(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 441**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07123564 .2**
(96) Fecha de presentación : **16.02.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1908461**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

(54) Título: **Uso del enantiómero (1S,2R) del milnaciprán para la preparación de un medicamento.**

(30) Prioridad: **14.02.2003 FR 03 01849**
03.06.2003 US 453574

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

(73) Titular/es: **PIERRE FABRE MEDICAMENT**
45, place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

(72) Inventor/es: **Deregnaucourt, Jean y**
Grosse, Richard

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 441 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

Uso del enantiómero (1S,2R) del milnaciprán para la preparación de un medicamento.

La presente invención se refiere al enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento destinado a prevenir o a tratar la depresión, los estados depresivos, la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el dolor, en pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares y/o que padecen trastornos cardiovasculares, administrado a una dosis comprendida entre 0,01 mg y 10 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas.

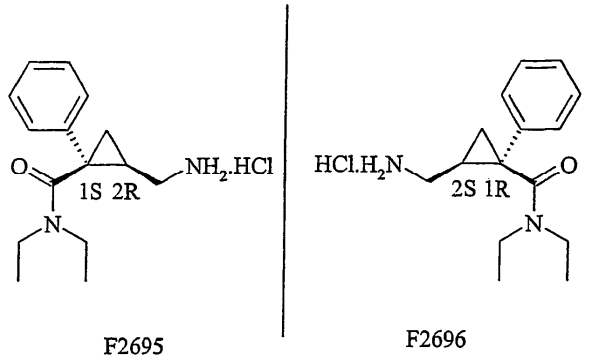
El Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), molécula sintetizada en el Centro de Investigación PIERRE FABRE MEDICAMENT (Castres, Francia), también denominado TN-912, Dalciprán, Milnaciprán, Midalciprán o Midaliprán, se conoce como inhibidor doble de la recaptura de la serotonina (5-HT) y de la noradrenalina (NA). El Milnaciprán y su procedimiento de preparación se describen en la patente US nº 4.478.836. Otras informaciones relativas al Milnaciprán se pueden encontrar en la duodécima edición del índice Merck, con la entrada nº 6281.

Los inhibidores dobles de la recaptura de la serotonina y de la noradrenalina corresponden a una clase bien conocida de agentes antidepresivos que inhiben de manera selectiva la recaptura al mismo tiempo de la serotonina y de la noradrenalina. A título de ejemplo, la venlafaxina y la duloxetina son asimismo unos inhibidores dobles de la serotonina y de la noradrenalina. Unos estudios han mostrado que el ratio entre la inhibición de la recaptura de la noradrenalina y la inhibición de la serotonina mediante el Milnaciprán es de aproximadamente 2:1 (Moret *et al.*, 1985 *Neuropharmacology* 24(12): 1211-1219; Palmier *et al.*, 1989, *Eur. J. Clin. Pharmacol* 37: 235-238).

La patente US nº 4.478.836 describe el uso del Milnaciprán para el tratamiento de patologías del sistema nervioso central, en particular de la depresión. La solicitud de patente WO 01/26623 describe el uso del Milnaciprán en asociación con fenilalanina y tirosina en unas indicaciones tales como el tratamiento de la fatiga, de los síndromes asociados con el dolor, del síndrome de la fatiga crónica, de la fibromialgia, del síndrome del intestino irritable. La solicitud de patente WO 01/62236 describe una composición que comprende Milnaciprán en asociación con uno o varios agentes anti-muscarínicos en un gran número de indicaciones incluyendo la depresión. La solicitud WO 97/35574 describe una composición farmacéutica que contiene Milnaciprán e idazoxano como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para tratar la depresión y sus diferentes formas, así como las patologías en las que se usan los antidepresivos. El Milnaciprán se usa asimismo en una indicación de tratamiento de la incontinencia urinaria (FR 2 759 290).

La molécula de Milnaciprán posee dos carbonos asimétricos que llevan a dos configuraciones espaciales diferentes (1S,2R) y (1R,2S). Siendo estas configuraciones espaciales no superponibles, la molécula de Milnaciprán presenta por lo tanto una isomería óptica.

El clorhidrato de Milnaciprán existe así en forma de dos enantiómeros ópticamente activos: el enantiómero dextrógiro o también clorhidrato de Z-(1S,2R)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida y el enantiómero levógiro clorhidrato de Z-(1R, 2S)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida. El Milnaciprán en su forma de clorhidrato (también denominado F2207) está actualmente comercializado (IXEL, PIERRE FABRE MEDICAMENT, Francia) en forma de mezcla racémica como medicamento antidepresivo serotoninérgico-noradrenérgico. F2695 y F2696 designan, respectivamente, los enantiómeros (1S,2R) (dextrógiro) y (1R,2S) (levógiro) del clorhidrato de Milnaciprán (F2207):



Estos dos enantiómeros pueden estar separados o aislados según unos procedimientos descritos en la bibliografía (Bonnaud *et al.*, 1985, *Journal of Chromatography*, Vol. 318: 398-403; Shuto *et al.*, *Tetrahedron letters*, 1996 Vol. 37:641-644; Grard *et al.*, 2000, *Electrophoresis* 2000 21: 3028-3034; Doyle y Hu, 2001, *Advanced Synthesis and Catalysis*, Vol. 343: 299-302).

Los inventores han realizado ahora un estudio farmacocinético en el ser humano del racemato y de los dos enantiómeros del Milnaciprán que usa unos métodos de dosificación de enantio-selectividad. Así, han demostrado la ausencia de racemización de los enantiómeros *in vivo*.

Por otra parte, aunque el racemato haya sido resuelto, no se ha realizado ningún análisis de las propiedades farmacológicas y toxicológicas de los dos enantiómeros, que usa los métodos modernos actualmente a disposición tales como las mediciones cardiovasculares por telemetría, o los análisis de predictividad farmaco-toxico-genómica *in vitro*.

Los antidepresivos, como cualquier principio activo, pueden generar unos efectos indeseables o ciertas toxicidades que resultan esencialmente de las propiedades farmacológicas de estos medicamentos, pero asimismo de la posología, de la variabilidad individual del paciente (polimorfismo genético, insuficiencia orgánica, sexo, edad) o de interacciones medicamentosas. Así, los antidepresivos representan la tercera clase de productos responsables de intoxicación, después de los hipnóticos y de los tranquilizantes (Nores *et al*., 1987 *Thérapie* 42: 555-558). El riesgo de sobredosis con unos antidepresivos es grave puesto que puede llevar a la muerte. Entre las causas de intoxicaciones agudas mediante los antidepresivos, conviene citar la ingesta involuntaria por los niños (considerando que ciertos antidepresivos se usan para el tratamiento de la enuresis), el intento de suicidio, la sobredosis involuntaria por el médico, la co-medicación asociada en la persona mayor, las modificaciones fisiológicas y farmacocinéticas relacionadas con la edad (insuficiencia cardiaca, insuficiencia hepática y/o renal, etc.), un metabolismo ralentizado de origen genético o medicamentoso (inhibición enzimática). Después de los niños, la persona mayor constituye por lo tanto la segunda población de riesgo entre los pacientes tratados. Estas personas tienen unas concentraciones plasmáticas más elevadas, relacionadas con una aclaración renal y/o hepática disminuida, y los riesgos de intoxicación son más graves (Meadoer-Woodruff *et al*., 1988 *J. Clim. Psychopharmacol.* 8: 28-32).

Los efectos secundarios indeseables, generalmente benignos, observados durante el tratamiento por el Milnaciprán se observan sobretodo durante la primera, incluso las dos primeras semanas del tratamiento, y se difuminan después, paralelamente con la mejora del episodio depresivo. Los eventos indeseables relatados más comúnmente en monoterapia, o durante una asociación con otros psicótropos son unos vértigos, una hipersudoración, la ansiedad, unos sofocos, y la disuria. Ciertos efectos indeseables relatados menos comúnmente son unas nauseas, unos vómitos, una sequedad bucal, un estreñimiento, unos temblores, unas palpitaciones, una agitación, unas erupciones cutáneas. Por otra parte, se conoce en los pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares o que reciben simultáneamente un tratamiento con diana cardiaca, que la incidencia de los efectos indeseables de naturaleza cardiovascular (hipertensión, hipotensión, hipotensión ortostática, palpitaciones) puede estar aumentada por el Milnaciprán. En los pacientes hipertensos o que padecen cardiopatías, se recomienda así reforzar la vigilancia clínica porque el Milnaciprán en forma de mezcla racémica es susceptible de aumentar la frecuencia cardiaca. Así, durante raros casos de sobredosis observados con el Milnaciprán (con dosis de 800 mg a 1 g) en monoterapia, los principales síntomas observados son los vómitos, los trastornos respiratorios y una taquicardia (Dictionnaire Vidal, 78ª edición, 2002). Otro efecto indeseable excepcionalmente inducido por el Milnaciprán es un aumento elevado de las transaminasas, que puede traducir una cierta toxicidad hepática.

De hecho, las poblaciones de riesgo susceptibles de desarrollar un cierto número de manifestaciones clínicas indeseables durante o después de un tratamiento por el Milnaciprán, son los insuficientes hepáticos y/o renales, los pacientes que reciben un tratamiento que induce unas toxicidades orgánicas y/o tisulares, en particular unas toxicidades hepáticas y/o renales, los pacientes que reciben un tratamiento con diana cardiaca o que inducen unos efectos secundarios cardiovasculares, los pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares y/o que padecen trastornos cardiovasculares, en particular los pacientes que presentan unos trastornos del ritmo cardiaco, de la presión arterial (pacientes hipo- o hipertensos) o lo pacientes que padecen cardiopatías.

Con la preocupación de prevenir, siempre antes, la aparición de eventuales efectos secundarios susceptibles de constituir un riesgo, lo más mínimo que sea, para la salud de los pacientes tratados con Milnaciprán, los inventores han descubierto ahora, de manera sorprendente e inesperada, que el enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán, que presenta lo esencial de la actividad de inhibición selectiva de la recaptura de la serotonina y de la noradrenalina, induce menos efectos secundarios de naturaleza cardiovascular y de toxicidad orgánica y/o tisular, en particular hepática, que la mezcla racémica. En particular, los inventores han descubierto que la administración en el perro del enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán provoca un menor aumento de la frecuencia cardiaca y de la presión arterial, en particular de la presión arterial diastólica, que la susceptible de ser provocada por la administración de la mezcla racémica. Los inventores han descubierto además que el enantiómero (1S,2R) del clorhidrato de Milnaciprán (F2695) presenta un mejor perfil toxico-genómico que el enantiómero (1R,2S) del clorhidrato de Milnaciprán (F2696) sobre un modelo experimental de hepatocitos primarios de rata. Además, los inventores han demostrado que el enantiómero (1R,2S) (F2696) presenta un perfil toxico-genómico parecido al obtenido con la Clomipramina, usada como psicótropo de referencia conocida por su relativa hepatotoxicidad.

La presente invención tiene por lo tanto por objeto el enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización

como medicamento destinado a prevenir o a tratar la depresión, los estados depresivos, la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el dolor, en pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares y/o que padecen trastornos cardiovasculares, administrado a una dosis comprendida entre 0,01 mg y 10 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas.

Mediante la expresión "trastornos cardiovasculares" se entiende unos efectos secundarios cardiovasculares indeseables del medicamento administrado en mono-terapia o en asociación con otros principios activos.

En el sentido de la presente invención, se entiende mediante la expresión "efecto secundario" la actividad previsible de un medicamento en un campo distinto a aquél para el cual se administra, que puede ser molesta o indeseable cuando limita el uso del medicamento.

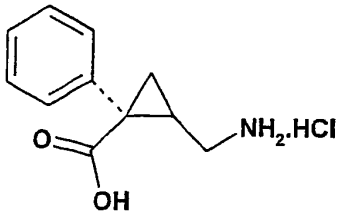
Por el término "toxicidad", se entiende la propiedad de un medicamento para provocar unos efectos nocivos a nivel orgánico y/o tisular, en particular a nivel de los órganos o tejidos implicados en el metabolismo del Milnaciprán, en particular el metabolismo hepático y/o renal del Milnaciprán, y más particularmente durante el primer paso del Milnaciprán a nivel hepático. Preferentemente, la toxicidad orgánica es la toxicidad cardiaca, y dicha toxicidad tisular es la toxicidad hepática y/o renal.

En el ámbito de la presente invención, se entiende mediante la expresión "limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares" o "limitando al mismo tiempo los riesgos de toxicidad" el hecho de impedir que estos riesgos aumenten significativamente en un paciente tras la administración del medicamento.

En el ámbito de la presente invención, la expresión "enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán" designa el enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán, así como las sales farmacéuticamente aceptables de éste. Preferentemente, se trata del enantiómero (1S,2R) del clorhidrato de Milnaciprán (F2695). La expresión "enantiómero (1R,2S) del Milnaciprán" designa el enantiómero (1R,2S) del Milnaciprán, así como las sales farmacéuticamente aceptables de éste tales como el clorhidrato (F2696). La expresión "mezcla racémica" designa una mezcla 50:50 en peso de enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán y de enantiómero (1R,2S) del Milnaciprán, así como las sales farmacéuticamente aceptables de éstos.

