



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 949**

51 Int. Cl.:

C07D 211/20 (2006.01) **A61K 31/451** (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01) **A61P 25/24** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) **A61P 25/32** (2006.01)
A61P 25/34 (2006.01) **A61P 25/36** (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07764496 .1**

96 Fecha de presentación : **15.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2044020**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54

Título: **Formas cristalinas de 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina con inhibición de la reabsorción de serotonina y norepinefrina combinada para el tratamiento del dolor neuropático.**

30

Prioridad: **16.06.2006 DK 2006 00816**
16.06.2006 US 805009 P
20.03.2007 DK 2007 00423

73

Titular/es: **H. Lundbeck A/S**
Ottiliavej 9
2500 Valby-Copenhagen, DK

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

72

Inventor/es: **Bang-Andersen, Benny;**
Faldt, André;
Stensbøl, Tine, Bryan;
Miller, Silke y
López de Diego, Heidi

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 949 T3

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

DESCRIPCIÓN

La percepción del dolor es más complicada que una transmisión directa de señales desde una parte lesionada del cuerpo hasta los receptores específicos en el cerebro, y en la que el dolor percibido es proporcional a la lesión. Mejor dicho, el daño al tejido periférico y la lesión a los nervios pueden producir alteraciones en las estructuras nerviosas centrales implicadas en la percepción del dolor afectando la sensibilidad al dolor posterior. Esta neuroplasticidad puede ocasionar una sensibilización central en respuesta a estímulos nocivos que duran mucho más tiempo, que pueden manifestarse como, p. ej., dolor crónico, es decir que la percepción del dolor permanece aún después que se ha interrumpido el estímulo nocivo, o como hiperalgesia, es decir un aumento de la respuesta a un estímulo, que normalmente es doloroso. Uno de los ejemplos más misteriosos y dramáticos de esto es el "síndrome del miembro fantasma", es decir la persistencia del dolor que existía en una extremidad antes de su amputación. Para un estudio reciente de neuroplasticidad y dolor véase Melzack *et al.*, en *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 933, 157-174, 2001.

El dolor crónico, tal como el dolor neuropático se manifiesta de forma diferente que otros tipos de dolor, p. ej., el dolor somático o visceral. El dolor con frecuencia se describe como punzante, ardiente, alfileres y agujas, entumecido o hiriente. Las causas frecuentes del dolor neuropático incluyen, el alcoholismo, la amputación, problemas en la espalda, piernas y cadera, quimioterapia, diabetes, VIH, esclerosis múltiple, cirugía vertebral e infección del virus zóster del herpes.

El componente principal para el dolor crónico puede explicar porqué el dolor crónico tal como p. ej., el dolor neuropático apenas responde a los analgésicos clásicos, tal como los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS) y a los analgésicos opioides. Los antidepresivos tricíclicos (ATC), tipificados por la amitrilina, se han convertido en patrones para el tratamiento del dolor neuropático, y se cree que el efecto está mediado por el efecto inhibidor combinado en el transportador de serotonina y el transportador de norepinefrina [*Clin. Ther.*, 26, 951-979, 2004]. Más recientemente, los antidepresivos denominados de acción doble con un efecto inhibidor en la reabsorción tanto de serotonina como de norepinefrina se han utilizado clínicamente para el tratamiento del dolor neuropático [*Human Psychopharm.*, 19, S21-S25, 2004]. Ejemplos de antidepresivos de doble actuación son la venlafaxina y la duloxetina, y esta clase de antidepresivos se denomina con frecuencia SNRI.

Los datos sobre la utilización de los inhibidores selectivos de reabsorción de serotonina (ISRS) para el dolor neuropático son escasos, pero generalmente sugieren un efecto limitado [*Bas. Clin. Pharmacol.*, 96, 399-409, 2005]. De hecho, se ha supuesto que los ISRS son solo antinociceptivos débiles en y de ellos mismos pero esta inhibición del transportador de serotonina aumenta el efecto antinociceptivo del inhibidor de reabsorción de norepinefrina. Esta noción está apoyada por un estudio de 22 animales y cinco seres humanos, estudio que demuestra que los ISRN tienen un efecto antinociceptivo superior en comparación con los inhibidores de reabsorción de norepinefrina, que de nuevo son superiores a ISRS [*Pain. Med.*, 4, 310-316, 2000].

Los datos recientes sobre el antagonista de 5'-HT₃ ondansetrón implica que los antagonistas de 5'-HT₃ pueden tener un efecto analgésico y de este modo ser útiles en el tratamiento del dolor neuropático [*Anesth. Analg.*, 97, 1474-1478, 2003].

La utilización de antidepresivos tricíclicos está asociada a conocidos efectos secundarios anticolinérgicos, tales como por ejemplo, somnolencia, ansiedad, insomnio y dificultades cognitivas y de la memoria. Por consiguiente, hay necesidad en la técnica de encontrar rutas alternativas de tratamiento del dolor neuropático.

La solicitud de patente internacional publicada como WO 2003/029232 da a conocer p. ej., el compuesto 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)fenil]piperidina como base libre y la correspondiente sal de HCl. Se ha publicado que el compuesto es un inhibidor del transportador de serotonina y del receptor de serotonina 2C (5-HT_{2C}) y se dice que es útil para el tratamiento de trastornos afectivos, p. ej., depresión y ansiedad.

Compendio de la invención

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que además del ya conocido perfil farmacológico, 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)fenil]piperidina es un potente inhibidor de la reabsorción de serotonina y de la reabsorción de norepinefrina, un antagonista del receptor 3 (5-HT₃) de serotonina, un antagonista del receptor 2A (5-HT_{2A}) de serotonina y un inhibidor o el receptor α_1 adrenérgico, y el compuesto puede como tal ser útil en el tratamiento p. ej., del dolor crónico. Por consiguiente, la invención se refiere al compuesto I, que es la 4-[2-(4-metilfenil-sulfanil)fenil]piperidina y las sales farmacéuticamente aceptables seleccionadas del mismo en una forma cristalina.

En una forma de realización, la invención se refiere al compuesto I para su utilización en terapia.

En una forma de realización, la invención se refiere a un método de tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto I a un paciente necesitado del mismo.

5 En una forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto I.

En una forma de realización, la invención se refiere a la utilización del compuesto I para la preparación de un medicamento.

