sistémica después de administración no intravenosa (es decir, después de administración oral, rectal, transdérmica, subcutánea), con la biodisponibilidad del mismo fármaco después de la administración intravenosa. Es la fracción del fármaco absorbida a través de la administración intravenosa, comparada con la administración intravenosa correspondiente del mismo fármaco. La comparación debe ser normalizada por la dosis, si se utilizan diferentes dosis, en consecuencia, cada AUC se corrige dividiendo la dosis correspondiente administrada.

Con el objeto de determinar la biodisponibilidad absoluta de un fármaco, se debe llevar a cabo un estudio farmacocinético para obtener un trazo de concentración de fármaco en plasma versus tiempo para el fármaco después de administración tanto intravenosa (IV) como no intravenosa. La biodisponibilidad absoluta es el área bajo la curva (AUC) corregida por la dosis no intravenosa, dividida entre la AUC intravenosa. Por ejemplo, la fórmula para calcular F de un fármaco administrado mediante ruta oral (po) es la que se encuentra a continuación.

Por consiguiente un fármaco proporcionado mediante la ruta intravenosa tendrá una biodisponibilidad absoluta de 1 (F=1), en tanto que los fármacos proporcionados por otras rutas de administración normalmente tienen una biodisponibilidad absoluta menor a uno.

Con respecto a la biodisponibilidad relativa, esto mide la biodisponibilidad (estimada como el área bajo la curva, o AUC) de un cierto fármaco cuando se compara con otra formulación del mismo fármaco, normalmente un estándar establecido, o a través de la administración mediante una diferente ruta. Cuando el estándar consiste en un fármaco administrado en forma intravenosa, esto es conocido como biodisponibilidad absoluta.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "equivalencia farmacéutica" o "farmacéuticamente equivalente" se refiere a formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco de la presente invención que contienen la misma cantidad de pioglitazona, en las mismas formas de dosificación, aunque r os ingredientes inactivos, $biodisponibilidad\ relativa = \frac{[AUC]_A * dosis_B}{[AUC]_B * dosis_A}$ cumplen con los mismos e ad y pureza del compendio comparables u otros aplicables, incluyendo potencia, y cuando es aplicable, uniformidad y/o estabilidad de contenido. Por lo tanto, deberá quedar entendido que la presente invención contempla formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco que pueden ser farmacéuticamente equivalentes a otras formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco utilizados de acuerdo con la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "equivalencia terapéutica o terapéuticamente equivalente" significa las formulaciones de pioglitazona de dosis baja o productos de fármaco que (a) producirán el mismo efecto clínico y perfil de seguridad cuando se utiliza el producto de fármaco de pioglitazona para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la presente invención, y (b) son equivalentes farmacéuticos, por ejemplo, contiene pioglitazona en la misma forma de dosificación, tienen la misma ruta de administración; y tienen la misma intensidad de pioglitazona. En otras palabras, la equivalente terapéutica significa que un equivalente químico de una formulación de pioglitazona de intensidad de dosificación menor de la presente invención (es decir que contienen la misma cantidad de pioglitazona en la misma forma de dosificación cuando administra a los mismos individuos en el mismo régimen de dosificación) proporcionará esencialmente la misma eficacia y toxicidad.

Los términos "enfermedad de Alzheimer", "enfermedad de Alzheimer", o "AD" tal como se utilizan en la presente invención, son una enfermedad en donde la función cognitiva es dañada gradualmente con el tiempo, e incluye una fase predemencia sintomática con la presentación de daño cognitivo leve (MCI), y una fase de demencia, en donde existe un daño significativo en el funcionamiento social u ocupacional. Ver la Publicación de Albert et al. 2011 Alzheimer's & Dementia 7: 270-279; McKhann et al. 2011 Alzheimer's & Dementia 7: 263-269.

Aunque se reportan un número de biomarcadores que coinciden con la enfermedad de Alzheimer, ninguno es reconocido como biomarcador validado o calificado para el diagnóstico o

pronóstico de enfermedad de Alzheimer por la US Food and Drug Administration. Desde un punto de vista clínico, la característica que está presente consistentemente y es necesaria para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, es daño cognitivo.

Las indicaciones de daño cognitivo pueden incluir, pero no se limitan a, dificultad con funciones mentales tales como lenguaje, memoria (por ejemplo, de episodio), percepción, comportamiento o personalidad emocional, habilidades cognitivas (por ejemplo, cálculo, pensamiento abstracto, juicio). La determinación se puede obtener del paciente, de un informante que conoce bien al paciente, de un especialista habilitado que observa al paciente o una combinación de los mismos.

El término "daño cognitivo leve" o "MCI" se refiere a una reducción en la capacidad cognitiva que es mayor a la anticipada, considerando la edad o educación de una persona en uno o más dominios cognitivos. Los dominios cognitivos incluyen memoria, funciones ejecutivas (por ejemplo, solución de problemas, planeación o razonamiento), atención (por ejemplo, atención simple y dividida), habilidad visuoespacial, y lenguaje (por ejemplo, nombrar las cosas, fluidez, lenguaje expresivo, comprensión). Los síntomas de MCI pueden incluir dificultades para identificar la palabra o nombre correcto; dificultad para recordar nombres cuando se presentan personas nuevas; mayor dificultad notable para llevar a cabo tareas en instalaciones sociables o de trabajo; olvidar material que se acaba de leer; perder u olvidar un objeto valioso; incrementar los problemas con planeación u organización, dificultad para manejar nuevas habilidades; déficit de concentración y ansiedad incrementada. El daño cognitivo leve es una fase en la cual los síntomas son suficientes para cumplir con los criterios de MCI aceptados actualmente, aunque los síntomas no cumplen con criterios de diagnóstico de demencia. Sin embargo, las personas con MCI, pueden permanecer funcionalmente intactas e independientes. Si es normal, se administran pruebas cognitivas estandarizadas, las personas con MCI generalmente tiene una calificación de 1 a 1.5 desviaciones estándar debajo de la edad y promedio ajustado a la educación de sus coétaneos. Se deberá observar que no toda la MCI conduce a demencia, ni a enfermedad de Alzheimer.

El "Daño Cognitivo del Tipo Alzheimer" o "CIAT" tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a daño cognitivo consistente con características en donde el Alzheimer es la probable causa, y por lo tanto puede considerarse como un subconjunto de MCI. Las designaciones "Daño Cognitivo del Tipo Alzheimer", "Daño Cognitivo Leve Debido a enfermedad de Alzheimer (MCI debido a AD)" o "Daño Cognitivo leve amnésico (aMCI)" se refiere a la fase predemencia, sintomática de la enfermedad de Alzheimer. CIAT o MCI debido a AD se determinan después del uso de pruebas neurofisiológicas y la evaluación clínica de la función cognitiva del individuo. Normalmente, se daña la memoria de episodios en personas con MCI que progresan a AD (aMCI). Sin embargo, existen formas atípicas de MCI - MCI con presentación no amnésica - que también progresan la enfermedad de Alzheimer. La disminución en la función cognitiva progresiva, proporciona evidencia adicional de que una persona padece de MCI debido a AD.

Existen una cantidad de evaluaciones neurofisiológicas, particularmente las que prueban la memoria de episodios (por ejemplo, la capacidad de aprender y retener información nueva) que son útiles en el diagnóstico de MCI debido a AD, o los

pacientes con MCI quienes probablemente progresen a AD dentro de algunos años. Las pruebas de memoria de episodios puede evaluar la memoria inmediata y/o retardada, tal como pruebas de aprendizaje en una lista de palabras. Además, se debe descartar una etiología alternativa del daño cognitivo, tal como degenerativa (por ejemplo, Parkinsonismo), eventos vasculares que incluyen microinfartos, depresión, traumáticos, comorbidades médicas. Se han propuesto un número de biomarcadores para utilizarse en la investigación, y también pueden ser útiles para soportar el diagnóstico clínico de MCI debido a AD, mediante la confirmación de la presencia de patologías consistentes con AD o para monitorear el progreso de la enfermedad, si se desea. Ver por ejemplo la Publicación de Albert et al. 2011 Alzheimer's & Dementia 7: 270-279.

De acuerdo con la presente invención, el daño cognitivo puede ser determinado a través de cualquier método de evaluación cognitiva aceptado en la técnica, que incluye pero no se limita a, como una evaluación de cognición global (por ejemplo, la Revisión del Mini Estado Mental Modificado (Modified Mini Mental State Examination) (3MS-E)), y los dominios específicos tales memoria visual y verbal (por ejemplo, la Prueba de Memoria Visuoespacial Breve (Revisada) (Brief Visuospatial Memory Test) (Revised)) (BVMT-R) y la Prueba de Aprendizaje Verbal de Hopkins (Revisada) (Hopkins Verbal Learning Test (HVLT-R), respectivamente), lenguaje (por ejemplo, la prueba de Fluidez Verbal Generativa (Generative Verbal Fluency Test) (GVFT)) y función y atención ejecutiva (por ejemplo, la Prueba de Duración de Dígito (Digit Span Test) (DST)).

Los cambios fisiológicos pueden o no también ser detectados. Los "cambios fisiológicos" significan por ejemplo, surgimiento de al menos uno de conectividad funcional alterada, atrofia cerebral, actividad sináptica disminuida en el cerebro, acumulación amiloide incrementada en el cerebro, función mitocondrial disminuida o disfunción mitocondrial incrementada en el cerebro, formación neuronal de enredos neurofibrilares en el cerebro, y un cambio que corresponde a cualquiera de otros síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Los cambios fisiológicos que pueden ser indicativos de enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a, hipometabolismo en el cerebro, conectividad funcional alterada, beta amiloides incrementados en el cerebro y/o CSF y tau y fosfo-tau en el CSF.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "desarrollo" significa el surgimiento en un sujeto de síntomas clínicos asociados o consistentes con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o una fase que progresa a demencia de Alzheimer, tal como CIAT, tal como se define en la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "retraso" en el desarrollo o progreso de una fase consistente con la enfermedad de Alzheimer, significa un incremento en el tiempo desde el primer punto de tiempo hasta el desarrollo o empeoramiento de una fase consistente, con la enfermedad de Alzheimer, tal como daño cognitivo del tipo Alzheimer. Por ejemplo, un retraso en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, significa que se retrasa que el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, tal como aquí se define, en un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, suceda en su estructura de tiempo natural en al menos seis meses, 1 año, 1 ½ años, 2 años, 2 ½ años, 3 años, 3 ½ años, 4 años, 4 ½ años, 5

años, 5 ½ años, 6 años, 6 ½ años, 7 años, 7 ½ años o 8 años o más, y preferentemente de 3 años a 8 años y más preferentemente durante 5 años después de que un sujeto cognitivo normal ha sido determinado como en alto riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer. Por medio de un ejemplo adicional, un retraso en el progreso de daño cognitivo que pueda progresar en la enfermedad de Alzheimer o un retraso en el progreso de demencia, significa que el rango de disminución cognitiva se disminuye en forma relativa a su estructura de tiempo natural. Estas determinaciones se llevan a cabo utilizando análisis estadísticos adecuados.

Un "primer punto de tiempo" incluye, por ejemplo, el inicio de un tratamiento de pioglitazona de dosis baja tal como aquí se enseña.

En algunas modalidades, un retraso en el desarrollo de daño cognitivo consistente con la enfermedad de Alzheimer puede ser determinado, por ejemplo, llevando a cabo cualquiera de las evaluaciones cognitivas aquí descritas, o cumpliendo con criterios de diagnóstico de daño cognitivo del tipo de Alzheimer. Además, para la evaluación del desempeño cognitivo, también se pueden medir cambios en otros biomarcadores que son consistentes con las patologías de la enfermedad de Alzheimer si se desea, incluyendo el rango de atrofia en el cerebro, por ejemplo medidos de mediante generación de imagen de resonancia magnética (MRI) o medidas de los cambios en las conexiones funcionales entre regiones del cerebro, evaluación del metabolismo del cerebro o actividad neuronal, acumulación amiloide en el cerebro, fisiología del cerebro tal como se mide a través de la señal BOLD-fMRI, función mitocondrial en el cerebro, proliferación mitocondrial en el cerebro, neuronas enfermas, enredos neurofibrilares en el cerebro, amiloides en el CSF y Tau o fosfo-Tau en el CSF, etc.

Los términos "diagnóstico" o "pronóstico" tal como se utiliza en la presente invención, se refieren al uso de información (por ejemplo, información genética o datos de otras pruebas moleculares, información biológica o química de las muestras biológicas, signos y síntomas, descubrimientos en exámenes fisiológicos, resultados de desempeño cognitivo, etc.), para anticipar que la mayor parte de los probables resultados, estructuras de tiempo y/o respuestas a un tratamiento particular para una enfermedad, trastorno o condición determinada, con base en comparaciones con una pluralidad de individuos que comparten secuencias de nucleótido, síntomas, signos, historiales familiares comunes, u otros datos relevantes para consideración del estado de salud del paciente, o la conformación del padecimiento de un sujeto, por ejemplo, con daño cognitivo leve (MCI) (por ejemplo, daño cognitivo del tipo de Alzheimer).

La "muestra biológica", tal como aquí se utiliza, se refiere a un material que contiene, por ejemplo, un ácido nucleico, proteína u otro material biológico o químico de interés. Las muestras biológicas que contienen ácido nucleico tal como ADN incluyen cabello, piel, raspado de la mucosa de la mejilla y fluidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, excremento, orina, fluido espinal, y similares. El aislamiento de ADN de dichas muestras es bien conocido para los expertos en la técnica.

Un "sujeto" de acuerdo con algunas modalidades es un individuo, cuyo genotipo(s) o haplotipo(s), serán determinados y registrados junto con la condición del individuo (es decir, el

estado de la enfermedad o trastorno) y/o la respuesta a un fármaco o tratamiento candidato.

Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente invención, es preferentemente, pero no se limita necesariamente a un sujeto humano. El sujeto puede ser hombre o mujer, y puede ser de cualquier raza o etnia, incluyendo sin limitarse a Caucásea, Africano-Americano, Africano, Asiático, Hispano, Indio, etc. El sujeto puede ser de cualquier edad, incluyendo recién nacido, neonato, infante, niño, adolescente, adulto, y geriátrico. El sujeto, tal como aquí se utiliza, también puede incluir un animal, particularmente un mamífero tal como un perro, felino, bovino, caprino, equino, ovino, porcino, roedor (por ejemplo, rata o ratón) un lagomorfo, un primate (incluyendo primate no humano), etc., que pueda ser tratado de acuerdo con los métodos de la presente invención o clasificado para medicina veterinaria o propósitos de desarrollo de fármacos farmacéuticos. Un sujeto de acuerdo con las modalidades de la presente invención incluye un paciente, humano u otro, que necesita del tratamiento terapéutico para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

El término "gen", tal como se utiliza en la presente invención, significa un segmento de ADN que contiene información de la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluyendo promotores, exones, intrones, y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

Un "factor de riesgo genético", tal como se utiliza en la presente invención, significa un marcador genético que está asociado con susceptibilidad incrementada a una condición, enfermedad o trastorno. También se puede referir a un marcador genético que está asociado con una respuesta particular a un fármaco seleccionado o tratamiento de interés. El término "asociado con" tal como se utiliza en la presente invención significa surgimiento conjunto de dos o más características más frecuentes de lo que se puede esperar. Un ejemplo de "asociado con", implica una característica en la superficie de los glóbulos blancos llamada HLA (HLA permanece para el antígeno de leucocito humano). En un tipo HLA particular, el HLA tipo B-27, está asociado con un riesgo incrementado para un número de enfermedades que incluyen espondilitis anquilosante.

La espondilitis anquilosante es 87 veces más probable que ocurra en personas con HLA B-27 que en la población general.

Se puede utilizar un marcador de "pronóstico" para predecir el curso probable de una condición o enfermedad, incluyendo pero sin limitarse a, predicción de la edad, probable de desarrollo de la condición o enfermedad, curso y/o rango de progreso de la condición o enfermedad, etc. Puede incluir el genotipo y/o otras variables, incluyendo la edad del sujeto.

Un sujeto "en riesgo incrementado de desarrollar una condición" debido a un factor de riesgo genético, es uno que está predispuesto a la condición, tiene susceptibilidad genética para la condición y/o es más probable que desarrolle la condición que los sujetos en los cuales está ausente el factor de riesgo genético. Un sujeto "en riesgo incrementado" también puede ser un sujeto quien es susceptible a desarrollar la enfermedad en una edad más temprana.

Tal como se utiliza en la presente invención, un sujeto "en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer" incluye un individuo que es más probable que desarrolle enfermedad de Alzheimer con base en uno o más de: edad; genotipo rs10524523; genotipo APOE, etc.

El término "polimorfismo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la existencia de dos o más diferentes secuencias de nucleótido en un locus particular en el ADN del genoma. Los polimorfismos pueden servir como marcadores genéticos y también pueden ser referidos como variantes genéticas. Los polimorfismos incluyen sustituciones, inserciones, eliminaciones de nucleótidos y microsatélites, y pueden, pero no necesariamente, dar como resultado diferencias detectables en la expresión genética o función de proteína. Un sitio polimórfico es una posición del nucleótido dentro de un locus en el cual la secuencia de nucleótido varía de una secuencia de referencia en al menos un individuo en una población.

Un "polimorfismo de eliminación/inserción", o "DIP," tal como se utiliza en la presente invención, es una inserción de uno o más nucleótidos en una versión de una secuencia relativa a otra. Si se conoce cuales de los alelos representan alelos menores, se utiliza el término "eliminación" cuando el alelo menor tiene una eliminación de uno o más nucleótidos, y se utiliza el término "inserción", cuando el alelo menor tiene uno o más nucleótidos adicionales. El término "polimorfismo de eliminación/inserción" también se utiliza cuando existen múltiples formas y longitudes, y no se puede apreciar cual es el alelo menor. Por ejemplo, para los polimorfismos poli-T aquí descritos, se observan múltiples longitudes de polimorfismos.

El "haplotipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una variante genética o combinación de variantes llevadas en al menos un cromosoma en un individuo. Un haplotipo con frecuencia incluye loci polimórficos contiguos múltiples. Todas las partes de un haplotipo, tal como se utiliza en la presente invención, ocurre en la misma copia de un cromosoma o molécula de ADN aploide. Sin evidencia de lo contrario, se presume que un haplotipo representa una combinación de múltiples loci que probablemente serán transmitidos juntos durante la meiosis. Cada humano lleva un par de haplotipos para cualquier locus genético determinado, que consiste en secuencias heredadas en los cromosomas homólogos de dos progenitores. Estos haplotipos pueden ser idénticos o pueden representar dos diferentes variantes genéticas para el locus determinado. La haplotipificación es un proceso para determinar uno o más haplotipos en un individuo. La haplotipificación puede incluir el uso de genealogía familiar, técnicas moleculares y/o interferencia estadística.

Una "variante" o "variante genética", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una isoforma específica de un haplotipo encontrado en una población, a la forma específica difiriendo de formas del mismo haplotipo en al menos uno, y frecuentemente más de un sitio variante o nucleótidos dentro de la región de interés en el gen. Las secuencias en estos sitios variantes que difieren entre alelos diferentes de un gen, son denominadas "variantes de secuencia de gen", "alelos" o "variantes". El término "forma alternativa" se refiere a un alelo que puede ser distinguido de otros alelos, por tener al menos uno, y frecuentemente más de un sitio variante dentro de la secuencia genética. Las "variantes" incluyen isoformas que tienen polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y polimorfismos de eliminación/inserción (DIPs). La referencia a la presencia de una variante significa una variante particular, es decir, nucleótidos particulares de sitios polimórficos particulares, en lugar de solamente la presencia de cualquier varianza en el gen.

El término "isoforma", tal como se utiliza en la presente invención, significa una forma particular de un gen, mARN, cADN o la proteína codificada de esta forma, distinguida de otras formas por su secuencia y/o estructura particular. Por ejemplo, la isoforma ApoE 4 de la apolipoproteína E en forma opuesta a las isoformas ApoE 2 o ApoE 3.

El término "genotipo" dentro del contexto de la presente invención, se refiere a la forma alélica particular de un gen, que puede definirse a través del nucleótido(s) particular presente en una secuencia de ácido nucleico en un sitio(s) particular. El genotipo también puede indicar los pares de alelos presentes en uno o más loci polimórficos. Para organismos diploides, tal como humanos, dos haplotipos cubren un genotipo. La genotipificación es cualquier proceso para determinar un genotipo de un individuo, por ejemplo, mediante amplificación de ácido nucleico, secuenciación de ADN, enlace de anticuerpo u otro análisis químico (por ejemplo, para determinar la longitud). El genotipo resultante puede ser sin fase, lo que significa que las secuencias encontradas no son conocidas por ser derivadas del cromosoma de un progenitor o del otro.

Los términos "tratar", "tratamiento", o "tratando", tal como se utiliza en la presente invención se refieren a cualquier tipo de medida que imparta un beneficio a un paciente que padece de, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, incluyendo mejoría en la condición del paciente, (por ejemplo en uno o más síntomas), retardar el desarrollo o progreso de la enfermedad, etc. El tratamiento puede incluir cualquier fármaco, producto de fármaco, método, procedimiento, cambio de estilo de vida u otro ajuste introducido en un intento de efectuar un cambio en un aspecto particular de la salud de un sujeto (es decir, dirigido a una enfermedad, trastorno o condición particular).

Los términos "fármaco" o "sustancia de fármaco, tal como se utiliza en la presente invención, se refieren a un ingrediente activo, tal como una entidad química o entidad biológica, o combinaciones de entidades químicas y/o entidades biológicas, adecuadas para ser administradas a un sujeto para (a) retardar el desarrollo o progreso de la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con la presente invención, el fármaco o sustancia de fármaco es pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "producto de fármaco", tal como se utiliza en la presente invención, es sinónimo de los términos "medicina", "medicamento", "intervención terapéutica", o "producto farmacéutico". Más preferentemente, un producto de fármaco es aprobado por una agencia gubernamental para el uso de acuerdo con los métodos de la presente invención. Un producto de fármaco, de acuerdo con la presente invención, contiene pioglitazona de dosis baja.

Los términos "enfermedad", "trastorno", y "condición" son comúnmente reconocidos en la técnica, y designan la presencia de signos y/o síntomas en un individuo o paciente que generalmente son reconocidos como anormales y/o indeseables. Las enfermedades o condiciones pueden ser diagnosticadas y categorizadas con base en cambios patológicos. La enfermedad o condición puede ser seleccionada de los tipos de enfermedades descritos en estos estándares, tal como Harrison's Principles de Internal Medicine, 1997, o Robbins Pathologic Basis de Disease, 1998.

El término "disfunción mitocondrial", tal como se utiliza en la presente invención, significa cualquiera anormalidades

perjudiciales de la mitocondria dentro de una célula o células. AD y las etapas que avanzan hacia AD, actualmente son conocidas en la técnica como asociadas con disfunción mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial origina daño celular y muerte, comprometiendo la producción de ATP, interrumpiendo la homeostasis de calcio e incrementando la tensión oxidativa. Además, el daño mitocondrial puede conducir a muerte celular apoptótica, originando la liberación del citocromo c y otros factores proapoptóticos en el citoplasma (para revisión ver la Publicación de Wallace 1999 Science 283: 1482-1488; Schapira 2006 The Lancet 368: 70-82). Con respecto a ejemplos específicos aquí encontrados, y sin pretender limitarse por alguna teoría, se hipotetiza que las isoformas ApoE 3 y ApoE 4 causan disfunción mitocondrial a través de interacciones con TOMM40. Algunas variantes TOMM40 pueden actuar en forma sinérgica con la isoforma ApoE 3, para acelerar la disminución mitocondrial. Además, en algunas modalidades, la isoforma ApoE 2 se considera que será protectora en la disfunción mitocondrial.

Tal como se utiliza en la presente invención, el alelo TOMM40 rs10524523 "corto" tiene menos de 19 residuos de timidina (T), y el alelo TOMM40 rs10524523 "largo" tiene 19 o más residuos T. En algunas modalidades, el alelo largo puede indicar un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad de Alzheimer de desarrollo tardío dentro de un periodo de tiempo ajustado (por ejemplo, un período de 5 a 7 años).