Existen unos metabolitos, preferentemente los metabolitos activos *in vivo* del Milnaciprán, y sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como:

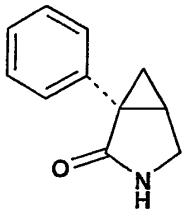
- el clorhidrato del ácido Z-(±)fenil-1-aminometil-2-ciclopropan-carboxílico (F1567):



F1567

Masa molecular:	277,7
Características:	cristales blancos
Punto de fusión:	230ºC
Cromatografía de placa:	soporte: sílice Disolvente: Butanol/etanol/agua (6/2/2) Revelación: Ultravioleta y ninhidrina Rf: 0,6

- el (±)fenil-3-metilen-2-4-pirrolidona-3 (F1612):

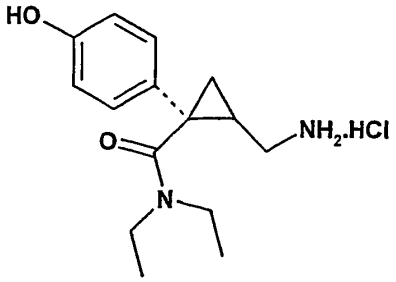


F1612

Masa molecular: 173,2

Características:	cristales blancos
Punto de fusión:	70ºC
Cromatografía de placa:	soporte: sílice Disolvente: Benzeno/dioxano/etanol (90/25/4) Revelación: Ultravioleta y yodo Rf: 0,46

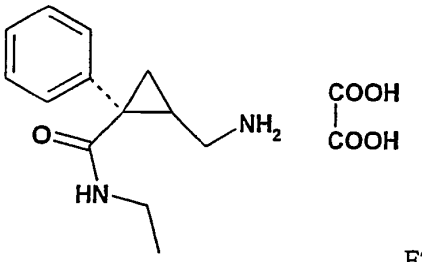
- el clorhidrato de Z(±)-(para-hidroxifenil)-1-dietilaminocarbonil-1-aminometil-2-ciclopropano (F2782):



F2782

Masa molecular:	298,82
Características:	cristales blancos
Punto de fusión:	250ºC
Cromatografía de placa:	soporte: sílice Disolvente: Butanol/etanol/agua (6/2/2) Revelación: Ultravioleta y yodo - ninhidrina Rf: 0,42

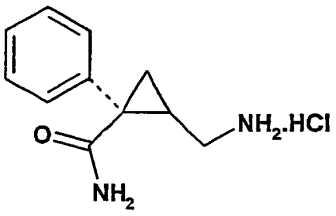
- el oxalato ácido de Z(±)-fenil-1-etilamino-carbonil-1-aminometil-2-ciclopropano (F2800):



F2800

Masa molecular:	308,33
Características:	cristales blancos
Punto de fusión:	150ºC
Cromatografía de placa:	soporte: sílice Disolvente: $CHCl_3$/metanol/NH_4OH (90/9/1) Revelación: Ultravioleta y ninhidrina Rf: 0,40

- el clorhidrato de Z(±)-fenil-1-aminocarbonil-1-aminometil-2-ciclopropano (F2941)



F2941

Masa molecular:	226,74
Características:	cristales blancos

Punto de fusión:	245ºC
Cromatografía de placa:	soporte: sílice
	Disolvente: $CHCl_3$/metanol/NH_4OH (80/18/2)
	Revelación: Ultravioleta y ninhidrina
	Rf: 0,30

Al igual que el Milnaciprán, estos metabolitos presentan dos carbonos asimétricos que conducen a dos configuraciones espaciales diferentes (1S,2R) y (1R,2S). Siendo estas configuraciones espaciales no superponibles, estos metabolitos presentan asimismo una isomería óptica. El ratio de los dos enantiómeros del metabolito del Milnaciprán en la mezcla de enantiómeros es tal como se ha descrito anteriormente para los enantiómeros del Milnaciprán.

Mediante la expresión "metabolito activo" se entiende designar un derivado que procede de la metabolización *in vitro* o *in vivo* y que presenta una aptitud para inhibir la recaptura de la serotonina y de la noradrenalina; se trata preferentemente del F2782, F2941, F2800, F1612 y F1567.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" designa todas las sales que conservan la eficacia y las propiedades de un principio activo y que no presentan ningún efecto secundario. Preferentemente, se trata de sales de ácidos minerales u orgánicos farmacéuticamente aceptables. A título de ejemplos preferidos, pero no limitativos, se mencionarán los halogenohidratos, tales como el clorhidrato y el bromohidrato, el fumarato, el maleato, el oxalato, el citrato, el metansulfonato, el glutamato, el tartrato, el mesilato, y sus hidratos eventuales.

El enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se administra a cualquier tipo de pacientes, tales como los definidos a continuación, que necesiten dicho tratamiento, ya sea con un objetivo terapéutico y/o profiláctico. En un objetivo terapéutico, se pretende la erradicación o la mejora de la afección a tratar y/o de uno o varios síntoma(s) asociado(s). En un objetivo profiláctico, se pretende la prevención de la aparición de la afección a tratar y/o de uno o varios síntoma(s) asociado(s). Sin embargo, el enantiómero según la invención se adapta a unas poblaciones de pacientes de riesgo que serían susceptibles de desarrollar ciertas manifestaciones clínicas indeseables a lo largo o tras un tratamiento mediante el Milnaciprán en forma racémica. Se trata de los pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares (por ejemplo el infarto de miocardio) y/o que padecen trastornos cardiovasculares, tales como unos pacientes que presentan unos trastornos del ritmo cardiaco (taquicardia, bradicardia, palpitaciones).

Entre las múltiples patologías o afecciones que presentan como síntoma unos trastornos del ritmo cardiaco y para las cuales la presente invención está particularmente adaptada al tratamiento de los pacientes de riesgo que las padecen, conviene citar más particularmente la taquicardia que corresponde a una aceleración del ritmo de los latidos cardiacos (la taquicardia es moderada cuando las pulsaciones son de 80 a 100 por minuto, intensa cuando sobrepasan 100), las palpitaciones, los extrasístoles (esporádicas, frecuentes o durante el infarto de miocardio), la fibrilación auricular, el flúter y la taquisistolia auricular, la bradicardia, la insuficiencia cardiaca, el infarto de miocardio.

Entre las múltiples patologías que presentan como síntomas unos trastornos de la presión arterial y para las cuales la presente invención está particularmente adaptada al tratamiento de los pacientes de riesgo que la padecen, conviene citar más particularmente: la hipertensión arterial, la hipertensión arterial maligna, la hipertensión arterial pulmonar, la hipertensión portal, la hipertensión paroxística esencial, la hipotensión, la hipotensión ortostática, la hipertensión intracraneal.

Ventajosamente, los trastornos cardiovasculares cuyos riesgos pueden ser limitados por la administración de la mezcla de enantiómeros según la invención, y preferentemente por la administración del enantiómero F2695 sustancialmente puro, son:

→ la elevación de la presión arterial diastólica y/o sistólica medida en milímetros de mercurio (mm de Hg); más particularmente, se trata del aumento de la presión cardiaca diastólica, y/o

→ unos trastornos del ritmo cardiaco, en particular un aumento de la frecuencia cardiaca en el paciente.

La presión arterial sistólica es el valor máximo de la presión arterial, y corresponde al momento en el que se escuchan los primeros latidos cardiacos a nivel de la arteria humeral durante la medición de la presión arterial. La sístole es el periodo de la revolución cardiaca durante la cual las cavidades del corazón se contraen, conllevando así la eyección de la sangre. La presión arterial diastólica es el valor mínimo de la presión arterial, que corresponde a la desaparición de los ruidos cardiacos a nivel de la arteria humeral cuando se deshincha el tonómetro durante la medición de la presión arterial. La diástole es el periodo de la revolución cardiaca durante la cual las cavidades del corazón se llenan de sangre. La elevación de la presión sistólica y/o diastólica implica la elevación de la tensión arterial que caracteriza la hipertensión arterial sistémica (y sus variantes) cuyos síntomas pueden ser los siguientes: dolores de cabeza, trastornos sensoriales ligeros tales como vértigos, zumbidos de oídos, palpitaciones, hemorragia de la nariz, confusión o somnolencia, calambres, entumecimientos u hormigueo en los pies y las manos. La

hipertensión arterial sistémica (o sus variantes) puede conllevar a unas complicaciones graves, incluso a veces mortales: accidentes neurológicos de origen vascular, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia renal, cardiopatías isquémicas (infarto de miocardio, angor y sus variantes). Según las recomendaciones actuales, se considera que un paciente padece de hipertensión arterial cuando la presión arterial es superior a 90 mm de Hg para la presión diastólica, y 140 mm de Hg para la presión sistólica.

La toxicidad cuyos riesgos se pueden limitar mediante la administración del enantiómero según la invención es ventajosamente la toxicidad orgánica, en particular la toxicidad cardiaca, y/o la toxicidad tisular, en particular la toxicidad hepática y/o renal. Esta toxicidad tisular puede ser revelada mediante la presencia de ictericias o mediante unos marcadores biológicos.

El uso del enantiómero según la invención en medicina veterinaria para el tratamiento de animales, en particular de animales domésticos o de criadero que necesitan dicho tratamiento está comprendido asimismo en el alcance de la presente invención.

Debido a sus propiedades farmacológicas, en particular de inhibidores dobles de la recaptura de la serotonina (5-HT) y de la noradrenalina (NA), el enantiómero según la invención es particularmente útil para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento preventivo y/o curativo de numerosas patologías o afecciones (síndrome) descritas a continuación, limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares y/o limitando al mismo tiempo la toxicidad orgánica y/o tisular, en particular la toxicidad cardiaca hepática y/o renal.

Entre estas patologías o afecciones, conviene citar las patologías del sistema nervioso central tales como se definen en "*The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders -IV (DSM-IV), 1995 American Psychiatric Association*" A título de ejemplos ilustrativos y no limitativos, conviene citar, la depresión, en particular la depresión profunda, la depresión resistente, la depresión de la persona mayor, la depresión sicótica, la depresión inducida por unos tratamientos interferón, el estado depresivo, el síndrome maniaco-depresivo, los episodios depresivos estacionales, los episodios depresivos relacionados con una condición médica general, los episodios depresivos relacionados con unas sustancias que actúan sobre el humor, el síndrome bipolar, la esquizofrenia, la ansiedad generalizada, los estados de morosidad y de marasmo, las enfermedades relacionadas con el estrés, los ataques de pánico, la fobia, en particular la agorafobia, los trastornos obsesivo-compulsivos, los trastornos de la conducta, los trastornos oposicionales, los síndromes de estrés post-traumáticos, la depresión del sistema inmunitario, la fatiga y los síndromes de dolor que la acompañan, el síndrome de fatiga crónica, la fibromialgia, y otras patologías de naturaleza somática funcional, el autismo, las patologías caracterizadas por una ausencia de atención debidas a unas condiciones médicas generales, los trastornos de la atención debidos a hiperactividad, los trastornos de las conductas alimenticias, la neurosis bulímica, la neurosis anoréxica, la obesidad, los trastornos sicóticos, la apatía, la migraña, el dolor, y en particular el dolor crónico, el síndrome del colon irritable, las enfermedades cardiovasculares, y en particular el síndrome ansio-depresivo en el infarto de miocardio o en la hipertensión, las enfermedades neurodegenerativas y los síndromes ansio-depresivos asociados (enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson), las incontinencias urinarias, en particular la incontinencia urinaria relacionada con el estrés y la enuresis, la dependencia a las drogas, y en particular la ansio-dependencia al tabaco, en particular a la nicotina, al alcohol, a los estupefacientes, a las drogas, a los analgésicos durante la abstinencia de estos estados de dependencia.

Más particularmente, la presente invención tiene por objeto el uso del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar la depresión o el estado depresivo limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares y/o limitando al mismo tiempo la toxicidad orgánica y/o tisular, en particular la toxicidad hepática y/o renal. En el ámbito de la presente invención, mediante el término "depresión" se entiende un conjunto de síntomas que comprenden por una parte un aspecto psíquico constituido por trastornos del humor con pesimismo, dolor moral, idea de muerte y de suicidio, inhibición psíquica, y por otra parte un aspecto físico de inhibición motora constituida en particular por una disminución motora, por trastornos del apetito, por estreñimiento, por trastornos del sueño y por la regulación del peso. La depresión corresponde por lo tanto a un estado psíquico patológico que asocia una modificación grave del humor y una disminución de la actividad intelectual y motora. Mediante la expresión "estado depresivo" se entiende un estado mental caracterizado por un aflojamiento del tono neuro-psíquico, que se manifiesta mediante la lasitud, el cansancio, el desánimo y la tendencia al pesimismo, y que se acompaña a veces de ansiedad.

Asimismo, la presente invención tiene más particularmente por objeto el uso del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar la fibromialgia y/o el síndrome de fatiga crónica limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares y/o limitando al mismo tiempo la toxicidad orgánica y/o tisular, en particular la toxicidad hepática y/o renal. El síndrome de fibromialgia es un síndrome crónico caracterizado por una sensación de dolor o de quemadura con rigidización matinal que afecta principalmente a los tejidos fibrosos articulares y periarticulares, y por un sentimiento de fatiga profunda. La fibromialgia comprende un conjunto de síntomas. Los más frecuentes son un descanso no reparador, dolores de cabeza, trastornos digestivos, un estado depresivo, unos espasmos musculares, unos dolores en la cara, unas entumecimientos, etc. El síndrome de fatiga crónica se caracteriza por un estado de

agotamiento o de fatiga. Los síntomas más corrientes son un estado de debilidad, unos espasmos y/o unos dolores musculares, una necesidad de descanso excesiva, fiebre, angina, pérdidas de memoria y/o problemas de concentración, insomnios, depresión.

Asimismo, la presente invención tiene más particularmente por objeto el uso del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar el dolor, y en particular el dolor crónico, limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares y/o limitando al mismo tiempo la toxicidad orgánica y/o tisular, en particular la toxicidad hepática y/o renal. El dolor se puede asociar a diferentes patologías y/o heridas. Puede ser agudo o crónico. Unos estudios epidemiológicos han demostrado las relaciones existentes entre unos estados de dolores crónicos y las ansio-depresiones. Así, unos pacientes que sufren de dolor crónico pueden desarrollar unos problemas emocionales que conducen a una depresión, y, en el peor de los casos, a un intento de suicidio. Se considera que un paciente padece dolores crónicos si se queja de sufrir desde un periodo que excede los seis meses. Entre los dolores crónicos, convienen citar a título de ejemplo ilustrativo y no limitativo, los dolores asociados con la fibromialgia y/o que proceden de tejidos fibrosos, de los músculos, de los tendones, de los ligamentos y de otros sitios, los dolores abdominales y las diarreas en el síndrome del colon irritable, y asimismo los dolores de la parte baja de la espalda.