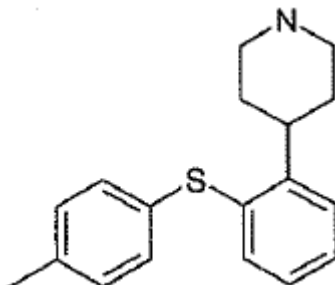
Figuras

- Figura 1: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de HBr del compuesto I
- 10 Figura 2: Modelo de difracción por rayos X del solvato de la sal de adición de HBr del compuesto I
- Figura 3: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición del ácido palmítico del compuesto I
- Figura 4: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición del ácido DL-láctico del compuesto I
- Figura 5: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición del ácido adípico (1:1) del compuesto I (forma $\alpha+\beta$)
- 15 Figura 6: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición del ácido adípico (2:1) del compuesto I
- Figura 7: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido fumárico (1:1) del compuesto I
- Figura 8: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido glutárico (1:1) del compuesto I
- Figura 9: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido malónico (1:1) del compuesto I, forma α
- 20 Figura 10: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido malónico del compuesto I, forma β
- Figura 11: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido oxálico (1:1) del compuesto I
- Figura 12: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido sebacoínico (2:1) del compuesto I
- 25 Figura 13: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido succínico (2:1) del compuesto I
- Figura 14: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-málico (1:1) del compuesto I, forma α
- Figura 15: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-málico (1:1) del compuesto I, forma β
- 30 Figura 16: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido D-tartárico (1:1) del compuesto I
- Figura 17: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-aspártico (1:1) del compuesto I en la mezcla con ácido L-aspártico
- Figura 18: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición hidratada de ácido L-aspártico (1:1) del compuesto I en la mezcla con ácido L-aspártico
- 35 Figura 19: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido glutámico (1:1) del compuesto I en la mezcla con ácido glutámico monohidratado
- Figura 20: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido cítrico (2:1) del compuesto I
- Figura 21: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido HCl del compuesto I
- Figura 22: Modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido fosfórico (1:1) del compuesto I
- 40 Figura 23: Concentraciones de dopamina en la corteza prefrontal en el momento de la administración de compuestos de la presente invención.
- Figura 24: Concentraciones de acetilcolina en la corteza prefrontal en el momento de la administración de compuestos de la presente invención.

Figura 25a+b: Concentraciones de acetilcolina en la corteza prefrontal y en el hipocampo ventral en el momento de la administración de compuestos de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere al compuesto I, que es 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina y a sus sales seleccionadas farmacéuticamente aceptables en forma cristalina. La estructura de 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina es la siguiente



10 El perfil farmacológico de los compuestos de la presente invención está representado en los ejemplos, pero puede resumirse de la forma siguiente. Los compuestos son inhibidores de reabsorción de serotonina y norepinefrina; inhiben los receptores 2A, 2C y 3 de serotonina; e inhiben al receptor α -1 adrenérgico.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables seleccionadas son sales de adición de ácido de ácidos que son inocuos. Dichas sales incluyen las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos, tales como los ácidos láctico, malónico, aspártico y glutámico. Dichas sales pueden también prepararse a partir del ácido bromhídrico. Las sales útiles adicionales están listadas en la tabla en el Ejemplo 1D (Tabla 1).

En una realización, el compuesto de la presente invención, es decir el compuesto de fórmula I, es la sal de adición de HBr.

En una forma de realización, el compuesto de la presente invención, es la sal de adición del ácido DL-láctico, y en particular la sal 1:1.

20 En una forma de realización, el compuesto de la presente invención, es la sal de adición del ácido L-aspártico, y en particular la sal 1:1.

En una forma de realización, el compuesto de la presente invención, es la sal de adición del ácido glutámico, y en particular la sal 1:1.

25 En una forma de realización, el compuesto de la presente invención, es la sal de adición del ácido glutámico, y en particular la sal 1:1.

En una forma de realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido malónico, y en particular la sal 1:1 que se ha descubierto que existe en dos modificaciones polimórficas α y β de las que la forma β se cree que es la más estable basándose en una solubilidad menor.

30 En una realización, los compuestos de la presente invención están en forma purificada. La expresión "forma purificada" pretende indicar que los compuestos están esencialmente exentos de otros compuestos o de otras formas, es decir polimorfos de dicho compuesto, como puede ser el caso.

35 Las formas farmacéuticas bucales, y en particular los comprimidos y cápsulas, con frecuencia son preferidos por los pacientes y por el médico debido a la facilidad de administración y por consiguiente mejor observancia. Para los comprimidos y cápsulas, es preferible que los ingredientes activos sean cristalinos.

40 Los cristales de la presente invención pueden existir en forma de solvatos, es decir cristales en los que las moléculas del disolvente forman parte de la estructura cristalina. El solvato puede formarse en agua, en cuyo caso los solvatos se denominan hidratos. Alternativamente, los solvatos pueden formarse en otros disolventes, tal como p. ej., etanol, acetona o acetato de etilo. La cantidad exacta de solvato con frecuencia depende de las condiciones. Por ejemplo, los hidratos por lo general perderán agua a medida que aumenta la temperatura o a medida que disminuye la humedad relativa. Los compuestos que no cambian o que cambian solamente poco cuando las condiciones, tales como p. ej., cambia la humedad se consideran generalmente más apropiados para las formulaciones farmacéuticas. Es de destacar que la sal de adición de HBr no forma hidratos cuando precipita en agua mientras que los compuestos tales como las sales de adición de ácido de succinato, malato y tartrato sí.

45

Algunos compuestos son higroscópicos, es decir, absorben agua cuando están expuestos a la humedad. La higroscopia se considera generalmente una propiedad indeseable para los compuestos que deben presentarse en una formulación farmacéutica, en particular en una formación anhidra tales como comprimidos o cápsulas. En una realización, la invención proporciona cristales con baja higroscopia.

5 Para las formas farmacéuticas bucales, que utilizan ingredientes activos cristalinos es también útil si dichos cristales están bien definidos. En el presente contexto, la expresión “bien definido” en particular significa que la estequiometría está bien definida, es decir que la relación entre los iones que forman la sal es la relación entre números enteros pequeños, tales como 1:1, 1:2, 2:1, 1:1:1, etc. En una realización, los compuestos de la presente invención, son cristales bien definidos.