El alelo rs10524523 ("523"), un tracto poliT intrónico en el gen TOMM40, es altamente polimórfico con respecto a la longitud (es decir, número de residuos T), y están asociados tamaños variables con las distribuciones de edad de desarrollo de AD de desarrollo tardío. Las medidas del número de residuos T en cada una de las 2 copias del 523 poliT, 1 en cada cromosoma, que son llevadas a cabo por cada individuo, comprenden el genotipo 523 y se pueden evaluar a través de procedimientos estándar, tal como el ensayo electroforético, o secuenciación de Sanger.

Las designaciones categóricas de cada 523 poliT, son asignadas de acuerdo con la longitud del homopolímero: Largo (S, homopolímero con longitud menor a 19 residuos T), Largo (L, con Longitud mayor o igual a 19, pero menor a 30) y Muy Larga (VL, longitud mayor a 29 residuos T). Por lo tanto son posibles seis diferentes genotipos 523, utilizando las designaciones categóricas: (S,S), (VL, VL), (S,L), (VL,L), (S,VL), (L,L). Ver también la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 201 1/0166185 de Roses, la cual está incorporada a la presente invención como referencia.

El genotipo APOE es un factor de riesgo bien conocido para la edad de desarrollo de AD. Los alelos APOE ε4 están fuertemente ligandos al alelo 523 largo (L) y, por consiguiente, los individuos que tienen el genotipo 523 L,L, normalmente (por ejemplo, 98% para Caucásico) poseen el genotipo APOE ε4/ε4. Sin embargo, los alelos 523 corto (S) y 523 muy largo (VL) pueden ser ligados a los alelos ya sea APOE ε2 o APOE ε3. Los alelos APOE ε2 están asociados con una edad tardía para la generación de AD en forma relativa a personas que llevan el alelo ε3 (5 a 8 años después, en comparación con individuos APOE ε2/ε3, con APOE ε3/ε3). Por consiguiente en algunas modalidades, APOE puede incluirse en la determinación con el objeto de asignar a todas las personas que llevan el alelo APOE ε2, al grupo de bajo riesgo en el rango de edad adecuado. El genotipo 523 proporciona mayor resolución para la edad de

desarrollo de daño cognitivo para individuos que llevan el alelo APOE ε3 y los genotipos APOE (ε/3/ε3) y APOE (ε3/ε4).

En algunas modalidades, un sujeto con dos copias del alelo TOMM40 rs10524523 largo está en mayor riesgo de desarrollar AD, en comparación con un sujeto con una copia del alelo TOMM40 rs10524523 largo, o dos copias del alelo TOMM40 rs10524523 corto. En algunas modalidades, un sujeto con una copia del alelo TOMM40 rs10524523 largo está en mayor riesgo de desarrollar AD, en comparación con un sujeto con dos copias del alelo TOMM40 rs10524523 corto. La determinación del riesgo de desarrollo AD o el desarrollo de una etapa o síntoma del mismo con base en el genotipo TOMM40 debe llevarse a cabo de acuerdo con otros factores de riesgo tales como edad, y también puede incluir el estado APOE en algunas modalidades. En algunas modalidades, un sujeto cognitivamente normal mayor a 62 años de edad con dos copias del alelo TOMM40 rs10524523 muy largo, está en riesgo disminuido de desarrollar AD en forma relativa a un sujeto con una o dos copias del alelo largo de rs10524523.

La detección de una variante genética de TOMM40 se puede llevar a cabo tal como se describe en la Publicación Internacional WO 2010/019550 o en la Patente Norteamericana No. 2011/0166185, cada una incorporada en su totalidad a la presente invención como referencia.

Tal como aquí se utiliza, un "sujeto en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer", significa uno que está predispuesto a la enfermedad de Alzheimer, tiene susceptibilidad genética para enfermedad de Alzheimer y/o es más probable que desarrolle enfermedad de Alzheimer en una edad predeterminada, que sujetos en los cuales está ausente el factor de riesgo genético.

Tal como se utiliza en la presente invención, un "riesgo incrementado" significa que probablemente desarrolle AD en un tiempo corto, por ejemplo, 5 a 7 años desde un punto de tiempo, por ejemplo, desde el inicio del tratamiento de acuerdo en algunas modalidades aquí descritas, o el tiempo de determinación de una predisposición a o síntoma de la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo mediante análisis de cualquiera de una de atrofia cerebral, actividad sináptica disminuida en el cerebro, acumulación amiloide incrementada en el cerebro, función mitocondrial disminuida en el cerebro, proliferación disminuida en el cerebro, neuronas enfermas, formación de enredos neurofibrilares en el cerebro, amiloide en CSF y Tau y/o fosfo-Tau en CSF).

El "riesgo incrementado" también puede significar que un individuo desarrolle probablemente AD en una edad más temprana que un sujeto de control, esto es, que un individuo con al menos una copia del alelo rs10524523 largo está en mayor riesgo de desarrollar AD en una edad más temprana que un individuo sin copias del alelo rs10524523 largo de acuerdo con algunas modalidades.

La edad en la cual el sujeto se considera como en riesgo incrementado de desarrollar AD, se puede determinar elaborando gráficas de uno o más factores (por ejemplo, genotipo TOMM40 523) contra la edad, y determinando el punto en el cual los cambios de riesgo están relacionados en mayor parte con el cambio en la edad (ver figura 2). Este punto puede ser "aproximadamente" una edad en particular, lo que significa que la edad puede variar en 0.5, 1, 2, 3, 4 o 5 años desde dicho punto, en donde la variación puede resultar, por ejemplo, de la

optimización adicional o mayor resolución de datos de las gráficas al momento de la recepción de los datos adicionales.

Un método de "administración" útil de acuerdo con la presente invención, incluye pero no se limita administración, por ejemplo, mediante ingestión a través de ruta oral, intranasal, rectal, mediante inhalación, tópica o inyección, tal como inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracraneal y espinal. Los métodos adicionales de administración se proporcionan en la presente invención más adelante en la sección titulada "dosificación y administración".

Tal como se utiliza en la presente invención, "diagnosticar" o "identificar un paciente o sujeto que tiene enfermedad de Alzheimer" se refiere a un proceso para determinar si un individuo padece de enfermedad de Alzheimer o una etapa que progresa a enfermedad de Alzheimer, tal como se define en la presente invención. Un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer puede basarse, por ejemplo, en los criterios de la National Institute of Neurological and Communicative Disorders y Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria.

La "pioglitazona de dosis baja" se refiere a pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad dentro del rango de 0.5 mg a 12 mg, tal como 0.5 mg, 0.75 mg, 1 mg, 1 .25 mg, 1 .5 mg, 1 .75 mg, 2 mg, 2.25 mg, 2.5 mg, 2.75 mg, 3 mg, 3.25 mg, 3.5 mg, 3.75 mg, 4 mg, 4.25 mg, 4.5 mg, 4.75 mg, 5 mg, 5.25 mg, 5.5 mg, 5.75 mg, 6 mg, 6.25 mg, 6.5 mg, 6.75 mg, 7 mg, 7.25 mg, 7.5 mg, 7.75 mg, 8 mg, 8.25 mg, 8.5 mg, 8.75 mg, 9 mg, 9.25 mg, 9.5 mg, 9.75 mg, 10 mg, 10.25 mg, 10.5 mg, 10.75 mg, 11 mg, 11.25 mg, 11.5 mg, 11.75 mg o 12 mg. Alternativamente, en algunas modalidades de la presente invención, la pioglitazona de dosis baja significa una cantidad de pioglitazona de dosis baja o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que proporciona una AUC de pioglitazona en un sujeto dentro del rango de aproximadamente 0.15 µg•h/mL hasta aproximadamente 3.6 µg•h/mL (± 25%). Por ejemplo, una AUC de pioglitazona de dosis baja puede estar dentro del rango de 0.12, 0.37, o 1 .12 a 3.4 o 4.5 µg•h/mL.

Tal como se utiliza en la presente invención, un "sujeto de control" significa un sujeto que no ha sido diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer y/o no exhibe cualquier síntoma detectable asociado con la enfermedad de Alzheimer. Un "sujeto de control" también significa un sujeto que no está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, tal como aquí se define.

Tal como se utiliza en la presente invención, un "sujeto que no está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer" significa, por ejemplo, un sujeto que no tiene un genotipo TOMM40 rs10524523 que indica, junto con la edad y posiblemente otros factores tales como el estado APOE, que el sujeto no tiene mayor probabilidad que la población general o una parte estratificada de la misma, de desarrollar AD o una etapa o síntoma de la misma.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales, las cuales, dentro del alcance del juicio médico notable son adecuadas para utilizarse con pioglitazona, cuando están en contacto con los tejidos de sujetos, por ejemplo, animales, incluyendo mamíferos, humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, indebidas, y tienen una proporción razonable del beneficio/riesgo.

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge, et al, describe con detalles sales farmacéuticamente aceptables en la Publicación de J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1 -19 (1977). Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la presente invención, o haciendo reaccionar por separado la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de ácido no tóxicas, las cuales son sales del grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido hidroclórico, ácido hidrobrómico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o utilizando otros métodos de la técnica, tal como intercambio de iones. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, camforato, camforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales de metal álcali o de metal de tierra alcalina representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando es adecuado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, y cationes de amina formados utilizando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, sulfonato y sulfonato de arilo.

II. Enfermedad de Alzheimer

Síntomas de la Enfermedad de Alzheimer

Los síntomas comunes de la enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a, pérdida de memoria, dificultad para llevar a cabo tareas familiares, problemas con el lenguaje, desorientación en el tiempo y lugar, juicio deficiente y disminuido, problemas con pensamiento abstracto, pensamientos de extravío, cambio en el humor o comportamiento, cambios en personalidad y pérdida de iniciativa. Estos síntomas aparecen gradualmente con el tiempo, normalmente (aunque no siempre) comienzan con problemas de la memoria de episodios, seguido de otros déficits cognitivos que afectan adversamente el funcionamiento normal de una persona (por ejemplo, actividades de la vida diaria). Los cambios en comportamiento/personalidad normalmente ocurren posteriormente en el proceso de la enfermedad, ya que una persona queda más moderada o severamente afectada. Algunos ejemplos de estos síntomas característicos se describen a continuación.

Pérdida de memoria

Esto incluye olvidar la información aprendida recientemente, y es uno de los signos de demencia temprana más comunes. Una persona comienza a olvidar con más frecuencia, y no tiene la capacidad de recordar la información más tarde. Esto incluye olvidar nombres y citas ocasionalmente.

Dificultad para desempeñar tareas familiares

Las personas con demencia con frecuencia encuentran difícil planear o completar las tareas diarias. Los individuos pueden perder el seguimiento de los pasos implicados en preparar un alimento, hacer una llamada telefónica o jugar un juego. Esto incluye olvidar ocasionalmente porqué se encuentra en una habitación o que planeaba decir.

Problemas con el lenguaje

Las personas con enfermedad de Alzheimer con frecuencia olvidan palabras simples o palabras inusuales sustitutas, haciendo que su lenguaje o escritura sea difícil de comprender. Pueden no tener la capacidad de encontrar el cepillo de dientes, por ejemplo, y más bien preguntar por "la cosa para mi boca". Esto incluye olvidar nombres y citas ocasionalmente.

Desorientación en el tiempo y lugar

Las personas con enfermedad de Alzheimer se pierden en su propio vecindario, olvidan donde están y como llegaron ahí, y no saben llegar a casa. Esto incluye olvidar el día de la semana o a donde va. En algunos pacientes, la confusión y algunas veces los aspectos de agitación y comportamiento que la acompañan se manifiestan más por la tarde o a horas tempranas de la noche, un síndrome referido como "vespertino".

Juicio deficiente o disminuido

Los que tienen Alzheimer pueden vestirse en forma inadecuada, portar varias prendas en un día caluroso o poca ropa durante el frío. Esto puede mostrar un juicio deficiente, dejando escapar grandes sumas de dinero para los telecomerciantes. Esto incluye tomar una decisión cuestionable o debatible de vez en vez.

Problemas con el pensamiento abstracto

Algunos con la enfermedad de Alzheimer pueden tener dificultad inusual para llevar a cabo tareas mentales complejas, tipo olvidar que números son para qué y cómo deben utilizarse. Esto incluye encontrar retos en cuadrar una chequera.

Objetos extraviados

Una persona con la enfermedad de Alzheimer puede poner las cosas en lugares inusuales: un metal en el congelador, un reloj de pulsera en la azucarera. Esto incluye extraviar llaves o cartera temporalmente.

Cambio en el humor o comportamiento

Algunos con enfermedad de Alzheimer pueden mostrar oscilaciones de humor rápidas - de la calma, a las lágrimas, al enojo - sin razón aparente. Esto incluye sentimientos ocasionales de tristeza o mal humor.

Cambios en la personalidad

Las personalidades de las personas con demencia pueden cambiar dramáticamente. Se pueden volver extremadamente confusos, suspicaces, temerosos, o dependientes de un miembro de la familia. Las personalidades de las personas cambian un tanto con la edad.

Pérdida de iniciativa

Una persona con enfermedad de Alzheimer puede volverse muy pasiva, sentarse enfrente del televisor durante horas, dormir más de lo usual o no desear realizar las actividades usuales. Esto incluye sensación de hartazgo en las obligaciones de trabajo o sociales.

Diagnóstico y Elaboración de Etapas de la Enfermedad de Alzheimer

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer es un proceso que normalmente implica una variedad de pasos (incluyendo historial médico, revisiones del estado físico y mental y pruebas de laboratorio) y herramientas. De lo último, desde 1984, los criterios de diagnóstico establecidos por el National Institute de Neurological Disorders y Stroke (NINDS)/Alzheimer's Disease y related Disorders Association (ADRDA) han sido, junto con los criterios de DSM-IV, los estándares principales utilizados en la práctica e investigación clínica. Ambos requieren la presencia de disfunción de memoria y daño cognitivo, aunque en tanto que los criterios DSM estipulan que lo último afecta adversamente el funcionamiento normal, los criterios de NINCDS/ADRDA no lo hacen. Una característica de ambos grupos de criterio es que no consideren un diagnóstico antemortem de AD como definitivo, ya que hasta actualmente, no había metodología para avaluar la patología del cerebro para las características de AD hasta después de la muerte del paciente. Los criterios NINCDS/ADRDA, han considerado el diagnóstico antemortem como ya sea "posible" o "probable" dependiendo de la fuerza de la evidencia clínica, incluyendo la eliminación de múltiples diagnósticos diferenciales.

Hasta recientemente, el deterioro de un sujeto por la enfermedad de Alzheimer, ha estado caracterizado por múltiples etapas clínicas. El término "etapa" se utiliza en la presente invención con un sentido general para describir cómo cambian las habilidades del sujeto de la función normal, por ejemplo, estado cognitivo normal, a la enfermedad de Alzheimer. Deberá observarse que las etapas son guías generales, los síntomas pueden variar en gran parte y/o entre las etapas, y que no cada sujeto experimentará los mismos síntomas en una etapa determinada, progresará a la enfermedad de Alzheimer en el mismo rango. Por ejemplo, una estructura de siete etapas fue desarrollada, por Barry Reisberg, M.D., director clínico de New York University School de Medicine's Silberstein Aging y Demencia Research Center, lo cual incluye: Etapa 1: Sin daño; Etapa 2: Disminución muy leve; Etapa 3: Disminución leve; Etapa 4: Disminución moderada; Etapa 5: Disminución moderadamente severa; Etapa 6: Disminución severa; y Etapa 7: Disminución muy severa. En el campo de la investigación clínica, AD con frecuencia ha sido definida en forma un tanto relajada como "leve, moderada o severa" con base en las calificaciones de instrumentos psicométricos tales como la Mini Revisión de Estado Mental (Mini-Mental State Examination), en donde, por ejemplo, AD leve puede considerarse de 18 a 26, moderada de 11 a 17 y severa cualquier cosa de 10 o menor (en una escala de 30 puntos en donde las calificaciones mayores indican mayor función cognitiva).

En el 2007, Dubois et al propuso que los criterios NINCDS/ADRDA para el diagnóstico de AD fueran revisados para incorporar aprendizajes procedentes del crecimiento en la comprensión en el campo del proceso de la enfermedad y el desarrollo de nuevos métodos para evaluar los biomarcadores antemordem de AD, incluyendo generación de imágenes cerebrales (Dubois et al. 2007 Lancet Neurol 6: 734-746). En esta propuesta, incluso con la presencia de características de soporte, el diagnóstico antemortem aún es considerado AD "probable", aunque el diagnóstico de AD "definitiva" se reservó para la confirmación histopatológica o evidencia genética (mutación en el cromosoma 1, 14, o 21).

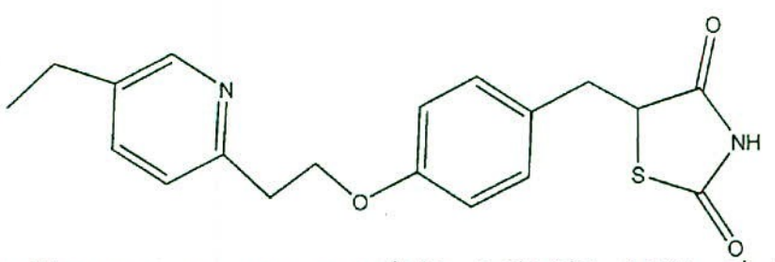
En 2011, un grupo de trabajo que representa National Institute on Aging /Alzheimer's Association Research Roundtable propuso revisiones similares a los criterios NINCDS/ADRDA, y propuso criterios para establecer un diagnóstico de MCI y MCI debido a AD (Albert et al. 2011 Alzheimers Dement 7:270-279; McKhann et al. 2011 Alzheimers Dement 7: 263-269). Este grupo de trabajo actualizó los criterios para todas las causas de demencia, y demencia debido a AD. El grupo de trabajo retuvo las designaciones de la demencia AD probable, demencia AD posible, y demencia AD probable o posible con la evidencia del proceso patofisiológico de AD. Las primeras dos designaciones fueron proyectadas para utilizarse en todas las instalaciones clínicas, mientras que la última designación fue determinada como adecuada para propósitos de investigación. El grupo de trabajo reconoció que el progreso de la enfermedad de Alzheimer es continuo, y que la distinción entre MCI y la demencia es una evaluación clínica de que si existe interferencia significativa con las actividades diarias.

"AD preclínica" se refiere a la etapa a la cual los síntomas son suficientes para cumplir con los criterios actualmente aceptados de AD Preclínica (ver la Publicación de Dubois et al., supra). Hablando de manera general, AD preclínica es una fase presintomática, larga, tiempo durante el cual están comenzando los procesos patofisiológicos de AD. Puede haber síntomas cognitivos muy sutiles años antes de que los sujetos cumplan con los criterios clínicos de MCI (Sperling et al. 2011 Alzheimers Dement 7: 280-292).

"AD Prodromal" se refiere a una etapa en la cual los síntomas cumplen con los criterios actualmente aceptados de AD Prodromal (ver la Publicación de Dubois et al. supra). De acuerdo con la presente invención, AD prodromal es una etapa de predemencia sintomática que generalmente incluye MCI, pero no demencia, y está caracterizada por síntomas que aún no son lo suficientemente severos para cumplir con los criterios de diagnóstico totales de la enfermedad de Alzheimer. La etapa AD Prodromal también es referida en la presente invención como la etapa MCI progresiva.

III. Pioglitazona

Pioglitazona es un agente de tiazolidinodiona que tiene la siguiente estructura química:



HCl de pioglitazona es un agonista potente para el receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPARy). Los receptores PPAR encontraron en tejidos tales como tejido adiposo, músculo esquelético e hígado.

Sin pretenderse limitarse a alguna teoría, se considera que la pioglitazona del agonista PPARy protege contra, o disminuye al menos algunos de los mecanismos patológicos implicados en la enfermedad de Alzheimer (AD), tal como la disminución en la actividad metabólica observada en la etapa preclínica.

Los cambios patofisiológicos que corresponden a la manifestación clínica de AD pueden comenzar años, o incluso décadas, antes de que aparezcan los primeros síntomas cognitivos, desarrollándose lentamente durante una fase preclínica. En algunas modalidades, la administración de pioglitazona de dosis baja tal como se enseña en la presente invención, puede proteger contra, o disminuir estos cambios, conduciendo a un retraso en el desarrollo de daño cognitivo del tipo de Alzheimer.

En algunas modalidades, se administra pioglitazona en una cantidad efectiva para proteger o incrementar la función mitocondrial neuronal, o para expandir el depósito mitocondrial, para tratamiento, tal como retardar o prevenir, el daño cognitivo (por ejemplo, daño cognitivo del tipo de Alzheimer). En algunas modalidades, se inicia el tratamiento antes de que haya ocurrido el daño patológico significativo y/o se detecte o diagnostique daño cognitivo.

La disfunción mitocondrial se considera que desempeña un papel importante en el hipometabolismo cerebral observado en AD. La actividad metabólica del cerebro, debido principalmente a la actividad mitocondrial, disminuye u ocurre una atrofia de cerebro no patológica durante edades saludables (Curiati et al. 2011 Am J Neuroradiol 32: 560-565), aunque ocurre una disminución o atrofia metabólica en un rango significativamente mayor en AD de desarrollo temprano prodromal o sintomático (Familiar), en daño cognitivo leve (MCI), y en el desarrollo tardío de la enfermedad de Alzheimer (Reiman et al. 1996 N Engl J Med 334: 752-758; Mosconi et al. 2004 Psychiatry Research: Neuroimaging 130: 141 -151; Mosconi et al. 2005 J Neurol Neurosurg Psychiatry 76:15-23; Mosconi et al. 2006 J Nucl Med 47: 1778-1786; Chetelat et al. 2008 Brain 131:60-71; Mosconi et al. 2008 Annals of the New York Academy de Sciences 1147: 180-195; Mosconi et al. 2009 Neurology 72: 513-520; Mosconi et al. 2009 Eur J Nucl Med Mol Imaging 36: 811-822; Villain et al. 2010 Brain 133: 3301-3314). También se ha descubierto que la actividad de enzima mitocondrial será reducida en el hipocampo de pacientes AD a los que se les practicó autopsia, y en plaquetas y fibroblastos en forma relativa a sujetos cognitivamente normales (Mancuso et al. 2010 Adv Exp Med Biol 685: 34-44).

La hipótesis de que la perturbación de la función mitocondrial es un evento muy temprano en la etiología AD, ocurriendo posiblemente décadas antes de los síntomas clínicos, está bien soportada (Castellani et al. 2002 Journal de Neuroscience Research 70: 357-360; Bubber et al. 2005 Annals de Neurology 57: 695-703; Beal 2007 Mitochondrial Biology: New Perspectives 287: 183-192; discussion 192-186; Liang et al. 2008 Physiological Genomics 33: 240-256; Liang et al. 2008 PNAS 105: 4441-4446; Jack et al. 2009 Brain 132: 1355-1365; másira et al. 2010 Biochimica et Biofysica Acta (BBA) - Molecular Basis de Disease 1802: 2-10; Swerdlow et al. 2010 J Alzheimers Dis 20 Suppl 2: S265-279; Cunnane et al. 2011 Nutrition 27: 3-20). Existen cambios en la expresión en múltiples regiones del cerebro, de genes implicados en la función mitocondrial en individuos jóvenes quienes están en riesgo incrementado de desarrollar AD debido al transporte de APOEε4 (Conejero-Goldberg et al. 2011 Molecular Psychiatry 16: 836-847), y se ha medido la actividad metabólica relativamente disminuida, bioquímicamente, después de la muerte y con técnicas de

generación de imagen durante la vida, en cerebros de personas cognitivamente normales quienes se ha determinado que están en riesgo incrementado de desarrollar en forma tardía AD debido a historial familiar de la enfermedad o el transporte de al menos un alelo APOEε4 (Small et al. 1995 JAMA 273: 942-947; Reiman et al. 2005 PNAS 102: 8299-8302; Mosconi et al. 2008 Annals of the New York Academy de Sciences 1147: 180-195; Langbaum et al. 2010 Arch Neurol 67: 462-468; Mosconi et al. 2011 Journal de Alzheimer's Disease).