Asimismo, la presente invención tiene más particularmente por objeto el uso del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, para la preparación de un medicamento destinado a prevenir o tratar las incontinencias urinarias, en particular la incontinencia urinaria relacionada con el estrés y la enuresis, limitando al mismo tiempo los riesgos de trastornos cardiovasculares y/o limitando al mismo tiempo la toxicidad orgánica y/o tisular, en particular la toxicidad hepática y/o renal.

El tratamiento profiláctico y terapéutico de las patologías anteriores se realiza suministrando a un animal, preferentemente el ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, solo o en asociación con por lo menos otro principio activo. En la mayoría de los casos, se trata del ser humano, pero el tratamiento se adapta asimismo a los animales, en particular a los animales de criadero (ganado, roedores, aves de corral, peces, etc.) y a los animales de compañía (perros, gatos, conejos, caballos, etc.).

El enantiómero (1S,1R) del Milnaciprán, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se ha descrito anteriormente, se administra ventajosamente a unos pacientes que reciben simultánea, separadamente o de manera espaciada en el tiempo, por lo menos un segundo compuesto activo en el tratamiento de las patologías citadas anteriormente.

De manera preferida, la presente invención tiene asimismo por objeto el uso como medicamento:

a) de dicho enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) de por lo menos un compuesto activo seleccionado de entre los psicótropos, en particular los antidepresivos, y los agentes anti-muscarínicos,

como productos de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para el tratamiento o la prevención de la depresión, en particular la depresión profunda, la depresión resistente, la depresión de la persona mayor, la depresión psicótica, la depresión inducida por unos tratamientos interferón, el estado depresivo, el síndrome maniaco-depresivo, los episodios depresivos estacionales, los episodios depresivos relacionados con una condición médica general, los episodios depresivos relacionados con unas sustancias que actúan sobre el humor.

Por el término “sicotrópico” se entiende designar una sustancia de origen natural o artificial capaz de modificar la actividad mental, y cuya acción esencial se ejerce sobre el sistema nervioso central y el psiquismo. Los psicótropos se dividen en tres grupos: 1) los psicolépticos (hipnóticos, neurolépticos y ansiolíticos), 2) los psicoanalépticos (antidepresivos y psicotónicos) y 3) los psicodislépticos (alucinógenos).

Preferentemente, dicho sicótropo es un antidepresivo. A título de ejemplo no limitativo, el antidepresivo se selecciona de entre (i) los inhibidores de la mono-amina-oxidasa (IMAO) tales como la iproniazida, la pargilina, la selegina, (ii) los agonistas 5HT1D tales como el sumatriptán, la adrenalina y la noradrenalina (simpato-miméticos alfa y beta), (iii) los antidepresivos tricíclicos, tales como la imipramina, la clomipramina, (iv) los inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina (SSRI) tal como la fluoxetina, (v) los inhibidores selectivos de la recaptura de la norepinefrina tales como, por ejemplo, la tandamina, el fluparoxán, la mirtazapina, (vi) los inhibidores de la recaptura de la serotonina y de la norepinefrina, tales como la venlafaxina y la duloxetina. A título de ejemplo no limitativo, el agente anti-muscarínico se selecciona de entre la tolterodina, la propiverina, la oxibutinina, el trospio, la darifenacina, la temiverina, el ipratropio.

Preferentemente, la presente invención tiene asimismo por objeto el uso como medicamento:

a) de dicho enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) de por lo menos otro principio activo seleccionado de entre los compuestos activos que inducen una toxicidad orgánica y los compuestos activos que inducen una toxicidad tisular, en particular hepática y/o renal, o con uno o varios principios activos destinados al tratamiento de la insuficiencia hepática y/o renal,

como productos de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para el tratamiento o la prevención de las afecciones o patologías que se pueden curar mediante la inhibición doble de la recaptura de la serotonina (5-HT) y de la noradrenalina (NA).

De manera preferida, la presente invención tiene asimismo por objeto el uso como medicamento:

a) de dicho enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) de por lo menos otro principio activo seleccionado de entre los compuestos activos que inducen unos efectos secundarios cardiovasculares y los compuestos con diana cardiaca,

como productos de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para el tratamiento o la prevención de las afecciones o patologías que se pueden curar mediante la inhibición doble de la recaptura de la serotonina (5-HT) y de la noradrenalina (NA).

Ventajosamente, los efectos secundarios cardiovasculares inducidos son los indicados anteriormente, y más particularmente una hipertensión arterial, una hipotensión, unos trastornos del ritmo cardiaco (taquicardia, bradicardia, palpitaciones).

La presente invención tiene asimismo por objeto las composiciones farmacéuticas que contienen los productos de combinación descritos anteriormente.

En el ámbito de la presente invención, el enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se administra ventajosamente, de manera no limitativa, por vía oral, vía nasal, transdérmica, rectal, intestinal, parenteral, por inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa, solo o en combinación con otros principios activos, tal como se ha descrito anteriormente,

Cuando se administra solo, el enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se puede administrar *per se* o en forma de una composición farmacéutica en la que dicho enantiómero o sus sales farmacéuticamente aceptables, está en asociación o en mezcla con uno o varios soportes, excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, que facilitan la biodisponibilidad.

Cuando el enantiómero según la invención, y preferentemente el enantiómero (1S,R2) F2695 del Milnaciprán sustancialmente puro, se administra en asociación con otros principios activos, dicho enantiómero y los demás principios activos se pueden formular en mezcla o aparte en forma idéntica o diferente. Se pueden administrar por la misma vía o una vía diferente.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular de maneras habituales bien conocidas por el experto en la materia, usando uno o varios soportes fisiológicamente aceptables que comprenden unos excipientes, adyuvantes y unos auxiliares tales como, por ejemplo, unos agentes conservantes, unos agentes estabilizantes, unos agentes humectantes o emulsionantes. El método de formulación seleccionado depende de la vía de administración deseada.

En el caso de una administración por inyección, se usa ventajosamente una disolución acuosa, en particular una disolución tampón fisiológicamente aceptable, tal como una disolución de Hank, una disolución de Ringer o una disolución tampón de salina fisiológica. En el caso de una administración transdérmica o a nivel de las mucosas, se usan ventajosamente unos agentes penetrantes apropiados para la mucosa a atravesar. Dichos agentes penetrantes son bien conocidos por el experto en la materia. En el caso de una administración oral, las composiciones farmacéuticas según la invención se administran ventajosamente en formas unitarias o multidosis de administración en mezcla con unos soportes farmacéuticos adecuados conocidos por el experto en la materia. Las formas unitarias de administración apropiadas comprenden en particular los comprimidos eventualmente divisibles, las cápsulas blandas, los polvos, los granulados y las disoluciones o suspensiones orales, los aerosoles. Las formas multidosis de administración apropiadas comprenden en particular las gotas bebibles, las emulsiones y los jarabes.

Durante la preparación de comprimidos, el enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como en particular la polivinilpirrolidona, el gel carbopol, el polietilenglicol, la gelatina, el talco, el almidón, la lactosa, el estearato de magnesio, la goma arábiga, o sus análogos. A título de ejemplo, el comprimido contiene los siguientes excipientes: hidrogenofosfato de calcio deshidratado, carmelosa cálcica, povidona K30, sílice coloidal anhidra, estearato de magnesio, talco. Los comprimidos pueden estar eventualmente revestidos, es decir recubiertos de varias capas de sustancias diversas tales como sacarosa, a fin de facilitar la toma o la conservación. El revestimiento puede

asimismo contener unos pigmentos o unos colorantes a fin de distinguir y caracterizar los comprimidos en función de su dosificación, por ejemplo. Los comprimidos pueden presentar asimismo una formulación más o menos compleja destinada a modificar la velocidad de liberación del principio activo. La liberación del principio activo de dicho comprimido se puede acelerar, ralentizar o retrasar en función de la absorción deseada. El enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se puede preparar así en una forma galénica de liberación prolongada obtenida según el procedimiento descrito en la patente EP 939 626. Esta forma galénica se presenta en forma multiparticular que reúne una pluralidad de minigránulos y presenta un cierto perfil de liberación *in vitro*.

La liberación del enantiómero según la invención se puede retrasar y/o controlar a través del uso de un implante o a través de una liberación transcutánea, en particular subcutánea o intramuscular, a través de una inyección intramuscular o a través de un parche transdérmico. Dicho enantiómero se formula entonces en particular con unas sustancias hidrófobas o poliméricas adecuadas y unas resinas intercambiadoras de iones.

La cantidad a administrar al paciente del enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, depende de las afecciones a tratar, del efecto deseado, en particular un efecto terapéutico o profiláctico, del estado de salud y de la edad del paciente, en particular de sus antecedentes cardiovasculares, de las condiciones de tratamiento y del modo de administración del medicamento. Las cantidades eficaces terapéuticas o profilácticas a administrar a un paciente humano se pueden determinar a partir de modelos animales o de unos datos, conocidos por el experto en la materia, durante el tratamiento de la depresión en el ser humano, por ejemplo mediante el uso de dicho enantiómero de Milnaciprán.

En el ámbito del tratamiento profiláctico y/o terapéutico de las patologías citadas anteriormente, y en particular de la depresión, de los estados depresivos, de la fibromialgia, del síndrome de la fatiga crónica, del dolor, el medicamento según la invención se administra ventajosamente a unas dosis comprendidas entre 0,01 mg y 10 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas, todavía más ventajosamente a unas dosis comprendidas entre 0,05 mg y 5 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas, todavía más ventajosamente a unas dosis comprendidas entre 0,1 mg y 1 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas. De manera particularmente ventajosa, la administración de dicho medicamento a unas dosis tales como se han definido anteriormente, se reparte en dos tomas diarias, preferentemente en forma de cápsulas blandas. A título de ejemplo, el enantiómero según la invención, preferentemente el enantiómero F2695 sustancialmente puro, se administra en forma de cápsula blanda cuyo contenido en principio activo es ventajosamente de aproximadamente 6,75 mg/cápsula blanda, 12,5 mg/cápsula blanda, 25 mg/cápsula blanda, 50 mg/cápsula blanda.

Otras características, objetivos y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes. La invención no está limitada a los ejemplos particulares mencionados a simple título ilustrativo y que se deben leer con referencia a las figuras siguientes:

Leyenda de las figuras

Figura 1: Evolución de la frecuencia cardiaca después de una única administración (valores de deltas).

*** $p \leq 0{,}001$ frente a agua desionizada
** $p \leq 0{,}01$ frente a agua desionizada
* $p \leq 0{,}05$ frente a agua desionizada
▲ $p \leq 0{,}05$ frente a F2207

Figura 2: Evolución de la frecuencia cardiaca después de una única administración (valores absolutas).

*** $p \leq 0{,}001$ frente a agua desionizada
** $p \leq 0{,}01$ frente a agua desionizada
* $p \leq 0{,}05$ frente a agua desionizada
▲ $p \leq 0{,}05$ frente a F2207

Figura 3: Efectos de los diversos tratamientos sobre los valores medios de presiones arteriales diastólicas (medias de las 6 horas tras el último tratamiento, después de 5 días de tratamiento consecutivos).

Figura 4: Efectos de los diversos tratamientos sobre los valores medios de presiones arteriales sistólicas (medias de las 6 horas tras el último tratamiento, después de 5 días de tratamiento consecutivos).

Figura 5: Representación esquemática del modo de calculo del índice de toxicidad. El índice de toxicidad es la suma de todos los genes aumentados y disminuidos (en función del factor de inducción definido por el usuario).

Figuras 6a, 6b, 6c: Ensayo con el MTT sobre unos hepatocitos primarios de ratas. Las concentraciones se expresan en µM.

Ejemplos

Ejemplo nº 1: Estudios farmacocinéticos del Milnaciprán y de sus enantiómeros

Se han realizado unos estudios farmacocinéticos del clorhidrato de Milnaciprán (F2207) y de sus enantiómeros (F2695 y F2696) en diferentes especies animales y en el ser humano.

En el animal, se ha estudiado la farmacocinética de cada enantiómero tras la administración del racemato o de un solo enantiómero. Los índices plasmáticos de los enantiómeros F2695 y F2696 son aproximadamente equivalentes en las especies ensayadas (mono y rata).

Se ha realizado un estudio farmacocinético en el ser humano que comprende 12 sujetos sanos administrándoles el racemato o uno sólo de los dos enantiómeros. Se desprende que el perfil farmacocinético de cada enantiómero es independiente debido a que han sido administrados separadamente o bien en forma de racemato, lo que indica la ausencia de interacciones entre los dos enantiómeros (Tabla 1).

TABLA 1: Tabla de las principales variables farmacocinéticas del clorhidrato de Milnaciprán (F2207) y de sus dos enantiómeros F2695 y F2696.

Cmax: concentración plasmática máxima estimada directamente a partir de los datos experimentales.

Tmax: Tiempo de obtención de la concentración plasmática máxima.

$Auc_{0\rightarrow\infty}$: Área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo extrapolado al infinito.

$T_{½}$: Semivida Terminal de decrecimiento de las concentraciones plasmáticas.

Dosis administrada (mg)	**F2207 (50 mg)**		**F2695 (D) (25 mg)**	**F2696 (L) (25 mg)**
	F2695 (D)	**F2696 (L)**		
Cmax ($nmol.l^{-1}$)	214	179	216	212
Tmax (hora)	3,42	2,87	3,08	2,21
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ ($nmol.h.l^{-1}$)	2896	1563	2869	1543
$T_{½}$ (horas)	9,28	5,75	9,38	5,58

Estos resultados indican que no se ha observado ninguna bioconversión de los enantiómeros F2695 y F2696 en las especies analizadas.