10 La solubilidad de un ingrediente activo es también de importancia para la elección de la forma farmacéutica ya que puede tener un impacto directo en la biodisponibilidad. Para las formas farmacéuticas bucales, una solubilidad mayor del ingrediente activo se cree generalmente que es beneficiosa ya que aumenta la biodisponibilidad. Algunos pacientes, p. ej., los pacientes de edad pueden tener dificultades para tragar los comprimidos y las soluciones bucales en gotas pueden ser una alternativa adecuada que evita la necesidad de tragar los comprimidos. Para limitar el volumen de una solución en gotas bucal, es necesario tener una alta concentración del ingrediente activo en la solución, lo que de nuevo requiere una alta solubilidad del compuesto. Como se muestra en la Tabla 3, las sales de adición del ácido DL-láctico, del L-aspártico, del ácido glutámico, del ácido glutárico y del ácido malónico tienen una solubilidad excepcionalmente alta.

20 Las formas cristalinas impactan las propiedades de filtración y tratamiento de un compuesto. Los cristales en forma de aguja tienden a ser más difíciles de manipular en un medio de producción ya que la filtración se hace más difícil y emplea más tiempo. La forma cristalizada exacta de una sal dada puede depender p. ej., de las condiciones en las que precipitó la sal. La tasa de adición de la ácido HBr de la presente invención crece en forma de agujas, los cristales se solvatan cuando precipitan en etanol, ácido acético y propanol, pero los cristales de una forma no hidratada, que no tienen forma de aguja, cuando la sal de adición de HBr se precipita en agua, proporcionan propiedades superiores de filtración.

25 La Tabla 3 describe además el pH resultante, es decir el pH en la solución saturada de la sal. Esta propiedad es de importancia porque la humedad no puede evitarse nunca completamente durante el almacenamiento y la acumulación de humedad dará lugar a una disminución de pH en o sobre un comprimido comprendiendo una sal a pH bajo resultante, lo que puede disminuir el periodo de conservación. Además, una sal con un pH resultante bajo puede dar lugar a la corrosión del equipo de proceso si los comprimidos se preparan por granulación en húmedo. Los datos en la Tabla 3 sugieren que las sales de adición del HBr, HCl y del ácido adípico pueden ser superiores a este respecto.

30 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición de HBr en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de HBr presenta picos en un difractograma de polvo de rayos X (DPRX) a aproximadamente 6,08°, 14,81°, 19,26° y 25,38° 2θ, y en particular dicha sal de HBr presenta un DPRX como se representa en la Figura 1.

35 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido DL-láctico (1:1) en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal del ácido DL-láctico presenta picos en un DPRX a aproximadamente 5,30°, 8,81°, 9,44° y 17,24°2θ, y en particular dicha sal de adición del ácido DL-láctico presenta un DPRX como se representa en la Figura 4.

40 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido L-aspártico (1:1) en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición del ácido L-aspártico no está solvatada y presenta picos en un DPRX a aproximadamente 11,05°, 20,16°, 20,60° y 25,00°2θ, y en particular dicha sal del ácido L-aspártico, cuando se mezcla con el ácido L-aspártico presenta un DPRX como se representa en la Figura 17.

45 En una realización, dicha sal de adición del ácido L-aspártico es un hidrato, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicho hidrato de la sal de adición del ácido L-aspártico presenta picos en un DPRX a aproximadamente 7,80°, 13,80°, 14,10° y 19,63°2θ, y en particular dicho hidrato de la sal de adición del ácido L-aspártico, cuando se mezcla con el ácido L-aspártico presenta un DPRX como se representa en la Figura 18.

50 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido glutámico (1:1) en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición del ácido glutámico presenta picos en un DPRX a aproximadamente 7,71°, 14,01°, 19,26° y 22,57°2θ, y en particular dicha sal del ácido glutámico, cuando se mezcla con el ácido glutámico monohidratado presenta un DPRX como se representa en la Figura 19.

55 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido malónico (1:1) en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal

de adición del ácido malónico es la forma α y presenta picos en un DPRX a aproximadamente 10,77°, 16,70°, 19,93° y 24,01°2 θ , o dicha sal de adición del ácido malónico es la forma β y presenta picos en un DPRX a aproximadamente 6,08°, 10,11°, 18,25°, 20,26°2 θ y en particular dicha sal del ácido malónico presenta un DPRX como se representa en la Figura 9 o 10.

5 En una realización, el compuesto de la presente invención es la sal de adición del ácido glutárico (1:1) en una forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición del ácido glutárico presenta picos en un DPRX a aproximadamente 9,39°, 11,70°, 14,05° y 14,58°2 θ , y en particular dicha sal del ácido glutárico presenta un DPRX como se representa en la Figura 8.

10 Tal como se mencionó anteriormente, los compuestos de la presente invención son particularmente muy apropiados para el tratamiento del dolor crónico. El dolor crónico incluye indicaciones tales como el dolor del miembro fantasma, el dolor neuropático, la neuropatía diabética, la neuralgia posherpética (NPH), el síndrome del túnel carpiano (STC), la neuropatía por VIH, el síndrome del dolor regional complejo (CPRS), la neuralgia trigémica/neuralgia del trigémino / tic doloroso, intervención quirúrgica (p. ej., analgésicos posoperatorios), vasculopatía diabética, resistencia capilar o síntomas diabéticos asociados a la insulinitis, dolor asociado a la angina de pecho, dolor asociado a la menstruación, dolor asociado al cáncer, dolor dental, jaqueca, migraña, jaqueca de tipo tensión, neuralgia trigémica, síndrome de la articulación temporomandibular, lesión muscular con dolor miofascial, síndrome de fibromialgia, dolor óseo y de articulaciones (osteoartritis), artritis reumatoide, artritis reumatoide y edema asociado al traumatismo asociado a quemaduras, esguinces o dolor por fractura ósea debido a osteoartritis, osteoporosis, metástasis ósea o por razones desconocidas, gota, fibrositis, dolor miofascial, síndromes torácicos externos, dolor de la espalda superior o dolor de la espalda inferior (en el que el dolor de espalda procede de la enfermedad de la columna vertebral general, regional o primaria (radiculopatía), dolor pélvico, dolor cardíaco de pecho, dolor no cardíaco de pecho, dolor asociado a la lesión de la columna vertebral (SCI), dolor central después del ictus, neuropatía del cáncer, dolor por SIDA, dolor depreanocítico o dolor geriátrico.