El cerebro humano consume más energía por gramo de tejido en cualquier otro órgano, abarcando aproximadamente una quinta parte de los consumos de energía total del cuerpo. La glucosa es el principal combustible para el metabolismo del cerebro, con la mayor parte de la producción de energía celular ocurriendo en las mitocondrias. Las mitocondrias neuronales generan trifosfato de adenosina (ATP) para potenciar la liberación de neurotransmisores y la captación en las sinapsas, para mantener gradientes de ión, para potenciar el transporte de mitocondrias y axonal. Las mitocondrias también regulan la homeostasis de calcio y la apoptosis, mientras que las mitocondrias disfuncionales producen niveles incrementados de especies de oxígeno reactivos tóxicos (Mattson et al. 2008 Neuron 60: 748-766). Algunos estudios sugieren que las neuronas también utilizan lactato producido por la oxidación de glucosa en astrocitos adyacentes (Pancani et al. 2011 Cell Calcio 50: 548-558). Lactato se reduce finalmente a piruvato en las neuronas, y posteriormente, igual que la glucosa, alimenta la trayectoria de fosforilación oxidativa en las mitocondrias para producir ATP.

En algunas modalidades, los cambios en la actividad metabólica cerebral al momento de la administración, pueden ser medidos para determinar la dosificación y/o formas de administración óptimas de pioglitazona. La actividad metabólica cerebral puede ser medida utilizando técnicas especializadas conocidas en el arte incluyendo Generación de Imagen de Resonancia Magnética funcional (fMRI), siendo la implementación más común en la fMRI Dependiente de Nivel de Oxígeno en la Sangre (BOLD), y la Tomografía de Emisión de [^{18}F]-fluorodesoxiglucosa-Positrón (FDG-PET) (Jack et al. 2000 Neurology 55: 484-490; Whitwell et al. 2007 Brain 130: 1777-1786). Las fMRI BOLD mide la proporción de desoxihemoglobina a oxihemoglobina; pequeños incrementos en la actividad neuronal regional dan como resultado una demanda regional incrementada para el suministro de oxígeno durante la vasculatura cerebral, dando como resultado una señal fMRI incrementada en el área. Por lo tanto, BOLD proporciona una medida indirecta, aunque sensitiva de actividad neuronal. Una medida cuantitativa de captación de glucosa, el rango metabólico cerebral de la glucosa (CMRglu), puede ser calculado con FDG-PET.

Cunnane et al., al revisar un cuerpo de literatura sustancial en los estudios FDG-PET de MCI y AD, concluyó que el rango metabólico cerebral global de glucosa (CMRg) se reduce en aproximadamente 20 a 25 % en pacientes AD después de la corrección de la atrofia cerebral. (Cunnane et al., supra). Los descubrimientos FDG-PET más consistentes en AD, son CMRglu reducido en la corteza entorhinal y el hipocampo - dos regiones que son afectadas en forma más temprana por AD - que progresa a la corteza de Cingulato posterior, áreas temporoparietales, precunos y corteza prefrontal como los avances de la enfermedad (During et al. 2011 Neurological Sciences 32: 559-569; Filippi y

Agosta 2011 Journal de Alzheimers Disease 24: 455-474). El metabolismo de glucosa cerebral reducido también puede ser apreciado antes de un diagnóstico de AD, en etapas muy tempranas de disminución cognitiva, así como en regiones del cerebro sensibles a MCI en AD, empeorando la magnitud y el grado de hipometabolismo conforme disminuye la cognición (Caselli et al. 2008 Arch Neurol 65: 1231-1236; Nishi et al. 2010 J Neuroimaging 20: 29-36; Chetelat et al. 2008, supra).

Un estudio longitudinal demostró que, para personas que progresan de cognición normal a diagnóstico clínico de MCI amnésico, tuvo una correlación entre la disminución en cognición y la reducción en el metabolismo en regiones cerebrales conocidas por ser afectadas preferentemente por AD. Esta disminución en las regiones sensitivas AD del cerebro, no fue evidenciada en un grupo de personas similar quienes mantuvieron una cognición estable en el estudio (Caselli et al. 2008, supra; Chetelat et al. 2008, supra). Además, los adultos jóvenes y los individuos de edad media quienes son cognitivamente normales, pero están en riesgo de AD (por ejemplo, con historial familiar de AD, un transportador de APOEε4, o individuos con AD familiar, de desarrollo presintomático temprano), tienen metabolismo a la glucosa reducido en regiones del cerebro sensibles a la patología AD relativa a los que están sin estos factores de riesgo (Small, et al. 1995, supra; Reiman et al. 1996, supra; Reiman et al. 2005, supra; Mosconi et al. 2006, supra; Langbaum et al. 2010, supra; Small et al. 2000 PNAS 97: 6037-6042; Reiman et al. 2004 PNAS 101 : 284-289). Por lo tanto, el metabolismo reducido en regiones del cerebro afectadas por AD, pueden ser uno de los cambios patofisiológicos más tempranos y/o indicadores de la futura enfermedad en los que están en riesgo de desarrollar la enfermedad, y también pueden correlacionarse con el progreso de la misma.

Tal como se sabe en la técnica, fMRI, utilizando el contraste dependiente del Nivel de Oxígeno en la sangre (BOLD), se puede utilizar para visualizar y medir la actividad neuronal durante las tareas, por ejemplo, tareas cognitivas, y para visualizar la actividad del cerebro en un estado en reposo, incluyendo la red de modo por omisión (DMN), la cual es una red de las regiones del cerebro que está activa durante el estado en reposo en vigilia, pero inactiva durante una tarea (Pihlajamaki and Sperling 2008 Future Neurology 3: 409-421; Huettel y Larry 2009 Encyclopedia de Neuroscience 273-281). La actividad neuronal incrementa el metabolismo y la demanda regional de glucosa y oxígeno, lo cual estimula el flujo de sangre a las regiones activas del cerebro. Esta es la respuesta hemodinámica (el producto del flujo de sangre cerebral local, el rango metabólico cerebral de oxígeno y el volumen de sangre cerebral) que se visualiza mediante fMRI BOLD, que es un indicador ampliamente aceptable de actividad neuronal y refleja el consumo de energía (Pihlajamaki y Sperling 2008, supra; Wise y Preston 2010 Drug Discovery Todía 15: 973-980; Reitz et al. 201 1 Nat Rev Neurol 7: 137-152).

fMRI BOLD revela que la actividad cerebral evocada por las tareas, se ve comprometida en los que están en riesgo de AD, y disminuye en forma adicional conforme progresa AD (Filippi y Agosta 2011, supra). Algunas de las tareas utilizadas pueden desafiar las funciones cognitivas de orden superior que se ven comprometidas en forma temprana en el proceso de la enfermedad, incluyendo memoria de episodios y de trabajo. La señal fMRI BOLD cambia en forma más temprana en el lóbulo

mediotemporal (MTL), incluyendo el hipocampo, y las redes neuronales conectadas que son requeridas para codificar o recuperar la memoria (Pihlajamaki y Sperling 2008, supra). La actividad neuronal reducida también es evidente en MTL, particularmente en regiones del hipocampo, de individuos jóvenes y mayores cognitivamente normales quienes están en riesgo incrementado en desarrollar AD (Pihlajamaki y Sperling 2008, supra; Filippi y Agosta 2011, supra; Wu et al. 2009 J Cell Physiol 220: 58-71; Jones et al. 2011 Neurology 77: 1524-1531), y la magnitud de la señal fMRI BOLD en la región cortical posteromedial, está asociada con el desempeño de memoria de episodios verbal en sujetos más grandes cognitivamente normales, y se disminuye conforme los sujetos progresan de daño cognitivo a demencia AD (Pihlajamaki et al. 2010 Alzheimer Disease & Associated Disorders 24: 28-36). Además de los cambios en la actividad cerebral evocada por las tareas en demencia prodromal y AD preclínica, los estudios fMRI y FDG-PET del cerebro en su estado en reposo, indican que la conectividad funcional entre las regiones específicas del cerebro son cada vez más alteradas conforme progresa MCI y AD (Reiman et al. 1996, supra; Filippi y Agosta 2011, supra; Jin et al. 2012 Magnetic Resonance Imaging 30: 48-61). BOLD-fMRI ha probado ser un método particularmente útil para medir la conectividad funcional en el cerebro humano y en cerebros de otras especies, por ejemplo, ratas. Biswal et al., reconoció en el año de 1995, que había una correlación temporal de fluctuaciones de baja frecuencia del flujo de sangre y oxigenación, medida mediante fMRI, en regiones del cerebro que estaban funcionalmente relacionadas (Biswal et al. 1995 Magn Reson Med 34: 537-541). Estas fluctuaciones coordinadas en forma espacio-temporal ocurren incluso cuando el cerebro no está enganchado en una tarea, es decir, cuando el cerebro está en reposo, y se considera que reflejan la actividad neuronal espontánea o los procesos del cerebro de trasfondo (Damoiseaux et al. 2011 Neurobiology de Aging; Yamasaki et al. 2012 Neurology Research International 2012). En AD, se ha observado la conectividad funcional alterada entre regiones cerebrales o sistemas requeridos para procesos cognitivos de orden superior, incluyendo en DMN y los sistemas implicados en la atención. (Yamasaki et al. 2012, supra). La actividad en reposo disminuida en DMN en regiones del cerebro específicas - por ejemplo, entre la corteza de singulato posterior y la corteza temporal o hipocampo, y entre la región subcortical, el tálamo, y un número de regiones corticales - ha sido reportada para pacientes AD y MCI (Wang et al. 2011 European Journal de Radiology). En contraste, existe una conectividad funcional en el estado de reposo incrementada en las regiones frontales entre las regiones frontales de DMN y las partes frontales del cerebro en AD y MCI (Wang et al. 2006 NeuroImage 31: 496-504; Zhang et al. 2009 Behav Brain Res 197: 103-108).

Hasta ahora, no ha sido factible predecir que personas tienen más probabilidad de desarrollar estos cambios patofisiológicos, los cuales pueden conducir a daño cognitivo, y finalmente a demencia de Alzheimer. El genotipo TOMM40 rs10524523 junto con la edad y posiblemente otros factores son útiles como un biomarcador de pronóstico para determinar que sujetos están en riesgo de desarrollar daño cognitivo del tipo de Alzheimer y proporcionar la oportunidad de intervenir en la fase temprana de esta enfermedad progresiva y devastadora.

PPARy es un factor de transcripción nuclear, activado por ligando que afecta muchas trayectorias implicadas en la etiología de AD (Landret et al. 2008 Neuroterapeutics 5: 481-489). Sus acciones biológicas incluyen la modulación de la expresión de gen inflamatorio y la regulación del metabolismo de glucosa y lípidos, ambos de los cuales son normales de AD. PPARy también tiene efectos directos en la función mitocondrial y producción ATP. Muchos líderes en la investigación de AD, creen que la disfunción mitocondrial desempeña un papel significativo en el hipometabolismo cerebral observado en AD.

El receptor PPARy se activa mediante ligandos endógenos y a través de un número de agentes farmacológicos incluyendo fármacos de la clase de tiazolidinodiona (TZD).

La Pioglitazona es comercializada para el tratamiento de diabetes tipo 2 (Actos™), y trata la resistencia a insulina que es el sello característico de la diabetes tipo 2 incrementando la sensibilidad de los tejidos, particularmente el hígado, músculos y tejido adiposo, a los efectos de la insulina (Olefsky 2000 The Journal de Clinical Investigation 106: 467-472). T2DM y la intensidad a insulina son factores de riesgo para desarrollar AD, y los pacientes diabéticos que llevan APOEε4 están en riesgo particular (Irie et al. 2008 Arch Neurol 65: 89-93; Ronnemaa et al. 2008 Neurology 71: 1065-1071; Bruehl et al. 2009 Journal of Clinical y Experimental Neuropsychology 32: 487-493). Los cerebros de pacientes AD que se les practicó autopsia, tienen niveles de insulina, y receptor de insulina y IRS-1 mARN marcadamente inferiores que los cerebros de control, en forma consistente con una intensidad a insulina o fenotipo diabético que conduce algunos a caracterizar AD como diabetes tipo 3 (Steen et al. 2005 J Alzheimers Dis 7: 63-80). Los receptores de insulina se encuentran a lo largo del cerebro humano, y están en concentraciones particularmente altas en el hipotálamo, cerebelo, y corteza, y PPARy y su coactivador, receptor de retinoide X (RXR), también se expresan en el cerebro, incluyendo en el hipocampo y corteza (Inestrosa et al. 2005 Experimental Cell Research 304: 91 -104; Gofflot et al. 2007 Cell 131: 405-418; Morales-Garcia et al. 201 1 GLIA 59: 293-307). El receptor PPARy expresa en asctrocitos y neuronas, y el nivel de proteína es reducido en un ~40% en lisados de cerebro postmortem de pacientes AD.

Pioglitazona mejora la intensidad a insulina neuronal (Liu et al. 2010 European Journal de Pharmacology 629: 153-158), y las concentraciones tan bajas como de 1 nM, reducen significativamente la muerte celular debido a la privación de glucosa, posiblemente debido a que la pioglitazona produce protección contra hipoglucemia, incrementando el contenido mitocondrial y/o modulando la estructura mitocondrial. El fármaco también incrementa la expresión de NRF1, TFAM 1 (factores de transcripción requeridos para biogénesis mitocondrial), y UCP-2 (requerido para remodelado mitocondrial) (Miglio et al. 2009 Neurochemistry International 55: 496-504).

Se han reportado efectos benéficos de pioglitazona en modelos de AD de ratón transgénico, y en modelo de ratones y ratas de neurodegeneración y lesión cerebral. Los efectos benéficos reportados en el tratamiento con pioglitazona, incluyen la reducción de la carga de la placa amiloide en el cerebro en modelos de ratón transgénicos de AD, utilización de glucosa de cerebro y función cerebrovascular incrementadas, inflamación cerebral reducida, tensión oxidativa disminuida, mejoría de los

déficits de aprendizaje y memorias relacionados con la patología y neurogénesis incrementada en animales adultos (Heneka et al. 2000 Journal de Neuroscience 20: 6862-6867; Yan et al. 2003 Journal de Neuroscience 23: 7504-7509; Heneka et al. 2005 Brain 128: 1442-1453; Patan et al. 2006 Life Sci 79: 2209-2216; Nicolakakis et al. 2008 Journal de Neuroscience 28: 9287-9296; Kaur et al. 2009 Fundamental & Clinical Pharmacology 23: 557-566; Roberts et al. 2009 Experimental Neurology 216: 459-470; Glatz et al. 2010 Journal de Hypertension 28: 1488-1497; Nicolakakis y Hamel 2011 J Cereb Blood Flow Metab 31: 1354-1370; Morales-Garcia et al. 2011, supra; Zhang, Xu et al. 2011, supra). Pioglitazona también mejoró la cognición e hiperinsulinemia, y mejoró el flujo de sangre cerebral regional en pequeñas pruebas clínicas controladas con placebo de pacientes diabéticos con AD o daño cognitivo leve (Hanyu et al. 2009 Journal de te American Geriatrics Society 57: 177-179; Hanyu et. al. 2010 J Am Geriatr Soc 58: 1000-1001; Sato et al. 2010 Neurobiology de Aging 32: 1626-1633).

La dosis de pioglitazona de 15 mg, 30 mg y 45 mg comercializada, es adecuada para dosificar diabetes tipo 2, y es segura y eficaz para el tratamiento de esta enfermedad. Las dosis de pioglitazona de nivel de diabetes, han sido utilizadas en pequeños estudios clínicos de enfermedad de Alzheimer (Hanyu et al. 2009 Journal de te American Geriatrics Society 57: 177-179; Hanyu et al. 2010 J Am Geriatr Soc 58: 1000-1001; Sato et al. 2010 Neurobiology de Aging 32: 1626-1633). Además, en una prueba clínica reciente para el tratamiento de Alzheimer utilizando una diferente tiazolidinediona - rosiglitazona - se utilizó la dosificación del fármaco de diabetes tipo 2 (Risner et al. 2006 Pharmacogenomics Journal 6: 246-254; Gold et al. 2010 Demencia y Geriatric Cognitive Disorders 30: 131 -146).

Sin embargo, puede ser preferido limitar la exposición al fármaco, si se puede lograr lo suficiente el efecto y la eficacia farmacodinámica requerida en una dosis inferior, para la población de pacientes proyectados. En esta forma, la frecuencia de eventos adversos raros o no comunes, puede reducirse en forma adicional, mejorando de esta forma la seguridad.

Tal como aquí se enseña y tal como se demuestra a través de los resultados del estudio BOLD presentados en los Ejemplos que se encuentran a continuación, se ha descubierto sorprendentemente que las dosificaciones significativamente inferiores a las utilizadas en el tratamiento de diabetes tipo II (es decir, pioglitazona de dosis baja) dan como resultado un cambio en el metabolismo del cerebro y por lo tanto pueden ser efectivas en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, incluyendo el retraso del desarrollo de la disminución cognitiva (por ejemplo, daño cognitivo del tipo de Alzheimer).

V. Formulaciones y Modos de Administración

La presente invención proporciona un número de formulaciones de producto de fármaco de pioglitazona de dosis baja útiles de acuerdo con los métodos de la presente invención, incluyendo pero sin limitarse a una formulación de baja intensidad (LS), una formulación de tableta de desintegración oral (ODT), una formulación líquida, una formulación de suspensión, una formulación nasal, una formulación de liberación oral inmediata, modificada controlada o extendida, una formulación transdérmica, una formulación rectal, una formulación tópica o una formulación inyectable.

(a) Formulación de Baja Resistencia (LS)

La presente invención proporciona formulaciones LS de pioglitazona de dosis baja, por ejemplo tal como se describe en la Publicación de Patente U.S. S.N. 12/452,587 y en la Publicación de Patente Norteamericana No. 2010/0166853, incorporadas en su totalidad a la presente invención como referencia. La preparación recubierta de la presente invención, comprende un centro que comprende un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable con solubilidad en agua a una temperatura de 20°C no mayor a 10 mg/mL y pK_{a1} (un logaritmo común negativo de la primera constante de disociación de ácido K_{a1}) a una temperatura de 25°C no mayor a 5, y una capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal de la misma.

La preparación recubierta de la presente invención, puede ser una preparación simple que tiene un centro y una capa de recubrimiento, o una recolección de preparaciones que tienen cada una un centro y una capa de recubrimiento. Además, la preparación recubierta de la presente invención puede ser una cápsula producida mezclando una recolección de preparaciones, que tienen cada una un centro y una capa de recubrimiento con aditivos, según sea necesario, y el llenado de la cápsula con la mezcla.

Además, la preparación recubierta de la presente invención puede ser una tableta o pastilla producida mezclando una recolección de preparaciones que tienen cada una un centro y una capa de recubrimiento, con aditivos y moldeando por compresión la mezcla.

El centro de la preparación recubierta de la presente invención, puede consistir únicamente en un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable, con solubilidad en agua a una temperatura de 20°C no mayor a 10 mg/mL y una pK_{a1} a una temperatura de 25°C no mayor a 5. Alternativamente, puede consistir en una composición de un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable con solubilidad en agua a una temperatura de 20°C no mayor a 10 mg/mL y una pK_{a1} a una temperatura de 25°C, no mayor a 5 y, por ejemplo, el aditivo que se menciona más adelante, y similares.

El ácido orgánico contenido en el centro de la preparación recubierta de la presente invención, es un ácido orgánico farmacéuticamente aceptable con solubilidad en agua a una temperatura de 20°C no mayor a 10 mg/mL y pK_{a1} a una temperatura de 25°C no mayor a 5. La solubilidad en agua a una temperatura de 20°C es preferentemente no menor 50 mg/mL, más preferentemente no menor a 100 mg/mL. La solubilidad en agua a una temperatura de 20°C, es preferentemente no mayor a 2000 mg/mL. La pK_{a1} a una temperatura de 25°C, es preferentemente no mayor a 5, más preferentemente no mayor a 4. La pK_{a1} es preferentemente no menor a 1. Se prefiere un ácido orgánico con solubilidad en agua a una temperatura de 20°C no menor a 300 mg/mL y una pK_{a1} una temperatura 25°C no mayor a 4.

Los ejemplos específicos del ácido orgánico incluyen uno o más de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido ascórbico, y similares. El ácido orgánico puede ser cualquiera de hidrato y sal de ácido. Además, el ácido orgánico está preferentemente en la forma de un cristal, ya que la intensidad mecánica y la estabilidad química del centro que contiene el ácido orgánico cristalino, no se degradan durante el paso de producción de la preparación de la presente invención, y en virtud de la acidez.

En la presente especificación, el ácido cítrico incluye monohidrato de ácido cítrico y ácido cítrico anhídrido.

En la forma del ácido orgánico, son preferibles el ácido cítrico, ácido tartárico y ácido málico, y el ácido cítrico (particularmente ácido cítrico anhídrido) es más preferible como un aditivo farmacéutico.

El tamaño de partícula promedio del ácido orgánico generalmente es de 100 a 1500 µm, preferentemente 300 a 800 µm. El tamaño de partícula promedio se mide, por ejemplo, utilizando un aparato de medida de distribución de partículas de difracción láser (por ejemplo, aparato de medida de distribución de partículas SYNPATEC HELOS-RODOS).

Aunque el tamaño de partícula promedio del centro varía dependiendo del tipo de preparación recubierta de la presente invención, generalmente es de 100 a 1500 µm, preferentemente 300 a 800 µm.

El centro de la preparación recubierta de la presente invención, puede ser cubierto con una capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal del mismo.

Aunque el contenido del ácido orgánico en el centro de la preparación recubierta de la presente invención varía dependiendo del tipo de ácido orgánico y similares, generalmente es de 20 a 95 partes en peso, preferentemente 40 a 80 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

Con respecto a una pioglitazona o una sal del mismo, utilizada para la preparación recubierta de la presente invención, los ejemplos de la sal de pioglitazona incluyen sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales con ácido inorgánico, sales con ácido orgánico, sales con aminoácido acídico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales con ácido inorgánico incluyen sales con ácido hidroclórico, ácido hidrobrómico, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos preferidos de las sales con ácido orgánico incluyen sal con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de las sales con aminoácido acídico, incluyen sales con ácido aspártico, ácido glutámico y similares.

Además, la pioglitazona puede ser cualquiera de anhídridos o hidratos, y la pioglitazona puede ser etiquetada en forma adicional con un isotopo (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{125}I) y similares.

La pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es preferentemente clorhidrato de pioglitazona.

La pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede diluir con un diluyente y similares, que son generalmente conocidos en la técnica.

En la preparación recubierta de la presente invención, el tamaño de partícula promedio de la pioglitazona y una sal del

mismo, que será utilizada como material de partida, es preferentemente de 0.5 a 50 µm.

Al adoptar dicho tamaño promedio, se puede obtener una preparación recubierta de pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene disolución superior.

El tamaño promedio preferido antes mencionado se aplica a pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como el material de partida. El material de partida puede comprender un producto pulverizado obtenido mediante pulverización durante el proceso para producir la preparación recubierta, o un producto pulverizado mezclado obtenido mediante pulverización junto con un excipiente (por ejemplo, celulosa cristalina) o similares. El tamaño promedio de pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede cambiar más allá del rango anterior durante un proceso de producción de la preparación recubierta de la presente invención, o un proceso de conservación de la preparación recubierta después de la producción, mediante la coagulación de pioglitazona o una sal del mismo. La pulverización se lleva a cabo utilizando una máquina para elaborar una formulación tal como un mortero, un molino de chorro, un molino de martillo, un molino de colador (P-3; Showa Kagaku Kikai Kosakusho Co., Ltd.) o similares.

Tal como aquí se utiliza, el tamaño promedio significa, un tamaño de partícula que se divide en partículas crudas y partículas finas en un 50% con base en la distribución de peso o distribución de número. El tamaño promedio puede ser medido, por ejemplo, mediante un aparato de medida de distribución de tamaño de partícula de difracción láser (por ejemplo aparato de medida de distribución de partícula SYNPATEC HELOS-RODOS).

