



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 559**

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01) **A61K 31/381** (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01) **A61P 25/30** (2006.01)
A61P 25/32 (2006.01) **A61P 25/34** (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07022078 .5**

96 Fecha de presentación : **19.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1900362**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54

Título: **Derivados de α -aminoamida útiles en el tratamiento de trastornos adictivos.**

30

Prioridad: **22.04.2004 EP 04009532**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73

Titular/es: **NEWRON PHARMACEUTICALS S.p.A.**
Via Ariosto, 21
20091 Bresso, MI, IT

72

Inventor/es: **Besana, Claudia;**
Barbanti, Elena;
Izzo, Emanuela;
Thaler, Florian;
Fariello, Ruggero;
Salvati, Patricia y
Benatti, Luca

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 559 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La invención se refiere a derivados de α -aminoamida, una clase química de inhibidores de monoamino oxidasa B (MAOB), bloqueadores de canal de sodio, inhibidores de la recaptación de dopamina y moduladores de niveles de glutamato para su uso en el tratamiento de trastornos adictivos.

5 Antecedentes de la invención

Habitualmente, drogas adictivas diferentes (anfetaminas, cocaína, heroína, nicotina, alcohol), incluso con objetivos moleculares primarios diferentes, tienen en común una actividad de aumento de la transmisión de dopamina en el sistema mesolímbico. En el tratamiento de trastornos adictivos se han usado diferentes enfoques, la mayor parte de ellos dirigidos a modular el sistema dopaminérgico.

1 0 Los inhibidores de MAOB afectan al metabolismo de dopamina en seres humanos y primates, provocando una prolongación de la evolución temporal de la dopamina en sus receptores. Se ha demostrado que el uso de inhibidores de MAOB es beneficioso en el tratamiento de patologías en las que existe un déficit dopaminérgico como en la enfermedad de Parkinson.

1 5 Hay nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de que los inhibidores de MAOB pueden ser beneficiosos en el tratamiento de trastornos adictivos. Estudios realizados en ratas y en seres humanos han demostrado que la selegilina (un inhibidor específico de MAOB) tiene un efecto antirreforzamiento moderado durante la desintoxicación de cocaína y puede mejorar los déficits de dopamina durante la abstinencia, que se piensa que contribuyen a episodios de recaída (Schiffer y col., 2003 Synapse 48:35-8). Houtsmuller y col. Divulgan en Psychopharmacology, 172(1), 2004, 31-40 que la selegilina puede ser un compuesto útil en el
2 0 tratamiento del consumo y la dependencia de la cocaína.

Recientemente, se ha observado que los fumadores presentan una actividad de MAOB reducida en plaquetas y en el cerebro.

Se ha desarrollado la hipótesis de que una actividad reducida de MOAB en el cerebro está implicada en el aumento de las propiedades adictivas de la nicotina. En un estudio multicentro de fase II, la lazabemida,
2 5 otro inhibidor de MOAB (200 mg/día), parece aumentar el porcentaje de abandono del tabaco (del 17 al 30 %) (Berlin y col., 2002 Adiction 97:1347-1354). Tony y col. divulgan en Biological Psychiatry, 53(2), 2003, 136-143 que la selegilina mejora los porcentajes de abandono del tabaco.

Se ha demostrado, además, que también los bloqueadores del canal de Na pueden ser eficaces en el tratamiento de trastornos adictivos. Ciertamente, un estudio clínico reciente ha demostrado que el topiramato
3 0 (un bloqueador del canal de Na) es eficaz en el tratamiento del alcoholismo (Johnson y col., 2003, The Lancet 361: 1677-1685).

Los tratamientos actuales de trastornos adictivos incluyen antidepresivos, agonistas del receptor de opiáceos tales como metadona, antagonistas y agonistas parciales del receptor de opiáceos tales como naltrexona y buprenorfina, benzodiazepinas y disulfiram para la desintoxicación alcohólica. Las desventajas de
3 5 estos tratamientos incluyen distintos efectos secundarios y, además, una eficacia terapéutica insatisfactoria.

Ya que existen evidencias de que los compuestos con actividad inhibitoria de MAOB y los compuestos con actividad bloqueadora del canal de Na pueden ser eficaces en el tratamiento de trastornos adictivos, proponemos el uso de derivados de α -aminoamida, una clase química de inhibidores de monoamino

oxidasa B (MAOB) y bloqueadores del canal de sodio de la presente invención en el tratamiento de trastornos adictivos.

Los documentos WO90/14334, WO94/22808, WO97/05102 Y WO97/05111 divulgan compuestos sustituidos de bencilaminopropionamida que son activos sobre el sistema nervioso central y útiles como
 5 agentes antiepilépticos, anti-Parkinson, neuroprotectores, antidepresivos e hipnóticos antiespásticos (véase también Prevarello P. y col. (1998), J. Med. Chemistry, 41: 579-590). Los documentos WO99/35125 y WO99/35123 divulgan compuestos sustituidos de bencilaminopropanamida que son activos sobre el sistema nervioso central y útiles como analgésicos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

1 0 La presente invención proporciona tratamientos rápidos y altamente eficaces de trastornos adictivos utilizando, in vivo, ciertos compuestos de α -aminoamida en una terapia que sea una alternativa superior a los tratamientos existentes.

La invención se refiere al uso de al menos un fármaco que sea un compuesto de α -aminoamida que se selecciona de entre:

- 1 5 2-(4-benciloxibencilamino)propanamida;
 2-[4-(2-metoxibenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
 2 0 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-N-metil-propanamida;
 N-{2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]}propionil-pirrolidina;
 2-[4-(3-metoxibenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2 5 (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-N-metil-propanamida;
 N-{2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]}propionil-pirrolidina;
 2-[4-(4-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 3 0 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
 2-[4-(2-clorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-3-hidroxi-propanamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-propanamida;
 3 5 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-propanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;

- 2-[4-(2-clorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
 2-[4-(3-clorobenciloxi)-feniletilamino]propanamida;
 5 2-{4-[2-(3-fluorofenil)-etiloxi]bencilamino}propanamida;
 2-{4-[2-(3-fluorofenil)-etil]bencilamino}propanamida;
 2-[N-(4-benciloxibencil)-N-metilamino]propanamida;
 2-{4-[(3-clorobenciloxi)-feniletil]-amino}propanamida;
 2-[4-benciltiobencilamino]propanamida;
 1 0 2-[4-(2-fluorobenciltio)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-fluorobenciltio)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(3-fenilpropiloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(4-fenilbutiloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(5-fenilpentiloxi)-bencilamino]propanamida;
 1 5 2-(4-benciloxibencilamino)-3-fenil-N-metil-propanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-3-metil-N-metil-butanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2 0 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 2 5 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 2-(4-(2-tieniloxi)-bencilamino)propanamida;

3 0 o isómeros ópticos, mezclas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos adictivos.