En particular, los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de trastornos del humor, tal como la depresión asociada a las indicaciones de dolor crónico listadas anteriormente.

30 El dolor está definido por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) como una sensación desagradable y una experiencia emocional asociada a daño en el tejido real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (IASP Classification of chronic pain, 2ª edición, IASP Press (2002), 210). Aún cuando el dolor es siempre subjetivo sus causas o síndromes pueden clasificarse. "Dolor neuropático" como subtipo está definido por la IASP como "el dolor iniciado o producido por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso".

Diferentes subtipos de dolor neuropático están reconocidos por la IASP, y son ejemplos:

- Alodinia que se define como "un dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor"
- Causalgia que se define como un síndrome de dolor de quemadura mantenido, alodinia e hiperpatía después de una lesión traumática nerviosa, a menudo combinada con disfunción vasomotora y sudomotora y cambios tróficos posteriores".
- Hiperestesia, que se define como "aumento de sensibilidad a la estimulación excluyendo las sensaciones".
- Neuralgia, que se define como "dolor en la distribución de un nervio o nervios".
- Neuritis, que se define como "la inflamación de un nervio o nervios".
- Neuropatía, que se define como "un trastorno funcional o cambio patológico en un nervio: en una mononeuropatía nerviosa, en varias mononeuropatía nerviosas múltiples, si es difusa y bilateral, polineuropatía". La neuropatía puede estar asociada a, p.ej., diabetes en cuyo caso se denomina neuropatía diabética.
- Hiperalgesia, que se define como "una respuesta aumentada a un estímulo que es normalmente doloroso".
- Hiperpatía, que se define como "un síndrome doloroso caracterizado por una reacción anormalmente dolorosa a un estímulo, especialmente a un estímulo repetitivo así como un umbral aumentado".

Los estímulos que provocan el dolor neuropático pueden ser mecánicos o térmicos.

El único perfil farmacológico de los compuestos de la presente invención les hace adecuados para el tratamiento de otras enfermedades, que no están directamente relacionadas con el dolor crónico. Los receptores 5-HT_{2C} están situados p. ej., en las neuronas dopaminérgicas donde la activación ejerce una influencia tónica inhibitoria sobre la liberación de dopamina, y los antagonistas de 5-HT_{2C} efectuarán un aumento en la concentración de dopamina. Los datos presentados en el Ejemplo 23 demuestran que los compuestos de la presente invención, ciertamente, dan lugar a un aumento dependiente de la dosis en las concentraciones extracelulares de dopamina en el cerebro. En este contexto puede suponerse que los antagonistas de 5-HT_{2C} son muy apropiados en particular para el tratamiento de la depresión que es refractaria al tratamiento con los inhibidores selectivos de reabsorción de serotonina [*PsychoPharmacol. Bull.*, 39, 147-166, 2006]. Esta hipótesis haya apoyo en varios estudios clínicos que presentan una combinación de mirtazapina e ISRS que es superior a la de ISRS solo para el tratamiento de pacientes deprimidos con una respuesta clínica inadecuada (depresión resistente al tratamiento, DRT o depresión refractaria) [*Psychother. Psychosom.*75, 139-153,2006]. La mirtazapina es también un antagonista de 5-HT₂ y de 5-HT₃, lo que indica que los compuestos que ejercen inhibición de reabsorción de serotonina en combinación con el antagonismo de 5-HT₂ y de 5-HT₃, tal como los compuestos de la presente invención, son útiles para el tratamiento de DRT, es decir, aumentarán la tasa de remisión para los pacientes que padecen depresión resistente al tratamiento.

Los datos presentados en los Ejemplos 2F y 2G demuestran que los compuestos de la presente invención dan lugar a un aumento en la concentración extracelular de acetilcolina en la corteza prefrontal y en el hipocampo ventral. No existen pruebas clínicas antiguas de que el aumentar las concentraciones de acetilcolina en el cerebro sea una manera de tratar la enfermedad de Alzheimer y la insuficiencia cognitiva en general, es decir la utilización de inhibidores de acetilcolina esterasa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, los compuestos de la presente invención se cree que son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y en la insuficiencia cognitiva, y también en los trastornos del humor, tal como la depresión asociada a la enfermedad de Alzheimer y la insuficiencia cognitiva.

Un segmento de pacientes depresivos responderá al tratamiento con p.ej., ISRS en el sentido de que mejorarán en las escalas de depresión clínicamente relevantes, tales como MADRD y HAMD, pero donde otros síntomas tales como los trastornos del sueño y la insuficiencia cognitiva permanecen. En el presente contexto, los pacientes se dice que responden parcialmente al tratamiento. Debido a los efectos expuestos anteriormente sobre las concentraciones de acetilcolina, los compuestos de la presente invención cabe esperar que sean útiles en el tratamiento de la insuficiencia cognitiva además de la depresión. Los estudios clínicos han demostrado que el compuesto prazosin, que es un antagonista receptor α -1 adrenérgico reduce los trastornos del sueño [*Biol. Psychiatry.*, 61, 928-934, 2007]. Además, el antagonismo de 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} de los compuestos de la presente invención se cree también que tiene un efecto sedante, mejorador del sueño [*Neuropharmacol.*, 33, 467-471, 1994] por esta razón los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de los pacientes que responden parcialmente o dicho de otra manera los pacientes con los compuestos de la presente invención reducirán la fracción de pacientes que responden parcialmente.

El trastorno de hiperactividad con falta de atención (THFA) es uno de los trastornos del neurocomportamiento más frecuentes. El THFA se caracteriza por la presencia de una triada de alteraciones sociales y comunicativas con comportamientos restringidos, repetitivos o estereotipados. El THFA normalmente comienza norepinefrina la niñez o adolescencia, pero los síntomas pueden continuar en la edad adulta. La atomoxetina es actualmente la única sustancia no estimulante aprobada pr la FDA para el tratamiento del THFA [*Drugs*, 64, 205-222, 2004]. La atomoxetina es un inhibidor de la reabsorción de la norepinefrina, y esto sugiere qué compuestos de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento del THFA. Además, los compuestos de la presente invención pueden tener un efecto sedante debido al receptor α -1 adrenérgico y al antagonismo de 5-HT₂ expuesto anteriormente, lo que es beneficioso en el tratamiento del THFA.