Ejemplo 2: Estudios bioquímicos del Milnaciprán y de sus enantiómeros

Se han estudiado los dos enantiómeros (F2695 y F2696) del clorhidrato de Milnaciprán (F2207) *in vitro* sobre las capturas de noradrenalina y serotonina así como sobre el enlace ("binding") de la paroxetina a nivel del cerebro de la rata.

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Captura de noradrenalina mediante un homogenado (P_2) de hipotálamo de rata.

Preparación del P2

Se matan y se decapitan unas ratas macho, Sprague-Dawley, de 200 a 300 g, y después se extrae rápidamente el hipotálamo. Se homogeneizan dos hipotálamos en 4 ml de sacarosa 0,32 M con un Potter S mediante 16 idas y vueltas completas a 800 rpm, y después se centrifugan durante 10 minutos a 1.000 g para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se centrifuga durante 20 minutos a 10.000 g y el P_2 así obtenido se recoge en 4 ml de sacarosa 0,32 M y se homogeneiza con un Dounce.

Captura ("absorción")

Se usa ^{3}H-(1)-NA:13 Ci/mmoles (Amersham).

La absorción se realiza en un tampón de fosfato (que contiene por litro: 8 g de NaCl, 1,21 g de K_2HPO_4 y 0,34 g de KH_2PO_4) preoxigenado durante 30 minutos antes del uso mediante una mezcla O_2/CO_2 (95%/5%).

En unos tubos de plástico de 5 ml dispuestos en baño maría a 37ºC se introducen:

- 100 µl de tampón inhibidor,
- 700 µl de tampón (que contiene pargilina 25 µM),
- 100 µl de P_2.

Después del equilibrado de la temperatura, la reacción comienza mediante la adición de 100 µl de ^{3}H-NA, 50 nM al final.

La reacción se detiene exactamente 10 minutos después, mediante adición de 2,5 ml de tampón helado y filtración sobre filtros GF/F. Después, el tubo se aclara una vez y el filtro una vez con 2,5 ml de tampón helado. Después, se introduce el filtro es un minifrasco Beckman, y después de la adición de 3 ml de líquido de centelleo Instagel (Packard), se mide la radioactividad en un contador de centelleo líquido Tricarb Packard.

La absorción no específica (NS) se mide en presencia de DMI 10^{-5} M.

El porcentaje de inhibición se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{\text{(absorción total - NS) - (absorción en presencia de inhibidor - NS)}}{\text{(absorción total - NS)}}$$

El IC_{50} se determina gráficamente sobre la curva media de los porcentajes de inhibición (4 ensayos) en función del log de la concentración en inhibidor.

2.1.2. Captura de serotonina

El método se ha realizado según Gray y Whittaker (1962, *J. Anat.*, 96: 79-97). Después de la homogeneización del tejido cerebral en una disolución de sacarosa, las terminaciones presinápticas se sueltan del axón y se vuelven a cerrar para formar unos sinaptosomas obtenidos mediante fraccionamiento subcelular.

Se han usado unas ratas macho Sprague-Dawley (Janvier) de 180-200 g. Después del sacrificio del animal, se extrae el hipotálamo, se pesa, se homogeneiza con un Dounce en sacarosa 0,32 M a 0ºC.

Este homogenado se ha centrifugado durante 10 minutos a 1.000 g (2.400 rpm. - Hettich, Rotenta). Se ha recuperado el sobrenadante y se ha centrifugado durante 20 minutos a 10.000 g (8.000 rpm. - Beckam, modelo J2-21 M: rotor J14). El residuo (denominado fracción P_2) se recogió en sacarosa con una concentración de 50 mg/ml.

Se ha incubado durante 5 minutos a 37ºC:

- 350 µl de tampón helado (NaCl 136 mM, KH_2PO_4 2,4mM, K_2HPO_4 6,9 mM, pH 7,2) preoxigenado 30 minutos antes,
- 50 µl de membranas (5 mg/ml final),
- 50 µl de citalopram (10^{-5} M final) para la captura no específica,
- 50 µl de ^{3}H-5-HT (50 nM final) (NEN, Francia, 28,4 Ci/mmol).

Exactamente 5 minutos después del comienzo de la incubación, se ha detenido la reacción mediante filtración al vacío sobre filtros Whatman GF/F (predilución con 2,5 ml de tampón helado, y después aclarado con 3 veces 2,5 ml).

Se ha medido la radioactividad recogida sobre el filtro (Packard Tricarb 4640) mediante centelleo líquido con Emulsifier-Safe (Packard).

Los IC_{50} se han determinado llevando gráficamente los porcentajes de inhibición en función del log de la concentración en producto (6 concentraciones por duplicado).

2.1.3. Enlace ("binding") de la paroxetina

Se han usado unas ratas macho Sprague-Dawley (Janvier) de 180-200 g. Se han reunido los hipotálamos de varias ratas y se han homogeneizado en 5 ml de tampón helado (50 mM de Tris-HCL, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, pH 7,5) con el Dounce, y el homogenado se centrifugó a 30.000 g (27.000 rpm. - Beckman, L5-50E, rotor T40) durante 10 minutos. El residuo obtenido se recogió en 5 ml de tampón y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El nuevo residuo se recogió en el mismo tampón y, por último, se rehomogeneizó con el Dounce con una concentración tisular de 10 mg/ml. Se ha incubado la suspensión membranaria (100 µl) con la 3H-paroxetina (NEN,

Francia, 28,6 Ci/mmol) con la concentración (final) de 0,1 nM, a 20ºC, en un volumen final de 1 ml durante 2 horas. Al cabo de las 2 horas de incubación, se ha detenido la reacción mediante filtración al vacío sobre filtros Whatman GF/F pretratados en una disolución de polietilenimina al 0,05% 30 minutos antes (predilución con 4 ml de tampón helado y después aclarado del tubo con 2 veces 4 ml). Se ha medido la radioactividad mediante espectrometría de centelleo líquido (Packard, Tricarb 4640) usando el Emulsifier-Safe (Packard) como agente de centelleo.

El enlace específico de la ^{3}H-paroxetina se ha definido como la diferencia entre el enlace total y el que permanece en presencia de 10 µM de fluoxetina.

Se han determinado los IC_{50} llevando gráficamente los porcentajes de inhibición en función del log de la concentración en producto (6 concentraciones por duplicado).

2.1.4. Productos usados

F2207: lote nº 10-CTN3 clave P118
F2695: lote nº PL-I-205
F2696: lote nº PL-I-204C.

2.2. Resultados

Los efectos del F2207 y de sus dos enantiómeros sobre la captura de noradrenalina y serotonina y sobre el enlace de la paroxetina se representan en un gráfico con en ordenadas el porcentaje de inhibición en función (%) y en abscisas la concentración (M) del F2207, F2695 o del F2696 (datos no mostrados). Los valores de los porcentajes de inhibición que corresponden a cada concentración de producto, ensayada por duplicado, son las medias de los resultados de cuatro experimentos independientes.

Los valores de los IC_{50} de los tres productos se han determinado a partir de sus curvas y figuran en la tabla 2.

TABLA 2: Inhibición de las capturas de ^{3}H-noradrenalina, ^{3}H-serotonina y enlace (binding) de la ^{3}H-paroxetina.

IC50 (M)			
Compuestos	Captura		Enlace (binding)
	^{3}H-noradrenalina	^{3}H-serotonina	^{3}H-paroxetina
F2695	1,5 X 10^{-8}	4,6 X 10^{-8}	6,0 X 10^{-8}
F2207	3,0 X 10^{-8}	15 X 10^{-8}	13 X 10^{-8}
F2696	75 X 10^{-8}	60 X 10^{-8}	70 X 10^{-8}

Los tres compuestos son activos en estos tres ensayos farmacológicos, pero existen unas diferencias:

- en la captura de noradrenalina:

  El F2695 es 2 veces más activo que el F2207.
  El F2695 es 25 veces más activo que el F2695.

- en la captura de serotonina:

  El F2695 es 3 veces más activo que el F2207.
  El F2695 es 12 veces más activo que el F2696.

- en el enlace (binding) de la paroxetina:

  El F2695 es 2 veces más activo que el F2207.
  El F2695 es 10 veces más activo que el F2696.

Los tres compuestos son activos en estos ensayos farmacológicos, sin embargo con una actividad menor para la forma (1R,2S) (F2696) y el racemato (F2207). La forma (1S,2R) del clorhidrato de Milnaciprán (F2695) es 2 a 3 veces más activa que el F2207.

Ejemplo nº 3

Actividad comparativa por vía oral del clorhidrato de Milnaciprán racémico (F2207) y de su enantiómero (1S,2R) activo (F2695) sobre la frecuencia cardiaca y la presión arterial en el perro vigilante.

3.1. Introducción

Este estudio propone estudiar los efectos del F2207 y del F2695 a) en administración única por vía oral sobre la frecuencia cardiaca (n = 28 perros), y b) después del tratamiento reiterado de 5 días por vía oral sobre las presiones arteriales sistólica y diastólica en el perro (n = 6 perros).

Se ha realizado este estudio con dosis equivalentes farmacológicamente activas de F2207 y F2695 sobre unos animales hembras equipados con implantes (Data Sciences International) que permiten la adquisición de la frecuencia cardiaca y de los parámetros tensionales por telemetría. Estos animales se han repartido para todos los estudios en 3 grupos de tratamiento:

- grupo 1 (control) tratado con agua desionizada,
- grupo 2 tratado con F2207 con la dosis de 20 mg/kg/D,
- grupo 3 tratado con F2695 con la dosis de 10 mg/kg/D,

3.2. Metodología

Debido al bajo número de animales simultáneamente equipados (máximo 8), del número de pistas de registro del equipo usado (8 pistas), y de manera que constituyen unos grupos de tratamiento homogéneos, la evaluación global se ha realizado en cuatro estudios, siendo cada estudio fraccionado en tres etapas (tratamiento de cada animal con cada uno de los tres productos), separadas por un periodo de lavado y de reinicialización de sondas ("wash-out"). Cada etapa en sí se desarrolla en dos fases:

- una primera fase durante la cual todos los animales se tratan con agua desionizada para acostumbrarles a la contención y al tratamiento oral mediante sonda de cebado,

- una segunda fase durante la cual los animales reciben su tratamiento respectivo (administración única para la frecuencia cardiaca, estudios nº 894/926/935/936; administración reiterada cinco días para la presión arterial, estudio nº 894).

El esquema experimental global se describe en la tabla siguiente:

TABLA 3: Esquema experimental global para el estudio mediante telemetría de los efectos del clorhidrato de Milnaciprán racémico (F2207) y de su enantiómero (1S,2R) activo F2695 administrados oralmente en el perro consciente.

GRUPO nº	**1**	**2**	**3**
ANIMALES Número	27	28	28
Identificación	1 - 2 - 7 - 8 - 13 - 14 (estudio 894) 1- 2 - 7 - 8 -13 -14 (estudio 926) 1- 2 - 9 – 10 11 - 17 - 18 - 19 (estudio 935) 1 - 2 - 9 - 10 11 - 17 -18 - 19 (estudio 936)	3 - 4 - 9 - 10 - 15 - 16 (estudio 894) 3 - 4 - 9 - 10 - 15 - 16 (estudio 926) 3 - 4 - 5 – 12 13 - 20 - 21 - 22 (estudio 935) 3 - 4 - 5 – 12 13 - 20 - 21 - 22 (estudio 936)	5 - 6 - 11 - 12 - 17 - 18 (estudio 894) 5 - 6 - 11 - 12 - 17 - 18 (estudio 926) 6 - 7 - 8 – 14 15 -16 - 23 - 24 (estudio 935) 6 - 7 - 8 – 14 15 -16 - 23 - 24 (estudio 936)
TRATAMIENTO			
Identificación	Agua desionizada	F2207	F2695
Dosis	-	20 mg/kg	10 mg/kg
Vía	.....	oral	.....
Volumen	.....	5 ml/kg	.....

(n = 27 en el grupo de control, al no haber sido registrada la señal de la sonda del animal n º 18

Se han analizado los efectos de los diferentes tratamientos sobre la frecuencia cardiaca en los cuatro estudios, después de la única administración. El análisis se refirió a los 13 tiempos de adquisición siguientes:

- antes del tratamiento único,
- cada 30 minutos tras las 6 horas después del tratamiento único.

Se han analizado los efectos de los diferentes tratamientos sobre la presión arterial, en el estudio nº 894 en el estado de equilibrio, el D5, D29 y D33 (último día de tratamiento efectivo para cada unas de las etapas). El análisis se refirió a los tiempos de adquisición siguientes:

- antes del tratamiento,
- cada 30 minutos tras las 6 horas después del tratamiento.

3.3. Resultados

3.3.1. En lo que se refiere a la frecuencia cardiaca (cuatro estudios conjuntos), se ha realizado un ensayo de Tukey sobre los deltas de frecuencia individuales, para cada uno de los 12 tiempos experimentales post-tratamiento, frente al valor pre-tratamiento, así como sobre los valores absolutos de frecuencia cardiaca en cada tiempo de registro.

Así, se han objetivado, con relación a los animales de control que reciben el agua desionizada:

cuando el análisis estadístico se realiza sobre los valores de deltas (figura 1):

- un aumento significativo de la frecuencia cardiaca a partir de la primera ½ hora después de la administración única de F2207 (20 mg/kg), aumento que persiste hasta 5,5 horas después del tratamiento ($p \leq 0,001$ para el conjunto de los tiempos de adquisición, con la excepción de los tiempos 0,5 y 5,5 horas, $p \leq 0,01$, y del tiempo 5,0 horas, $p \leq 0,05$, después del tratamiento),

- un aumento de la frecuencia cardiaca después de la administración del F2695 que sigue siendo todavía inferior a la obtenida después de la administración de F2207. Además, esta diferencia entre los efectos del F2207 y del F2695 es significativa ($p < 0,05$) 1 y 4 horas después de la administración a favor del F2695.