3 5 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácidos con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido nítrico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico o con ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, tartárico, cítrico, succínico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico y salicílico.

Algunos de los compuestos de la invención pueden tener átomos de carbono asimétricos, y por lo tanto pueden existir bien como mezclas racémicas o bien como isómeros ópticos individuales (enantiómeros). Por consiguiente, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" de la α -aminoamida

de la invención también significa que incluye dentro de su alcance todos los isómeros ópticos posibles y sus mezclas.

Compuestos preferidos, que se pueden usar en solitario, o en combinación con otros compuestos, en una cantidad eficaz para tratar uno o varios trastornos adictivos en un paciente son (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida o (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida.

En una realización, el paciente que está siendo tratado es un mamífero, incluidos seres humanos, con necesidad de alivio, o inhibición de los síntomas de uno o varios trastornos adictivos.

Particularmente, al mamífero con necesidad del tratamiento anteriormente mencionado se le ha de administrar una dosis de una α -aminoamida de la invención según se ha definido anteriormente que oscila de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier cuidado mediante procedimientos o aplicaciones a un mamífero, y particularmente a un ser humano, que pretende a) prevenir que tenga lugar la enfermedad o trastorno en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad/trastorno, pero al que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; b) inhibir la enfermedad/trastorno o afección, es decir, detener su desarrollo; o c) aliviar la enfermedad/trastorno, o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad/trastorno o afección.

En otro aspecto, la invención incluye una de las α -aminoamidas anteriormente enumeradas que se administran como agente activo de una composición farmacéuticamente aceptable que presente actividad en el tratamiento de trastornos adictivos que pueda prepararse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo mezclando el agente activo con un vehículo orgánico y/o inorgánico farmacéuticamente aceptable, terapéuticamente inerte o materiales excipientes.

Compuestos preferentes que se usan en una cantidad eficaz para trastornos adictivos en un paciente son (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida o (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida. Los compuestos y las sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, se pueden obtener mediante procedimientos bien conocidos según se describen en las solicitudes de patentes anteriormente citadas.

"Terapia de combinación" (o "co-terapia") incluye la administración de un compuesto de alfa-aminoamida de la invención y al menos un segundo agente, por ejemplo:

- agonistas de dopamina tales como bromocriptina, cabergolina, lisurida, pergolida, ropinirol, apomorfina, sumanirol, rotigotina, talipexol, dihidroergocriptina y pramipexol.
- levodopa, levodopa más carbidopa (SINEMET®), levodopa más carbidopa de liberación controlada (SINEMET-CR®), levodopa más benserazida (MADOPAR®), levodopa más benserazida de liberación controlada (MADOPAR-HBS),
- inhibidores de COMT tales como tolcapona y entacapona,
- STALEVO®, Amantadina
- y agentes anticolinérgicos,

como parte de un régimen de tratamiento específico ideado para proporcionar el efecto beneficioso a partir

de la acción conjunta de esos agentes terapéuticos. Beneficios de combinaciones de este tipo incluyen la reducción de la dosis de agentes convencionales (es decir, distintos de los agentes de la presente invención) con la consiguiente reducción de los efectos secundarios de agentes convencionales de este tipo. El efecto beneficioso de la combinación incluye la acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de esos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo típicamente durante un período de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La "terapia de combinación" puede que esté ideada para abarcar, aunque generalmente no lo haga, la administración de dos o más de esos agentes terapéuticos como parte de regímenes separados de monoterapia que incidentalmente y arbitrariamente dan como resultado las combinaciones contempladas por la presente invención. La "terapia de combinación" está ideada para abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de manera secuencial, esto es, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos de manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, administrando al sujeto una cápsula sencilla que tiene una proporción fija de cada uno de los agentes terapéuticos o en múltiples cápsulas sencillas para cada uno de los agentes terapéuticos. Se puede efectuar la administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico por cualquier vía adecuada que incluye vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membranas mucosas. Los agentes terapéuticos se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar oralmente.

Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos se pueden administrar oralmente o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar por inyección intravenosa. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es rigurosamente crítica. La "terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos según se ha descrito anteriormente en combinación adicionalmente con otros ingredientes biológicamente activos y terapias sin fármacos (por ejemplo, tratamiento quirúrgico o de radiación). Cuando la terapia de combinación comprende adicionalmente un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármacos se puede realizar en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento sin fármacos. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se consigue cuando se suprime temporalmente el tratamiento sin fármacos de la administración de los agentes terapéuticos, puede que durante días o incluso semanas.

Las composiciones de α -aminoamida de la invención se pueden administrar en una diversidad de formas farmacéuticas, por ejemplo oralmente en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, comprimidos revestidos de azúcar o película, disoluciones líquidas, emulsiones o suspensiones; rectalmente, en forma de supositorios; parenteralmente, por ejemplo mediante inyección o infusión intravenosa o intramuscular; y transdérmicamente en forma de parche, ungüento, emulsión, loción, solución, gel, crema y pulverización

nasal.

Los vehículos orgánicos y/o inorgánicos, farmacéuticamente aceptables, terapéuticamente inertes, o los materiales excipientes adecuados útiles en la preparación de composiciones de este tipo incluyen, por ejemplo, agua, gelatina, goma arábiga, lactosa, almidón, celulosa, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, ciclodextrinas y polialquilenglicoles. Las composiciones de α -aminoamida se pueden esterilizar y pueden contener ingredientes adicionales, bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, por ejemplo, aceite de parafina, monooleato de manida, sales para ajustar la presión osmótica y tampones.

Adicionalmente, las formas orales sólidas pueden contener, además del agente activo, diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato magnésico o cálcico y/o polietilenglicoles; agentes aglomerantes, por ejemplo almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, un almidón, ácido algínico, alginatos o almidón glicolato sódico; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacéuticamente inactivas que se usan en formulaciones farmacéuticas. Las preparaciones farmacéuticas se pueden fabricar de cualquier forma conocida, por ejemplo, por medio de mezclado, granulación, formación de comprimidos, revestimiento con azúcar, procedimientos de revestimiento con películas.