La melancolía es un subtipo específico de depresión con frecuencia relacionado con la depresión grave; este tipo de depresión se denomina también depresión melancolía. La melancolía está asociada a la ansiedad, miedo al futuro, insomnio y pérdida de apetito. Los compuestos que inhiben la reabsorción tanto de serotonina como de la norepinefrina, tal como p.ej., venlafaxina, se ha demostrado que son efectivos específicos en el tratamiento de pacientes con depresión grave y melancolía [*Depres. Anxiety.*, 12, 50-54, 2000]. Como se expuso anteriormente, los compuestos que ejercen el antagonismo de 5-HT_{2C} aumentan la concentración de dopamina, de aquí que cabe esperar que dichos compuestos sean eficaces en el tratamiento de la melancolía [*Psychopharm.*, 39, 147-166, 2006]. Además, el receptor α -1 adrenérgico y el antagonismo de 5-HT₂ de los compuestos de la presente invención cabe esperar que ayuden a normalizar el sueño, de aquí que dichos compuestos son útiles en el tratamiento de la melancolía.

La FDA ha aprobado recientemente la sertralina y la paroxetina, dos SSRI, para el tratamiento del trastorno del estrés postraumático (TEPT). Además, los compuestos con actividad antagonística de 5-HT_{2A} son útiles ya que cabe esperar que sean capaces de contener la agitación, el insomnio y el carácter

explosivo en pacientes con TEPT [*Curr. Opinion Invest., Drug*, 4, 37-41, 2003]. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención cabe esperar que sean útiles en el tratamiento del TEPT.

5 Los rubores es un síntoma asociado a la transición menopáusica. Algunas mujeres pueden padecerlo en una medida en la que interfiere con el sueño o las actividades en general, y en la que el tratamiento es necesario. La terapia hormonal de sustitución con estrógeno se ha demostrado práctica durante décadas, sin embargo, recientemente la preocupación ha sido expresada en los efectos secundarios, tales como el cáncer de mama y episodios cardíacos. Las pruebas clínicas con SSRI y SNRI han demostrado que estos compuestos tienen un efecto sobre los rubores, si bien menos que para los estrógenos [*J. Am. Med. Ass.*, 295, 2057-2071, 2006]. El tratamiento de los rubores con compuestos que inhiben la reabsorción de la serotonina y/o norepinefrina, p. ej., los compuestos de la presente invención podrían ser, sin embargo, un tratamiento alternativo para las mujeres que no pueden o no aceptarán los estrógenos.

15 La apnea del sueño o el síndrome de la apnea-hiponea del sueño obstructivo o la respiración desordenada del sueño obstructivo es un trastorno para el que una farmacoterapia eficaz queda por identificar. Varios estudios en animales, sin embargo, sugieren que los antagonistas de 5-HT₃, p. ej., los compuestos de la presente invención pueden ser eficaces en una intervención terapéutica [*Sleep*, 21, 131-136, 1998; *Sleep*, 8, 871, 878, 2001].

20 El antagonista de 5-HT₃ ondansetrón se ha mostrado recientemente eficaz en el tratamiento de la bulimia, tal como el alcohol, la nicotina o la bulimia de carbohidratos; y el alcoholismo y la drogodependencia.

Otras utilidades sugeridas de los antagonistas de 5-HT₃ incluyen el vómito, en particular el vómito provocada por la quimioterapia, trastornos de la alimentación, tal como la bulimia y el síndrome del intestino irritable (IBS) [*Exp. Opin. Ther. Targets.*, 11, 527-540, 2007].

25 Los compuestos de la presente invención que están dotados de un único perfil farmacológico cabe esperar además que sean útiles en el tratamiento de trastornos afectivos, depresión, trastorno de depresión mayor, depresión posnatal, depresión asociada al trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, psicosis o enfermedad de Parkinson, ansiedad, trastorno general de ansiedad, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, ataques de pánico, fobias, fobia social, agorafobia e incontinencia urinaria por tensión.

30 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento del dolor crónico, la depresión en pacientes que responden en parte, depresión resistente al tratamiento, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cognitiva, THFA, melancolía, TEPT, rubores, apnea del sueño, alcoholismo, dependencia de la nicotina o bulimia de carbohidratos, dependencia de fármacos, alcoholismo o drogodependencia, vómitos, trastornos de la alimentación, IBS, trastornos afectivos, depresión, trastorno depresivo mayor, depresión posnatal, depresión asociada al trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, psicosis o enfermedad de Parkinson, ansiedad, trastorno de ansiedad general, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, ataques de pánico, fobia, fobia social, agorafobia o incontinencia urinaria por estrés, comprendiendo el método la administración a un paciente necesitado de ella de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto I. En una realización, dicho paciente que está siendo tratado de cualquiera de las enfermedades listadas anteriormente ha sido diagnosticado inicialmente de dicha enfermedad.

45 En una realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento del dolor crónico, comprendiendo el método administrar a un paciente necesitado del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto I. En una realización, dicho dolor crónico se selecciona de entre el dolor del miembro fantasma, neuropatía diabética, neuralgia proteínas-herpética (NPH), el síndrome del túnel carpiano (STC), neuropatía por VIH, síndrome del dolor regional complejo (CPRS), neuralgia trigémica/neuralgia del trigémino/tic doloroso, intervención quirúrgica (p. ej., analgésicos posoperatorios), vasculopatía diabética, resistencia capilar o síntomas diabéticos asociados a la insulinitis, dolor asociado a la angina de pecho, dolor asociado a la menstruación, dolor asociado al cáncer, dolor dental, jaqueca, migraña, jaqueca de tipo tensión, neuralgia trigémica, síndrome de la articulación temporomandibular, lesión muscular con dolor miofascial, síndrome de fibromialgia, dolor de huesos y de articulación (osteoartritis), artritis reumatoide, artritis reumatoide y edema resultante del traumatismo asociado a quemaduras, esguinces o dolor por fractura ósea debido a la osteoartritis, osteoporosis, metástasis ósea o por razones desconocidas, gota, fibrositis, dolor miofascial, síndromes torácicos externos, dolor de la espalda superior o dolor de la espalda inferior (en las que el dolor de espalda procede de la enfermedad de la columna vertebral general, regional o primaria (radiculopatía), dolor pélvico, dolor cardíaco en el pecho, dolor no cardíaco en el pecho, dolor asociado a la lesión de la columna vertebral (SCI), dolor después del ictus central, neuropatía de cáncer, dolor de SIDA, dolor depranocítico o dolor geriátrico.