- un aumento de la frecuencia cardiaca que tarda menos tiempo con F2695 (1,0 a 4,5 horas) que con F2207 (persiste hasta 5,5 horas después del tratamiento).

cuando el análisis estadístico se realiza sobre unos valores absolutos de frecuencia cardiaca, este mismo estudio demuestra (figura 2):

- un aumento significativo de la frecuencia cardiaca a partir de la primera hora después de la administración única de F2207 (20 mg/kg), aumento que persiste hasta 5,5 horas después del tratamiento ($p \leq 0,001$ para el conjunto de los tiempos de adquisición de 1,0 a 4,5 horas, con la excepción del tiempo 3,5 horas, $p \leq 0,01$; y $p \leq 0,01$ para el tiempo de adquisición 5,5 horas después del tratamiento),

- un aumento de la frecuencia cardiaca después de la administración del F2695 que sigue siendo todavía inferior a la obtenida después de la administración de F2207. Además, esta diferencia entre los efectos del F2207 y del F2695 es significativa ($p < 0,05$) 1 y 4 horas después de la administración a favor del F2695.

- Un aumento de la frecuencia cardiaca que tarda menos tiempo con F2695 (1,0 a 4,5 horas) que con F2207 (que persiste hasta 5,5 horas después del tratamiento).

3.3.2. En lo que se refiere a la presión arterial (un estudio en administración reiterada), se ha calculado un valor medio de presión arterial diastólico (figura 3 y tabla 4), así como un valor medio de presión arterial sistólico (figura 3 y tabla 4) para cada perro y para las 6 horas tras el último tratamiento, después de 5 días consecutivos de administración. Se han analizado estos valores de presiones mediante ANOVA seguido de un ensayo de Tukey cuando ésta lo permitía (datos no mostrados).

Así, se han objetivado:

- un aumento significativo ($p \leq 0,001$) de la presión arterial diastólica después de la administración reiterada durante 5 días de F2207 (20 mg/kg/D) o de F2695 (10 mg/kg/D) en comparación con el tratamiento con agua desionizada,

- una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) del valor de presión arterial diastólica mediada después de la administración reiterada durante 5 días de F2207 (20 mg/kg/D) en comparación con el valor mediado de la presión arterial diastólica después de la administración reiterada de F2695 (10 mg/kg/D),

- ningún efecto significativo a nivel de la presión arterial sistólica; sin embargo, se puede observar que los valores PAS después de la administración reiterada durante 5 días de F2695 son próximos a los valores de PAS después del tratamiento con agua desionizada.

Los datos individuales de presiones arteriales diastólica y sistólica se representan en las tablas 4 y 5 respectivamente.

TABLA 4: Datos individuales de presión arterial diastólica

PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD expresada en mm Hg)

Datos individuales después de la administración reiterada durante 5 días consecutivos

Grupo	1								2								3							
Tratamiento	VEHÍCULO								F2207 (20 mg/kg/D)								F2695 (10 mg/kg/D)							
Animal nº	1	2	7	8	13	14	Med.	e.s.m.	3	4	9	10	15	16	Med.	e.s.m.	5	6	11	12	17	18	Med.	e.s.m.
Tiempo antes del tratamiento	79	77	73	77	101	76	81	4	112	89	93	88	86	91	93	4	73	89	80	71	76	78	78	3
Tiempo después del tratamiento (h)																								
0,50	84	76	70	63	80	70	74	3	103	106	96	92	88	87	95	3	91	91	99	90	108	85	94	3
1,00	82	84	77	72	72	76	77	2	130	117	113	113	90	106	112	5	112	96	75	97	87	96	94	5
1,50	102	81	79	75	82	68	81	5	131	127	137	96	100	91	114	8	109	83	88	97	87	112	96	5
2,00	83	75	71	98	77	75	80	4	123	113	99	88	107	109	107	5	115	88	93	95	84	109	97	5
2,50	85	75	75	84	85	79	81	2	137	111	116	101	115	107	115	5	111	88	97	89	92	107	97	4
3,00	91	95	99	85	79	84	89	3	121	118	112	116	106	92	111	4	104	91	96	96	100	106	99	2
3,50	83	72	78	73	77	65	75	3	120	106	133	116	103	103	114	5	96	106	94	107	77	103	97	5
4,00	81	79	75	77	82	68	77	2	133	114	105	111	110	103	113	4	125	91	99	108	80	109	102	6
4,50	82	76	91	84	113	85	89	5	135	110	126	109	104	108	115	5	103	104	92	100	85	108	99	3
5,00	97	79	67	95	81	82	84	5	116	120	98	97	97	105	106	4	126	100	92	95	110	102	104	5
5,50	94	80	70	ND	85	82	82	4	103	107	115	106	92	93	103	4	88	86	105	98	89	99	94	3
6,00	83	74	82	82	78	77	79	1	115	133	120	104	103	104	113	5	101	113	98	105	109	108	106	2
PAD media después del tratamiento	**87**	**79**	**78**	**81**	**83**	**76**	**81**	**2**	122	115	114	104	101	101	110	4	107	95	94	98	92	104	98	2

ND: no determinado

TABLA 5: Datos individuales de presión arterial sistólica

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA (PAD expresada en mm Hg)

Datos individuales después de la administración reiterada durante 5 días consecutivos

Grupo	1								2								3							
Tratamiento	VEHÍCULO								F2207 (20 mg/kg/D)								F2695 (10 mg/kg/D)							
Animal nº	1	2	7	8	13	14	Med.	e.s.m.	3	4	9	10	15	16	Med.	e.s.m.	5	6	11	12	17	18	Med.	e.s.m.
Tiempo antes del tratamiento	139	141	120	157	172	138	145	7	188	164	176	149	130	169	163	8	136	141	138	130	134	149	138	3
Tiempo después del tratamiento (h)																								
0,50	135	132	119	131	149	138	134	4	158	154	152	128	126	129	141	6	135	129	140	135	160	139	140	4
1,00	134	158	129	144	141	143	142	4	180	167	157	150	126	130	152	9	159	135	124	148	131	143	140	5
1,50	158	151	145	150	153	137	149	3	186	181	189	129	136	138	160	12	164	119	138	158	127	156	144	8
2,00	138	136	145	173	151	144	148	5	171	160	146	122	140	163	150	7	168	125	135	141	127	156	142	7
2,50	142	143	145	159	160	148	150	3	195	168	168	144	153	161	165	7	165	124	142	141	134	154	143	6
3,00	149	167	162	163	150	154	158	3	173	177	164	157	141	146	160	6	156	131	145	144	151	157	147	4
3,50	135	129	149	154	153	137	143	4	165	153	184	167	139	155	161	6	146	147	141	169	123	156	147	6
4,00	142	143	149	166	164	144	151	4	180	157	151	154	150	153	158•	5	180	132	145	160	124	164	151	9
4,50	137	140	159	170	190	152	158	8	184	161	180	155	145	168	166	6	158	151	138	163	131	163	151	5
5,00	150	146	127	177	160	145	151	7	161	171	146	141	139	166	154	6	182	144	137	150	162	158	156	6
5,50	153	149	132	ND	148	144	145	4	151	154	173	152	132	155	153	5	142	127	152	153	141	153	145	4
6,00	146	144	151	176	146	143	151	5	158	192	171	154	148	172	166	7	156	170	148	159	160	166	160	3
PAD media después del tratamiento	143	145	143	160	155	144	148	3	172	166	165	146	140	153	157	5	159	136	140	152	139	155	147	4

ND: no determinado

3.4. Conclusión

En las condiciones experimentales de la presente evaluación, realizada en cuatro estudios sucesivos mediante administración oral en el perro de vigilancia provisto de aparatos de telemetría:

- en administración única y comparativamente al grupo de control (n = 28), el aumento de la frecuencia cardiaca es claramente significativa y duradera con el F2207 con la dosis de 20 mg/kg/D; es estadística y clínicamente menor y más fugaz con el F2695 con la dosis equivalente farmacológicamente activa de 10 mg/kg/D,

- el F2695, con la dosis de 10 mg/kg/D, no provoca ninguna modificación estadísticamente significativa de la presión arterial sistólica mediada en las 6 horas después del último tratamiento, en el estado de equilibrio después de la administración reiterada durante 5 días,

- una diferencia estadísticamente significativa se demuestra sobre los valores de la presión arterial diastólica mediada en las 6 horas después del último tratamiento, en el estado de equilibrio después de la administración reiterada durante 5 días, entre el enantiómero activo F2695 (98 ± 2 mm Hg) y el racémico F2207 con dosis equivalentes farmacológicamente activas (110 ± 4 mm Hg).

Estas diferencias demuestran claramente una mejor tolerancia cardiovascular del enantiómero activo F2695.

Ejemplo 4: Ensayo de predictividad farmaco-toxico-genómica *in vitro*.

4.1. Materiales y métodos

Los compuestos F2695 y F2696, enantiómeros de la molécula racémica F2207, así como un producto de referencia, la clomipramina (codificada en el ensayo C218), se han evaluado durante el presente estudio. Los dos enantiómeros F2695 y F2696 se han evaluado en primer lugar en un ensayo preliminar de citotoxicidad (ensayo con el MTT) sobre unos hepacitos primarios de rata, a fin de seleccionar las tres concentraciones a usar en el ensayo definitivo.

Después del tratamiento de hepacitos primarios de rata en cultivo, se ha extraído el ARN a fin de generar unas sondas de ADN complementario marcadas, que, después, han sido hibridadas sobre una membrana que contiene 682 fragmentos de corte y empalme alternativo específicos del estrés celular. Se han obtenido unos índices de toxicidad, para cada uno de los productos ensayados, comparando el perfil de hibridación de las células tratadas con el obtenido a partir de células no tratadas.

4.1.1. Principio y objetivo del estudio

Safe-Hit es un ensayo farmaco-toxicogenómico predictivo sensible, robusto, fiable, rápido y seguro que permite la comparación y la clasificación de productos, basado en la evaluación optimizada de su potencial tóxico.

Safe-Hit se beneficia de una tecnología, propiedad de EXONHIT (DATAS™: *Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing*), que permite aislar y, por consiguiente, clonar los eventos de corte y empalme que resultan de un estado biológico dado, en comparación con una condición de control. Esto permite el aislamiento de isoformas de ARNm, expresadas de forma diferente en función de la condición biológica.

Safe-Hit permite la clasificación de las moléculas en el seno de una serie química, en función de un Índice Tóxico, determinado después de las etapas de base siguientes (sistemáticamente realizadas por duplicado para cada producto):

- tratamiento de las líneas celulares con los diferentes productos, con tres concentraciones deducidas de un ensayo previo de toxicología celular (ensayo MTT): correspondiendo una concentración de referencia a 80% de viabilidad celular, una concentración 10 veces superior - cuando es posible - y una concentración 10 veces inferior,

- preparación del ARN total y de las sondas radiomarcadas de ADNc correspondientes,

- hibridación de las sondas de ADNc: Safe-Hit macro-array que contiene 682 clones independientes, que corresponden a unas modificaciones de corte y empalme inducidas por la sobre-expresión de WTp53 (p53 es el “mediador” más ubicuo del estrés celular seleccionado para el desarrollo de esta metodología),

- adquisición y determinación del Índice de Toxicidad.

4.1.2. Células

Las células usadas para el estudio (ensayo MTT previo de citotoxicidad y ensayo principal) son unos hepatocitos criopreservados de rata Sprague-Dawley en primocultivo (lotes Hep184005 y Hep184006 - Biopredic), cultivados en condiciones estándares.

4.1.2.1. Medios de cultivo

- *medio de descongelación*: medio de Leibovitz 15 con glutamax 1, adicionado con 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,6 M de glucosa (lote MIL 210009 - Biopredic),

- *medio de inoculación*: medio de Williams E con glutamax 1, adicionado con 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 4 µg/ml de insulina bovina y 10% v/v de suero de ternera fetal (lote MIL 260005 - Biopredic),

- *medio de incubación*: medio de Williams E con glutamax 1, adicionado con 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 4 µg/ml de insulina bovina y 50 µM de hemisuccinato de hidrocortisona (lote MIL 260009-260007 - Biopredic).

4.1.2.2. Condiciones de cultivo

37ºC, atmósfera CO2 (5%), higrometría relativa (95%).

4.1.2.3. Procedimiento de cultivo

	Ensayo de toxicidad celular	Estudio principal
	Células inoculadas el día del tratamiento	
Densidad de inoculación	35.000 células/pocillo (placas de 96 pocillos)	1,5 millones de células por placa de 30 mm
Volumen de medio	0,1 ml	3 ml

4.1.3. Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo de citotoxicidad (ensayo MTT) detecta las células vivas gracias a una reacción colorimétrica que revela la integridad de la respiración celular que implica la actividad de las mitocondrias. El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), soluble en agua, se transforma mediante escisión, bajo la acción de una enzima mitocondrial de las células vivas, en un formazán púrpura insoluble. El formazán se solubiliza en un disolvente orgánico, y la disolución obtenida se puede medir mediante espectrofotometría. La absorbancia medida es proporcional al número de células supervivientes.

Las células se ponen en contacto durante 16 horas con el producto a ensayar con 5 concentraciones diferentes (0 - 1 - 10 - 25 - 50 y 100 µM).

Después de esta fase de exposición, se añade una disolución de MTT (0,5 mg/ml en el medio de incubación de los hepatocitos primarios) durante 3 horas. Después de la solubilización de los cristales de formazán, las placas multipocillo se leen mediante un espectrofotómetro a 500 nm a fin de determinar el porcentaje de viabilidad celular.