Las formulaciones orales comprenden formulaciones de liberación retardada que se pueden preparar de manera convencional, por ejemplo aplicando un revestimiento entérico a los comprimidos y gránulos.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser, por ejemplo, jarabes, emulsiones o suspensiones. Los jarabes pueden contener adicionalmente como vehículo, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o disoluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína. Las disoluciones para inyecciones o infusiones intravenosas pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o preferiblemente pueden estar en forma de soluciones salinas estériles, acuosas o isotónicas.

Los supositorios pueden contener, además del agente activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo manteca de coco, polietilenglicol, un tensioactivo de éster de ácido graso y polioxietileno sorbitán o lecitina.

Las composiciones que incluyen α -aminoamidas de la invención generalmente están en forma de una unidad de dosificación que contiene, por ejemplo, 20 a 7000 mg de ingrediente activo por forma de

dosificación unitaria. Se da tratamiento adecuado 1 ó 2 ó 3 veces al día, dependiendo de la tasa de tolerancia. Por consiguiente, la dosis deseada se puede presentar en una dosis sencilla o como dosis divididas que se administran a intervalos apropiados, por ejemplo, dos a cuatro o más subdosis por día.

5 Las composiciones farmacéuticas que incluyen una α -aminoamida de la invención pueden contener, por unidad de dosificación, por ejemplo, cápsula, comprimido, polvo para inyección, cucharilla, supositorio, de 20 a 7000 mg del ingrediente activo.

10 Se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica dosis para administrar eficaces, terapéuticamente óptimas, y variarán, básicamente, con la concentración de la preparación, con el modo de administración y con el avance del trastorno tratado. Además, factores asociados con el sujeto particular que está siendo tratado, que incluyen edad del sujeto, peso, dieta y momento de administración, pondrán de manifiesto la necesidad de ajustar la dosis a un nivel eficaz terapéuticamente apropiado.

Son muchas las ventajas derivadas de los usos de la invención según se han definido anteriormente e incluyen la posibilidad de tratar básicamente todos de síntomas de trastornos adictivos.

EJEMPLO 1

15 Estudio de interacción de cocaína en ratones

Habitualmente, las drogas psicoestimulantes tales como anfetamina y cocaína inducen un aumento en la actividad locomotora en roedores y en primates. Algunos compuestos con propiedades potencialmente antiadictivas pueden prevenir el aumento en la actividad locomotora inducida por drogas psicoestimulantes. (Katz JL, Kipajtic TA, Myers KA, Mitkus RJ, Chider M, Behavioral effects of cocaine: 20 interactions with D1 dopaminergic antagonists and agonists in mice and squirrel monkeys. J Pharmacol Exp Ther. octubre 1999, 291(1): 265-79).

El efecto de los compuestos de ensayo se evalúa en un modelo de aumento de la locomoción inducida por cocaína en ratones.

Procedimiento

25 Sujetos: ratones Webster suizos, machos

Instrumental: cámaras con fotocélulas automáticas

Drogas: Se administran intraperitonealmente (i.p.) 20 mg/kg de cocaína; los compuestos de ensayo disueltos en vehículo se administran i.p. a diferentes dosis (10-100 mg/kg) justo después de la cocaína.

30 Ensayo conductual: Los animales (8 por grupo de experimentación) recibieron una inyección i.p. de cocaína (20 mg/kg) o solución salina y o bien los compuestos de ensayo (10-100 mg/kg) o bien su vehículo y se registra la actividad locomotora durante 1 hora.

Análisis de datos

35 Evolución temporal: para el vehículo, la cocaína sola y cada dosis de compuesto de ensayo solo + cocaína, se representa gráficamente la actividad media (+SEM) para cada periodo de 10 min.

Efecto máximo: El periodo de 30 min en el que la cocaína (20 mg/kg) produce la actividad máxima se usa para determinar el efecto del compuesto de ensayo. Se realiza una transformación a log10 de los recuentos promedio del periodo de 30 min para sujetos individuales con el fin de homogeneizar

varianzas para análisis subsiguientes. Se realiza un análisis estadístico ANOVA y se comparan el vehículo y cada dosis del compuesto de ensayo + cocaína con cocaína sola para determinar efectos de dosificación significativos ($p < 0,05$). Se lleva a cabo un análisis lineal de regresión de mínimos cuadrados; se realiza la regresión de los recuentos promedio del periodo de 30 min a través de los sujetos sobre la porción descendiente de la curva frente al \log_{10} de la dosis del compuesto de ensayo. La DA50 (dosis que atenúa la estimulación inducida por cocaína en un 50 %) se determina a partir del análisis de regresión lineal.

EJEMPLO 2

Ensayo de discriminación de drogas en ratas

Los trabajos de discriminación de drogas (DD) son procedimientos para evaluar la capacidad de un compuesto para sustituir una droga psicoactiva (tal como una droga adictiva). La rata aprende a utilizar los estímulos interoceptivos de la droga para señalar cual de dos o tres manipulandos producirá suministros de comida (aprendizaje dependiente del estado). Tales trabajos constituyen el mejor modelo animal para examinar efectos “subjetivos” de la droga. Adicionalmente, los procedimientos DD pueden tener la capacidad, en determinadas circunstancias, de medir independientemente varios efectos subjetivos diferentes de una droga, incluidos algunos que promueven la drogadicción (euforígenos) y otros que inhiben la drogadicción (nocioceptivos).

Los efectos de potenciación y prevención de la drogadicción de los compuestos de ensayo se evalúan en un modelo de ensayo de discriminación de cocaína en ratas.

(Colpaert FC (1986) Drug discrimination: behavioral, pharmacological y molecular mechanisms of discriminative drug effects, in Behavioral Analysis Of Drug Dependence, Goldberg SR y Stolerman IP eds, pp 161-193, Academic Press, Orlando).

Procedimientos

Sujetos. Se realizan estudios en ratas Sprague-Dawley macho. Todos los animales se alojan en un bioterio con control de la temperatura y la humedad con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se encienden a las 7:00 AM). Todos los experimentos se realizan durante la fase de luz del ciclo de luz/oscuridad, entre las 8:00 AM y las 3:00 PM. Las ratas se mantienen a aproximadamente 80-85 % de su peso corporal con alimento a voluntad.