55 En una realización, dicho dolor crónico es el dolor neuropático.

En una realización, dicho dolor neuropático se selecciona de entre hiperpatia, hiperalgesia, neuropatía, neuropatía diabética, neuritis, neuralgia, hiperestesia, causalgia y alodinia.

En una realización, el compuesto de la invención se administra en una cantidad de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día.

5 Una dosis oral típica está comprendida en el intervalo entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, preferentemente desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal al día, administrada en una o más dosis tal como 1 a 3 dosis. La dosis exacta dependerá de la frecuencia y del modo de administración. Del sexo, edad, peso y estado general del paciente tratado, la naturaleza y la severidad de la enfermedad tratada y cualquier enfermedad correspondiente que ha de tratarse y otros factores evidentes para los expertos en la materia.

10 Una dosis oral típica para adultos está comprendida en el intervalo entre 1 y 100 mg/día de un compuesto de la presente invención, tal como 1 a 30 mg/día o 5 a 25 mg/día. Esto por lo general puede conseguirse mediante la administración de 0,1 a 50 mg tal como 1 a 25 mg, tal como 1, 5, 10, 15, 20 ó 25 mg del compuesto de la presente invención una o dos veces al día.

15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto tal como se utiliza en la presente memoria significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de la enfermedad dada y sus complicaciones en una intervención terapéutica que comprende la administración de dicho compuesto. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz". El término incluye además cantidades suficientes para curar, aliviar y detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones en un tratamiento que comprende la administración de dicho compuesto. Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y el estado general del paciente. Debe entenderse que determinar una dosis apropiada puede conseguirse utilizando experimentación de rutina construyendo una matriz de valores y diferentes puntos de ensayo, que están todos dentro de las habilidades ordinarias de un medico entrenado.

20 El término "tratamiento" como se utiliza en la presente memoria significa la gestión y atención de un paciente con el fin de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. El término se pretende que incluya el espectro completo de tratamientos para una enfermedad dada de la que padece el paciente, tal como la administración de un compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retardar la evolución de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o mitigar los síntomas y complicaciones y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección así como para prevenir la afección, en la que la prevención debe sobreentenderse como la gestión y atención de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el comienzo de los síntomas o complicaciones. No obstante, el tratamiento profiláctico (preventivo) y terapéutico (curativo) son dos aspectos separados de la invención. El paciente que va a tratarse es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano.

30 En una realización, la invención se refiere a a la utilización de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor crónico, la depresión en pacientes que responden en parte, depresión resistente al tratamiento, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cognitiva, THFA, melancolía, TEPT, rubores, apnea del sueño, alcoholismo, dependencia de la nicotina o bulimia de carbohidratos, dependencia de fármacos, alcoholismo o drogodependencia, vómitos, trastornos de la alimentación, IBS, trastornos afectivos, depresión, trastorno depresivo mayor, depresión posnatal, depresión asociada al trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, psicosis o enfermedad de Parkinson, ansiedad, trastorno de ansiedad general, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, ataques de pánico, fobia, fobia social, agorafobia o incontinencia urinaria por estrés.

45 En una realización, la invención se refiere a la utilización de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor crónico, tal como el dolor neuropático.

50 En una realización, la invención se refiere a compuestos de la presente invención para su utilización como medicamentos para el tratamiento del dolor crónico, la depresión en pacientes que responden en parte, la depresión resistente al tratamiento, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cognitiva, THFA, melancolía, TEPT, rubores, apnea del sueño, alcoholismo, dependencia de la nicotina o bulimia de carbohidratos, dependencia de fármacos, alcoholismo o drogodependencia, vómitos, trastornos de la alimentación, IBS, trastornos afectivos, depresión, trastorno depresivo mayor, depresión posnatal, depresión asociada al trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, psicosis o enfermedad de Parkinson, ansiedad, trastorno de ansiedad general, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, ataques de pánico, fobia, fobia social, agorafobia o incontinencia urinaria por estrés.

55 En una realización, la invención se refiere a compuestos de la presente para su utilización como medicamento para el tratamiento del dolor crónico, tal como el dolor neuropático.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos en forma de un compuesto puro o combinados con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, en una sola o múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvantes y excipientes conocidos según las técnicas convencionales tales como las dadas a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse específicamente para la administración por cualquier vía adecuada, tal como la vía oral, rectal, nasal, pulmonar, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, intracisternal, intraperitoneal, vaginal y parenteral (incluyendo la vía subcutánea, intramuscular, intratecal, intravenosa e intradérmica) siendo preferida la vía oral. Se apreciará que la vía preferida dependa de la enfermedad general y la edad del paciente que se va a tratar, la naturaleza de la enfermedad que va a tratarse y del ingrediente activo seleccionado. Las composiciones farmacéuticas para administración oral incluyen las formas farmacéuticas sólidas, tales como capsulas, comprimidos, grajeas, píldoras, pastillas, polvos y gránulos, cuando procedan pueden prepararse con revestimientos.

Las fórmulas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen soluciones, emulsiones suspensiones, jarabes y elixires.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones, dispersiones, soluciones o emulsiones inyectables acuosas y no acuosas estériles así como polvos estériles para ser redisueltos en soluciones o dispersiones inyectables antes de su utilización.

Otras formas de administración adecuadas incluyen supositorios, pulverizadores, pomadas, cremas, geles, inhaladores, parches dérmicos, implantes, etc.

Convenientemente, los compuestos de la invención se administran en una forma farmacéutica unitaria que comprende dichos compuestos en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 50 mg, tal como 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 o 25 mg de un compuesto de la presente invención.

Por vías parenterales tales como intravenosa, intratecal, intramuscular y administración similares, por lo general las dosis son del orden de aproximadamente la mitad de la dosis empleada para la administración oral.