La capacidad de dispersión de pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene el tamaño promedio deseado antes mencionado, se define preferentemente a través de partículas no mayor a 0.1 µm que están contenidas en no más del 10% de la cantidad total, y partículas no menores a 1000 µm que están contenidas en no más del 10% de la cantidad total. El límite inferior del mismo, generalmente es definido por partículas con un tamaño no mayor a 0.1 µm que están contenidas en no menos del 0.1% de la cantidad total, y partículas con un tamaño no menor a 1000 µm que están contenidas en no menos del 0.1% de la cantidad total.

Aunque el contenido de pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación recubierta de la presente invención, varía dependiendo de la forma de dosificación, la dosis y similares de la preparación recubierta, generalmente es de 0.01 a 30 partes en peso, preferentemente 0.5 a 25 partes en peso, preferentemente en forma adicional 0.5 a 20 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

En la preparación recubierta de la presente invención, una proporción en peso de pioglitazona y el ácido orgánico farmacéuticamente aceptable antes mencionado es preferentemente de 1:4 a 1:100, más preferentemente 1:4 a 1:20, más preferentemente 1:5 a 1:10. El peso de pioglitazona significa el equivalente de pioglitazona en la sal de pioglitazona farmacéuticamente aceptable.

En la preparación recubierta de la presente invención, la cantidad de la capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal del mismo que será utilizada generalmente es de 5 a 205 partes en peso, preferentemente 10 a 100 partes en peso,

más preferentemente 20 a 90 partes en peso, por 100 partes en peso del centro.

La preparación recubierta de la presente invención contiene preferentemente celulosa o un derivado de celulosa en una capa de recubrimiento. De éstos, es preferible un derivado de celulosa.

El derivado de celulosa es una celulosa en donde una parte de la molécula de celulosa es sustituida por otros átomos o grupos funcionales. Los ejemplos del derivado de celulosa incluyen hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel (L-HPC), hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa y similares. De estos, se prefiere la hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel. Más preferida es la hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel que tiene un contenido del grupo hidroxipropilo de 5 a 16% en peso (por ejemplo, LH-11, LH-21, LH-31, LH-22, LH-32, LH-20, LH-30, LH-33 (nombres comerciales, fabricados por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) etc.) y similares.

El contenido de celulosa o derivado de celulosa en la capa de recubrimiento de la preparación recubierta de la presente invención, generalmente es de 0.5 a 70 partes en peso, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 partes en peso, más preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 partes en peso, por 100 partes en peso de la capa de recubrimiento.

Ya que la celulosa o un derivado de celulosa (preferentemente un derivado de celulosa) está contenido preferentemente en la capa de recubrimiento, la preparación recubierta de la presente invención tiene una construcción que constituye una capa de recubrimiento, que comprende celulosa o

un derivado de celulosa como un esqueleto, y se mantiene en un solvente acuoso, en donde la pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se disuelve en un ácido orgánico (solución) en la construcción para producir una solución acuosa. Como resultado, la preparación recubierta de la presente invención, en comparación con las preparaciones convencionales, puede incrementar en forma remarcada la concentración en sangre máxima y la AUC de pioglitazona después de la administración, y disminuir en forma marcada la desviación estándar relativa interindividual (RSD) en AUC.

Además, ya que la preparación recubierta de la presente invención tiene una construcción que constituye una capa de recubrimiento, que comprende celulosa o un derivado de celulosa, como un esqueleto, y se mantiene en un solvente acuoso, en donde la pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se disuelve en un ácido orgánico (solución) en la construcción para producir una solución acuosa, puede incrementar la biodisponibilidad en comparación con preparaciones convencionales. Específicamente, la biodisponibilidad de la preparación recubierta de la presente invención excede el 75% cuando la preparación se administra a perros.

En la presente especificación, la biodisponibilidad puede ser determinada, por ejemplo, dividiendo la AUC en el tiempo de administración no intravenosa de una cantidad determinada de pioglitazona, entre la AUC en el momento de la administración intravenosa de la misma cantidad de pioglitazona. Por ejemplo, cuando la biodisponibilidad de un producto de fármaco de liberación inmediata de pioglitazona de dosis baja de la presente invención, se administra en forma oral para ser calculada, la

fórmula puede ser como la siguiente:

Biodisponibilidad (%)=(AUC de administración oral/AUC de administración intravenosa)x100.

Cuando pioglitazona se disuelve en la construcción para producir una solución acuosa, se puede proporcionar un efecto similar al logrado por la administración de la solución, lo cual se espera que incremente la concentración en sangre máxima, la AUC y la biodisponibilidad.

Aquí, el solvente acuoso en la presente especificación incluye agua, amortiguador KCl--HCl (por ejemplo, amortiguador KCl--HCl en pH 2.0), amortiguador de McIlvaine (por ejemplo, amortiguador de McIlvaine en pH 2.2, pH 2.5 o pH 3.0) y similares. La construcción que constituye una capa de recubrimiento, que comprende un derivado de celulosa como un esqueleto y se mantiene en un solvente acuoso significa específicamente, por ejemplo, que la construcción está presente durante no menos de 10 minutos, preferentemente en un amortiguador KCl--HCl (pH 2.0, 900 mL) bajo condiciones del Método de Paddle (50 rpm), más preferentemente en un amortiguador de McIlvaine (pH 2.2, 900 ml) bajo condiciones del Método Paddle (50 rpm), aún más preferentemente en amortiguador de McIlvaine (pH 2.5, 900 ml) bajo condiciones del Método Paddle (50 rpm), particularmente, preferentemente en amortiguador de McIlvaine (pH 3.0, 900 mL) bajo condiciones del Método Paddle (50 rpm).

El Método de Paddle en la presente especificación significa la medición de acuerdo con la Farmacopea Japonesa, 14° Edición, General Tests, Dissolution Test Method 2, a menos que se indique de manera particular.

La preparación recubierta de la presente invención puede

contener aditivos convencionalmente utilizados en el campo técnico de la formulación de preparaciones. Los ejemplos del aditivo incluyen excipiente, desintegrante, enlazador, lubricante, colorante, regulador de pH, tensoactivo, estabilizador, corrector, edulcorante, saborizante, deslizante, agente antiestática, agente de protección contra la luz, antioxidante, agente de reducción, agente de quelación y similares. Estos aditivos se utilizan en una cantidad empleada convencionalmente en el campo técnico de la formulación de preparaciones. Además, estos aditivos pueden ser utilizados en una mezcla de dos o más tipos de los mismos en una proporción adecuada.

Los ejemplos del excipiente incluyen sacáridos; celulosa cristalina; almidones tales como almidón de maíz, almidón de papa, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón parcialmente pregelatinizado, almidón pregelatinizado, almidón poroso, dextrina, almidón de carboximetilo y similares; fosfato de calcio anhidro, carbonato de calcio precipitado, silicato de calcio, celulosa en polvo, gelatina, ácido silícico, anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, aluminometasilicato de magnesio, óxido de magnesio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio.

Los ejemplos de sacáridos incluyen azúcar, azúcar de almidón, lactosa, miel y alcohol de azúcar. Se pueden utilizar dos o más tipos de estos sacáridos en una mezcla en una proporción adecuada.

Los ejemplos de sacáridos incluyen azúcar, azúcar de almidón, lactosa, miel y alcohol de azúcar. Se pueden utilizar dos o más de estos tipos de sacáridos en una mezcla en una proporción adecuada.

Los ejemplos de azúcar incluyen sacarosa, azúcar blanca

blanda, sacarosa de glucosilo [azúcar de acoplamiento (nombre comercial)], fructooligosacárido y palatinosa.

Los ejemplos de azúcar de almidón incluyen glucosa, maltosa, jarabe de almidón pulverizado, jarabe de almidón, fructosa y trehalosa.

Los ejemplos de lactosa incluyen lactosa, lactosa isomerizada (lactulosa) y lactosa hidrogenada (lactitol).

Los ejemplos de miel incluyen varios tipos de miel generalmente utilizada para alimento.

Los ejemplos de alcohol de azúcar incluyen sorbitol, manitol (específicamente, D-manitol), maltitol, jarabe de glucosa hidrogenado, xilitol, paratinosa reducida y eritritol.

Los sacáridos son preferentemente alcohol de azúcar, azúcar de almidón y sacarosa, más preferentemente manitol, trehalosa y sacarosa. De estos, son preferibles el manitol y la trehalosa. Desde el aspecto del cambio de color sorpresivo de la preparación (específicamente el cambio de color bajo condiciones de conservación), en la preparación recubierta de la presente invención, la capa de recubrimiento contiene preferentemente manitol o trehalosa.

Cuando se utilizan sacáridos para la preparación recubierta, el contenido de la misma es por ejemplo de 5 a 90 partes en peso, preferentemente 5 a 40 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

Particularmente, cuando la preparación recubierta de la presente invención contiene manitol o trehalosa, el contenido de manitol o trehalosa es preferentemente 5 a 40 partes en peso, más preferentemente 5 a 30 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

Los ejemplos de celulosa cristalina incluyen CEOLUS

KG801, KG802, PH101, PH102, PH301, PH302, PH-F20, RC-A591NF (nombres comerciales, fabricados por Asahi Kasei Chemicals Corporation), incluyendo uno llamado celulosa microcristalina.

Los ejemplos de desintegrantes incluyen carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio (calcio de carmelosa), almidón de carboximetilo de sodio, sodio de carmelosa, sodio de croscarmelosa, crospovidona [preferentemente, Kollidon CL, CL-M, CL-F, CL-SF (nombre comercial, BASF JAPAN LTD.); Poliplasdona XL, XL-10, INF-10 (nombre comercial, ISP JAPAN LTD.)], hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel [preferentemente hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel que tiene un contenido del grupo hidroxipropilo del 5 al 16% en peso, tal como LH-11, LH-21, LH-31, LH-22, LH-32, LH-20, LH-30, LH-33 (nombre comercial, fabricado por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) etc.], almidón de hidroxipropilo, almidón de maíz y almidón parcialmente pregelatinizado.

Cuando se utiliza un desintegrante para la preparación recubierta de la presente invención, el contenido del desintegrante es por ejemplo, de 0.5 a 50 partes en peso, preferentemente 1 a 25 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

Los ejemplos de enlazadores incluyen hidroxipropilcelulosa [preferentemente HPC-SSL, SL, L (nombre comercial, NIPPON SODA CO., LTD.)], hidroxipropilmetilcelulosa, povidona (polivinilpirrolidona), polvo de goma arábiga, sacarosa, gelatina, pululan, metilcelulosa, celulosa cristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel [preferentemente hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel que tiene un contenido del grupo

hidroxipropilo del 5 al 16% en peso, tal como LH-11, LH-21, LH-31, LH-22, LH-32, LH-20, LH-30, LH-33 (nombre comercial, fabricado por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) etc.], macrogol, dextrano, alcohol polivinílico y pasta de almidón. De éstos, es preferible la hidroxipropilcelulosa.

Cuando se utiliza un enlazador para la preparación recubierta de la presente invención, el contenido del enlazador es por ejemplo de 0.01 a 50 partes en peso, preferentemente 0.1 a 10 partes en peso, por 100 partes en peso de la preparación recubierta.

Los ejemplos de lubricantes incluyen ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, ésteres de sacarosa de ácidos grasos, fumarato estearilo de sodio, ceras, DL-leucina, sulfato laurilo de sodio, sulfato laurilo de magnesio, macrogol y ácido silícico anhidro ligero (por ejemplo, AEROSIL). De éstos, es preferible el estearato de magnesio.

Los ejemplos de colorantes incluyen colorantes de alimentos tales como el Amarillo de Alimentos No. 5 (Sunset Yellow, igual que el amarillo de Alimentos No. 6 en los E.U.A.), Rojo de Alimentos No. 2, Azul de Alimentos No. 2 y similares, colores de lago alimenticio, óxido férrico amarillo (óxido de hierro amarillo), trióxido de dihierro (óxido de hierro rojo), riboflavina, éster de ácido orgánico de riboflavina (por ejemplo, butirato de riboflavina), fosfato de riboflavina o una sal de metal álcali del mismo o sal de metal de tierra alcalina del mismo, fenolftaleína, óxido de titanio, licopeno, beta-caroteno.

Los ejemplos de regulador de pH incluyen sal de citrato, fosfato, carbonato, tartrato, fumarato, acetato y aminoácido.

Los ejemplos del tensoactivo incluyen sulfato laurilo de sodio, polisorbato 80, polioxietilen (160) polioxipropilen (30)

glicol, polioxietilen (196) polioxipropilen (67) glicol y aceite de castor hidrogenado de polioxietileno 60.

Los ejemplos del estabilizador incluyen ascorbato de sodio, tocoferol, edetato tetrasódico, nicotinamida, ciclodextrinas; sales de metal de tierra alcalina (por ejemplo, carbonato de calcio, hidróxido de calcio, carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, silicato de magnesio, aluminato de magnesio) y butilhidroxianisole.

Los ejemplos del corrector incluyen ácido ascórbico, ácido cítrico (anhidro), ácido tartárico y ácido málico.

Los ejemplos de edulcorante incluyen aspartame, potasio de acesulfame, taumatina, sodio de sacarina y glicirricinato de dipotasio. De éstos, aspartame es el preferido.

Los ejemplos de saborizantes incluyen mentol, aceite de hierbabuena, aceite de limón y vainilla.

Los ejemplos de deslizantes incluyen ácido silícico, anhidro ligero y dióxido de silicón hidratado. Aquí, el ácido silícico anhidro ligero puede ser cualquiera que contenga dióxido de silicón hidratado (SiO_2 nH_2O) (n es un entero) como un componente principal, y Sylysia 320, como ejemplos concreto del mismo, (nombre comercial, FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.), AEROSIL 200 (nombre comercial, NIPPON AEROSIL CO., LTD.) y similares pueden ser utilizados.

Los ejemplos de agentes antiestáticos incluyen talco y ácido silícico anhidro ligero.

Los ejemplos del agente de protección contra la luz incluyen óxido de titanio.

Los ejemplos del antioxidante incluyen dibutilhidroxitolueno (BHT), tocoferol, éster de tocoferol (por ejemplo, acetato de tocoferol), ácido ascórbico o sal de metal álcali del mismo, o sal

de metal de tierra alcalina del mismo, licopeno, beta-caroteno.

Los ejemplos del agente de reducción incluyen cistina y cisteína.

Los ejemplos del agente de quelación incluyen EDTA o la sal de metal álcali del mismo, o la sal de metal de tierra alcalina del mismo.

La preparación recubierta de la presente invención, puede tener una capa intermedia formada entre el centro y la capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal del mismo. Utilizando una capa intermedia, se puede evitar un efecto adverso (por ejemplo, descomposición de la pioglitazona) del ácido orgánico en el centro en la pioglitazona o una sal del mismo en la capa de recubrimiento, y se puede prolongar la durabilidad de la preparación recubierta.

La forma de dosificación de la preparación recubierta de la presente invención generalmente es una preparación sólida. Los ejemplos de la preparación sólida incluyen tabletas, grageas, cápsulas, polvos, gránulos y trociscos. De éstos, se prefieren gránulos, cápsulas y tabletas. Las formas de dosificación semisólida, tal como un gel que contiene la preparación recubierta, y preparaciones líquidas que contienen una solución de pioglitazona de la dosificación adecuada, se pueden utilizar también de acuerdo con la presente invención.

La forma de la preparación sólida no está particularmente limitada, y puede ser cualquiera de redonda, cápsula, en forma de rosca, oblonga y similares.

La preparación sólida puede ser recubierta con un agente de recubrimiento, y puede tener una marca y letras para identificación, y además una línea marcada para dividirse.

Los ejemplos de la base de recubrimiento incluyen base de

recubrimiento de azúcar, base de recubrimiento de película acuosa, base de recubrimiento de película entérica, base de recubrimiento de película de liberación sostenida y similares.

Como la base de recubrimiento de azúcar, se utiliza sacarosa y uno o más tipos seleccionados de talco, carbonato de calcio precipitado, gelatina, goma arábiga, pululan, cera de carnauba y similares se pueden utilizar en combinación.

Los ejemplos de la base de recubrimiento de la película acuosa incluyen, polímeros de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa y similares; polímeros sintéticos tales como dietilaminoacetato de polivinilacetal, copolímero de metacrilato de aminoalquilo E [Eudragit E (nombre comercial)], polivinilpirrolidona y similares; polisacáridos tales como pululan y similares; y similares.

Los ejemplos de la base de recubrimiento de película entérica incluyen polímeros de celulosa tales como ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetiletilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa y similares; polímeros de ácido acrílico tales como copolímero de ácido metacrílico L [Eudragit L (nombre comercial)], copolímero de ácido metacrílico LD [Eudragit L-30D55 (nombre comercial)], copolímero de ácido metacrílico S [Eudragit S (nombre comercial)] y similares; que tienen sustancias de origen natural tales como shellac y similares; y similares.

Los ejemplos de la base de recubrimiento de película de liberación sostenida incluyen polímeros de celulosa tales como etilcelulosa, acetato de celulosa y similares; polímeros de ácido acrílico tales como copolímero metacrilato de aminoalquilo RS [Eudragit RS (nombre comercial)], suspensión de copolímero de

acrilato de etilo-metacrilato de metilo [Eudragit NE (nombre comercial)] y similares; y similares.

Dos o más tipos de las bases de recubrimiento antes mencionadas pueden ser utilizadas en una mezcla en una proporción adecuada. Además, también se pueden utilizar durante el recubrimiento aditivos de recubrimiento.

Los ejemplos del aditivo de recubrimiento incluyen agentes de protección contra la luz y/o colorantes tales como óxido de titanio, talco, óxido férrico y similares; plastificantes tales como polietilenglicol, citrato de trietilo, aceite de castor, polisorbatos y similares; y similares.

La preparación recubierta de la presente invención puede ser producida utilizando los diversos aditivos antes mencionados de acuerdo con un método convencional en el campo técnico de la formulación de preparaciones.

Por ejemplo, la preparación recubierta de la presente invención puede ser producida mediante:

(1) mezclar un ácido orgánico con aditivos cuando sea necesario, para proporcionar un centro que contiene un ácido orgánico;

(2) formar una capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal del mismo en la superficie del centro, recubriendo el centro que contiene un ácido orgánico con pioglitazona o una sal del mismo y aditivos cuando es necesario,

(3) secar y cernir el producto recubierto obtenido, según sea necesario.

Además, la preparación recubierta de la presente invención, también puede ser producida mezclando el producto recubierto después de secarse, y cernirlo con un aditivo según sea necesario, y mediante moldeo de compresión o llenado de la

mezcla en una cápsula.

Aquí, el mezclado (incluyendo granulado, secado, molido y similares) se lleva a cabo, por ejemplo, utilizando una máquina para elaborar preparaciones, tal como un mezclador tipo V, un mezclador por rebote, un granulador de agitación de alta velocidad (FM-VG-10; POWREX CORPORATION), un amasador en circunferencia (Hata Tekkosho, Co., Ltd.), un secador/granulador de lecho fluidizado (LAB-1, FD-3S, FD-3SN; POWREX CORPORATION), un secador de caja de vacío (Kusunoki Machinery Co., Ltd.), un molino de colador (P-3; Showa Kagaku Kikai osakusho Co., Ltd.), un granulador de cama fluidizada centrífuga (CF-mini, CF-260, CF-360; Freund Corporation), un granulador seco, un granulador de secado con rocío, granulador de cama fluidizada por rotación (MP10; POWREX CORPORATION) y similares.

Para el recubrimiento, por ejemplo, se utiliza una máquina para elaborar preparaciones, tal como un granulador de cama fluidizada centrífuga (CF-mini, CF-260, CF-360; Freund Corporation), un granulador por rodillo (MP10; POWREX CORPORATION), un aparato de recubrimiento de cama fluidizada general, un aparato de recubrimiento tipo Wurster y similares, y se utiliza preferentemente un granulador de cama fluidizada centrífuga.

Se lleva a cabo moldeo por compresión, por ejemplo, golpeando generalmente en una presión de 0.3 a 35 kN/cm^2 utilizando una máquina de generación de tabletas de punzón simple (KIKUSUI SEISAKUSHO LTD.), una máquina de generación de tabletas rotatoria (KIKUSUI SEISAKUSHO LTD.), Auto-graph (Shimadzu Corporation) y similares.

Los ejemplos de cápsulas que se pueden utilizar para el

relleno de cápsulas incluyen cápsulas de gelatina, cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), cápsulas de pululan y similares (preferentemente, cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)) Licaps®, Vcaps®, Coni-Snap® caps, Press-fit® caps y Xpress-fit™ caps.

El centro antes mencionado que contiene ácido orgánico, se recubre a través del siguiente método o un método análogo al mismo.

1) un método que incluye rociar pioglitazona o una sal del mismo junto con aditivos según sea necesario (preferentemente, un excipiente [preferentemente celulosa cristalina (la cual se puede omitir), sacáridos (preferentemente manitol, trehalosa, sacarosa)], un detergente (preferentemente L-HPC)) sobre el núcleo que contiene un ácido orgánico, mientras que se rocía una solución de un enlazador (preferentemente, hidroxipropilcelulosa) en un solvente [por ejemplo, uno o más tipos seleccionados de agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol), acetona y acetonitrilo; preferentemente agua o isopropanol] (la solución puede ser una dispersión);

2) un método que incluye rociar una solución de un enlazador (preferentemente, hidroxipropilcelulosa) que contiene pioglitazona o una sal del mismo, y un aditivo según sea necesario (preferentemente, excipiente [preferentemente celulosa cristalina (que se puede omitir), sacáridos (preferentemente, manitol, trehalosa sacarosa)], un desintegrante (preferentemente, L-HPC)) en un solvente [por ejemplo, uno o más tipos seleccionados de agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol), acetona, acetonitrilo; preferentemente agua o isopropanol] (la solución puede ser una dispersión) en el ácido orgánico que contiene el centro.

3) un método que incluye rociar pioglitazona o una sal del mismo junto con un aditivo según sea necesario (preferentemente, excipiente [preferentemente, celulosa cristalina (que pueda omitirse), sacáridos (preferentemente, manitol, trehalosa, sacarosa)], un desintegrante (preferentemente, L-HPC), y un enlazador (preferentemente, hidroxipropilcelulosa)) en el centro que contiene ácido orgánico, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol), acetona, acetonitrilo; preferentemente agua o isopropanol]; o

4) un método que incluye rociar pioglitazona o una sal del mismo junto con celulosa o un derivado de celulosa [preferentemente, derivado de celulosa (más preferentemente L-HPC)], y un aditivo según sea necesario (preferentemente, un excipiente [preferentemente celulosa cristalina (que se puede omitir), sacáridos (preferentemente, manitol, trehalosa, sacarosa)] en el centro que contiene ácido orgánico, mientras se rocía una solución de un enlazador (preferentemente, hidroxipropilcelulosa) en un solvente [por ejemplo, uno o más tipos seleccionados de agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol), acetona y acetonitrilo; preferentemente agua o isopropanol] (la solución puede ser una dispersión).

El centro de la preparación recubierta de la presente invención consiste preferentemente en al menos un tipo de ácido orgánico seleccionado de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido ascórbico [preferentemente ácido cítrico (particularmente ácido cítrico anhidro)].

Además, la capa de recubrimiento que comprende pioglitazona o una sal del mismo en la preparación recubierta de la presente invención, consiste preferentemente en pioglitazona o una sal del mismo (preferentemente clorhidrato de pioglitazona),

un excipiente [preferentemente celulosa cristalina (que se puede omitir), sacáridos (preferentemente manitol, trehalosa, sacarosa; más preferentemente manitol)], un desintegrante (preferentemente L-HPC) y un enlazador (preferentemente hidroxipropilcelulosa), o es una capa de recubrimiento que consiste en pioglitazona o una sal del mismo (preferentemente clorhidrato de pioglitazona), un excipiente [preferentemente celulosa cristalina (que puede ser omitida), sacáridos (preferentemente manitol, trehalosa, sacarosa; más preferentemente manitol)], celulosa o un derivado de celulosa (preferentemente un derivado de celulosa, más preferentemente L-HPC) y un enlazador (preferentemente hidroxipropilcelulosa).

(b) Formulación de tabletas de desintegración oral (ODT)

La presente invención proporciona una tableta de desintegración oral, en donde el ingrediente activo es pioglitazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo tal como se describe en la Publicación de Patente USSN 12/810,779, que corresponde a la Publicación de Patente US 2010-0278390, incorporada en su totalidad a la presente invención como referencia).