Discriminación de cocaína. Las ratas se alimentan diariamente con aproximadamente 15 g de pienso de laboratorio estándar al menos 30 min después de comprobar que se mantienen en sus pesos individuales a lo largo del estudio. Los sujetos se analizan diariamente en dos cámaras de condicionamiento operante con dos palancas que están alojadas dentro de armarios atenuantes de la luz y el sonido. A lo largo del análisis hay presencia de ruido blanco para enmascarar sonidos exteriores. La iluminación ambiental se logra mediante una lámpara situada en la parte superior central del panel frontal (luz ambiental). Las palancas se disponen con una distancia de 17 cm, con pares de lámparas (diodos emisores de luz; LED) sobre cada una de las palancas, también en el panel frontal. Las respuestas reforzadas proporcionan una pella de 45 mg en un recipiente para comida centrado entre las palancas en el panel frontal de la cámara. Se entrena inicialmente a los animales para presionar ambas palancas con

un programa de razón fija de 10 respuestas (RF 10) de refuerzo de comida y para discriminar inyecciones i.p. de 29 $\mu\text{mol/kg}$ de cocaína (10 mg/kg) de inyecciones i.p. de solución salina. Después de la inyección de cocaína sólo se refuerzan las respuestas sobre una palanca. Después de la inyección de solución salina, se refuerzan las respuestas sobre la otra palanca. La asignación de las palancas apropiadas de cocaína y de solución salina se equilibró en las ratas. Inmediatamente después de la inyección, las ratas se sitúan en las cámaras de experimentación. Un periodo de espera de 5 min, durante el cual se mantienen apagados la luz ambiental y los LED y la respuesta no tiene consecuencias programadas, precede al encendido de la iluminación ambiental y los LED. Se refuerza sólo la respuesta en la palanca apropiada y las respuestas en la palanca inapropiada ponen a cero los requerimientos de respuesta de RF. A cada consecución de comida le sigue un periodo de espera de 20 s durante el cual se apagan todas las luces y la respuesta no tiene consecuencias programadas. Las sesiones terminan después de 20 consecuciones de comida o 20 min, lo que suceda antes. Las sesiones de entrenamiento con inyecciones de cocaína (C) y solución salina (S) se realizan diariamente 5 días por semana y con un orden de secuencia de doble alternancia (por ejemplo, SCCS).

El ensayo se inicia cuando las actuaciones logran criterios de al menos el 85 % de respuesta apropiada en conjunto y durante la primera RF 10 de la sesión durante cuatro sesiones consecutivas. Las dosis seleccionadas de los compuestos de ensayo se administraron por vía oral en momentos diferentes de hasta 360 min después de la inyección para examinar la evolución temporal de los efectos del estímulo discriminativo. Después de la sesión de ensayo, se necesita que un sujeto cumpla los criterios de actuación mencionados anteriormente durante dos sesiones de entrenamiento consecutivas (cocaína y solución salina) para ser analizado de nuevo. Se realizan sesiones de ensayo repetidas, con al menos dos sesiones de entrenamiento entre los ensayos, hasta que se determinan completamente en cada animal los efectos de la dosis. Las sesiones de ensayo son idénticas a las sesiones de entrenamiento, con la excepción de que se refuerzan 20 respuestas consecutivas en cada palanca.

Para cada una de las ratas estudiadas en el procedimiento de discriminación de cocaína, se calcula la tasa de respuesta total y el porcentaje de respuestas que tiene lugar sobre la palanca apropiada de cocaína. Los valores promedio se calculan para cada medida en cada dosis de fármaco analizada. Si a una dosis particular responden menos de la mitad de las ratas, no se calcula ningún valor medio para el porcentaje de respuesta apropiada a la cocaína a esa dosis. Se adopta un mínimo del 20 % de respuesta apropiada a la cocaína como criterio conservativo en el cual se asume una diferencia significativa de la solución salina; una respuesta apropiada a la cocaína del 80 % o superior se toma como similar a la dosis de entrenamiento de cocaína, y niveles intermedios de respuesta apropiada a la cocaína se consideran sustitución parcial.

Análisis de datos. Los resultados de estudios de discriminación de cocaína se evalúan con datos registrados durante toda la sesión, que dura un máximo de 20 min.

Si un animal individual no completa un programa de razón fija durante el ensayo, sus datos se incluyen en la media para la tasa de respuesta, pero no se incluyen en la media para el porcentaje de respuesta de palanca de cocaína. Se calcula un valor de DE50 usando un análisis de regresión lineal para

los compuestos de ensayo que sustituyen a la cocaína (>80 % de respuesta apropiada a droga). Para los compuestos de ensayo que sustituyen parcialmente a la cocaína (>20 % y <80 % de respuesta apropiada a droga), se da la dosis inferior que produce la sustitución máxima y qué porcentaje. Para los compuestos que no sustituyen la cocaína (<20 % de respuesta apropiada a droga), se calcula la dosis superior
5 analizada.

EJEMPLO 3

Ensayo de autoadministración de drogas en ratas

El ensayo de autoadministración de drogas en ratas es un procedimiento usado extensamente para estudiar las propiedades de refuerzo de una droga (tal como la cocaína) y los efectos de varios
10 compuestos sobre estas propiedades recompensantes. En este ensayo, la rata se entrena para “trabajar” con el fin de recibir la administración oral o intravenosa de drogas. Este procedimiento conductual permite evaluar si un compuesto de ensayo tiene un efecto sobre las propiedades de refuerzo de una droga adictiva. (Caine S.B.; Lintz R; Koob G.F.: Intravenous drug self-administration techniques in animals. En: Behavioral Neuroscience: A Practical Approach. Editado por A. Sahgal Páginas 117-143, Oxford University
15 Press, Nueva York. 1993; Fischman MW, Behavioral pharmacology of cocaine J. Clin Psychiatry. Febrero 1988; 49 Sup:7-10).

Procedimiento

Sujetos

Se alojan ratas Sprague-Dawely machos, que pesan 350-400 g, en una jaula y se les proporciona
20 acceso a voluntad a comida y agua y se mantienen en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (las luces se encienden a las 7:00 AM y se apagan a las 7:00 PM).

Autoadministración

Se implanta quirúrgicamente a todos lo animales, anestesiados con quetamina (60 mg/kg i.p.) y pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.), un catéter yugular silástico crónico. El catéter se pasa
25 subcutáneamente a una porción expuesta del cráneo, donde se fija con acrílico dental a cuatro tornillos de acero inoxidable incrustados en el cráneo. En el momento de la sesión de autoadministración (normalmente seis días a la semana), el catéter se conecta a un sistema basculante a través de un resorte metálico que, a su vez, se conecta a una bomba de infusión.