Para la administración parenteral, las soluciones del compuesto de la invención en la solución acuosa estéril, propilenglicol acuoso, vitamina E acuosa o aceite de sésamo o de cacahuete pueden emplearse. Dichas soluciones acuosas deberían estar tamponadas de manera adecuada si es necesario y el primer diluyente líquido se haría isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Las soluciones acuosas son particularmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. Los medios acuosos estériles empleados están todos fácilmente disponibles por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes o cargas, sólidos inertes, solución esterilizada acuosa y varios disolventes orgánicos. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar-agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y éteres de alquilo inferior de celulosa. Ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácido graso, polioxietileno y agua. Las composiciones farmacéuticas formadas combinando el compuesto de la invención y los vehículos farmacéuticos aceptables se administran a continuación fácilmente en varias formas farmacéuticas adecuadas para las vías de administración dadas a conocer.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades descritas tales como capsulas o comprimidos, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del ingrediente activo, y que pueden incluir un excipiente adecuado. Además, las formulaciones disponibles por vía oral pueden estar en forma de polvo o gránulos, una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite.

Si se utiliza un vehículo sólido para la administración oral, la preparación puede ser un comprimido, p. ej., colocado en una capsula de gelatina dura en polvo o en forma de gránulos o en forma de una grajea o de pastilla. La cantidad de vehículo sólido puede variar pero normalmente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g.

Si se utiliza un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de jarabe, emulsión, capsula de gelatina dura o de líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

Los comprimidos pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con adyuvantes o diluyentes ordinarios seguidos por compresión de la mezcla en una máquina de elaboración de comprimidos convencional. Ejemplos de adyuvantes o diluyentes comprenden: almidón de maíz, almidón de patata, talco, estearato de magnesio, gelatina, lactosa, cauchos y similares. Cualquier otro adyuvante o aditivo utilizado para dichos fines tales como colorantes, aromatizantes, conservantes, etc. Pueden utilizarse con tal que sean compatibles con los ingredientes activos.

Las cápsulas que comprenden un compuesto de la presente invención pueden prepararse mezclando un polvo que comprende dicho compuesto con celulosa microcristalina y estearato de magnesio y colocar dicho polvo en una capsula de gelatina dura. Opcionalmente dicha capsula puede colorearse por medio de un pigmento adecuado. Por lo general, las capsulas comprenderán 0,25 al 20% de un compuesto de la presente invención, tal como 0,5 al 1,0%, 3,0 al 4,0%, 14,0 al 16,0% de un compuesto de la presente invención. Estos poderes pueden utilizarse para administrar convenientemente 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg de un compuesto de la presente invención en una forma farmacéutica unitaria.

Las soluciones para inyecciones pueden prepararse disolviendo el ingrediente activo y posibles aditivos en una parte del disolvente para inyección, preferentemente agua esterilizada, ajustando la solución al volumen deseado, esterilizando la solución y llenándola en ampollas o viales adecuados. Cualquier aditivo adecuado convencionalmente utilizado en la técnica puede añadirse, tales como agentes de tonicidad, conservantes, antioxidantes, etc.

El compuesto I puede prepararse como se esboza en el documento WO 2003/029232. Las sales del compuesto I pueden mediante adición de un ácido apropiado seguido de precipitación. La precipitación puede provocar p. ej., enfriamiento, eliminación del disolvente, adición de otro disolvente o de una mezcla del mismo.

Todas las referencias incluyendo todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en la presente memoria se incorporan de este modo por alusión en su totalidad y en la misma medida como si cada referencia se indicase individualmente y específicamente para incorporarse por referencia y se publicaron en su totalidad en la presente memoria (en la máxima medida permitida por la Ley), independientemente de cualquier incorporación proporcionada por separado de documentos particulares preparados en cualquier parte en la presente memoria.

La utilización de los términos “un” y “una” y “el” y “la” y sus referentes similares en el contexto de la descripción de la invención deben considerarse que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en la presente memoria o que se contradiga claramente por el contexto. Por ejemplo, la frase “el compuesto” que debe entenderse que se refiere a varios “compuestos” de la invención o a un aspecto específico descrito a menos que se indique de otra manera.

A menos que se indique de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en la presente memoria son representativos de los valores aproximados correspondientes (p. ej., todos los valores ilustrativos exactos proporcionados con respecto a un factor específico o medición pueden considerarse también que proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por “aproximadamente”, cuando proceda).

La descripción en la presente memoria de cualquier aspecto o aspecto de la invención utilizando términos tales como “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” o “que contiene” con referencia a un elemento o elementos se desea que proporcione apoyo para un aspecto similar o aspecto de la invención que “consiste en”, “consiste esencialmente en” o “comprende sustancialmente” que el elemento o elementos particulares, a menos que se indique de otra manera o que se contradiga claramente por el contexto (p. ej., una composición descrita en la presente memoria que comprende un elemento particular debe sobreentenderse como que describe también una composición que consiste en este elemento, a menos que se indique de otra manera o que se contradiga claramente por el contexto).

Ejemplos

Métodos analíticos

Los difractogramas en polvo de rayos X (DPRX) se midieron en un difractómetro de rayos X PANalytical X'Pert PRO utilizando la radiación $\text{CuK}_{\alpha 1}$. Se midieron las muestras en modo de reflexión en el intervalo 2θ 50-40° utilizando un detector acelerador de X.

Se midió la composición elemental (CHN) en un instrumento Elemental Vario EL de Elemental. Se utilizaron aproximadamente 4 mg de la muestra para cada medición y los resultados se dan como valores medios de dos mediciones.

Ejemplo 1a Sal de HBr del compuesto I

A 442 gramos de éster etílico del ácido 4-(2-p-tolilsulfanil-fenil)-piperidina-1-carboxílico agitado y calentado ligeramente (aprox. a 45°C) como aceite se añadieron 545 ml de 33% en peso de HBr en AcOH

(5,7 M, 2,5 eqv.). Esta mezcla proporciona una exoterma de 10°C. Después de la adición final la mezcla de reacción se calienta a 80°C y se deja durante 18 horas. Se retira una muestra y se analiza por HPLC y si no se completa más debe añadirse HBr al 33% en peso en AcOH. De otro modo se enfría la mezcla a 25°C haciendo precipitar el producto hidrobromuro de 4-(2-p-tolilsulfanil-fenil)-piperidina. Después de una hora a 25°C la suspensión espesa se añaden 800 ml de éter dietílico. Se continúa la agitación durante otra hora antes de aislar el producto por filtración, se lava con 400 ml de éter dietílico y se seca al vacío a 40°C durante la noche. El hidrobromuro del compuesto I se aisló como sólido blanco.