Utilizando el método de producción de la presente invención, una tableta de desintegración oral, la cual se desintegra rápidamente en una cavidad oral, tiene una dureza adecuada deseada, y es superior en estabilidad de almacenamiento, ya que muestra únicamente una pequeña disminución en la dureza, y un pequeño incremento en el grosor de la tableta incluso bajo condiciones de alta temperatura y/o alta humedad sin empaque alguno, puede producirse fácilmente a través de vasos simples. Además, utilizando el método de producción de la presente invención, se pueden suprimir los problemas en la generación de tabletas durante la elaboración de tabletas, tal como el nivelado y

enlace a la pared interna del troquel, y similares.

Tal como se utiliza en la presente invención, una tableta de desintegración oral o ODT, significa una tableta que se desintegra rápidamente mediante la saliva en una cavidad oral.

La tableta de desintegración oral de la presente invención, puede comprender (a) uno o más sacáridos o alcoholes de azúcar seleccionados del grupo que consiste en manitol (particularmente, D-manitol), lactosa (particularmente hidrato de lactosa), xilitol, sacarosa, eritritol y glucosa (que también será referida como un componente (a) en la presente especificación) y (b) hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel (también referida como el componente (b) en la presente especificación).

Como el componente (a), se prefieren manitol y lactosa.

El contenido del componente (a) es preferentemente de 50 a 95% en peso, más preferentemente de 70 a 90% en peso del peso de la preparación. El componente (a) también puede ser disuelto opcionalmente en agua y similares, tal como se menciona más adelante, y utilizarse como una solución de enlace para granulado mediante agitación. El contenido del componente (a) antes mencionado, también incluye la cantidad utilizada como la solución de enlace. Cuando se utiliza como la solución de enlace, la cantidad de la misma es preferentemente menor al 10% en peso, más preferentemente aproximadamente 2 a 5% en peso del contenido del componente (a) antes mencionado.

El tamaño de partícula promedio de los sacáridos y alcoholes de azúcar del componente (a), es preferentemente no mayor a 50 µm, más preferentemente 10 a 20 µm. Cuando el tamaño de partícula promedio excede 50 µm, tiende a extenderse el tiempo de desintegración.

El tamaño de partícula promedio de los sacáridos y

alcoholes de azúcar del componente (a) antes mencionado, significa el tamaño de partícula promedio inicial de los materiales de partida antes de someterse a granulado por agitación, y significa que tienen un tamaño de partícula dentro del rango antes mencionado, y el tamaño de partícula promedio puede cambiar durante los procesos de producción subsecuentes y el almacenamiento de la preparación.

Los sacáridos y alcoholes de azúcar del componente (a) que tienen un tamaño de partícula promedio dentro del rango antes mencionado, están comercialmente disponibles. Alternativamente, los productos comercialmente disponibles pueden ser pulverizados con un método convencional para ajustar el tamaño de partícula y posteriormente utilizarse.

En una modalidad, el tamaño de partícula promedio en la presente especificación muestra un tamaño de partícula acumulado del 50% en la distribución de tamaño de partícula medida con base en un método seco utilizando un dispersor tipo flujo de aire.

En la presente invención, la hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel no requiere una limitación particular en el grado y similares, y se puede utilizar un producto comercialmente disponible. Por ejemplo, se puede utilizar hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel que tiene un contenido del grupo hidroxipropilo de aproximadamente 7.0 a 12.9% en peso.

El contenido de la hidroxipropilcelulosa sustituida de bajo nivel, es preferentemente de 3 a 20% en peso, más preferentemente 5 a 15% en peso, del peso de la preparación.

La tableta de desintegración oral de la presente invención contiene preferentemente (c) uno o más sacáridos o alcoholes de azúcar seleccionados del grupo que consiste en jarabe de almidón

de maltosa hidrogenado en polvo, maltosa, maltitol, sorbitol y trehalosa (que también será referido como el componente (c) en la presente especificación). La presencia del componente (c), incrementa además la dureza de la tableta.

Como el componente (c), se prefiere el jarabe de almidón de maltosa hidrogenado en polvo y maltosa.

El contenido del componente (c) es preferentemente de 0.1 a 5% en peso, más preferentemente de 0.1 a 1% en peso del peso de la preparación.

La tableta de desintegración oral de la presente invención no contiene sustancialmente un desintegrante de almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de carboximetilo de sodio, almidón de arroz, almidón de trigo, almidón pregelatinizado, almidón parcialmente pregelatinizado, etc.).

Aquí, el término sustancialmente libre de, en la presente especificación, significa la ausencia de una cantidad que tiene influencia adversa en la estabilidad de almacenamiento de las preparaciones. Aquí, "sustancialmente libre de" en la presente especificación significa la ausencia de una cantidad que tiene influencia adversa en la estabilidad de almacenamiento de las preparaciones. Específicamente el contenido del desintegrante de almidón es preferentemente no mayor al 5% en peso, más preferentemente no mayor al 3% en peso, aún más preferentemente, no mayor al 1% en peso del peso de la preparación.

La tableta de desintegración oral de la presente invención, contiene preferentemente taumatina. El contenido de taumatina es preferentemente 0.1 a 5% en peso, más preferentemente 0.1 a 1% en peso, del peso de la preparación. La taumatina es un edulcorante agregado generalmente para cubrir el sabor amargo

de un ingrediente activo. En la presente invención, la presencia de taumatina proporciona efectos de capacidad de moldeo mejorada durante la producción y dureza incrementada.

Además de los componentes antes mencionados, la tableta de desintegración oral de la presente invención puede contener aditivos generalmente utilizados para preparaciones sólidas. El aditivo es por ejemplo, un excipiente, desintegrante además de desintegrante de almidón, enlazador, lubricante, fluidizador, corrector, agente edulcorante, agente de recubrimiento, colorante, sabor y similares. El contenido de estos aditivos no está limitado particularmente y puede ser seleccionado en forma adecuada de una cantidad convencionalmente utilizada en el campo farmacéutico. La cantidad total de los aditivos, excepto para los componentes (a) y (b) cuando está contenido el componente (c), la cantidad total de los aditivos excepto los componentes (a)-(c)), es preferentemente no mayor al 50% en peso, más preferentemente no mayor al 25% en peso del peso de la preparación.

La tableta de desintegración oral de la presente invención contiene pioglitazona como un ingrediente activo. El contenido del ingrediente activo puede ser determinado en forma adecuada con base en la cantidad utilizada para la aplicación clínica, y preferentemente no es mayor al 50% en peso, más preferentemente no mayor al 25% en peso, del peso de la preparación.

La tableta de desintegración oral de la presente invención está caracterizada por producción que incluye los pasos de granular una composición que contiene los componentes (a) y (b) antes mencionados (preferentemente los componentes (a), (b) y (c) antes mencionados) mediante un método de granulado de

agitación, y moldeo por compresión del producto de granulación obtenido. Se considera que ya que el producto de granulación se vuelve esférico mediante granulación de agitación, en la presente invención se evitan los problemas de generación de tabletas (particularmente enlace a la pared interna del troquel) en el paso de moldeo por compresión subsecuente.

El método de producción de la tableta de desintegración oral de la presente invención, se explica con detalle a continuación.

1. Paso de Granulado

Los componentes (a) y (b) antes mencionados (preferentemente los componentes (a), (b) y (c) antes mencionados), un ingrediente activo opcional y/o un aditivo opcional, son mezclados. El aditivo, es por ejemplo excipientes (por ejemplo, talco), desintegrantes además de desintegrantes de almidón (por ejemplo, crospovidona), agentes edulcorantes, colorantes, saborizantes y similares. El ingrediente activo puede ser mezclado con un excipiente (por ejemplo, talco), primero y posteriormente recubrirse con un agente de recubrimiento (por ejemplo, dispersión de etilcelulosa acuosa, triacetina) para el propósito de cubrir el sabor amargo y similares.

La mezcla antes mencionada se granula a través de un método de granulación de agitación. El método de granulación de agitación también es referido generalmente como un método de granulación de agitación de alta velocidad. Aquí, el método de granulación de agitación (alta velocidad) es un método que incluye agregar en forma de gotas o mediante rocío una solución enlazadora en un polvo mezclado, rotando el conjunto de alas principales en la parte inferior de una máquina de granulado para formar partículas grandes, y moler las partículas con un picador en la pared lateral para proporcionar gránulos con el tamaño de

partícula deseado (Yoshihisa SAGAWA, Pharmaceutical Product Preparation Technique, CMC Publishing CO., LTD., publicado en el 2002, página 108).

La granulación mediante el método de granulado de agitación puede llevarse a cabo utilizando lo que se llama un granulador de agitación (también referido como un granulador de agitación de alta velocidad) (por ejemplo, mezclador de alta velocidad, LFS-GS-2J (fabricado por Fukae Powtec); VERTICAL GRANULATOR (fabricado por POWREX CORPORATION); NEW SPEED KNEADER (fabricado por OKADA SEIKO CO., LTD.) etc.). La velocidad de rotación de las alas principales y el picador no está particularmente limitada, y puede ser seleccionada en forma adecuada del rango generalmente utilizado en el granulado de agitación. Específicamente, se agrega una solución de enlace (por ejemplo agua, o cuando es necesario, se pueden combinar otros aditivos) a la mezcla antes mencionada en el granulador de agitación, y la mezcla se granula. Cuando se agrega taumatina en la presente invención, aunque no se limita particularmente, se puede agregar a la solución de enlace.

2. Paso de Moldeo por Compresión

Al producto de granulación obtenido en el paso de granulación, se le agrega un ingrediente activo opcional y/o aditivo opcional (por ejemplo, fluidizadores (por ejemplo, ácido silícico anhidro ligero), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, fumarato estearilo de sodio, estearato de calcio) sabores), y la mezcla se combina y se moldea por compresión a través de una máquina de elaboración de tabletas y similares. La presión de moldeo por compresión (presión de elaboración de tableta) se puede seleccionar en forma adecuada del rango generalmente utilizado en la producción de tabletas. Aunque la

presión no está limitada particularmente, preferentemente no es menor a 200 kg.

La tableta de desintegración oral de la presente invención producida como se mencionó anteriormente, tiene una dureza adecuada deseada, se desintegra rápidamente en una cavidad oral, y muestra estabilidad de almacenamiento superior, incluso aunque pueda ser producida fácilmente sin pasos de humidificación y secado incómodos después de la elaboración de las tabletas, y una instalación especial para un sistema de lubricación externo.

La dureza de la tableta de desintegración oral de la presente invención generalmente es de aproximadamente 3 a 6 kg cuando la tableta tiene un diámetro de 6 a 7 mm y un grosor de aproximadamente 3 mm. Aquí, la dureza de la tableta en la presente especificación es un valor medido a través de un probador de dureza de tabletas Schleuniger (Dr. Schleuniger Pharmatron AG).

Aunque el tiempo de desintegración de la tableta de desintegración oral de la presente invención en una cavidad oral, varía dependiendo de la forma de preparación, la dosis y similares, generalmente es en 60 segundos, preferentemente en 30 segundos.

La tableta de desintegración oral de la presente invención, no se limita particularmente con respecto al tamaño y forma, y puede ser una tableta marcada que tiene una línea de división.

La tableta de desintegración oral de la presente invención puede ser ingerida sin agua.

VI. Usos

Los métodos de la presente invención se utilizan para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer o una fase o

etapa indicativa de, o asociada con el desarrollo de enfermedad de Alzheimer en un paciente en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer. La presente invención también proporciona farmacéuticos que pueden ser utilizados para retardar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, o un síntoma de la misma, o una fase o etapa indicativa o que está asociada con el desarrollo de enfermedad de Alzheimer en un paciente en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado al comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias aquí mencionadas, están incorporadas en su totalidad como referencia. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, tomarán el control. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están proyectados para ser limitantes.

EJEMPLOS

Habiendo descrito ahora de manera general la invención, la misma será comprendida más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a manera de ilustración, y no están proyectados para ser limitantes de la presente invención, a menos que se indique de manera específica.

Los ejemplos que se encuentran a continuación son establecidos con propósitos ilustrativos únicamente, y no

pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

EJEMPLO 1

Gránulos de Pioglitazona de Dosis Baja 1

Se mezclan HCl de pioglitazona (228.1 g), manitol (ROQUETTE, 335.8 g) y L-HPC (LH-32 Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., 115.0 g) para proporcionar un polvo pulverizado. Se disuelve hidroxipropilcelulosa (HPC-SSL, NIPPON SODA CO., LTD., 9.2 g) en agua purificada (194.6 g) para proporcionar un líquido de enlace. Se alimenta cristal de ácido cítrico anhidro (Jungbunzlauer, 1380 g) en un granulador de cama fluidizada centrífuga (CF-360, Freund Corporation) y se recubre con el polvo pulverizado, mientras se rocía el líquido de enlace. Se secan los gránulos resultantes bajo presión reducida a una temperatura de 40°C durante 18 horas, y se utilizan cernidores de malla 16 y malla 42 para proporcionar granulados en un rango de malla de 16 a 42 (apertura 0.355 a 1.00 mm). Los gránulos (7193.6 g) se mezclan con talco (Matsumurasangyo Co., Ltd., 3.2 g) y ácido silícico anhídrido ligero (AEROSIL, NIPPON AEROSIL, 3.2 g) en un mezclador de rebote (60 L, Showa Kagaku Kikai Kosakusho Co., Ltd.) para proporcionar gránulos de clorhidrato de pioglitazona que tienen la siguiente composición por 450 mg.

cristal de ácido cítrico anhidro	300 mg
HCl de pioglitazona	49.59 mg
manitol	73.01 mg
L-HPC	25 mg
hidroxipropilcelulosa	2 mg
talco	0.2 mg
ácido silícico anhidro ligero	0.2 mg
total	450 mg

La composición resultante puede ser diluida en un excipiente adecuado para proporcionar la dosificación deseada, incluyendo cualquiera de las dosis aquí mencionadas, por ejemplo, 0.5 mg, 1.5 mg, 4.5 mg y 9.0 mg. Las dosificaciones deseadas posteriormente pueden formularse en formas de dosificación oral, tal como cápsulas, tabletas y píldoras.

EJEMPLO 2

Gránulos de Pioglitazona de Dosis Baja 2

Se mezclaron HCl de pioglitazona (9.90 g), manitol (ROQUETTE, 186.2g) y L-HPC (LH-32 Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., 39.96 g) para proporcionar un polvo pulverizado. Se disolvió hidroxipropilcelulosa (HPC-SSL, NIPPON SODA CO., LTD., 12.00 g) en agua purificada (340.2 g) para proporcionar un líquido de enlace. Se alimentó cristal de ácido cítrico anhidro (Jungbunzlauer, 400.0 g) en un granulador de cama fluidizada centrífugo (CF-260, Freund Corporation) y se recubrió con el polvo pulverizado, rociando al mismo tiempo el líquido de enlace. Los gránulos resultantes se secaron bajo presión reducida a una temperatura de 40°C durante 18 horas, y se utilizaron cernidores de malla 16 y malla 42 para proporcionar gránulos de clorhidrato de pioglitazona dentro del rango de malla de 16 a 42 (apertura 0.355 a 1.00 mm) que tiene la siguiente composición.

cristal de ácido cítrico anhidro	53.33 mg
HCl de pioglitazona	1.102 mg
manitol	20.69 mg
L-HPC	4.44 mg
hidroxipropilcelulosa	0.36 mg
total	79.92 mg

EJEMPLO 3

Cápsulas de Pioglitazona de Dosis Baja

Los gránulos de pioglitazona de dosis baja 2 formulados en el Ejemplo 2 (39.96 g), se mezclaron con talco (Matsumurasangyo Co., Ltd., 0.02 g) y ácido silícico anhidro ligero (AEROSIL, NIPPON AEROSIL, 0.02 g) en una botella de vidrio para proporcionar gránulos de clorhidrato de pioglitazona que tienen la siguiente composición por 80 mg. Los gránulos de clorhidrato de pioglitazona (80 mg) se rellenan en cápsulas de hipermelosa No. 4 (Qualicaps Co., Ltd.) para proporcionar cápsulas que tienen la siguiente composición.

Componente	cantidad agregada
gránulo obtenido en el Ejemplo 2	79.92 mg
talco	0,04 mg
ácido silícico anhidro ligero	0,04 mg
cápsula de hipromelosa No. 4	1 cápsula

EJEMPLO 3

Formulación Líquida de Pioglitazona 1

Se preparó una formulación líquida de pioglitazona utilizando los materiales que se encuentran a continuación.

Materiales:

Ácido Cítrico, Sigma, C1857, lote 089K0057

Agua Destilada, Ice Mountain

HPMC, USP, Sigma, H-3785, lote 122K0149

HCl de pioglitazona, Takeda, lote 345

Polietilénglicol 200, Sigma, P3015, lote 098K0056

Polisorbato 80, NF, Spectrum, P0138, lote XV0879

Propilénglicol, USP/FCC, Fisher, P355, lote 080676

Sacarosa, USP, Sigma, S3929, lote 086K0022

Syrup NF, Spectrum, SY105, lote XP0703

Se transfirieron aproximadamente 0.01496 g de HCl de pioglitazona en un cilindro graduado de 50 mL. Se agregaron 0.69 g de polietilénglicol 200 y se mezclaron para humedecer los sólidos. Se agregaron 1.51 g de propilen glicol y la mezcla resultante se revolvió y se sometió a ultrasonido para mezclar y disolver los sólidos. Se agregaron 1.48 g de polisorbato 80 y se revolvieron para mezcla. Se agregaron 0.50373 g de ácido cítrico y se revolvieron para mezcla. Algunos sólidos de ácido cítrico permanecieron no disueltos. Se agregaron aproximadamente 10 mL de agua destilada y se revolvieron para mezclar/disolver los sólidos. La muestra se diluye a 50 mL con agua destilada, y se mezcla bien, de modo que todos los sólidos estén en la solución para formular un líquido que tiene la siguiente concentración de pioglitazona de aproximadamente 15 mg/50 mL o 0.3 mg/mL.

En la práctica de los métodos de la presente invención, se puede administrar una pioglitazona de dosis baja seleccionada a un sujeto utilizando el líquido de pioglitazona de este Ejemplo 4. Por ejemplo, 5 mL o una cucharadita proporcionarán una dosis de aproximadamente 1.5 mg de HCl de pioglitazona, en tanto que 15 mL o una cucharada proporcionarán una dosis de aproximadamente 4.5 mg de HCl de pioglitazona. Dos cucharadas o aproximadamente 30 mL del líquido de pioglitazona de este Ejemplo 4, proporcionarán aproximadamente 9 mg de HCl de pioglitazona por dosis.

EJEMPLO 5

Formulación Líquida de Pioglitazona 2

Se preparó una formulación líquida de pioglitazona utilizando los materiales que se encuentran a continuación.

Materiales:

Ácido Cítrico, Sigma, C1857, lote 089K0057

Agua Destilada, Ice Mountain

HPMC, USP, Sigma, H-3785, lote 122K0149

HCl de pioglitazona, Takeda, lote 345

Polietilénglicol 200, Sigma, P3015, lote 098K0056

Polisorbato 80, NF, Spectrum, P0138, lote XV0879

Propiléglicol, USP/FCC, Fisher, P355, lote 080676

Sacarosa, USP, Sigma, S3929, lote 086K0022

Syrup NF, Spectrum, SY105, lote XP0703

Se agregaron aproximadamente 0.01613g de HCl de pioglitazona a un frasco volumétrico de 50 mL. Se agregaron 1.0043 g de ácido cítrico. Se agregaron aproximadamente 25 mL de agua destilada, y la mezcla resultante se revolvió y se sometió a ultrasonido para humedecer los sólidos. La mezcla se diluye hasta un volumen, por ejemplo de aproximadamente 50 mL, con agua destilada, y se mezclan bien y posteriormente se someten a ultrasonido durante 1 a 2 minutos, de modo que todos los sólidos estén en la solución.

La solución de pioglitazona de este Ejemplo 5, tendrá la siguiente concentración de pioglitazona de aproximadamente 16.13 mg/50 mL o 0.326 mg/mL.

En la práctica de los métodos de la presente invención utilizando la solución de pioglitazona líquida de este Ejemplo 5, se puede administrar una pioglitazona de dosis baja seleccionada a un sujeto. Por ejemplo, 5 mL o una cucharadita proporcionará una dosis de aproximadamente 1.63 mg de HCl de pioglitazona, en tanto que 15 mL o una cucharada proporcionará una dosis de aproximadamente 4.89 mg de HCl de pioglitazona. Dos cucharadas, o aproximadamente 30 mL del líquido de pioglitazona de este Ejemplo 5, proporcionarán aproximadamente 9.78 mg de HCl de pioglitazona por dosis.

EJEMPLO 6

Formulación de Suspensión de Pioglitazona 1

Se prepara una formulación de suspensión de pioglitazona como se indica a continuación.

Preparación de Suspensión A de HCl de Pioglitazona: Un vehículo de Suspensión es Jarabe NF (densidad de Jarabe NF es 1.30 g/mL).

Se transfirieron 0.025 g de la Substancia de Fármaco HCl de Pioglitazona a un mortero de vidrio. Se humedeció la HCl de Pioglitazona con aproximadamente 4 gotas de Vehículo de Suspensión y se mezcló/molió durante aproximadamente 1 minuto para formar una pasta uniforme blanda. El vehículo de suspensión se agregó hasta que el peso total en el mortero es de aproximadamente 1 g. La mezcla resultante se mezcló/molió durante un minuto. Se agregó más agente de suspensión hasta un peso total de aproximadamente 8 g. La mezcla resultante se mezcló durante 1 minuto. Se agregó más vehículo de suspensión hasta que el peso total es de aproximadamente 48 g, y posteriormente se mezcló durante 1 minuto. Se agregó vehículo de suspensión hasta que el peso total de la suspensión es de 130.04 g y se mezcló durante 1 minuto. La mezcla del mortero se vertió en una botella de reactivo de 4 onzas (113.3 g). La botella se niveló y la suspensión se agitó manualmente durante aproximadamente 1 minuto.

Se determinó la concentración teórica de HCl de pioglitazona;

25.60 mg/130.04 g = 0.1969 mg/g (como la sal HCl - no la base libre)

25.60 mg/100mL = 0.2560 mg/mL (como la sal HCl - no la base libre)

Para practicar los métodos de la presente invención utilizando la suspensión 1 de pioglitazona líquida de este Ejemplo 6, se puede administrar a un sujeto una pioglitazona de dosis baja seleccionada. Por ejemplo, 5 mL o una cucharadita proporcionarán una dosis de aproximadamente 1.28 mg de HCl de pioglitazona, en tanto que 15 mL o una cucharada proporcionarán una dosis de aproximadamente 3.84 mg de HCl de pioglitazona. Dos cucharadas o aproximadamente 30 mL de la suspensión 1 de pioglitazona líquida de este Ejemplo 6, proporcionará aproximadamente 7.68 mg de HCl de pioglitazona por dosis.

EJEMPLO 7

Formulación 2 de Suspensión de Pioglitazona

Preparación de Vehículo de Suspensión B: 0.6% HPMC + 10% Sacarosa

Solución HPMC al 0.6%:

Se transfirieron 1000 mL de agua destilada en un frasco Erlenmeyer de 2 L. El agua se calentó a una temperatura de 60°C con agitación constante. Se pesaron 6 g de HPMC y se dispersaron de manera uniforme en el agua calentada. El calentamiento de la mezcla continuó hasta que alcanzó la ebullición. La mezcla se eliminó del calor y se colocó en un baño de hielo con agitación constante. La mezcla se agitó hasta que se aclaró y se enfrió a temperatura ambiente.

Vehículo de Suspensión: (HPMC al 0.6% con 10% de Sacarosa):

Se agregaron 80 g de sacarosa a una botella de vidrio de 1000 mL. Se agregaron 50 mL de agua destilada y la mezcla se mezcló agitando de modo que todos los sólidos fueran disueltos. Se agregó la solución de HPMC al 0.6% hasta que el peso total fue de 800 g. La mezcla se agitó para disolver los sólidos.

La densidad de la solución es de 103.86 g/100 mL.