4.1.1. Estudio principal de farmaco-toxicogénomica

El estudio principal se realiza por duplicado, a partir de los cultivos inoculados y expuestos a cada producto, a fin de aumentar la coherencia entre los experimentos y validar los resultados obtenidos.

4.1.4.1. Inoculaciones celulares y tratamiento

Las células se inoculan y se cultivan durante 16 horas con cada producto, con las tres concentraciones seleccionadas a partir del ensayo previo MTT; se añaden dos controles (células no tratadas, disolvente solo) para la serie.

4.1.4.2. Extracción del ARN total y dosificación

Después del tratamiento, el ARN se extrae y se analiza como sigue:

- recogida de las células y centrifugación,

- extracción realizada con un agente reactivo fenol listo para el uso (Trizol - lote 1106266 y 1121067 - Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante,

- solubilización del ARN en agua,
- dosificación del ARN en espectrofotometría (densidad óptica medida a 260, 280 y 300 nm),
- verificación de la calidad del ARN mediante Agilent.

4.1.4.3. Preparación de las sondas de ADNc

Las sondas de ADNc se preparan mediante transcripción inversa radioactiva (alfa dATP^{33}P - Amersham). Se realiza la cuantificación de ADNc radioactivo (Instant Imager - Packard) para confirmar la actividad de las sondas.

4.1.4.4. Hibridación sobre membrana Safe-Hit

En las membranas Safe-Hit de nylon precortado (Q-BIOgene) se disponen en doble 682 clones DATAS (motivos de corte y empalme alternativo), con la ayuda de un aparato de Q-Pix (GENETIX). Las sondas de ADN se hibridan durante la noche sobre las membranas, y después se lavan.

4.1.1.5. Preparación de las sondas de ADNc:

- matriz: 5 µg de ARN total (para cada serie de tratamiento y para cada concentración),
- cebador: 100 ng de oligonucleótido oligo-dTV, para la 1ª y la 2ª hibridación sobre la rata (lote 12.00, Invitrogen),
- mezcla principal:

  10 µl de tampón First Strand 5x Premier (lote 1131226 - Invitrogen)
  1 µl de dCTP+dGTP+dTTP 20 mM (lote 1105201 - Invitrogen)
  1 µM de ATP 120 µM (lote 1105201- Invitrogen)
  5 µl de ditiotreitol (DTT) 0,1 M (lote 133609 - Invitrogen)
  1 µl de ARNasa Out 40 U (lote 1113345 - Invitrogen)
  5 µl de α ^{33}P dATP 3000Ci/mmol 10 mCi/µl (lote B0239 - Amersham)
  4 µl de Superscript II (lote 1137806 - Invitrogen)
  1 µl de glucógeno (lote 1129328 - Invitrogen)

- ***procedimiento***:

  Incubar el ARN y el oligo-dTV a 70ºC durante 10 minutos, y después poner en hielo. Añadir 27 µl de MasterMix e incubar a continuación a 43ºC/1 hora y después a 50ºC/15 minutos. Añadir 20 µl de agua, y después 20 µl de EDTA 50 mM, y a continuación 4 µl de NaOH 10N. Incubar durante 20 minutos a 65ºC y después poner en hielo.

  Cuantificación: Instant Imager, Packard: 1 µl de mezcla de reacción, añadir 8 µl de ácido acético, 100 µl de isopropanol y 1 µl de glucógeno (20 µg/µl). Incubar a -20ºC durante 20 minutos, centrifugar durante 20 minutos a 13.000 v/min. a 4ºC. Resuspender en 200 µl de agua,

  Cuantificación: Instant Imager, Packard: 1 µl de mezcla de reacción.

- ***Medios y tampones***

Disoluciones comunes:

20X SSC (Invitrogen)
50X Denhardt's
50% (w/v) Sulfato de Dextrano (ICN)
20% SDS (v/v)(Quantum biotech.)
10 mg/ml ADN de esperma de salmón (Q-Biogene)

Tampón de lavado 1:

2X SSC

Tampón de pre-hibridación:

6X SSC
10X Denhardt's
10% Sulfato de Dextrano
0,5% SDS
H_2O

Tampón de lavado 2:

2X SSC
0,1% SDS

Tampón de hibridación:

5X SSC
5X Denhardt's
0,1% SDS
H_2O

Tampón de lavado 3:

0,5X SSC
0,1% SDS

Tampón de lavado 4:

1X SSC
0,1% SDS

- ***Pre-hibridación***

Alicuotar 5 ml de tampón de pre-hibridación en los tubos de hibridación, añadir el volumen correspondiente de ADN de esperma de salmón para una concentración final de 100 µg/ml,

empapar las membranas de 5X SSC,

disponer la membrana en el tubo de hibridación y pre-hibridación durante 2 horas a 65ºC.

- ***Hibridación***

Eliminar el tampón de pre-hibridación y aclarar con 10-20 ml de 5 X SSC, eliminar el 5 X SSC, sustituir por 5 ml de tampón + ADN de esperma de salmón, desnaturalizar las sondas RT durante 5 mn a 95ºC, y después colocar sobre hielo durante 1 minuto, centrifugar para la reconstitución, y recuperar a continuación el volumen apropiado de sontas RT desnaturalizadas en el tubo (100.000 a 200.000 cpm/ml), incubar durante una noche a 55ºC.

- ***Lavado:***

Aclarar las membranas con 10-20 ml de tampón de lavado 1, eliminar el tampón y sustituirlo por 50 ml de tampón de lavado 2, incubar durante 30 min. a 55ºC, y después eliminarlo y sustituirlo lavando con el tampón 4, incubar durante 30 min. a 55ºC, y decantar a continuación el lavado final, quitar las membranas de los tubos, disponer sobre un casete y dejar que la adquisición se realice durante 3 horas.

4.1.4.5. Adquisición y análisis de imagen

Las membranas se disponen sobre una pantalla (FX Imaging ScreenK – Bio-rad) durante 3 horas. La película se lee a continuación utilizando un Personal Molecular Imagen FX (Bio-rad). El análisis de imagen se realiza utilizando el programa Safe-Hit Reader (COSE).

4.1.4.6. Cálculo del índice de toxicidad

Todos los datos se transfieren a un programa de cálculo automático que normaliza las diferentes membranas y calcula un índice de toxicidad = suma del número aumentado y disminuido de genes para un compuesto dado a una concentración dada, comparativamente con los resultados de los controles no tratados. Los resultados de los dos análisis Safe-Hit se comparan entonces y se combinan para evaluar la toxicidad potencial de los diversos compuestos ensayados. Dos parámetros modificables por el usuario están implicados en el cálculo del índice de toxicidad:

- el Background Threshold (BT) atenúa las señales débiles, próximas del ruido de fondo o no atribuibles a una expresión significativa de gen. Determina por lo tanto el nivel de detección;

- el factor de inducción (IF) se determina como el factor multiplicador, frente a las muestras de control, para que aumenten o disminuyan los clones. El valor de este parámetro es generalmente 2 o por debajo de 2 para obtener unos resultados relevantes. El aumento progresivo del valor del IF selecciona los clones que aumentan o disminuyen cada vez más.

El procedimiento de cálculo del índice de toxicidad se ha desarrollado mediante la comparación de los perfiles de referencia (R: células no tratadas) con un perfil experimental (E) y sigue las etapas siguientes (véase la figura 5) para una vista esquemática del procedimiento):

- transformación de todos los vales obtenidos en valores log,

- cálculo de la media de los valores log para cada uno de los ensayos duplicados (M_{iR} y M_{iE}),

- establecimiento de una matriz con M_{iR} y M_{iE} para todas las señales (= D_i),

- normalización de los M_{iE} individuales sustrayendo a M_{iE} la media de los 14 valores proximales de Di (= NM_{iE}),

- comparación de los valores normalizados con los valores de referencia ($C_i = NM_{iE} - M_{iR}$),

- transformación exponencial de C_i (= F_i),

- comparación de F_i con el factor de inducción seleccionado por el usuario:

  - si $F_i > IF$, el gen se considera como aumentado,
  - si $1/IF < F_i < IF$, el gen se expresa sin ninguna modificación,
  - si $F_i < 1/IF$, el gen se considera como disminuido.

4.2. RESULTADOS DEL ENSAYO CON EL MTT

Estos ensayos se han realizado por triplicado sobre unos hepatocitos primarios de ratas expuestos durante 16 horas.

La clomipramina, referenciada C218, presenta una toxicidad importante a 100 µM debido a que no se observa ninguna viabilidad después de la exposición de las células durante 16 horas. Por el contrario, no se observa ninguna toxicidad a 25 µM. A 50 µM, la viabilidad superior al 80% es totalmente compatible con un estudio farmaco-toxicogenómico. Los compuestos F2695 y F2696 no presentan ninguna toxicidad en este ensayo, incluso con la concentración de 100 µM.

Para realizar las evaluaciones farmaco-toxicogenómicas, se usan 3 concentraciones de un mismo compuesto: la concentración que permite obtener 80% de viabilidad (C), así como las concentraciones que corresponden a (C)x10 y a (C)/10.

A fin de comparar la capacidad de F2695 y F2696 para producir un resultado en el ensayo realizado, se han usado las mismas concentraciones para cada uno de ellos: 1 µM, 10 µM y 100 µM. En el caso de la clomipramina, se han usado las concentraciones de 1 µM, 10µM y 50 µM. Véanse las figuras 6a, 6b y 6c.

4.3 RESULTADOS SOBRE HEPATOCITOS PRIMARIOS DE RATA

Los índices de toxicidad (IT) se han determinado como se ha descrito anteriormente. En estos índices, se ha tomado en cuenta sólo los clones que han sido encontrados modulados con relación a los controles en los dos experimentos independientes, considerando sólo los clones cuya señal es 2 veces superior al ruido de fondo (BT). Se han realizado dos análisis diferentes tomando dos niveles de diferencia (Factor de inducción - IF) con relación a la situación no tratada:

- por lo menos 1,7 veces con relación a la situación no tratada. Este factor de 1,7 veces representa el valor más bajo que permite no obtener ningún índice durante la comparación de dos situaciones no tratadas.

- por lo menos 2 veces con relación a la situación no tratada. Este factor de 2 veces permite tomar en cuenta las señales más robustas.

4.3.1. Factor de inducción de 1,7 con relación a la situación no tratada (tabla 6)

TABLA 6: clones aumentados y disminuidos con unos hepatocitos primarios de rata (Factor de inducción = 1,7 veces)

		F2695 -1 µM	F2695 - 10 µM	F2695 - 100 µM	F2696 - 1 µM	F2696 - 10 µM	F2696 - 100 µM	C218 - 1 µM	C218 - 10 µM	C218 - 100 µM
Aumento >1,7	Aumento			1			15	2	2	13
Disminución <0,588	Disminución			1	2	5	7	7	13	15
	TI			2	2	5	22	9	15	28

Pos.	nb U	nb D										Gen
A09	3								2,90	2,23	2,14	H. sapiens mitochondrion, 12S
A20		1						0,56				H. sapiens initiation factor eIF-5A gen
B20		2								0,14	0,27	H. sapiens chromosome 19; BAC CIT-B-191n6
B22		2								0,17	0,32	H. sapiens Genomic sequence from 17
C01	4							3,20	1,93	1,82	1,91	H. sapiens mitochondrion, 16S
E01	1										1,73	H. sapiens mRNA for lipocortin II
E05		2								0,22	0,35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the COL4A5 for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complete sequence
E11	1							2,12				H. sapiens chlordecone reductase homolog liver, mRNA
E19	1										1,72	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
E21		2								0,56	0,58	H. sapiens ribosomal protein S14 gene
F24		1									0,52	H. sapiens LIM homeobox protein cofactor (CLIM-1) mRNA
G01	1										2,04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA
G05	1										2,02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
G09	2							2,09			1,76	H. sapiens mitochondrion, cytochrome b
I01	1							2,05				H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
I18	2							2,38			1,88	H. sapiens 18S rRNA gene H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA
L01	1							2,05				
L22	1							1,78				H. sapiens mRNA for Lon protease-like protein
L23	1										1,75	H. sapiens cDNA NIH mgC_16 clone IMAGE:3350241 5', mRNA sequence
M07	2							2,25			1,75	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
M12		3						0,21		0,16	0,39	H. sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C1563
M23	1							1,95				Sequence 21 from patent US 5851764
P05	1							1,78				H. sapiens PAC clone DJ404K21 from Xq23
Q11	2				1,81						1,92	unk
Q24	1							1,77				H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
S01	1										2,98	Mus muculus TCR beta locus
T08		6				0,50	0,22	0,20	0,35	0,14	0,22	H. sapiens mRNA for I IAA1185 protein
U04		6				0,57	0,26	0,19	0,48	0,22	0,37	H. sapiens translation initiation factor eIF-2alpha mRNA
V22												H. sapiens mRNA for elongation factor 1-alpha (clone CEF4)
W17	1							2,96				H. sapiens mitochondrion, hypoxia inducible gene-14
X02		5					0,29	0,20	0,36	0,24	0,31	unk
X05		2								0,15	0,24	H. sapiens microsomal epoxide hydrolase (EPHX) gene
X06		5					0,2	0,16	0,23	0,15	0,23	H. sapiens Genomic sequence from 9q34
X23	1							1,92				unk
Y17	1							2,65				H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
Z13		3							0,34	0,29	0,27	unk
Z20		1									0,57	Homo sapiens cDNA wc44h09,x1 NCI_CGAP_Pr28 clone IMAGE:2321537 3' similar to SW:RB24_Mouse P35290 RAS_RELATED PROTEIN RAB-24;, mRNA sequence
AA11		3							0,38	0,27	0,31	H. sapiens Repeat sequence AluJb fragment inserted into a cDNA coding for an unknown protein
AA13	1										1,79	H. sapiens 18S rRNA gene
AC13		5					0,22	0,16	0,28	0,16	0,28	H. sapiens 7S RNA L gene

Se han obtenido los índices de toxicidad siguientes:

F2695	Índice de toxicidad
1 µM	0
10 µM	0
100 µM	17

F2696	Índice de toxicidad
1 µM	2
10 µM	5
100 µM	22

C218	Índice de toxicidad
1 µM	9
10 µM	15
50 µM	28

Por lo tanto, se puede establecer la clasificación siguiente, del más tóxico por lo menos tóxico C218 (clomipramina) > F2695 >>> F2695.