Siete días después de la cirugía, se permite a los animales 2 h de acceso diarias a la palanca
30 metálica instalada en la pared lateral de la jaula de condicionamiento operante estándar, a 3 cm del suelo de la jaula. La fuerza requerida para presionar la palanca es de una media de 30 gramos (un intervalo de 25 a 35 gramos en diferentes jaulas). Las jaulas mismas se alojan dentro de cámaras atenuantes del sonido. En cada cámara operante estan presentes dos palancas, una palanca provocaba una infusión de droga, mientras que la otra permanecía inactiva durante todas las sesiones. Una presión a la palanca
35 activa provocaba una inyección intravenosa de 0,1 ml de clorhidrato de cocaína (0,50 mg/kg/inyección) disueltos en solución salina fisiológica al 0,9 %, que se suministraba durante un periodo de 4 s. Un sistema basculante permite el libre movimiento del animal en la jaula. Coincidiendo con la aparición de la inyección, un estímulo de luz situado 1 cm sobre la palanca en la misma pared lateral de la cámara

operante se enciende durante 20 s, periodo durante el cual la palanca permanece inactiva. Las presiones de la palanca durante el periodo en el que la luz señalizadora no luce se reforzaron en un programa de refuerzo continuo (razón fija 1, RF-1). Una vez los animales demostraron consumo de droga estable durante tres días (un margen inferior al 15 % del consumo diario durante tres días), el programa de autoadministración se cambia a uno de RF10 hasta su estabilización (15-20 días) y después comienza el estudio. El día del ensayo, los animales se pretrataron i.p. inmediatamente antes del comienzo de la sesión con el compuestos de ensayo. Se usaron diferentes dosis del compuesto de ensayo. Cada dosis se analiza sólo una vez para cada animal usando un diseño de cuadrados latinos. Al menos dos días de autoadministración de línea base separan los días de ensayo de droga.

1 0 Análisis de datos

El número total de refuerzos ganados durante los 120 min de sesión se registra y se realiza en el ordenador el análisis estadístico de los datos usando un análisis factorial de varianza de una ruta con medidas repetidas (ANOVA) o un ensayo t de Student según sea apropiado. Las comparaciones de medias individuales se realizan usando un ensayo Newman-Keuls a posteriori.

1 5 EJEMPLO 4

Sensitización conductual inducida por cocaína en ratas

La drogadicción es un comportamiento patológico caracterizado por una búsqueda y un consumo compulsivo de droga. Un modelo animal de estos cambios conductuales es el aumento de larga duración de la actividad locomotora inducida por la administración repetida de drogas psicoestimulantes en roedores (Robinson y col, 1993) conocido como sensitización conductual inducida por droga. El efecto de los compuestos de ensayo se evalúa en un modelo de sensitización conductual inducido por cocaína en ratas.

Procedimiento

Sujetos. Se usan ratas Wistar macho que pesan 200-250 g en el momento de la llegada.

2 5 Aparato de actividad locomotora. Se mide la actividad locomotora en dieciséis jaulas idénticas que cuelgan de un alambre metálico, con unas medidas individuales de 26 cm (longitud) x 25 cm (ancho) x 20 cm (altura). Cada jaula contiene dos conjuntos de fotocélulas emisoras-receptoras de infrarrojos ubicadas a lo largo del eje longitudinal a 1 cm sobre el suelo de rejilla y a 8 cm de la parte frontal y trasera de la jaula. El ruido de fondo se proporciona mediante un generador de ruido de fondo. El movimiento dentro de la jaula produce interrupciones en las fotocélulas, lo que se registra automáticamente en un ordenador compatible con IBM.

3 0 Procedimiento de sensitización y tratamiento. Los animales se habitúan a las cámaras de actividad locomotora durante 2-3 días consecutivos antes del experimento. Las ratas reciben 5 inyecciones i.p. diarias de cocaína (15 mg/kg) o de solución salina y o bien el compuesto de ensayo (40-3 5 100 mg/kg i.p.) o bien su vehículo y se registra la actividad locomotora durante 3 horas. Diez días después de la última inyección de cocaína o solución salina (día 15), se administra a los animales 15 mg/kg de cocaína (desafío) en ausencia del compuesto de ensayo y se supervisa de nuevo la actividad locomotora durante 3 h.

El quinto día de tratamiento con cocaína, los animales se someten a pretratamiento i.p. con vehículo, mostrando un aumento de respuesta locomotora (20 % superior al primer día, $p < 0,05$). Diez días después de la última inyección de cocaína o solución salina, se administra a los animales 15 mg/kg de cocaína (desafío) en ausencia del compuesto de ensayo y se supervisa de nuevo la actividad locomotora durante 3 h. Las ratas tratadas previamente con cocaína y las que no han recibido el compuesto de ensayo se espera que muestren un aumento de la actividad locomotora en respuesta a la cocaína (30 % superior al primer día, $p < 0,05$). Si las ratas pretratadas con el compuesto de ensayo durante el tratamiento con cocaína de 5 días no mostraban un aumento de la actividad locomotora, se consideraba que el compuesto de ensayo tenía un efecto en la prevención de la adición de drogas psicoestimulantes. (Koob, G.F. Sanna, P.P. y Bloom, F.E. *Neuron* 21, 467-476 1998; Robinson T.E. y Berridge K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 247-91, 1993).

Análisis de datos. Los datos (número total de interrupciones del rayo de luz en 3 horas) se analizan usando un ANOVA de dos rutas con medidas repetidas en un factor que incluye los cuatro grupos experimentales (es decir, solución salina/vehículo, solución salina/compuesto de ensayo, cocaína/vehículo y cocaína/compuesto de ensayo) y dos puntos temporales (día 1 y día 5) seguido de un análisis sencillo de los efectos. Se usa un segundo ANOVA de dos rutas con medidas repetidas de un factor para comparar el día 1 y el día del desafío seguido de un ensayo retrospectivo de Newman-Keuls.

EJEMPLO 5

Ensayo de discriminación de drogas en monos

La discriminación de cocaína es un ensayo conductual usado extensamente para evaluar medicamentos experimentales para el tratamiento. En este procedimiento se determinan la potencia y evolución temporal de los efectos conductuales similares a la cocaína producidos por una administración en dosis única del compuesto de ensayo. Específicamente, el compuesto de ensayo se administra o bien solo o bien como un pretratamiento de cocaína en monos rhesus entrenados para discriminar 0,4 mg/kg de cocaína de una solución salina.