Preparación de Suspensión B de 0.025 g de Pioglitazona: El vehículo de Suspensión es 0.6 HPMC + 10% Sacarosa

Se transfirieron 0.025 g de la Sustancia de Fármaco de HCl de Pioglitazona en un mortero de vidrio. Se humedeció el HCl de Pioglitazona con aproximadamente 4 gotas del Vehículo de Suspensión y se mezclaron/molieron durante aproximadamente 1 minuto para formar una pasta uniforme blanda. El vehículo de suspensión se agregó hasta que el peso total en el mortero es de aproximadamente 1 g. La mezcla se mezcló/molió durante 1 minuto. Se agregó vehículo de suspensión adicional hasta que el peso total fue de aproximadamente 8 g, y posteriormente se mezcló durante 1 minuto. Se agregó vehículo de suspensión adicional hasta que el peso total es de aproximadamente 20 g y posteriormente se mezcló durante 1 minuto.

Se agregó vehículo de suspensión adicional hasta que el peso total fue de aproximadamente 40 g a 50 g y posteriormente se mezcló durante 1 minuto. Se agregó vehículo de suspensión hasta que el peso total de la suspensión fue de 103.31 g y se mezcló durante 1 minuto. La mezcla se vertió del mortero en una botella de reactivo de 4 onzas (113.3 g). La botella se niveló y la suspensión se agitó en forma manual durante aproximadamente 1 minuto.

Se determinó la concentración teórica del HCl de pioglitazona;

26.44mg/103.31 g = 0.25593 mg/g (como la sal HCl – no la base libre)

26.44mg/100mL = 0.2644mg/mL (como la sal HCl - no la base libre)

En la práctica de los métodos de la presente invención utilizando la suspensión 2 de pioglitazona líquida de este Ejemplo

7, se puede administrar a un sujeto una pioglitazona de dosis baja seleccionada. Por ejemplo, 5 mL o una cucharadita proporcionará una dosis de aproximadamente 1.322 mg de HCl de pioglitazona, mientras que 15 mL o una cucharada proporcionará una dosis de aproximadamente 3.966 mg de HCl de pioglitazona. Dos cucharadas o aproximadamente 30 mL de la suspensión 2 de pioglitazona líquida de este Ejemplo 7, proporcionarán aproximadamente 7.932 mg del HCl de pioglitazona por dosis.

EJEMPLO 8

Hasta ahora no se ha tenido la capacidad de predecir que personas es más probable que desarrollen cambios patofisiológicos del tipo aquí descrito, que conducen a daño cognitivo y finalmente demencia de Alzheimer. El genotipo TOMM40 rs10524523 junto con la edad, y posiblemente otros factores, constituyen un biomarcador de pronóstico para determinar que sujetos están en riesgo de desarrollar daño cognitivo del tipo de Alzheimer en los siguientes 5 a 7 años, y de esta forma proporciona la oportunidad de intervención médica en la fase temprana de esta enfermedad progresiva y devastadora. El beneficio clínico de esta intervención puede ser confirmado en un estudio clínico de la forma general que se describe más adelante. Además, un estudio clínico de prospecto de esta naturaleza puede proporcionar datos suficientes para determinar los valores predictivos positivos y predictivos negativos del biomarcador de pronóstico, cuya comprensión es necesaria antes de la introducción del biomarcador en la práctica clínica.

Estudio OPAL

rs10524523 (523) es un polimorfismo de longitud poli-T que ocurre en el desequilibrio de ligadura (LD) con los genotipos APOE, y es heredado junto con el genotipo APOE en cada hebra

en la región LD. Esencialmente, una variante intrónica simple de TOMM40 varía en la longitud poli-T, con las formas más largas de la variante asociada con aproximadamente una diferencia de 7 años en la edad de desarrollo, en comparación con las formas más cortas. Con base en la edad en que se presenta el sujeto normal, se determina el "alto riesgo" de desarrollo de daño cognitivo y AD en los siguientes 5 a 7 años, o se determina un "bajo riesgo".

Este estudio proporciona un modelo de base genética novedoso para la identificación de sujetos en diversas y grandes poblaciones basadas en la comunidad, quienes están en mayor riesgo de desarrollar AD en 5 a 7 años, combinando evaluaciones de riesgo clínico con base en la presencia de genotipos específicos relacionados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y expresión clínica.

El estudio:

• se utilizan los polimorfismos de longitud poli-T TOMM40 rs10524523 (523) en la región TOMM40 - APOE LD, posiblemente junto con el genotipo APOE, para predecir la edad de desarrollo de daño cognitivo y enfermedad de Alzheimer. Específicamente, para determinar si una prueba de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer independiente, puede separar a los sujetos en "grupos de enfermedad de Alzheimer de alto riesgo y bajo riesgo"; y

• se utiliza diariamente un agonista PPARγ de dosis baja durante 60 meses (5 años) versus placebo en sujetos presintomáticos quienes están en Alto riesgo tal como lo define su genotipo TOMM40 - APOE de la enfermedad de Alzheimer, para retardar el desarrollo de los síntomas de demencia relacionados con enfermedad de Alzheimer.

Los sujetos cognitivamente normales entre las edades de 62

a 87, son evaluados con respecto a susceptibilidad a AD en los siguientes 5 a 7 años, y son probados para los efectos de pioglitazona en el desarrollo de AD. La definición, cognitivamente normal, se calcula como dentro de 1.5 desviaciones estándar (SD) de la población promedio, tomando en cuenta la edad del sujeto y el nivel de educación para las evaluaciones que se describen a continuación. Las calificaciones debajo de este corte se consideran cognitivamente dañadas. Se utilizaron las siguientes evaluaciones cognitivas para evaluar la función cognitiva en el enrolamiento, y a lo largo del curso del estudio.

Se eligen las escalas de evaluación cognitiva como sensibles a déficits tempranos en la enfermedad de Alzheimer. Estas escalas de evaluación se utilizan en el estudio ADAPT (1), lo cual es un estudio de prevención para la enfermedad de Alzheimer utilizando terapia NSAID llevada a cabo en el 2004. Se utiliza la Mini Revisión Mental (Mini Mental examination) (2MS-E) en el Women's Health Initiative Study para terapia de reemplazo hormonal (2) para la prevención de AD. Por lo tanto las evaluaciones cognitivas incluyen:

• Mini Revisión de Estado Mental Modificada (Modified Mini Mental State Examination) (3MS-E)

• Prueba de Memoria Visuoespacial Breve (Revisada) (Brief Visuospatial Memory Test (Revised)) (BVMT-R)

• Prueba de Aprendizaje Verbal de Hopkins (Revisada) (Hopkins Verbal Learning Test (Revised)) (HVLT-R)

• Prueba de Memoria de Comportamiento de Rivermead (Rivermead Behavioural Memory Test) (RBMT)

• Prueba de Fluidez Verbal Generativa (Generative Verbal Fluency Test) (GVFT)

• Prueba de Duración de Dígito (DST)

El enrolamiento en este estudio está basado únicamente en las calificaciones de estas evaluaciones. Para la aleatorización en el estudio, a los individuos se les proporciona adicionalmente una prueba de ADN que consiste en genotipificar APOE y medir las longitudes de repetición 523 poli-T para evaluar su estado de riesgo como "Alto riesgo" o "Bajo riesgo" de desarrollar daño cognitivo o AD en los siguientes 5 a 7 años. Los siguientes diseños describen el procedimiento de estudio.

Suposiciones del Diseño de Estudio

Los puntos extremos son 1) cambio en una medida de cognición a partir de la línea de base, con base en las calificaciones de las evaluaciones neurofisiológicas, y 2) diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con los criterios NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS), y Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA). Éstos se toman ya sea como dos puntos extremo principales o como un punto extremo de evento combinado.

Cálculos de Tamaño de Muestra

El cálculo del tamaño de muestra se determina para una prueba de tiempo de clasificación logarítmica para los datos del evento, con base en los puntos extremos anteriores. Se asume que el rango de conversión para el grupo de "Alto riesgo" será del 20% al final del seguimiento de 5 años, con base en los datos de los estudios de prevención previos (3,4). Se requiere un tamaño de muestra de 374/grupo para detectar una mejoría del 50% en este rango de conversión (es decir de 20% a 10%) en el nivel de importancia del 5% y con una potencia del 90%. En este cálculo se acumula un rango de disminución del 20% tanto para los grupos de placebo como de tratamiento en el período de cinco

años. Este tamaño de muestra no se ajusta para múltiples comparaciones.

Se realiza una suposición adicional de que el grupo de "Bajo riesgo" tiene un rango de conversión del 10% con base en los rangos de incidencia de la enfermedad de Alzheimer en la población general (4). El tamaño de la muestra requerido para comparar este grupo con el grupo de placebo de "Alto riesgo" es nuevamente de 374/grupo con el 90% de potencia y un nivel de importancia del 5%.

Diseños del estudio

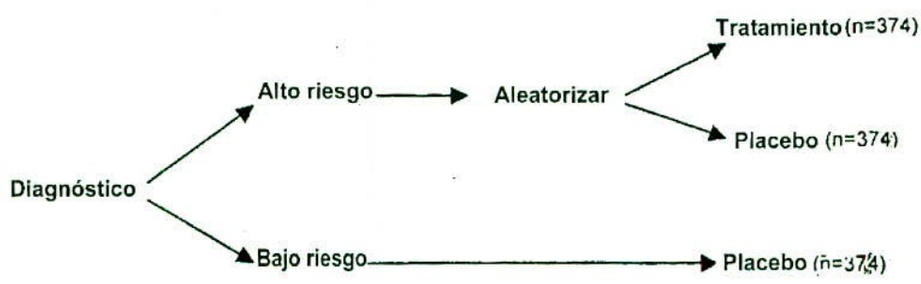
La prueba de diagnóstico define que pacientes están en "Alto riesgo" de conversión a la enfermedad de Alzheimer o daño cognitivo leve (Alto riesgo) y que pacientes están en el "Bajo riesgo" de conversión (Bajo riesgo). Los investigadores son ciegos para los resultados de la prueba de diagnóstico y se utiliza aleatorización central para mantener esta ceguera. Los objetivos principales de cualquier diseño son:

Determinar si la prueba de diagnóstico puede diferenciar entre sujetos de "Alto" y "Bajo riesgo", y

Evaluar el efecto del tratamiento en el rango de conversión de pacientes de "Alto riesgo".

Todos los sujetos reclutados para estos estudios serán cognitivamente normales, tal como se definió anteriormente.

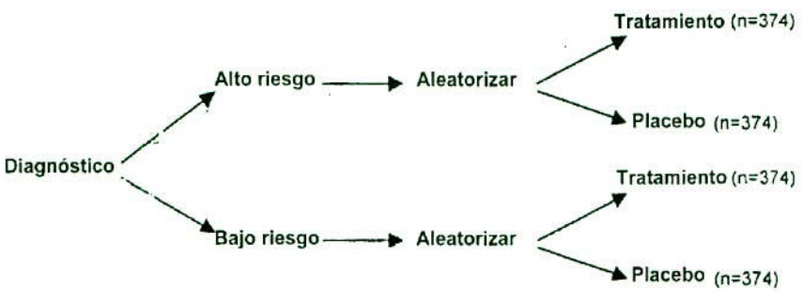
Diseño de estudio preferido



En este diseño, se aleatorizó únicamente el grupo de "Alto

riesgo" para recibir placebo o tratamiento. Este es un diseño simple, que por ejemplo, utiliza un tamaño de muestra total de 1122 sujetos. Este diseño permite que se investiguen dos hipótesis: la primera se refiere a la capacidad del diagnóstico para definir los grupos de "Alto" y "Bajo riesgo", comparando los datos de los sujetos tratados con placebo; la segunda se refiere a si el tratamiento puede mejorar el rango de conversión, comparando los datos de los grupos de tratamiento y placebo de la ramificación de "Alto riesgo".

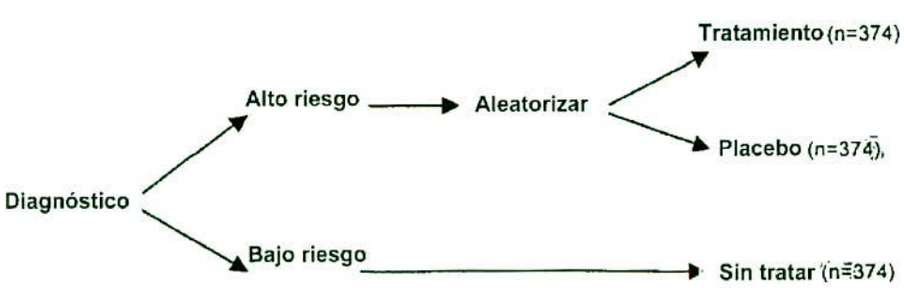
Diseño alternativo 1



En este diseño, se agrega un cuarto grupo para permitir que el efecto de tratamiento sea evaluado en el grupo de "Bajo riesgo". Este diseño puede incrementar el tamaño de muestra total a 1496 pacientes.

Este diseño puede proporcionar información útil si el grupo de "Bajo riesgo" tiene un rango de conversión mayor al esperado. Sin embargo, existen aspectos potenciales con este diseño en términos de riesgo/beneficio para el grupo de "Bajo riesgo". Los sujetos en el grupo de "Bajo riesgo" deben estar en riesgo de experimentar efectos secundarios con el tratamiento sin el beneficio esperado para su rango de conversión.

Diseño alternativo 2



Este diseño es el mismo que el diseño preferido, excepto que el grupo de "Bajo riesgo" permanece sin tratar y sirve como un grupo de observación. Este diseño tendrá la capacidad de cumplir con los objetivos del estudio, aunque existen una cantidad de deficiencias potenciales:

- no se tiene la capacidad de cegar la ramificación no tratada, de modo que los resultados de la prueba de diagnóstico no serán ciegos.
- posiblemente un mayor rango de disminución en el grupo de "Bajo riesgo", si los sujetos sienten que están siendo observados pero no "tratados" no se tiene beneficio.
- no se puede comparar similar con similar, lo cual puede ser un aspecto si existe un efecto de "placebo" (probablemente no para el momento del ejemplo pero si posible para la prueba cognitiva").

Los cálculos del tamaño de muestra están basados en detectar una diferencia de 10 puntos de porcentaje entre los rangos de conversión y el final de 5 años. Un incremento en los números permite que una señal sea detectada en forma más temprana con una menor diferencia. Se asume que el rango de conversión en el grupo de "Alto riesgo" es de 5%/año, posteriormente después de tres años aproximadamente, el 15% de los sujetos puede haberse convertido a la enfermedad de Alzheimer o mostrar daño cognitivo. Suponiendo que el tratamiento puede mejorar este rango en un 50%, entonces el rango de conversión esperado en el grupo tratado será del 7.5%. Con el objeto de detectar la diferencia con el 90% de potencia en

la significancia del 5%, se requerirán 559 sujetos por grupo, para obtener como resultado un tamaño de muestra total del diseño preferido de 1677. Este incremento en el número de sujetos permite la investigación de una familia con edades de curvaa de desarrollo asociadas con cada haplotipo TOMM40 – APOE. Se utiliza un análisis de exploración para investigar los efectos de la edad, incluyendo la edad como una covariable del tiempo de los riesgos proporcionales de Cox para el análisis del caso, lo cual permite la investigación de las covarianzas. Un cierto porcentaje de los sujetos son definidos como teniendo daño cognitivo leve (MCI) con base en las evaluaciones neuropsicológicas en la clasificación. El estudio reclutará únicamente a los sujetos que sean definidos como cognitivamente normales con base en las evaluaciones neuropsicológicas.

Referencias

1) Grupo de Investigación ADAPT: Cognitive Function Over Time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT) Results of a Randomized, Controlled Trial of Naproxen and Celecoxib: Archives of Neurology, Vol 65 (No 7), Julio 2008 (Función Cognitiva con el Tiempo en los Resultados de la Prueba de Prevención Antiinflamatoria de la Enfermedad de Alzheimer (ADAPT) de una Prueba Controlada, Aleatorizada de Naproxeno y Celecoxib: Archivos de Neurología, Volumen 65 (No 7), Julio 2008)

2) Stephen R. Rapp; Mark A. Espeland; Sally A. Shumaker et al: Effect of Estrogen Plus Progestin on Global Cognitive Function in Postmenopausal Women, The Women's Health Initiative Memory Study: 2003;289(20):2663-2672 *JAMA* (Efecto de Estrógeno Más Progestina en Función Cognitiva Global en Mujeres Postmenopáusicas, Estudio de Memoria Iniciativa de La Salud de

la Mujer: 2003;289(20):2663-2672 *JAMA)*

3) Curtis L. Meinert, John C. S. Breitner: Chronic disease long-term drug prevention trials: Lessons from the Alzheimer's Disease Antiinflammatory Prevention Trial (ADAPT): Alzheimer's & Dementia 4 (2008) S7-S14 (Prueba de prevención de fármaco a largo plazo de enfermedades crónicas: Lecciones de la Prueba de Prevención Antiinflamatoria de la Enfermedad de Alzheimer (ADAPT): Alzheimer y Demencia 4 (2008) S7-S14)

4) Stephen Salloway, Stephan Correia: Alzheimer disease: Time to improve its diagnosis and treatment: Cleveland Clinic Journal Of Medicine Volume 76, Number 1 January 2009 (Enfermedad de Alzheimer: Tiempo para mejorar su diagnóstico y tratamiento: Revista de Medicina Clínica de Cleveland Volumen 76 Número 1 Enero 2009)

5) ADAPT Research Group: Cognitive Function Over Time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT) Results of a Randomized, Controlled Trial of Naproxen and Celecoxib: Archives of Neurology, Vol 65 (No 7), July 2008 (Grupo de Investigación ADAPT: Función Cognitiva con el Tiempo en los Resultados de la Prueba de Prevención Antiinflamatoria de la Enfermedad de Alzheimer (ADAPT) de una Prueba Controlada, Aleatorizada de Naproxeno y Celecoxib: Archivos de Neurología, Vol 65 (No 7), Julio 2008)

6) Stephen R. Rapp; Mark A. Espeland; Sally A. Shumaker et al: Effect of Estrogen Plus Progestin on Global Cognitive Function in Postmenopausal Women, The Women's Health Initiative Memory Study: 2003;289(20):2663-2672 JAMA (Efecto de Estrógeno Más Progestina en la Función Cognitiva Global en Mujeres Postmenopáusicas, Estudio de la Memoria Iniciativa de Salud de la Mujer 2003; 289(20): 2663-2672 JAMA)

7) Curtis L. Meinert, John C. S. Breitner: Chronic disease long-term drug prevention trials: Lessons from the Alzheimer's Disease Antiinflammatory Prevention Trial (ADAPT): Alzheimer's & Dementia 4 (2008) S7-S14 (Pruebas de prevención de fármaco a largo plazo de enfermedades crónicas: Lecciones de la Prueba de Prevención Antiinflamatoria de Enfermedad de Alzheimer (ADAPT): Alzheimer y Demencia 4 (2008) S7-S14

8) Stephen Salloway, Stephan Correia: Alzheimer disease: Time to improve its diagnosis and treatment: Cleveland Clinic Journal Of Medicine Volume 76, Number 1 January 2009 (Enfermedad de Alzheimer: Tiempo para mejorar su diagnóstico y tratamiento: Revista de Medicina Clínica de Cleveland Volumen 76 Número 1 Enero 2009).

EJEMPLO 9

Estudio BOLD

La presente invención proporciona los siguientes análisis de descubrimiento de dosis de ejemplo.

La presente invención proporciona medidas de cambios farmacodinámicos en respuesta a diferentes dosis bajas de pioglitazona. La medida farmacodinámica que es relevante, es un cambio en la oxigenación de sangre regional acoplada a la actividad neuronal como medida, mediante la generación de imágenes de resonancia magnética funcional dependientes del nivel de oxígeno en la sangre (BOLD fMRI).

La neuroprotección y la biogénesis mitocondrial están entre los efectos fisiológicos de la tiazolidinodionas. En una modalidad, el tratamiento con pioglitazona de sujetos puede incrementar la capacidad metabólica de las regiones activas del cerebro. Este cambio en la capacidad metabólica puede ser observable utilizando BOLD fMRI.

BOLD fMRI es una tecnología ampliamente utilizada para generación de imagen de cerebro completa no invasiva. Esta técnica mide un cambio en la oxigenación de sangre regional acoplada a la actividad neuronal.

BOLD fMRI mide el cambio relativo en la proporción de oxi a desoxihemoglobina en el cerebro, que ocurre como resultado de la actividad neuronal. Conforme las neuronas se vuelven activas, existe un incremento concomitante en el metabolismo celular, y el flujo de sangre incrementa a regiones de actividad neuronal incrementada para cumplir con estas demandas metabólicas. El resultado de esta respuesta hemodinámica es un cambio medible en la proporción local de oxi a desoxihemoglobina. La oxihemoglobina es diamagnética y la desoxihemoglobina es paramagnética y esta diferencia en magnetismo es detectada mediante BOLD fMRI.

Las señales BOLD reflejan cambios complejos y no completamente comprendidos en el flujo de sangre cerebral (CBF), volumen de sangre cerebral (CBV), y rango metabólico cerebral del consumo de oxígeno ($CMRO_2$) después de la actividad neuronal. Los elementos de circuito candidatos para activar diversos tipos de señales BOLD incluyen neuronas de excitación, poblaciones neuronales mezcladas, astroglia y los tractos axonales o fibras del pasaje (descritos con detalle en las Publicaciones de Lee et al., 2010 Nature 465: 788-792; Logothetis 2008 Nature 453: 869-878; Logothetis et al. 2001 Nature 412: 150-1571; Raichle 2010 Cell 14: 180-190, cada una de las cuales está incorporada en su totalidad a la presente invención como referencia.

El estudio utilizará sujetos saludables, cognitivamente normales de mayor edad de interés, por ejemplo con edades entre

62 y 87. El escaneo de BOLD fMRI se llevará a cabo utilizando un escáner optimizado para generación de imágenes de cerebro funcionales y estructurales de alta resolución (por ejemplo un escáner GE 3 Tesla de estado del arte.

En una modalidad, el estudio es un estudio doble ciego que utiliza múltiples cohortes, con cada cohorte recibiendo una diferente dosis de pioglitazona. En otra modalidad, el estudio es un diseño en serie en donde el mismo cohorte recibe múltiples y diferentes dosis de fármaco. El marcador farmacodinámico utilizado para indicar los cambios en la actividad neuronal como resultado de la exposición a pioglitazona, es un cambio en la señal BOLD, especialmente en la corteza prefrontal dorsolateral y el hipocampo, que están asociados con las funciones cognitivas superiores que están dañadas en la enfermedad de Alzheimer.

Cada participante pasará por escaneo MRI en al menos tres ocasiones:

1. predosis (para obtener un valor de línea de base o de control de cada sujeto):

2. inmediatamente después de que se ha recibido la primera dosis (ya sea a las 2 horas o el tiempo aproximado de la Cmax), medir el resultado de la exposición aguda al fármaco; y

3. después de 7 días de exposición al fármaco (cuando la concentración en suero de pioglitazona debe cada una estar en estado constante, y debe haber ocurrido un efecto fisiológico del fármaco en la función mitocondrial).

La pioglitazona se administrará diariamente durante 7 días.

45 mg de pioglitazona (la formulación comercializada para el tratamiento de diabetes tipo 2) da como resultado una Cmax de aproximadamente 3 mM en suero (ver la Publicación de Ghosh et al. 2007 Mol. Pharmacol 71: 1695-1702).

Las dosis de prueba incluyen:

a) dosis de 0.5 mg-aproximadamente 33.3 nM en suero y aproximadamente 6.7 nM en cerebro

b) dosis de 1.5 mg-aproximadamente 100 nM en suero y aproximadamente 20 nM en cerebro;

c) dosis de 4.5 mg-aproximadamente 300 nM en suero y aproximadamente 50 nM en cerebro;

d) dosis de 9 mg-aproximadamente 600 nM en suero y aproximadamente 120 nM en cerebro.