La clomipramina, molécula de referencia codificada en el presente ensayo C218, muestra un aumento de las firmas en relación con las concentraciones ensayadas: respectivamente 9, 15 y 28 firmas con las concentraciones de 1, 10 y 50 µM (concentración máxima definida en el ensayo previo de citotoxicidad). Muy lógicamente, la totalidad de las firmas que aparecen con las concentraciones baja y media se encuentra con las concentraciones superiores.

Con las concentraciones de 1 y 10 µM, el F2695 no induce ninguna firma sobre las 682 posibles firmas de estrés ensayadas en el presente ensayo. Con la concentración más elevada de 100 µM, sólo se identifican dos firmas, de las cuales una es común con el C218 pero de significado desconocido.

El F2696 muestra un aumento de las firmas en relación con las concentraciones ensayadas: respectivamente 2, 5 y 22 firmas con las concentraciones de 1, 10 y 100 µM. La totalidad de las firmas que aparecen con las concentraciones baja y media se encuentra con las concentraciones superiores. Ninguna de las 22 firmas es común con el F2695. Por el contrario, las firmas que aparecen con las concentraciones baja y media (5 de las cuales 2 están presentes a partir de la baja concentración), las 5 forman todas parte de las 9 firmas objetivadas para la clomipramina a partir de la dosis baja de 1 µM. Con la alta concentración de 100 µM, 10/26 firmas del F2696 se encuentran entre las 28 identificadas con la clomipramina a 50 µM.

En el plano cualitativo, se debe subrayar para el F2696 y la clomipramina el impacto sobre los transcritos mitocondriales, en particular a nivel de Cox1 y del citocromo b. Estas firmas no están presentes con el F2695 (posiciones G05/G09/I01).

4.3.2. Factor de inducción de 2 con relación a la situación no tratada (tabla 7)

TABLA 7: clones aumentados y disminuidos con unos hepatocitos primarios de rata (Factor de inducción = 2 veces)

Aumento >1,7
Disminución <0,588

	F2695 -1 µM	F2695 - 10 µM	F2695 - 100 µM	F2696 - 1 µM	F2696 - 10 µM	F2696 - 100 µM	C218 - 1 µM	C218 - 10 µM	C218 - 100 µM
Aumento						10	1	1	4
Disminución					5	6	7	12	12
TI					5	16	8	13	16

Pos.	nb U	nb D										Gen
A09	3								2,90	2,23	2,14	H. sapiens mitochondrion, 12S
B20		2								0,14	0,27	H. sapiens chromosome 19; BAC CIT-B-191n6
B22		2								0,17	0,32	H. sapiens Genomic sequence from 17
C01	4							3,20	1,93	1,82	1,91	H. sapiens mitochondrion, 16S
E05		2								0,22	0,35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the COL4A5 gene for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complete sequence
E11	1							2,12				H. sapiens chlordecone reductase homolog liver, mRNA
G01	1										2,04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA
G05	1										2,02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
G09	2							2,09				H. sapiens mitochondrion, cytochrome b
I01	1							2,05				H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
I18	2							2,38				H. sapiens 18S rRNA gene H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA
I18	1							2,38				H. sapiens 18S rRNA gene
J03	1							2,12				H. sapiens CLP mRNA
L01	1							2,05				H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA
M07	2							2,25				H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
M12		3						0,21		0,16	0,39	H. sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C1563
T08		5					0,22	0,20	0,35	0,14	0,22	H. sapiens mRNA for I IAA1185 protein
U04		5					0,26	0,19	0,48	0,22	0,37	H. sapiens translation initiation factor eIF-2alpha mRNA
W17	1							2,96				H. sapiens mitochondrion, hypoxia inducible gene-14
X02		5					0,29	0,20	0,36	0,24	0,31	unk
X05		2								0,15	0,24	H. sapiens microsomal epoxide hydrolase (EPHX) gene
X06		5					0,20	0,16	0,23	0,15	0,23	H. sapiens Genomic sequence from 9q34
Y17	1							2,65				H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
Z13		3							0,34	0,29	0,27	unk
AA11		3							0,38	0,27	0,31	H. sapiens Repeat sequence AluJb fragment inserted into a cDNA coding for an unknown protein
AC13		5					0,22	0,16	0,28	0,16	0,28	H. sapiens 7S RNA L gene

Se han obtenido los índices siguientes:

F2695	Índice de toxicidad
1 µM	0
10 µM	0
100 µM	0

C218	Índice de toxicidad
1 µM	8
10 µM	13
50 µM	16

F2696	Índice de toxicidad
1 µM	0
10 µM	5
100 µM	16

Según estos parámetros, se puede proponer la siguiente clasificación, del más tóxico por lo menos tóxico: C218 (clomipramina) > F2696 >>>>> F2695.

Considerando los clones sobre- o sub-expresados de un factor 2, el F2695 no induce ninguna firma, incluso con la concentración de 100 µM.

El efecto de la concentración sobre la aparición de las firmas se confirma mediante la desaparición de las firmas de baja intensidad para el F2696 con 1 µM, presentes en el análisis anterior con un factor de inducción de 1,7.

Se confirma asimismo, en el plano cualitativo, el impacto de F2696 y de la clomipramina sobre Cox1 y citocromo b (posiciones G05/G09/I01).

El F2695, enantiómero farmacológicamente activo del F2207, está desprovisto de impacto significativo en este ensayo, mientras que la clomipramina se usa como producto de referencia de control positivo.

Por el contrario, el F2696, enantiómero inactivo del F2207 presenta un perfil de firmas cuantitativa y cualitativamente cercano a la clomipramina, y no presenta ninguna firma común con el F2695.

Todo esto demuestra un mejor perfil toxicogenómico para el enantiómero activo F2695 del que, en este modelo experimental, el coeficiente de seguridad es significativamente mejor que para el F2696.

4.4. Conclusión

Los estudios farmaco-toxicogenómicos realizados sobre las moléculas F2695 y F2696, enantiómeros del F2207 (con las concentraciones de 10, 50 y 100 µM), y C218 (clomipramina, con las concentraciones de 1, 10 y 50 µM), a partir de hepatocitos de rata en primocultivo, han permitido obtener unas firmas de estrés y unos índices de toxicidad dependientes de la concentración. Estos estudios confirman la capacidad del ensayo farmacotoxicogenómico para revelar unas firmas de estrés en unas condiciones de tratamiento (concentraciones, duración de tratamiento) que no provocan ninguna toxicidad en un ensayo habitual de viabilidad tal como el MTT.

Varios hechos destacan de este estudio:

- en este modelo de hepatocitos primarios de rata, sólo el F2695, enantiómero farmacológicamente activo del F2207 no induce ningún índice de toxicidad significativo;

- el F2696, enantiómero inactivo del F2207, y la clomipramina, psicótropo de referencia, inducen unos índices importantes formados por firmas de estrés comunes o muy cercanas. En este sistema, la clomipramina, molécula de referencia producida positiva, es el producto que induce más firmas de estrés, obteniéndose unos índices significativos a partir de las concentraciones más bajas. En este sentido, es interesante mencionar que la clomipramina puede inducir un cierto número de efectos indeseables en el ser humano, tales como por ejemplo la taquicardia, la hipotensión ortostática, unos trastornos de la conducta o del ritmo y, excepcionalmente unas hepatitis. En caso de sobredosis accidental con la clomipramina, se pueden observar entre otros unos síncopes, unos trastornos hematológicos, unas manifestaciones cardiovasculares severas.

Sin prejuzgar una identidad de mecanismo fisiopatológica, es interesante observar que F2696 presenta unas firmas de estrés comunes o muy cercanas a las de la clomipramina, e induce asimismo unos efectos indeseables tales

como los trastornos cardiovasculares descritos anteriormente.

Así, es legítimo adelantar que las firmas observadas son independientes de cualquier perfil antidepresivo o más ampliamente psicotrópico. Se deben considerar, por el contrario, como unas “firmas de estrés” (el F2696 provoca en particular una disminución de expresión de un gen implicado en la síntesis proteica y de un factor de iniciación de traslación). Todo esto demuestra un mejor perfil toxicogenómico para el enantiómero activo F2695, cuyo coeficiente de seguridad en el modelo experimental es significativamente mejor que para el F2696.

REIVINDICAIONES

1. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización como medicamento destinado a prevenir o a tratar la depresión, los estados depresivos, la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el dolor, en pacientes que presentan unos antecedentes cardiovasculares y/o que padecen trastornos cardiovasculares, administrado a una dosis comprendida entre 0,01 mg y 10 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas.

2. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado porque la dosis administrada está comprendida entre 0,05 mg y 5 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas.

3. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la dosis administrada está comprendida entre 0,1 mg y 1 mg/kg de peso corporal por día en una o varias tomas.

4. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los trastornos cardiovasculares corresponden a un aumento de la presión arterial y/o a un aumento de la frecuencia cardiaca.

5. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 4, caracterizado porque el aumento de la presión arterial corresponde a un aumento de la presión arterial diastólica.

6. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, limitando además al mismo tiempo los riesgos de toxicidad orgánica y/o tisular.

7. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán es el clorhidrato de Z-(1S,2R)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida (F2695).

8. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el tratamiento o la prevención de la depresión profunda, de la depresión resistente, de la depresión de la persona mayor, de la depresión psicótica, de la depresión inducida por unos tratamientos con interferón, del estado depresivo, del síndrome maniaco-depresivo, de los episodios depresivos estacionales, de los episodios depresivos relacionados con una condición médica general o de los episodios depresivos relacionados con unas sustancias que actúan sobre el humor.

9. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el tratamiento o la prevención del dolor crónico.

10. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque los antecedentes cardiovasculares y/o trastornos cardiovasculares se seleccionan de entre el infarto de miocardio, los trastornos del ritmo cardiaco (taquicardia, bradicardia, palpitaciones), los trastornos de la presión arterial (pacientes hipo- o hipertensos) y las cardiopatías.

11. Enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán (Z(±)-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenilciclopropanocarboxamida), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el medicamento contiene:

a) dicho enantiómero (1S,2R) del Milnaciprán o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) por lo menos un compuesto activo seleccionado de entre los psicótropos, en particular los antidepresivos, y los agentes anti-muscarínicos,

como productos de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para el tratamiento o la prevención de la depresión, en particular la depresión profunda, la depresión resistente, la depresión de la persona mayor, la depresión psicótica, la depresión inducida por unos tratamientos con interferón, el estado depresivo, el síndrome maniaco-depresivo, los episodios depresivos estacionales, los episodios depresivos relacionados con una condición médica general, o los episodios depresivos relacionados con unas sustancias que actúan sobre el humor.