Procedimiento

Sujetos. El sujeto son monos rhesus machos adultos (*Macaca mulatta*). Los monos se mantienen a dieta de 3-4 galletas de monos (Purina Monkey Chow Jumbo N° 5037) y una pieza de fruta fresca por día, además de las pellas con sabor a fruta que se suministran durante las sesiones de operación. Los monos tienen agua disponible libremente en cualquier momento. Los monos están alojados en una habitación con control de la humedad y la temperatura con 12 h de ciclo luz-oscuridad (las luces se encienden a las 7:00 am y se apagan a las 7:00 pm).

Instrumental. Cada mono está alojado individualmente en una cámara de acero inoxidable bien ventilada (56 x 71 x 69 cm). Las jaulas de todos los monos se modifican para incluir un panel operante (28 x 3 x 28 cm) instalado en el muro frontal. Se disponen tres llaves de respuesta traslúcidas cuadradas (6,4 x 6,4 cm) separadas 2,54 cm en una hilera horizontal a 3,2 cm de la parte superior del panel operante. Cada llave puede ser iluminada al trasluz por luces de estímulo rojas o verdes (LED superbrillantes). El panel operante también da soporte a un dispensador de pellas instalado externamente (Gerbrands,

modelo G5210) que suministra pellas de comida de 1 g a un receptáculo de comida instalado sobre la jaula debajo del panel de respuesta operante. La operación de los paneles operantes y la recogida de datos se realizan con un ordenador ubicado en una habitación aparte.

Ensayo de discriminación. Los procedimientos de discriminación de drogas son similares a los usados en otros estudios (Lamas X, Negus SS, Hall E y Mello NK (1995) relationship between the discriminative stimulus effects and plasma concentrations of intramuscular cocaine in rhesus monkeys. Psychopharmacology 121:331-338; Negus SS, Mello NK, Portoghese PS, Lukas SE y Mendelson JH (1995) Role of delta opioid receptors in the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 273:1245-1256.; Negus SS, Mello NK, Lamas X and Mendelson JH (1996) Acute and chronic effects of flupenthixol on the discriminative stimulus and reinforcing effects of cocaine in rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 278: 879-890.

Las sesiones de discriminación están constituidas por ciclos múltiples y se realizan 5 días a la semana. Cada ciclo está constituido por un periodo de espera de 15 min seguido de un periodo de respuesta de 5 min. Durante el periodo de espera, todas las luces de estímulo están apagadas y la respuesta no tiene consecuencias programadas. Durante el periodo de respuesta, las llaves de respuesta derecha e izquierda están iluminadas al trasluz con luz verde o roja, y los monos pueden recibir hasta 10 pellas de comida respondiendo a un programa de razón fija (RF) 30 de suministro de comida. Para un grupo de monos, la llave izquierda se ilumina con luz verde y la llave derecha con luz roja. Para el otro grupo de monos, los colores de las llaves de respuesta se invierten. La llave central no se ilumina en ningún momento, y la respuesta sobre la llave central no tiene consecuencias programadas. Si todas las pellas de comida disponibles se suministran antes de finalizar el periodo de respuesta de 5 min, las luces de estímulo que iluminan al trasluz se apagan y la respuesta no tiene consecuencias programadas durante el resto de dicho periodo de respuesta. Los días de entrenamiento, se administra a los monos una inyección i.m. de o bien solución salina o bien de 0,40 mg/kg de cocaína 5 min después del comienzo de cada periodo de espera (es decir, 10 min antes del periodo de respuesta). Después de la administración de solución salina, solo produce comida la respuesta sobre la llave verde (la llave apropiada para la solución salina), mientras que después de la administración de 0,40 mg/kg de cocaína solo produce comida la respuesta sobre la llave roja (la llave apropiada para la droga). Las respuestas sobre la llave inapropiada ponen a cero los requerimientos de RF de la llave apropiada. Las sesiones diarias constan de uno a cinco ciclos, y si se administra la dosis de entrenamiento de cocaína, ésta se administra sólo durante el último ciclo. Así, los días de entrenamiento constan de 0-5 ciclos de solución salina seguidos de 0-1 ciclo de droga.

Durante el periodo de respuesta de cada ciclo, se determinan tres variables dependientes: 1) porcentaje de respuesta apropiada a la inyección antes del suministro del primer refuerzo [(respuesta apropiada a la inyección emitida antes del primer refuerzo / respuestas totales emitidas antes del primer refuerzo) x 100]; 2) porcentaje de respuesta apropiada a la inyección para el periodo de respuesta total [(respuesta apropiada a la inyección emitida durante el periodo de respuesta / respuestas totales emitidas durante el periodo de respuesta) x 100]; y 3) tasa de respuesta (respuestas totales emitidas durante el

periodo de respuesta / tiempo total de luces de estímulo encendidas). Se considera que los monos han adquirido discriminación a la cocaína cuando se cumplen los tres criterios siguientes durante siete de ocho sesiones de entrenamientos consecutivas: 1) el porcentaje de respuesta apropiada a la inyección antes del suministro del primer refuerzo es superior o igual al 80 % para todos los ciclos; 2) el porcentaje de respuesta apropiada a la inyección para la totalidad del ciclo es superior o igual al 90 % para todos los ciclos; y 3) se logra al menos una pella durante todos los ciclos de entrenamiento.

Ensayo de discriminación. Una vez los monos han cumplido los niveles de criterio de discriminación de cocaína, comienza el ensayo. Las sesiones de ensayo son idénticas a las sesiones de entrenamiento, excepto en que la respuesta sobre ambas llaves produce comida, y se administran cocaína y compuestos de ensayo tal como se describe a continuación. Se realizan dos series de experimentos para caracterizar los efectos del compuesto de ensayo administrado solo o como pretratamiento de cocaína. En la primera serie de experimentos, se determina la evolución temporal de los efectos del compuesto de ensayo solo. Se administra una dosis sencilla del compuesto de ensayo (1-100 mg/kg) al comienzo de la sesión de ensayo y el periodo de respuesta de 5 min comienza después de 10, 30, 100 y 300 min. En la segunda serie de experimentos, se determinan los efectos del pretratamiento con el compuesto de ensayo sobre la discriminación de cocaína. Se administra una dosis única del compuesto de ensayo en un momento apropiado antes de la sesión de ensayo en la que se determina la curva dosis de cocaína acumulada-efecto (0,013-1,3 mg/kg). En general, el fármaco de ensayo se evalúa hasta dosis que o bien producen un cambio significativo en la curva de dosis de cocaína-efecto o las tasas de respuesta disminuyen hasta menos de 0,1 respuestas/segundo de media en la totalidad de la sesión.