Síntesis del Protocolo de Generación de Imagen de Resonancia Magnética

Procedimiento de Clasificación de Participantes Generales

Los participantes serán clasificados para implantes de metal ferroso lo cual podría excluir el escaneo antes de la selección. A los participantes se les darán instrucciones de ayuno y abstinencia de cafeína, productos de tabaco y ejercicio durante dos horas antes de la sesión de escaneo, y se abstendrán de beber alcohol y tomar medicamentos no esenciales durante 12 horas antes del escaneo. Los participantes que toman medicamento estimulantes, se les pedirán no tomarlos al menos 24 horas con aprobación médica. Se obtendrán dos muestras de respiración para medir los niveles de alcohol. Se obtendrán muestras de orina para probar 5 metabolitos de fármaco (psicoestimulantes, cannabis, opiatos y sedantes). A las participantes mujeres se les administrará una prueba de embarazo en orina, la cual debe ser negativa para que el participante pase por escaneo.

Protocolo de Escaneo General

A los pacientes se les dará la oportunidad de ingresar a un simulador MRI para evaluar su nivel de comodidad para participar

en la sesión de MRI. Posteriormente se colocarán instrumentos a los participantes para monitorear la frecuencia cardíaca (fotopletismógrafo) y presión sanguínea, y se colocarán en el escáner. Se minimizará el movimiento de la cabeza utilizando una combinación de almohadas y cintas. Después de adquirir escaneos de localizador, se presentarán los protocolos en el siguiente orden fijo, con un tiempo de escaneo total de aproximadamente 60 minutos.

MRI estructural. Las medidas de materia gris y blanca total y regional, así como CSF, serán tomadas utilizando MRI de alta resolución.

Detalles técnicos: Se adquirirán imágenes con peso T1 con voxeles isométricos de 2 mm, utilizando técnicas de Codificación de Sensibilidad Espacial de Formación (Array Spatial Sensitivity Encoding Techniques) (ASSET), con revocación de gradiente nula rápida (FSPGR). Los parámetros de imagen serán optimizados para contraste entre la materia blanca, materia gris y CSF (TR/TE/ángulo de vuelta=7.484 ms/2.984 ms/12°, 256 mm FOV, 1 mm de sílice, 166 rodajas, matriz 256x256, 1 Nex).

MRI de Perfusión. Se recolectarán medidas del flujo de sangre cerebral en reposo total y regional, utilizando Etiquetado de Giro Arterial pulsado (Pulsed Arterial Spin Labeling) (PASL).

Detalles Técnicos: Se adquirirán imágenes intercaladas con y sin etiquetado, utilizando una secuencia de generación de imagen eco-plana de gradiente (EPI). Los parámetros de adquisición consisten en lo siguiente: campo de visión (FOV) = 22 cm, matriz = 64 x 64, tiempo de repetición (TR) = 3 seg, tiempo de eco (TE) = 17 mseg, tiempo de etiqueta = 1.6 seg, tiempo de retardo = .8 seg, ángulo de vuelta = 90°. El protocolo de escaneo de perfusión en reposo toma aproximadamente 6 minutos, tiempo

durante el cual a los sujetos se les darán instrucciones de permanecer quietos y dejar sus mentes en blanco, pero mantener sus ojos abiertos y permanecer despiertos. Los datos que corresponden a catorce rodajas (grosor 8 mm con abertura de 2 mm) serán adquiridos en orden secuencial de inferior a superior.

MRI Funcional (fMRI). Se administrarán paradigmas de estimulación de memoria de episodios y de trabajo de archivo, para medir los patrones de activación neuronal, especialmente en la corteza prefrontal dorsolateral y el hipocampo, asociado con funciones cognitivas superiores dañadas en la enfermedad de Alzheimer, utilizando fMRI dependiente del nivel de oxígeno en la sangre (BOLD).

Detalles técnicos: Se adquirirá una serie de 34 rodajas funcionales axiales intercaladas para la cobertura total del cerebro (TR/TE/vuelta=2000/31/60; FOV= 240 mm; 3.75 x 3.75 x 3.8 mm voxeles; salto interrodaja = 0) utilizando una secuencia de pulsación de espiral inverso para reducir la susceptibilidad del artefacto. Se adquirirán imágenes estructurales coplanas de eco de giros tridimensionales de alta resolución en 68 rodajas axiales (TR/TE/vuelta=12.2/5.3/20, tamaño de voxel= 1 x 1 x 1 .9 mm, FOV = 240 mm, salto de interrodaja = 0) para normalización y promediado del sujeto.

Memoria de Trabajo de Paradigmas de Estimulación fMRI; Ver la Publicación de Mattay et al., PNAS 2003 para los detalles. Memoria de Episodios: Ver la Publicación de Bookheimer et al. New England Journal of Medicine 2000 para detalles.

EJEMPLO 10

Estudio BOLD en ratas

La pioglitazona de dosis baja, penetran en la barrera de sangre cerebro e induce cambios en la fisiología cerebral.

Se determinó si las dosis bajas de HCl de pioglitazona penetran la barrera de sangre cerebro en suficientes concentraciones para provocar cambios funcionales o moleculares en el cerebro. Se utilizó BOLD fMRI para medir los cambios relacionados con el fármaco en la conectividad funcional en el estado en reposo en todo el cerebro.

Se alojaron por separado ratas adultas macho Wistar (275 ± 25 g) y se mantuvieron en un programa de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Los animales se cuidaron de acuerdo con los lineamientos publicados en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publications* No. 85-23, *Revised* 1985). Se midieron los pesos corporales de los animales aproximadamente 24 horas antes del Día 3, y los Días 3 y 6 del Estudio.

Se disolvió HCl de pioglitazona (PIO) en 0.5 mol/L de ácido cítrico (CA) para producir una solución de existencia en una concentración de 0.32 mg/10 mL/kg. Se prepararon otras dosificaciones mediante dilución adecuada de la solución de existencia con 0.5 mol/L de CA para producir volúmenes de dosis de 10 mL/kg. Las ratas de control recibieron el vehículo en 10 mL/kg. Las concentraciones de la dosis estuvieron basadas en el peso del artículo de prueba tal como se suministró (es decir, como la sal HCl) con la dosis ajustada al peso corporal más reciente del animal. La dosificación diaria con PIO en la solución, fue mediante gavage oral aproximadamente a la misma hora cada día. Los animales fueron anestesiados ligeramente con isoflurano inmediatamente antes de facilitar la dosificación.

Todos los animales utilizados en los estudios de generación de imagen fueron aclimatados al dispositivo de retención MRI,

siendo colocados en el mismo durante 15 a 90 minutos diariamente durante al menos 7 días, tal como se describió previamente (Zhang et al. 2010 J Neurosci Methods 189: 186-196; Liang et al. 2011 J Neurosci 31: 3776-3783).

Después del período de aclimatación, los animales fueron asignados a 1 de 7 ramificaciones del tratamiento que coincidieron con los pesos corporales promedio (ver cuadro 1). La dosificación ocurrió una vez al día, aproximadamente a la misma hora cada día. Se generaron imágenes de todos los animales en la línea de base (Día 3 del Estudio), de aproximadamente 2.5 a 3 horas después de la dosificación con el vehículo. La dosificación comenzó 3 días después (Día 2 del Estudio 1). En este día, a todos los animales se les administró ya sea vehículo (CA) o PIO dependiendo de su asignación de grupo. El Día 2 del estudio, se generaron imágenes de un grupo de vehículo y un grupo tratado con PIO en 0.08 mg/kg/día (Ramificación Aguda), de aproximadamente 2.5 a 3 horas después de la dosificación. Para todos los grupos, la dosificación continuó durante siete días en total. El Día 7 del Estudio, se generaron imágenes de todas las ratas aproximadamente de 2.5 a 3 horas después de la administración de la dosis final.

Tabla 1. Ramificaciones de Tratamiento, Dosis PIO Diaria y Puntos de Tiempo de Generación de Imagen

Ramificación de tratamiento	Dosificación Diaria (mg/kg) (N=5/grupo)	Puntos de tiempo de Generación de Imagen		
		Día 3 de Estudio (Línea de Base)	Día 2 de Estudio	Día 7 de Estudio
Agudo	0, 0.08	√	√	√
Subcrónico	0, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32	√	Sin generación de imagen	√

La extrapolación a la dosificación correspondiente en humanos, se logró mientras se ajustó la AUC relativa de cada una. En humanos, una dosis de 7.5 mg está asociada con una AUC de 2.8 pg•h/mL. En ratas, una dosis de 0.50 mg/kg/día de HCl PIO está asociada con una AUC de 7.11 µg•h/mL. Los resultados de estos cálculos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 Dosis Equivalentes en Ratas y Humanos Basadas en Exposiciones Extrapoladas

Parámetro	Dosis en Humanos (mg total/día)			
	1.5	3	6	12
Dosis de Rata (mg/kg/día)	0.04	0.08	0.16	0.32
AUC Dirigida (µg.h/mL)	0.57	1.14	2.28	4.55

Se iniciaron actividades de preparación de los animales relacionadas con la generación de imágenes, para asegurar que ocurriera la generación de imágenes de aproximadamente 2.5 a 3 h después de la dosificación. Los animales se prepararon para colocarse en el control bajo anestesia con isoflurano tal como se describió previamente (Zhang et al. 2010, supra). Este procedimiento tomó aproximadamente de 10 a 15 minutos, tiempo a través del cual los animales estuvieron normalmente completamente conscientes. La generación de imágenes se llevó a cabo en animales despiertos.

Se llevaron a cabo todos los experimentos MR utilizando 4.7T/40 cm de un imán horizontal (Oxford, RU) en interfaz con una consola BiospecBruker (Bruker, Alemania) y equipada con un gradiente de campo magnético 20G/cm. Se utilizó una configuración de bobina de radiofrecuencia (RF) ^{1}H dual (Insight

NeuroImaging Systems, Worcester, MA) que consiste en una bobina de volumen para excitar los giros de protones de agua y una bobina de superficie para recibir la señal MRI; las bobinas de volumen y de la superficie fueron sintonizadas y desintonizadas en forma activa para evitar un acoplamiento de bobina mutuo. Esta configuración de bobina dual permitió suficiente homogeneidad de campo RF en el cerebro de ratas para la transmisión RF, conservando al mismo tiempo la ventaja de la proporción mayor de señal a ruido (SNR) proporcionada por la bobina de recepción más pequeña.

Se adquirieron imágenes anatómicas utilizando primero una secuencia de eco-giro rápido de rodajas múltiples (RARE) con los parámetros: tiempo de repetición (TR) = 2125 ms; factor RARE = 8; tiempo de eco efectivo (TE) = 50 ms; tamaño de matriz = 256x256; campo de visión (FOV) = 3.2x3.2 cm^2; número de rodajas = 18; grosor de rodaja = 1 mm; n = 8. Con base en la geometría de las imágenes anatómicas, se adquirieron imágenes de eco-gradiente de rodajas múltiples que cubren todo el cerebro, utilizando generación de imágenes eco-planas (EPI) con los parámetros: TR = 1 s; Ángulo de vuelta = 60□; TE = 30 ms; tamaño de matriz = 64x64; FOV = 3.2x3.2 cm^2; número de rodaje = 18; grosor de rodaja = 1 mm. Las ratas estuvieron en descanso durante la adquisición de imágenes. Se adquirieron 200 volúmenes por cada corrida. Se obtuvieron 9 corridas por cada rata.

Los análisis de todos los datos fMRI se llevaron a cabo utilizando el software de Análisis y Visualización de Imágenes Médicas (MIVA), Mapeo Paramétrico Estadístico (SPM8) (Wellcome Department of Cognitive Neurology, Londres, RU) y Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA, E.U.A.). Los datos fueron

corregidos inicialmente para movimiento (valor de umbral de 0.25 mm). El procesamiento previo adicional de los datos incluyó (a) corrección de tiempo de exploración de rodaja, (b) alisamiento espacial utilizando filtro 3D (1-mm FWHM) para abarcar pequeñas variaciones en señal debido al movimiento y efectos vasculares, y (c) eliminando la tendencia lineal tipo voxel y la filtración de paso alto de las frecuencias (3 ciclos por curso de tiempo) para ajustar el desplazamiento del escáner entre las corridas. Posteriormente se transformaron los datos estructurales y funcionales de cada animal, al espacio estereotáxico estándar incrustado en MIVA para facilitar el análisis del grupo de los datos funcionales.

Se utilizó el análisis de conectividad funcional correlacional para analizar la conectividad funcional en el estado de reposo. Primero, cada animal fue alineado y registrado en conjunto, con base en las imágenes anatómicas, a un atlas del cerebro de rata completamente segmentado. El procedimiento de registro conjunto proporcionará las coordenadas de cada región de interés de la semilla (ROI) en el espacio de la imagen. Después del registro y la alineación conjunta, los cursos de tiempo fMRI de voxeles individuales en un ROI de semilla fueron obtenidos de acuerdo con sus coordenadas correspondientes. Un curso de tiempo de cada región de semilla se creó mediante cursos de tiempo de promedio regional procedente de todos los pixeles dentro del ROI de semilla. Todos los cursos de tiempo ROI fueron filtrados con paso de banda 0.002 a 0.08 Hz. Después de la filtración, se calculó el coeficiente de relación cruzada (CC) de Pearson entre los cursos de tiempo ROI, y se utilizó para cuantificar la intensidad de la conectividad funcional.

Para evaluar los efectos de PIO en la conectividad funcional a través de todo el cerebro, dividimos el cerebro de rata total en

57 ROIs. La intensidad de la conectividad funcional entre cada par de ROIs, fue evaluada utilizando el coeficiente de correlación cruzada entre los dos cursos de tiempo ROI. En total, se evaluaron 57x56/2= 596 conexiones funcionales por cada una de las corridas rsfMRI. Este procedimiento se repitió las 9 corridas de cada sesión fMRI, y la intensidad de conectividad de la conexión correspondiente fue promediada posteriormente a través de 9 corridas. Como resultado, la intensidad de conectividad de las 1596 conexiones fue obtenida para cada sesión de escaneo 1596.

Para cada conexión (es decir, una conexión entre cada par de ROIs), la medida repetida de ANOVA con factores del día de generación de imagen, dosificación e interacción fueron calculadas posteriormente. El nivel significativamente estadístico se ajustó en $P<0.005$, no corregido.

Para evaluar los efectos de PIO en los circuitos neuronales individuales, se utilizó un análisis correlacional basado en semilla (Zhang et al. 2010, supra). El CA1 del hipocampo fue seleccionado como el ROI de la semilla. El patrón espacial de las regiones del cerebro que están conectadas funcionalmente con el ROI de semilla, se calculó en una forma de voxel por voxel. Primero, se obtuvo como una referencia el curso de tiempo promediado en forma regional del ROI de semilla. El coeficiente de correlación cruzada entre el curso de tiempo de tiempo de cada voxel y el curso de tiempo de referencia, fue calculado posteriormente. El coeficiente de correlación representó la intensidad de conectividad funcional entre este voxel y la semilla. Se creó un mapa de conectividad para el ROI de semilla por cada corrida fMRI, y los mapas a través de las nueve corridas fueron promediados posteriormente para crear el mapa de conectividad

para cada sesión de escaneo. Por último, se genera un mapa de conectividad compuesto, promediando los mapas de conectividad en las ratas del mismo grupo de las que se generó una imagen el mismo día en el protocolo (Zhang et al. 2010, supra).

La figura 1 proporciona un ejemplo de los datos fMRI y demuestra que incluso las dosis más bajas de pioglitazona de liberación inmediata, administrada en forma oral produce un cambio en el metabolismo en la región central de las estructuras corticales profundas del cerebro. Esto es consistente con un efecto mitocondrial intracelular.

Conclusiones

1. En forma relativa al control de vehículo, existe la evidencia de que el tratamiento PIO en dosis tan bajas como 0.04 mg/kg/día, induce cambios en múltiples regiones del cerebro en la rata. Este resultado indica que PIO de dosis baja, administrada en forma oral, penetra la barrera de sangre cerebro.

2. PIO, en dosis tan bajas como 0.08 mg/kg/día, indujo cambios funcionales en forma tan temprana como 24 horas, lo cual fue el punto de tiempo más temprano ensayado después del inicio del tratamiento.

Tal como se puede apreciar en la figura 1, parece haber una señal disminuida en la dosis 0.32 mg/kg/día con base en la apariencia de estos datos. Sin embargo, se realizarán pruebas adicionales con el objeto de confirmar si existe o no un efecto disminuido real en esta dosificación en forma relativa a las dosis inferiores, y no reflejar simplemente la variabilidad biológica intrínseca entre los sujetos animales.

EJEMPLO 11

Determinación de Riesgo de Ejemplo

Con el objeto de identificar a sujetos con cognición normal

quienes están en alto riesgo de desarrollar daño cognitivo del tipo Alzheimer (también llamado tipo hipocampo) en los siguientes 5 años con base en el genotipo TOMM40 rs1054523 (523), la edad y posiblemente el genotipo APOE, se estudiaron los datos de edad de desarrollo a partir de un cohorte de 438 individuos con seguimiento en prospecto del estudio de Envejecimiento y Salud de Memoria de Duke Bryan ADRC.

La tabla 3 resume una categorización de riesgo de ejemplo con base en los genotipos 523 y APOE y la edad. Se debe observar que parece haber un subconjunto de sujetos ε3/ε3 VL/VL, APOE quienes sucumbieron al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en las edades entre 51 y 59. Estos sujetos no son considerados en la tabla 3, que presenta únicamente el subgrupo de bajo riesgo de transportadores VL/VL, quienes están cognitivamente normales después de la edad de 62. También se contempló una categorización de riesgo expandida que incluye los sujetos ε3/ε3 VL/VL APOE de alto riesgo.

Tabla 3. Valores de Umbral de Edad de Ejemplo que Definen Alto Riesgo para los Genotipos 523 en las Edades de 62 a 83

Genotipo 523 o APOE	Edad que define alto riesgo
523 L,L	Todas alto riesgo
523 L,VL	Todas alto riesgo
523 S,L	74
523 S,S	77
523 S,VL	76
523 VL,VL	Todas bajo riesgo
APOE ε2/ε2	Todas bajo riesgo
APOE ε2/ε3	Todas bajo riesgo
APOE ε2/ε4	Todas bajo riesgo

Es sencillo un uso de ejemplo de estas asignaciones. La tabla 3 se utiliza para realizar asignaciones de individuos en los grupos de alto o bajo riesgo (que pueden ser sin tomar en cuenta

la etnia) tal como se indica a continuación:

1) los individuos con un genotipo 523 de (L,L) o (L,VL), son asignados al grupo de alto riesgo,

2) los individuos con un genotipo 523 de (VL,VL) (>62 años) o genotipo APOE de (ε2/ε2) o (ε2/ε3) son asignados al grupo de bajo riesgo,

3) para individuos con el genotipo 523 de (S,S), (S,VL) o (S,L), se compara una edad actual del individuo con la edad en la tabla 2, para realizar la asignación de riesgo.

Para cada genotipo 523, se revisa la curva de edad de desarrollo correspondiente para daño cognitivo, para identificar en donde la pendiente de la curva indica alto riesgo de desarrollo de daño cognitivo en una ventana de 5 años. La parte pronunciada de la curva, sigue una asíntota relativamente plana, y tiene un punto de tiempo característico (edad), en donde se observa un rápido incremento en la proporción de individuos con daño cognitivo (ver figura 2 y figura 3).

La figura 3, ilustra la determinación de edad utilizada para distinguir la clasificación de alto y bajo riesgo del genotipo 523 (S,L). La parte pronunciada de la curva puede ser identificada como comenzando aproximadamente a la edad de 74, lo cual corresponde a la edad asociada con el nivel del 90% de los individuos con este genotipo que no presentan daño cognitivo. Por consiguiente, los individuos con edad de 74 o mayor se pueden asignar al grupo de alto riesgo del estudio, mientras que los individuos más jóvenes de 74 años, son asignados al grupo de bajo riesgo. Las curvas de edad de desarrollo de ejemplo para daño cognitivo para los restantes genotipos 523, se proporcionan en las figuras 4 a 9, las cuales se reflejan en las asignaciones en la tabla 2 presentada anteriormente.

Deberá quedar entendido que, aunque las gráficas aquí presentadas son interpretadas para proporcionar una edad específica en donde ocurre el cambio en la pendiente, estas gráficas pueden ser actualizadas conforme se recolectan datos adicionales, para modificar y/o optimizar las designaciones de edad sin apartarse de las enseñanzas generales de este método.

Las descripciones de las patentes, documentos de patentes, artículos, resúmenes y otras publicaciones aquí mencionadas, están incorporadas en sus totalidades a la presente invención como referencia, como si cada una estuviera incorporada individualmente. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, tomará el control. Los expertos en la técnica podrán apreciar diversas modificaciones y alteraciones a la presente invención, sin apartarse del alcance y espíritu de la misma. Se proporcionan modalidades y ejemplos ilustrativos únicamente como ejemplos, y no están proyectados para limitar el alcance de la presente invención. El alcance de la presente invención está limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL

1. Una composición que comprende pioglitazona de dosis baja para utilizarse en el tratamiento de daño cognitivo del tipo Alzheimer, donde la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona.

2. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque la composición retarda el desarrollo de daño cognitivo del tipo Alzheimer.

3. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizada porque la composición retarda el desarrollo de daño cognitivo de tipo Alzheimer en un sujeto humano con riesgo incrementado de desarrollar daño cognitivo del tipo de Alzheimer en los siguientes 5 a 7 años, en donde el riesgo está basado en la edad del sujeto y el genotipo rs10524523.

4. La composición tal como se describe en la reivindicación 1, reivindicación 2 o reivindicación 3, caracterizada porque la pioglitazona de dosis baja está en forma de dosificación unitaria.

5. La composición tal como se describe en la reivindicación 4, caracterizada porque la forma de dosificación unitaria comprende de 0.5 a 6 miligramos de pioglitazona.

6. La composición tal como se describe en la reivindicación 4, caracterizada porque la forma de dosificación unitaria comprende de 0.5 a 1.5 miligramos de pioglitazona.

7. El uso de pioglitazona de dosis baja en la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de daño cognitivo del tipo de Alzheimer, donde la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona.

8. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es una tableta.

9. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es una cápsula.

10. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es una pastilla.

11. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es un líquido.

12. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es un semi-sólido.

13. El uso tal como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque la formulación farmacéutica es un sólido.

14. El uso tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 7 a la 13, caracterizado porque la pioglitazona es capaz de proporcionar una AUC de aproximadamente 0.15 µg•h/mL hasta aproximadamente 3.6 µg•h/mL.

15. Una composición que comprende pioglitazona de dosis baja para utilizarse en el tratamiento de disminución cognitiva, donde la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona.

16. Una composición farmacéutica que comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona para usarse retardando el desarrollo de daño cognitivo leve en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

17. Una composición farmacéutica que comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona para usarse retardando el desarrollo de daño cognitivo leve amnésico en el sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

18. Una composición farmacéutica que comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona para usarse retardando la enfermedad de Alzheimer preclínica en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

19. Una composición farmacéutica que comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona para usarse retardando el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer prodromal en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

20. Una composición farmacéutica que comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona para usarse retardando el desarrollo de cambios fisiológicos asociados con la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

21. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 20, caracterizado porque la pioglitazona es capaz de proporcionar una AUC de aproximadamente 0.15 µg•h/mL hasta aproximadamente 3.6 µg•h/mL.

22. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es una tableta.

23. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es una cápsula.

24. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es una pastilla.

25. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es un líquido.

26. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es un semi-sólido.

27. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque la composición farmacéutica es un sólido.

28. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 22, caracterizado porque la tableta es una tableta que se desintegra en forma oral.

29. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 26, caracterizado porque la composición farmacéutica semi-sólida se selecciona de un grupo de formulaciones farmacéuticas semi-sólidas que consiste en un gel, crema, loción, ungüento, bálsamo y salve.

30. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 25, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es una formulación oral.

31. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 25, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es una formulación inyectable.

32. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 25, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es una formulación intranasal.

33. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 26, caracterizado porque dicha composición farmacéutica es una formulación tópica

34. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 32, caracterizado porque la composición farmacéutica es un polvo.

35. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto tiene cognición normal.

36. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto es más joven de 60 años.

37. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto tiene edades de entre 60 y 70 años.

38. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto tiene una copia del alelo rs10524523 TOMM40 largo.

39. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto tiene dos copias del alelo rs10524523 TOMM40 largo.