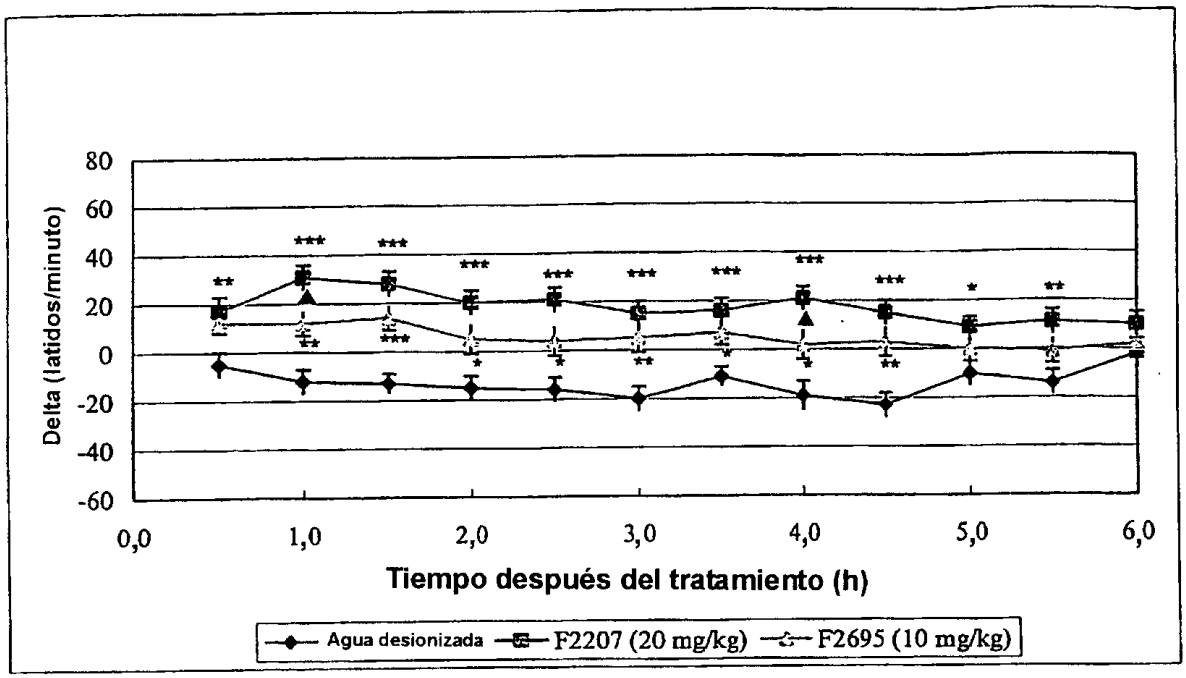


FIGURA 1

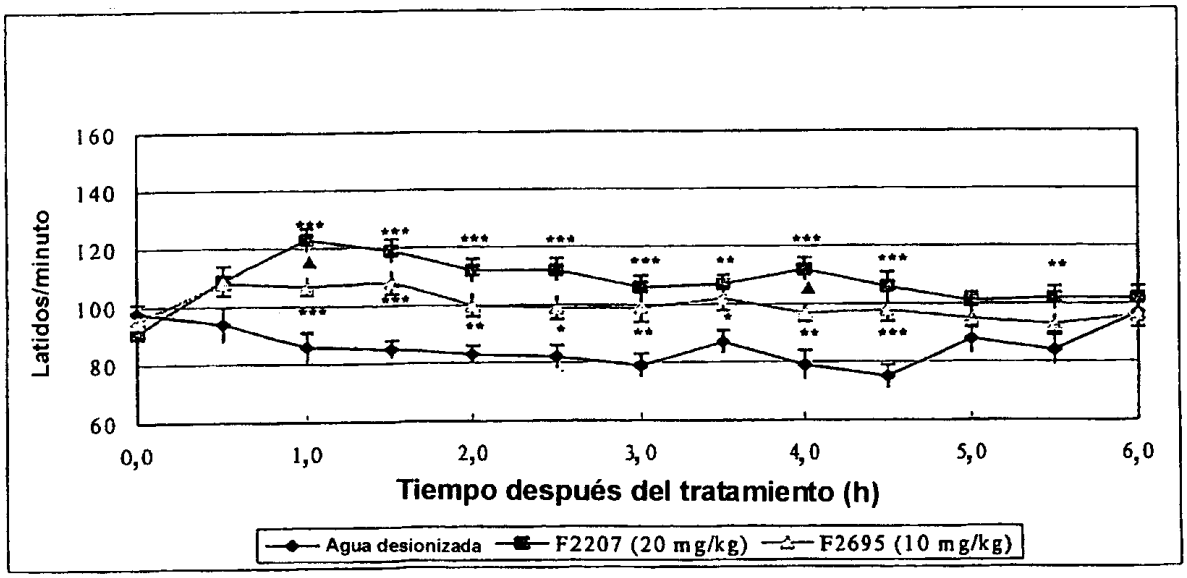


FIGURA 2

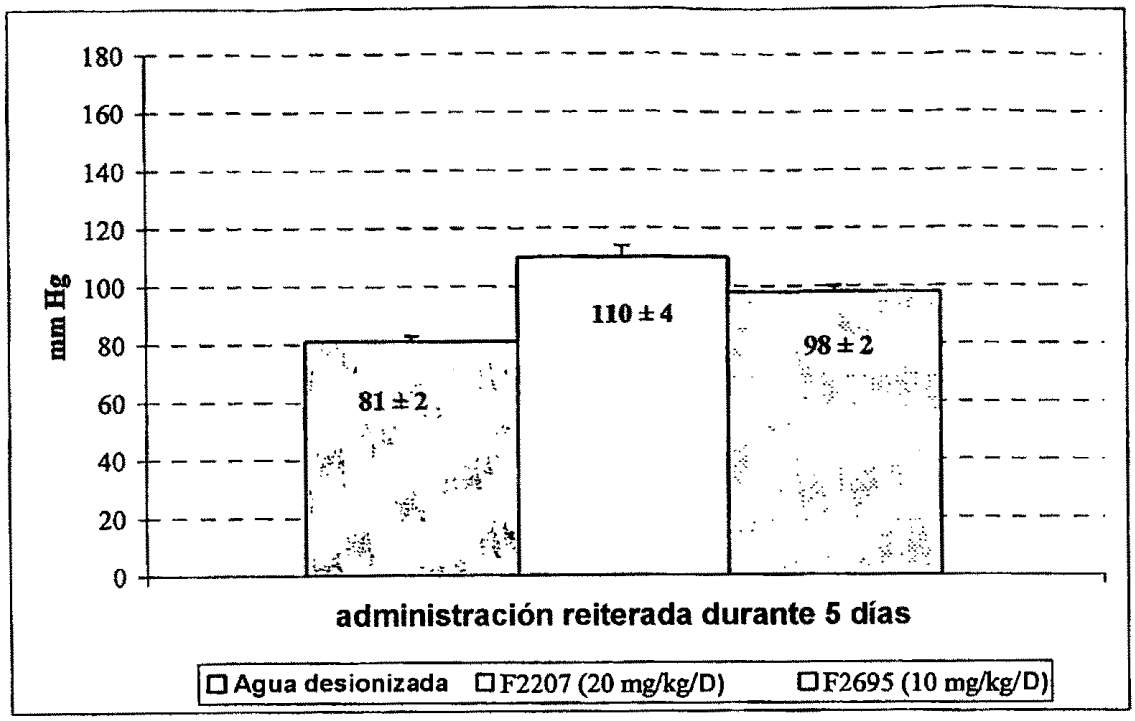


FIGURA 3

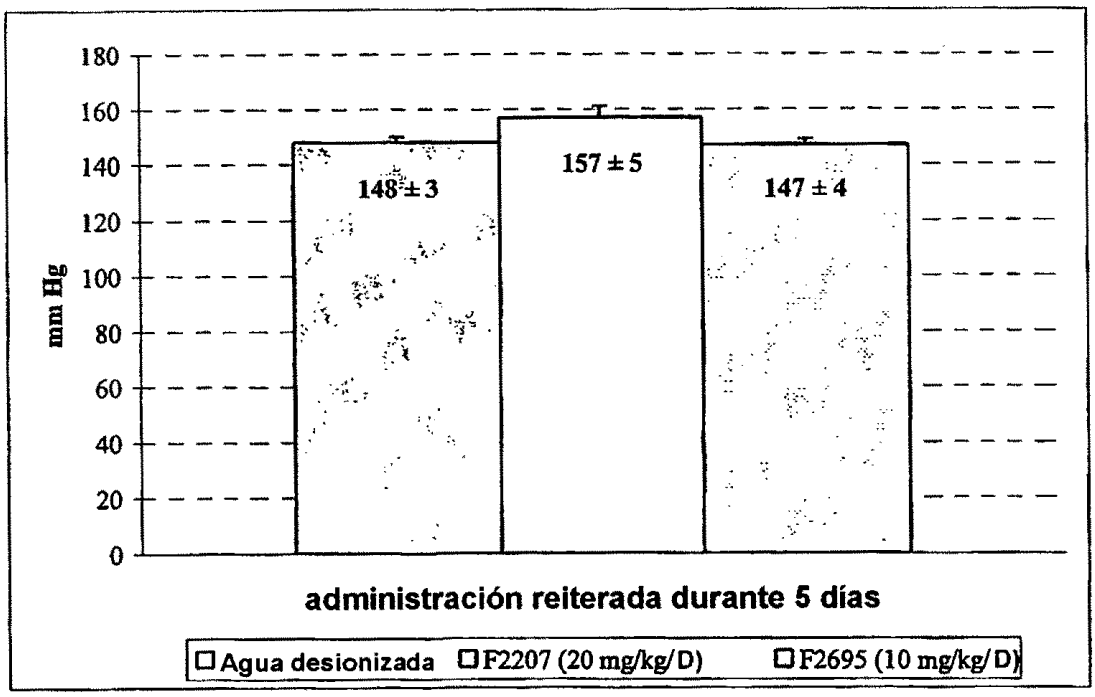


FIGURA 4

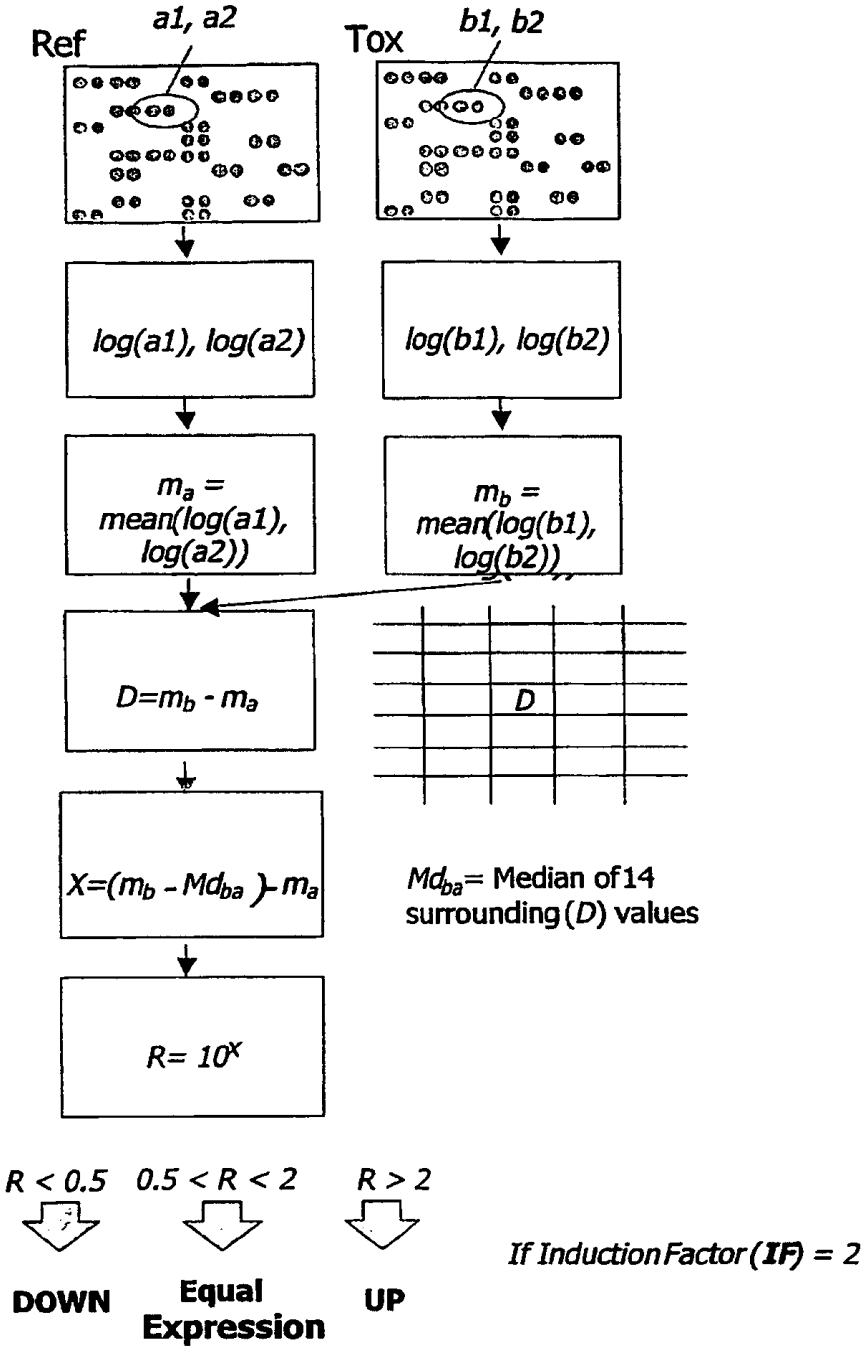
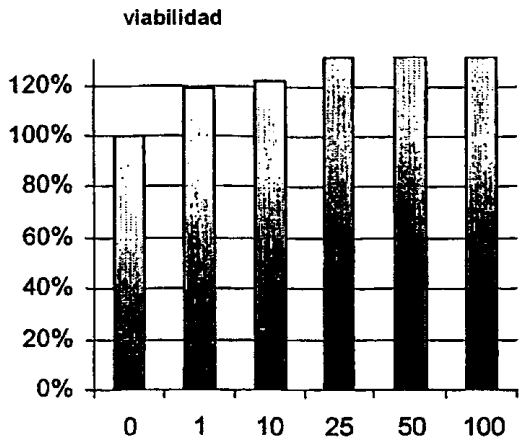
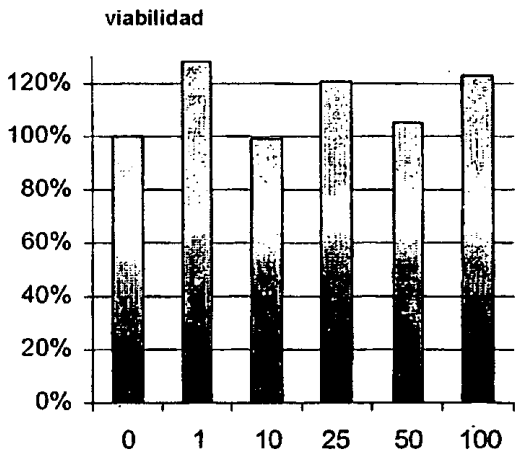

Ref
a1, a2
Tox
b1, b2
log(a1), log(a2)
log(b1), log(b2)
m_a = mean(log(a1), log(a2))
m_b = mean(log(b1), log(b2))
$D=m_b - m_a$
D
$X=(m_b - Md_{ba}) - m_a$
Md_{ba}= Median of 14 surrounding (D) values
$R= 10^X$
R < 0.5
0.5 < R < 2
R > 2
DOWN
Equal Expression
UP
If Induction Factor (IF) = 2

FIGURA 5



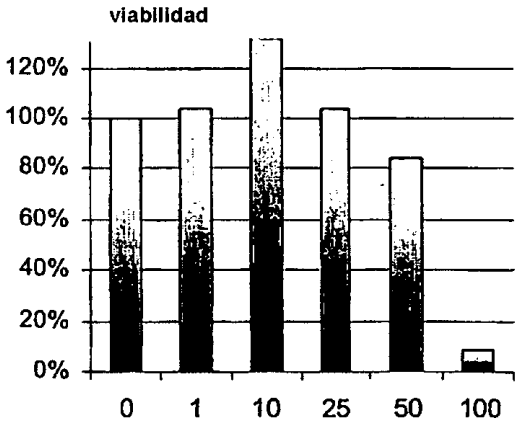
F2695

FIGURA 6A



F2696

FIGURA 6B



C218

FIGURA 6C