Análisis de datos. El porcentaje de respuesta apropiada a la cocaína (durante el periodo total de respuesta) y las tasas de respuesta se representan gráficamente como función de o bien el tiempo después de la administración del compuesto de ensayo (para los estudios de la evolución temporal) o bien la dosis acumulada de cocaína (para los estudios de pretratamiento con el compuesto de ensayo). Se incluyó un porcentaje de respuesta apropiada a la cocaína durante un ciclo dado en el análisis sólo si los monos emiten al menos 30 respuestas durante el ciclo (es decir, respuestas suficientes para provocar el suministro de un refuerzo). Los valores de DE50 se definen como la dosis del compuesto de ensayo o de cocaína que produce un 50 % de respuesta apropiada a la cocaína, y se calculan mediante interpolación lineal en las curvas de dosis del sujeto individual-efecto. Para cada compuesto de ensayo, se calcularon valores de DE50 a partir de los datos obtenidos en el momento aproximado del máximo efecto.

EJEMPLO 6

Ensayo de autoadministración de droga a monos

Los procedimientos de autoadministración en animales de laboratorio se usan frecuentemente para evaluar medicamentos experimentales para controlar la adicción a la cocaína y drogas estimulantes psicomotoras relacionadas. Habitualmente, los experimentos se llevan a cabo para determinar cómo alteran las drogas las tasas de respuesta o el número de inyecciones i.v. mediante un programa sencillo, con el consiguiente refuerzo a un número de respuestas fijo o progresivamente creciente, es decir, programas de razón fija (RF) o de razón progresiva (Mello NK y Negus SS (1996) Preclinical evaluation of

pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self administration procedures. Neuropsychopharmacology 14: 375-424). En dicha investigación, la comparación de cambios entre el comportamiento de autoadministración i.v. y la actuación mantenida mediante otro refuerzo tal como el suministro de comida puede proporcionar una medida de la selectividad conductual en los efectos de un medicamento experimental (Woolverton WL (1996) Intravenous self-administration of cocaine under concurrent VI schedules of reinforcement. Psychopharmacology 127: 195-203.; Negus SS, Brandt Mr y Mello NK (1999) Effects of the long-acting monoamine reuptake inhibitor indatralien o cocaine self-administration in rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 291: 60-69; Caine SB, Negus SS y Mello NK (2000) Effects of dopamine D1-like and D2-like agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. Psychopharmacology 148: 41-51).

Procedimiento

Sujetos. El sujeto son monos rhesus adultos machos (*Macaca mulatta*). Los monos se mantienen a dieta de 3-4 galletas de monos (Purina Monkey Chow Jumbo N° 5037) y una pieza de fruta fresca por día, además de las pellas con sabor a fruta que se suministran durante las sesiones operantes. Los monos se alojan en una habitación con control de la humedad y la temperatura con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (la luz se enciende a las 7:00 am y se apaga a las 7:00 pm).

Procedimientos quirúrgicos. Se implantaron catéteres de goma de silicona de doble lumen (diámetro interno 0,7 mm; diámetro externo 2,0 mm) en la yugular o en la vena femoral y se sacaron en la región escapular media. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en condiciones asépticas. Los monos se sedaron inicialmente con quetamina (5 mg/kg) y la anestesia se indujo con tiopental sódico (10 mg/kg, i.v.). Además, los monos se trataron con 0,05 mg/kg de atropina para reducir la salivación. Después de insertar el tubo traqueal, se mantuvo la anestesia con isoflurano (1-1,5 % en oxígeno). Después de la cirugía, se administra durante tres días aspirina o paracetamol (80-160 mg/día, p.o.). Se administra todos los días durante 5 días un antibiótico, penicilina G procaína (300.000 U/día, i.m.). El catéter i.v. se protege mediante un sistema de sujeción constituido por un peto de nailon fijado de forma habitual conectado a un cable flexible de acero inoxidable y conexión basculante fluida (Lomir Biomedical, Malone, NY). Este sistema de sujeción flexible permite que el mono se mueva con libertad. La permeabilidad del catéter se evalúa periódicamente mediante administración i.v. de un barbitúrico de actuación corta, metohexital (3 mg/kg, i.v.). Se considera que el catéter no está obstruido si la administración i.v. de metohexital produce una pérdida de tono muscular en un intervalo de 10 s.

Aparatos conductuales. Cada mono se aloja individualmente en una cámara (64 x 64 x 79 cm) de acero inoxidable bien ventilada. Las jaulas de todos los monos se modifican para incluir un panel operante (28 x 28 cm) instalado en la pared frontal. Se disponen tres llaves de respuesta cuadradas (6,4 x 6,4 cm) traslúcidas separadas 2,54 cm en una fila horizontal a 3,2 cm de la parte superior del panel operante. Cada llave puede iluminarse al trasluz con luces de estímulo rojas o verdes (LED superbrillante). El panel operante también da soporte a un dispensador instalado externamente que suministra pellas de comida con sabor a fruta de 1 g a un receptáculo de alimento instalado en la jaula debajo del penal de respuesta operante. Además, se instalan dos bombas de jeringa (modelo B5P-IE; Braintree Scientific, Braintree, MA,

Estados Unidos, o modelo 980210; Harvard Apparatus, South Natick, MA, Estados Unidos) sobre cada jaula para suministrar soluciones salinas o droga a través de los dos lumenes de los catéteres i.v. La operación de los paneles operantes y la recogida de datos se llevaron a cabo con ordenadores ubicados en una habitación aparte.