40. La composición farmacéutica tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 20, caracterizado porque el sujeto tiene un riesgo incrementado de desarrollar enfermedad de Alzheimer en comparación a un sujeto control.

41. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 40, caracterizado porque el sujeto control lleva al menos una copia del alelo rs10524523 TOMM40 que comprende una poli repetición T que tiene menos de 19 nucleótidos de longitud.

42. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 40, caracterizado porque el sujeto control no tiene una copia del alelo rs10524523 TOMM40 que comprende una poli repetición T que tiene más de 19 nucleótidos de longitud.

43. La composición farmacéutica tal como se describe en las reivindicaciones de la 16 a la 34, caracterizado porque la composición farmacéutica es una formulación bioequivalente.

44. La composición farmacéutica tal como se describe en las reivindicaciones de la 16 a la 34, caracterizado porque la composición farmacéutica es una formulación farmacéuticamente equivalente.

45. La composición farmacéutica tal como se describe en las reivindicaciones de la 16 a la 34, caracterizado porque la composición farmacéutica es una formulación terapéuticamente equivalente.

46. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 6 mg de pioglitazona.

47. La composición farmacéutica tal como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 1.5 mg de pioglitazona.

48. La pioglitazona de dosis baja para utilizarse en el tratamiento de daño cognitivo del tipo de Alzheimer, donde la pioglitazona de dosis baja comprende de 0.5 a 9 mg de pioglitazona.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde el riesgo está basado en la edad del sujeto y el genotipo rs10524523 es determinado por el método que comprende:

detectar a partir de una muestra biológica del sujeto el genotipo rs10524523 del sujeto, en donde cada alelo del genotipo rs10524523 es asignado como:

(a) corto (S, menos de 19 residuos T);

(b) largo (L, 19 a 29 residuos); o

(c) muy largo (VL, 30 o más residuos); y

determinar a partir del genotipo rs10524523 si el sujeto está en riesgo incrementado de desarrollar daño cognitivo del tipo de Alzheimer en la edad o rango de edad predeterminada, en donde:

(1) una edad mayor a aproximadamente 62 y L,L o L,VL indica un riesgo incrementado;

(2) una edad mayor a aproximadamente 62 y VL,VL no indica un riesgo incrementado;

(3) una edad mayor a aproximadamente 74 y S,L indica un riesgo incrementado;

(4) una edad mayor a aproximadamente 77 y S,S indica un riesgo incrementado; y

(5) una edad mayor a aproximadamente 76 y S,VL indica un riesgo incrementado.

50. La composición de acuerdo con la reivindicación 49, caracterizado porque la determinación comprende además detectar a partir de una muestra biológica de dicho sujeto, el genotipo APOE del sujeto, en donde la presencia de un alelo APOE2 en el genotipo indica que el sujeto no está en riego incrementado.

RESUMEN

Se proporcionan productos de fármaco con pioglitazona de baja dosis para utilizarse en el tratamiento (por ejemplo, retraso de desarrollo) de daño cognitivo del tipo de Alzheimer. También se proporcionan métodos para la fabricación de los mismos. Se proporcionan además métodos para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, incluyendo administrar un producto de fármaco con pioglitazona de baja dosis. Los métodos pueden incluir determinar si el sujeto está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer con base en la edad del sujeto y el genotipo 523 TOMM40.

CPT\CPT\ID-417688\WPC20376

Notaría Sexta 6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 1

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1461
FECHA: 29/Marzo/2011

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co

ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - 1.481 - - - - -

- - - MIL CUATROCIENTOS OCHENTA Y UNO - - - - - - -

DE FECHA: MARZO VEINTINUEVE (29) - - - - - - - -

DEL AÑO DOS MIL ONCE (2011). ----------

OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. ----------

ACTO: PODER ----------

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS NIT. No. 860041367-3

APODERADOS: ----------

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	C.C. No. 35.456.344
NIDIA OSORIO LOPEZ	C.C. No. 39.787.682
OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA	C.C. No. 79.524.634
EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY	C.C. No. 52.006.265
JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL	C.C. No. 16.209.380

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, en la Notaria Sexta (6a) del circulo de Bogotá, Distrito Capital, cuyo Notario(a) - - - - - - - - - - es el(la) doctor(a) - - - - - - AMPARO QUINTERO ARTURO - - - - - - - - - - - - a los VEINTINUEVE (29) días del mes MARZO - - - del año dos mil once (2011) se otorga la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: ----------

Compareció con minuta escrita, la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadania No. **51.680.061** de Bogotá, y dijo: ----------

ESTIPULACIONES:

PRIMERA.- Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la **Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.** ----------

SEGUNDA: Que **ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Carolina del Norte, Estados Unidos de América, domiciliada en One Science Drive, Suite 342, Box 90344, Durham, North Carolina 27708, Durham County, Estados Unidos de América, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

auténtica del documento de representación que se protocoliza. ----------

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS,** y en desarrollo de la facultad otorgada por **ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ,** T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA,** T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY,** T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL,** T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. ----------

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de

101

01

1015807 74

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

3 DE MARZO DE 2011 HORA 11:48:29

R030684524 PAGINA: 1 de 3

* *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII,LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-

LA SUSCRITA NOTARIA 6A. DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HACE CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

29 MAR. 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559	
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906	
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386	
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652	
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740	
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786	
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787	
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841	
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862	
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882	
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881	
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA	27-VIII-1991 NO.	4.019	
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA	16-III -1992 NO.	4.430	
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436	
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554	
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819	
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850	
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065	
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077	
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174	
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937	
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092	
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294	
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873	

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO.INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006	BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506
915	2011/02/28	0006	BOGOTA D.C.	2011/03/03	00013022

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: $10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE $1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

01

1015807755

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

3 DE MARZO DE 2011 HORA 11:48:29

R030684524 PAGINA: 2 de 3

* *

- SOCIO CAPITALISTA (S)
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568
NO. CUOTAS: 8,800.00 VALOR: $8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00 VALOR: $1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)
CHAVARRO JORGE C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: $0.00
TOTALES
NO. CUOTAS: 10,000.00 VALOR: $10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO
CAVELIER GAVIRIA GERMAN C.C. 000000001280709

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DE ACCIONISTAS DEL 20 10

CONO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE COPIA CONCUERDA FIELMENTE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

29 MAR. 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002977024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

28 MAR 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

01

1015807768

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

3 DE MARZO DE 2011 HORA 11:48:29

R030684524 PAGINA: 3 de 3

* *

RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

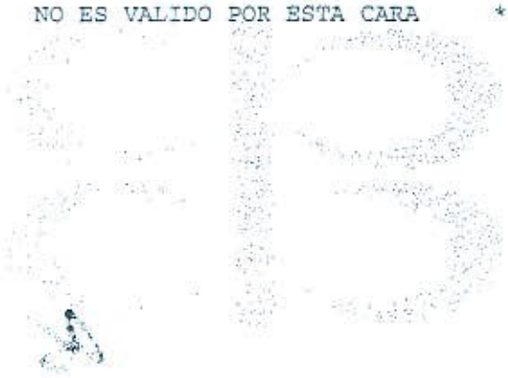
SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : $ 3,700
DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

10 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

* * * NO ES VALIDO POR ESTA CARA * * *



104

This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions.

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the capacity of the person who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears.

This Apostille does not certify the content of the document for which it was issued.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. District of Columbia, United States of America
2. This public document has been signed by JONATHAN MATHEWS
3. acting in the capacity of Notary Public in and for the District of Columbia
4. bears the seal/stamp of JONATHAN MATHEWS, District of Columbia Notary Public

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 9th day of March 2011
7. by *Acting Secretary of the District of Columbia*
8. No. 247671
9. Seal/Stamp



10. Signature:

Cynthia Brock-Smith

Cynthia Brock-Smith

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Date: March 9 2011

I, Antonio Antezana certify that this is an original Power of Attorney for Zinfandel Pharmaceuticals.

(signature)
Date: 3-9-11

District of Columbia, ss:

Subscribed and sworn to before me on this the 9th of March, 2011

DC Notary

JONATHAN MATHEWS
Notary Public, District of Columbia
My Commission Expires April 14, 2015

VISAS & PASSPORTS 2 GO, INC.

2300 Wisconsin Ave, NW Ste. 200A
Washington, DC 20007

Phone: 1-800-598-7240
Fax: 202-986-4130
Questions: Info@vp2go.com

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

105

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 – COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.

domiciliado (s) en/of One Science Drive, Suite 342, Box 90344, Durham, North Carolina 27708, Durham County, United States of America

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial

© CAVELIER ABOGADOS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 25 February, 2011

En/in DURHAM, NC, USA

Por/by ALLEN ROSES

Firma/Signature Allen Roses

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____

de la compañía _____

_____,

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de _____

_____,

que la dirección de dicha compañía es _____

_____

_____,

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

© CAVELIER ABOGADOS

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of Allen Rosen

is authentic, that the signatory currently acts in the position of CFO

of the company

ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC.

a company currently existing and organized under the laws of State of North Carolina, United States of America

that the address is

One Science Drive, Suite 342, Box 90344, Durham, North Carolina 27708, Durham County, United States of America

and that the signatory has the power to grant this document.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

29 MAR. 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.
Dado y firmado en _____

El _____

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.
Given and signed in Durham North Carolina

On 2/25/2011

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: .....
This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at .....
6. the .....
7. by .....
8. No .....
9. Seal/stamp
10. Signature

ROBIN E EDWARDS NOTARY PUBLIC DURHAM COUNTY NC

Robin E Edwards

© CAVELIER ABOGADOS

29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA


ROBIN E EDWARDS
NOTARY
PUBLIC
DURHAM COUNTY, NC


29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

107

Traducción Oficial No. 2011/459 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Hilda Aguilera de Piedrahita, traductora oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y autorizada por el Ministerio de Justicia y del Derecho por Resolución No. 323 de 1980.

(Se traduce del idioma Inglés las Certificaciones Notariales, y la Apostilla anexas a un documento de representación otorgado por ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC el cual se encuentra escrito a doble columna en Inglés y Español, firmado el 25 de Febrero de 2011 en Durham, NC; Estados Unidos de América por Allen Roses)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Público certifica: que la firma que antecede de Allen Roses es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de CEO de la compañia ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC, sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo con las leyes del Estado de Carolina del Norte, Estados Unidos de América, que la dirección de dicha compañia es One Science Drive, Suite 342, Box 0344, Durham, Carolina del Norte 27708, Condado de Durham, Estados Unidos de América y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Durham, Carlina del Norte

El 2/25/2011

APOSTILLA
(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)

1. País:
2. Este documento público ha sido firmado por
3. Actuando en calidad de
4. Lleva el sello/estampilla de

CERTIFICADO

5. En
6. El
7. Por
8. Número
9. Sello (Sello Notarial) 10. Firma (Firmado)

Fecha: Marzo 9 de 2011

Yo, Antonio Antezana certifico que esta es un Poder original para Zinfandel Pahramaceuticals.

(Firmado)
(Firma)
Fecha: 3-9-11

Distrito de Columbia, ss:

29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCION OFICIAL No. 2011/459
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

Suscrito y juramentado ante mi este dia 9 de Marzo de 2011.
(Firmado)
Notario DC
Sello a tinta: Jonathan Mathews, Notario Público, Distrito de Columbia, Mi Comisión expira el 14 de Abril, 2015.

Papelería con información de contacto de Visas & Passports 2 Go, Inc.

Distrito de Columbia

Esta Apostilla no es válida para uso en cualquier parte de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.

Esta Apostilla únicamente certifica la autenticidad de la firma y la calidad de la persona que ha firmado el documento público, y, cuando sea apropiado, la identidad del sello o estampilla que el documento público lleva.

Esta Apostilla no certifica el contenido del documento para el cual fue expedida.

APOSTILLA

(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por JONATHAN MATHEWS
3. Actuando en calidad de Notario Público en y para el Distrito de Columbia
4. Lleva el sello/estampilla de JONATHAN MATHEWS, Notario Público del Distrito de Columbia

CERTIFICADO

5. En Washington DC
6. El 9 de Marzo de 2011.
7. Por el Secretario Encargado del Distrito de Columbia
8. Número **247671**
9. Sello/Estampilla : Sello del Distrito de Columbia
10. Firma (Firmado)
    Cynthia Brock-Smith

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito, habiendo tenido a la vista el documento original.

Bogotá, Marzo 23 de 2011.

CONSULADO GENERAL DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
CIRCULO DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE EL ORIGINAL QUE ME HA SIDO TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
29 MAR. 2011
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
2011 MAR 24 P 3:56

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

TRADUCCION OFICIAL No. 2011/053
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES. No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO ADJUNTO
LAS FUNCIONES INDICADAS

053455

agentes oficiosos. ----------

QUINTO- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS,** igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día 25 de febrero de 2011 por **ZINFANDEL PHARMACEUTICALS, INC** documento que está debidamente legalizado por Apostilla. ----------

Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. ----------

HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO

NOTA 1. La Notaria les informa a los otorgantes : 1. Que únicamente responde de la regularidad formal de (los) instrumento (s) que autoriza, pero no de la veracidad de las Declaraciones de los interesados (Art. 9º. Decreto 960 de 1970). **NOTA 2.** El (Los) compareciente (s) hace (n) constar que: ----------

1. Ha (n) verificado cuidadosamente su (s) nombre (s) y apellido (s), estado (s) civil (es), el número de su (s) documento (s) de identificación, y aprueba (n) esta escritura sin reserva alguna, en la forma como quedó redactado. 2. Las declaraciones consignadas en esta escritura corresponden a la verdad y en consecuencia asume (n) la responsabilidad de lo manifestado en caso de utilizarse esta escritura con fines ilegales. 3.-Conoce (n) la Ley y sabe (n) que el notario responde de la regularidad formal de (los) instrumento (s) que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones del (los) otorgante (s). Ni de la autenticidad del (los) documento (s) que forma (n) parte de este instrumento. ----------

EN CONSECUENCIA LA NOTARIA NO ASUME NINGUNA RESPONSABILIDAD POR ERRORES O INEXACTITUDES ESTABLECIDAS CON POSTERIORIDAD A LA FIRMA DEL (LOS) OTORGANTE (S) Y DE LA NOTARIA. EN TAL CASO, ESTOS DEBEN SER CORREGIDOS DE LA MANERA PREVISTA EN EL DECRETO 960 DE 1970.----------

CONSTANCIA NOTARIAL: (Artículo 9 Decreto Ley 960 de 1970). El Notario responde de la regularidad formal del instrumento que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados. Tampoco responde de la

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

capacidad o aptitud legal de estos para celebrar el acto o contrato respectivo. ------

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído, el presente instrumento público por el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza. ----------

DERECHOS NOTARIALES: $ 44.000.oo - - - - - - - - - - - - - - - - - -

RECAUDO SUPERINTENDENCIA: $3.700.oo - - - - - - - - - - - - - - - -

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO: $3.700.oo - - - - - - - -

IVA: $ 16.544.oo -

RESOLUCIÓN 11621 DE DICIEMBRE 22 DE 2010, MODIFICADA POR LA RESOLUCION 11903 DE DICIEMBRE 30 DE 2010

PAPEL NOTARIAL: El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: 7 700105 652489 - 7 700105 652472 - - - - - - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO

ADRIANA ZAPATA GIRALDO

C.C. 51450601

TEL. 3473611

DIRECCIÓN.

QUIEN OBRA EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD DENOMINADA **CAVELIER ABOGADOS**

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA 6 BOGOTÁ
AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) —— DE BOGOTÁ, D.C.

ELABORÓ: MILENA.R.1560
IDENTIFICÓ:
REVISÓ:
CERRÓ:

109

ES FIEL Y PRIMERA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1481 DE FECHA MARZO 29 DE 2011.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 10 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES.1 LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA , MODIFICACION , O SUSTITUCIÓN , POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. MARZO 30 DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

110

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, D - COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

FE

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

C

14656
08085

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
domiciliado (s) en/of 1-1, Doshomachi 4-chome,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka Japan

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit

© CAVELIER ABOGADOS

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir, este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 14th day of December, 2004

en/in Osaka, Japan

por/by

Firma Hiroshi Akimoto Ph. D. Signature
Executive Director
Member of the Board, General Manager,
Intellectual Property Dept.
Authorized Signing Officer

© CAVELIER ABOGADOS
WPPODE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

112

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

   This public document

2. has been signed by — Kiyoomi FUJITA
3. acting in the capacity of — Notary Public of the Osaka Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of — Kiyoomi FUJITA, Notary Public

Certified

5. at **Osaka**
6. DEC. 17. 2004
7. by **the Ministry of Foreign Affairs**
8. No. 04149
9. Seal/stamp:
10. Signature:

Tsutomu HIGUCHI

For the Minister for Foreign Affairs

113

大阪法務局所属　公証人役場

認証登簿　平成１６年第　334　号

嘱託人 武田薬品工業株式会社 常務取締役　知的財産部長 秋元浩は、本職の面前でこの証書に署名した。

よって、その署名が本人の自筆であることを証する。

平成　16　年　12　月　14　日

大阪市西区江戸堀１丁目１０番８号（帝人殖産ビル内）

公証人　藤田清臣　役場において

大阪法務局所属

公証人　藤田清臣



REGISTER NUMBER 334 / 2004

I hereby certify that this document was signed before me and that the signature appearing on the same is the true signature of Hiroshi Akimoto, Ph. D., Executive Director, Member of the Board, General Manager, Intellectual Property Department of Takeda Pharmaceutical Company Limited.

Dated this 14th day of December, 2004

10-8, Edobori 1-chome,
Nishi-ku, Osaka, Japan.

Kiyoomi Fujita

Kiyoomi Fujita
Notary attached
to The Osaka Legal
Affairs Bureau

115

総第 3603 号

証　　明

大阪法務局所属公証人　藤田清臣

平成16年12月14日付

平成16年 登第 334 号

この認証の付与は，在職中の公証人がその権限に基づいてしたものであり，かつ，その押印は，真実のものであることを証明する。

平成16年12月17日
平成　　年　　月　　日

大阪法務局長　梅津和宏

CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka, Japan, and that the Official seal appearing on the same is genuine.

Date 04.12.17

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

116

THE OSAKA CHAMBER OF COMMERCE & INDUSTRY

2-8 HOMMACHIBASHI, CHUO-KU, OSAKA 540-0029, JAPAN.
FAX : (06)6944-6248 TEL : (06)6944-6472~6411
URL : http://www.osaka.cci.or.jp/

November 17, 2004

To whom it may concern:

CERTIFICATE OF MEMBERSHIP

This is to certify that the undermentioned company is registered as a member of this Chamber.

Company name: Takeda Pharmaceutical Company Limited

(The former company name in English was Takeda Chemical Industries, Ltd. until June 29, 2004.)

Address: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka, Japan

Membership Number: KT-01-00080

The Osaka Chamber of Commerce & Industry

Yoshinobu Kobayashi
Authorized Signatory





EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, DICIEMBRE 20, 2004
No. 299

El encargado de las funciones consulares de Colombia

CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) YOSHINOBU KOBAYASHI, quien autoriza el presente documento , es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) CAMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA, OSAKA y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Firma del Encargado de Funciones Consulares)

Derechos: US$20.oo

RAFAEL RICARDO OROZCO
Segundo Secretario

117

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 02.04/05b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento por medio del cual **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMIMTED** domiciliado en el 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, Japón, otorga derechos de Representación y Poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555; y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 14 de diciembre de 2004 en Osaka, Japón.

Firma Ilegible

Firma Hiroshi Akimoto Ph. D.
Director Ejecutivo
Miembro de la Junta, Gerente General,
Departamento de Propiedad Intelectual
Signatario Autorizado

REGISTRO NÚMERO 334 / 2004

Por el presente certifico que este documento fue firmado ante mí y que la firma que aparece en el mismo es la firma auténtica de Hiroshi Akimoto, Ph. D., Director Ejecutivo, Miembro de la Junta, Gerente General, Departamento de Propiedad Intelectual de Takeda Pharmaceutical Company Limited.

Expedido hoy 14 de diciembre de 2004

10-8, Edobori 1-chome

Nishi-ku, Osaka, Japón

Firma ilegible

Kiyoomi Fujita
Notario adjunto a la
Oficina de Asuntos Legales de Osaka

DOCUMENTO ANTERIOR EN JAPONÉS

(Anexo)

Texto en Japonés

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo ha sido suscrito por un notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón, y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha: 04.12.17

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: **JAPÓN**
   Este documento público
2. ha sido firmado por Kiyoomi FUJITA
3. actuando en calidad de Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
4. lleva el sello/estampilla de Kiyoomi FUJITA, Notario Público

Certificado

5. en Osaka 6. DIC 17 DE 2004

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. **No. 04149**

DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

9. **Sello/estampilla** 10. **Firma:**

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES · JAPÓN ·

Firma Ilegible

Tsutomu HIGUCHI

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

LA CÁMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE OSAKA
2-8 HOMMACHIBASHI, CHUO-KU, OSAKA 540-0029, JAPÓN
FAX: (06) 6944-6248 TEL: 6944-~~6410~~ 6411
URL: http://www.osaka.cci.or.jp/

Noviembre 17 de 2004

A quién pueda interesar:

CERTIFICADO DE MEMBRESÍA

El presente es para certificar que la siguiente compañía está registrada como miembro de esta Cámara.

Nombre de la compañía: Takeda Pharmaceutical Company Limited

(El nombre anterior de la compañía en inglés fue Takeda Chemical Industries, Ltd. hasta el 29 de junio de 2004.)

Dirección: 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka, Japón

Número de Membresía: KT-01-00080

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO DE SANTAFE DE
BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE:

Diego Fernando

Vargas

CORRESPONDE A LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (LOS) SEÑOR(ES) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA - 08 FEB 2005

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

3 1 3 3 9 1

Diego Vargas
FIRMA ANTE EL SUSCRITO FUNCIONARIO
DOCUMENTO DE SEMEJANZA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE AGUARE
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

AUG FEB -8 P 2:39

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

La Cámara de Comercio e Industria de Osaka

Firma Ilegible

Yoshinobu Kobayashi

Signatario Autorizado

(Respaldo)

Certificado No. 299 del 20 de diciembre de 2004 expedido por la EMBAJADA DE COLOMBIA en Tokio, Japón, en donde se certifica que YOSHINOBU KOBAYASHI está legalmente facultado para firmar a nombre de la Cámara de Comercio e Industria de Osaka y que su firma en el anterior documento es auténtica.

Firmado por RAFAEL RICARDO OROZCO, Segundo Secretario.

Pagados los derechos consulares.

Legalización de la firma anterior con el **No. 085749** expedida por el Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores en Santafe de Bogotá el 4 de febrero de 2005.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-6472/WPCL002G/COLO 14656-845-001-0

Diego F. Vargas

DIEGO F. VARGAS Z.

TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

ESPAÑOL - INGLES – INGLES - ESPAÑOL

RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

313395

Diego Urrego

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 FEB -8 P 2:40

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



121

CAVELIER
ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**

Poder conferido el : 14/12/2004

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

EMILIO FERRERO
T.P.A. N° 31.929
C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N° 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C. 05 NOV 2009

Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO,

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Compareció(eron)

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

REPÚBLICA DE COLOMBIA

Amparo Quintero Arturo

NOTARIA

NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ

122

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 102274

Bogotá D.C., Septiembre 17 de 2015 - 11:20:34

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95568	31/08/2015	1.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95823	01/09/2015	2.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98499	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98500	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98502	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100561	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100562	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101426	16/09/2015	119.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101440	16/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101441	16/09/2015	536.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-187439- -00014-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 124

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-222430- -00000-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 124

0010-20376-841-002-9

123

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 102271

Bogotá D.C., Septiembre 17 de 2015 - 11:20:34

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95568	31/08/2015	1.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95823	01/09/2015	2.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98499	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98500	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98502	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100561	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100562	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101426	16/09/2015	119.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101440	16/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101441	16/09/2015	536.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
40	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	1.280.000.00
				$1.280.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N DOSCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-222430- -00000-0000

Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 124

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-187439- -00014-0000

Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 124

COLO-20376-841-002-9

124

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la p
- ☐ Representación gráfica de un esquema de traz
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecida

Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-187439- -00014-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 124

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-222430- -00000-0000
Fecha: 2015-09-18 17:24:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 124