5 Procedimientos de entrenamiento iniciales. Los procedimientos para la evaluación de respuesta sostenida a la cocaína y la comida fueron similares a los usados en otros estudios (Negus SS, Mello NK, Portoghese PS y Lin CE (1997) Effects of kappa opioids on cocaine self-administration by rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 282: 44-55; Negus SS, Mello NK, Portoghese PS, Lukas SE y Mendelson JH (1995) Role of delta opioid receptors in the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in
10 rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 273: 1245-1256.). Siguiendo un protocolo básico, se tuvieron a disposición comida e inyecciones i.v. durante tres componentes alternos. Tanto la comida como las inyecciones i.v. estuvieron a disposición en un programa RF30 de refuerzo. Una luz roja está asociada con el suministro de comida y una luz verde está asociada con las inyecciones de droga. Los componentes de alimento y droga están separados por un periodo de descanso de 5 min. La sesión completa alimento-
15 droga-alimento dura 120 min y se realiza diariamente de 3 a 5 pm. Durante el entrenamiento la solución disponible para autoadministración durante el componente de droga se alterna entre 0,032 mg/kg/inj de cocaína y solución salina. Los monos se entrenan hasta que cumplen con los criterios de autoadministración estable de cocaína: 1) 3 días consecutivos durante los cuales la tasa de respuesta durante el componente de droga de cada sesión difiere en no más del 20 % de la tasa de respuesta del
20 componente de droga media; 2) la extinción de la solución salina rápida, tal como se indica mediante una disminución en las tasas de respuesta del componente de droga el primer día de sustitución de solución salina.

Ensayo de autoadministración de droga. Una vez los monos cumplen con los criterios de niveles estables altos de autoadministración de cocaína y comida, se inicia el ensayo usando sesiones de
25 sustitución en las que se sustituyen las condiciones de dosis de entrenamiento solución salina/cocaína por diferentes dosis de cocaína (0,00032-0,1 mg/kg/inyección). El mantenimiento de la dosis de cocaína se reestablece después de cada ensayo de sustitución durante un periodo de al menos 4 días y hasta que el número de refuerzos por día mantenido por cocaína y comida vuelva a los niveles de línea base.

Evaluación del compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se evaluaron usando un
30 ensayo de procedimiento de pretratamiento. Un primer experimento examina los efectos de tratamiento no contingente con solución salina o compuesto de ensayo sobre la respuesta a la cocaína o a la comida. Los compuestos de ensayo se administran i.m. (o bien i.p y p.o) antes de la sesión. Los compuestos de ensayo se administrarán hasta dosis que produzcan o bien un desplazamiento estadístico significativo en la rama ascendente de la curva de dosis de autoadministración de cocaína-efecto, o bien eliminan la
35 respuesta durante el primer componente de comida. En un segundo experimento se evalúan al menos tres dosis de compuestos de ensayo como pretratamientos a una dosis unidad de cocaína en el máximo de la curva de dosis de cocaína-efecto. Estos estudios iniciales se usan para identificar una dosis del compuesto de ensayo que sea activa conductualmente en el procedimiento de autoadministración de

droga. Una vez se ha identificado la dosis conductualmente activa de la droga de ensayo, esa dosis se administra como pretratamiento en un intervalo de dosis unidades de cocaína diferentes. De este modo, puede determinarse el efecto de una dosis conductualmente activa del fármaco de ensayo sobre la curva total de dosis de cocaína-efecto. Pueden analizarse también otras dosis de los compuestos de ensayo.

- 5 Análisis de datos. Los números totales de inyecciones o pellas de alimento suministradas por día se determinaron como tasa de respuesta. Los datos para los efectos del compuesto de ensayo sobre la autoadministración de cocaína se evaluaron usando un ANOVA de uno o dos factores. A continuación de un ANOVA significativo se realizó la comparación de las medias individuales usando el ensayo retrospectivo de Duncan. El criterio para significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

REIVINDICACIONES

1. El uso de los compuestos que se seleccionan de entre:
 - 2-(4-benciloxibencilamino)propanamida;
 - 2-[4-(2-metoxibenciloxi)-bencilamino]propanamida;
 - 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 5 (S)-(+)-2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- (S)-(+)-2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
- 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-N-metil-propanamida;
- N-{2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]}propionil-pirrolidina;
- 1 0 2-[4-(3-metoxibenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-N-metil-propanamida;
- 1 5 N-{2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]}propionil-pirrolidina;
- 2-[4-(4-fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-propanamida;
- 2-[4-(2-clorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]propanamida;
- 2 0 2-(4-benciloxibencilamino)-3-hidroxi-propanamida;
- 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-propanamida;
- 2-(4-benciloxibencilamino)-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2 5 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2-[4-(2-clorobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2-[4-(3-cianobenciloxi)-bencilamino]-2-metil-3-hidroxi-N-metil-propanamida;
- 2-[4-(3-clorobenciloxi)-feniletilamino]propanamida;
- 3 0 2-{4-[2-(3-fluorofenil)-etiloxi]bencilamino}propanamida;
- 2-{4-[2-(3-fluorofenil)-etil]bencilamino}propanamida;
- 2-[N-(4-benciloxibencil)-N-metilamino]propanamida;
- 2-{4-[(3-clorobenciloxi)-feniletil]-amino}propanamida;
- 2-[4-benciltiobencilamino]propanamida;
- 3 5 2-[4-(2-fluorobenciltio)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-fluorobenciltio)-bencilamino]propanamida;
- 2-[4-(3-fenilpropiloxi)-bencilamino]propanamida;

- 2-[4-(4-fenilbutiloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-[4-(5-fenilpentiloxi)-bencilamino]propanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-3-fenil-N-metil-propanamida;
 2-(4-benciloxibencilamino)-3-metil-N-metil-butanamida;
 5 2-(4-benciloxibencilamino)-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencil-N-metilamino]-2-fenil-acetamida;
 1 0 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]-2-fenil-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(2-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(2-fluorofenil)-acetamida;
 2-[4-(3-fluorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 1 5 2-[4-(3-clorobenciloxi)-bencilamino]-2-(3-fluorofenil)-acetamida;
 2-(4-(2-tieniloxi)-bencilamino)propanamida;

o isómeros ópticos, mezclas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la preparación de un medicamento para tratar trastornos adictivos.

2. El uso del compuesto según se define en la reivindicación 1 que es (S)-(+)-2-[4-(2-
 2 0 fluorobenciloxi)-bencilamino]propanamida.
3. El uso del compuesto según se define en la reivindicación 1 que es (S)-(+)-2-[4-(3-
 fluorobenciloxi)-bencilamino] propanamida.
4. El uso de los compuestos según se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en
 combinación con agonistas de dopamina y/o con levodopa, carbidopa, benserazida y
 2 5 combinaciones de los mismos.
5. El uso de los compuestos según se definen en las reivindicaciones 1-3, en el que dicho
 medicamento se ha de administrar en una dosis que oscila de 0,3 a 100 mg/kg de peso corporal
 por día.