Ejemplo 1b Sal HBr del compuesto I

Bromuro de 2-(4-tolilsulfanil)-fenilo

10 En un reactor cubierto con nitrógeno agitado, la N-metil.pirrolidona NMP (4,5 l) se roció con nitrógeno durante 20 minutos. Se añadió 4-metilbencenotiol (900 g, 7,25 moles) y a continuación 1,2-dibromobenceno (1709 g, 7,25 moles). Se añadió finalmente terc-butóxido de potasio (813 g, 7,25 moles) como último reactante. La reacción fue exotérmica proporcionando un aumento de temperatura de la mezcla de reacción hasta 70°C. la mezcla de reacción se calentó a continuación a 120°C durante 2 a 3
15 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (4 l) y solución acuosa de cloruro sódico (15%, 2,5 l). Se agitó la mezcla durante 20 minutos. La fase acuosa se separó y se extrajo con otra fracción de acetato de etilo (2 l). Se separó la fase acuosa y se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con solución de cloruro de sodio (15%, 2,5 l). Se separó la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida hasta un aceite rojo que contiene 20 a 30% de NMP.
20 Se diluyó el aceite a dos veces el volumen con metanol y la mezcla se calentó a reflujo. Se añadió más metanol hasta que se obtuvo una solución de color rojo claro. Se enfrió la solución lentamente a temperatura ambiente mientras se sembraba. El producto cristaliza en forma de cristales de color blanco desvaído, se aislaron por filtración y se lavó con metanol y se secó a 40°C en una estufa al vacío hasta peso constante.

4-hidroxi-4-(2-(4-tolilsulfanil)fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo

25 En un reactor agitado bajo capa de nitrógeno se puso en suspensión bromuro de 2-(4-tolilsulfanil)-fenilo (600 g, 2,15 moles) en heptano (4,5 l). A la temperatura ambiente se añadió BuLi (235 ml, 2,36 moles) 10 M en hexano a temperatura ambiente durante 10 minutos. Solo se observó una pequeña exoterma. Se agitó la suspensión durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se enfrió hasta -40°C. Se disolvió 1-carboxi-4-piperidona (368 g, 2,15 moles) en THF (1,5 l) a un ritmo no más rápido que la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de -40°C. Cuando se completó la
30 reacción se calentó a 0°C y se añadió HCl 1 M (1 l) a 0°C manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. Se separó la fase ácida acuosa y se extrajo con acetato de etilo (1 l). Se combinaron las fases orgánicas y se extrajeron con solución de cloruro sódico (15%, 1 l). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó hasta una masa semicristalina. Se puso en suspensión con éter etílico (250 ml) y se filtró. Se secó al vacío en estufa a 40°C hasta peso constante.

4-(2-(4-tolilsulfanil)fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo

40 Se cargaron ácido trifluoroacético (2,8 kg, 24,9 moles) y trietilsilano (362 g, 3,1 moles) en un reactor con un agitador eficiente. Se añadió 4-hidroxi-4-(2-(4-tolilsulfanil)fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo (462 g, 1,24 moles) mediante un embudo para polvo en fracciones. La reacción fue ligeramente exotérmica. La temperatura subió hasta 50°C. Una vez finalizada la adición se calentó la mezcla de reacción a 60°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente.

45 Se añadieron tolueno (750 ml) y agua (750 ml). Se aisló la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con otra fracción de tolueno (750 ml). Se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con solución de cloruro sódico (15%, 500 ml) y se secaron sobre sulfato sódico. Se filtró el sulfato sódico, se evaporó el filtrado a presión reducida hasta un aceite rojo que se procesó más en la etapa siguiente.

Hidrobromuro de 4-(2-(4-tolilsulfanil)fenil)-piperidin

50 El 4-(2-(4-tolilsulfanil)fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo en forma de aceite rojo del ejemplo 3 se mezcló en un reactor agitado con ácido bromhídrico en ácido acético (40%, 545 ml, 3,11 moles). Se calentó la mezcla a 80°C durante 18 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento cristalizó el producto. Después de 1 hora a temperatura ambiente se añadió éter etílico (800 ml) a la mezcla de reacción, y la mezcla se agitó durante otra hora. Se filtró el producto, se lavó con éter etílico y se secó en una estufa de vacío a 50°C hasta peso constante.

Ejemplo 1c Recristalización de la sal de HBr del compuesto I

55 Una mezcla de 10,0 gramos de la sal del HBr del compuesto I, p. ej., como anteriormente, se calentó a reflujo en 100 ml de H₂O. La mezcla se volvió clara y se disolvió totalmente a 80-90°C. A la solución transparente se añadió 1 gramo de carbón vegetal y se continuó el reflujo durante 15 minutos

antes de filtrar y se dejó enfriar espontáneamente a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento, tuvo lugar la precipitación del sólido blanco y se agitó la suspensión durante 1 hora a temperatura ambiente. La filtración y el secado al vacío a 40°C durante la noche produjo 6,9 gramos (69%) de la sal de adición del ácido HBr del compuesto I. Para XRPD véase la figura 1. Análisis elemental: 3,92% N, 59,36% C, 6,16% H (en teoría: 3,85% N, 59,34% C, 6,09% H).

Ejemplo 1d. Preparación de soluciones madre de la base libre

A una mezcla de 500 ml de acetato de etilo y 200 ml de H₂O se añadieron 50 gramos de la sal del HBr del compuesto I produciendo una suspensión en dos fases. A esta suspensión se añadieron aproximadamente 25 ml de NaOH conc., que ocasionó la formación de una solución transparente en dos fases (se midió el pH a 13-14). Se agitó intensamente la solución durante 15 minutos y se separó la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica con 200 ml de H₂O, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó al vacío a 60°C produciendo la base libre en 38 gramos de rendimiento (99%) como un aceite casi incoloro.

Disolviendo 10 gramos del aceite y ajustando el volumen a 150 ml utilizando acetato de etilo produjo una solución madre 0,235 M en acetato de etilo de la que se utilizaron alícuotas de 1,5 ml (100 mg de la base libre).

Disolviendo 10 gramos del aceite y ajustando el volumen a 100 ml utilizando EtOH de 96% vol. se produjo una solución madre 0,353 M en EtOH de la que se utilizaron alícuotas de 1,0 ml (100 mg de la base libre).

Ejemplo 1e. Formación de sales utilizando soluciones madre de la base libre

Se colocaron las alícuotas dadas en tubos de ensayo y mientras se agitaba la cantidad apropiada de ácido se añadió como se indica en la Tabla 1. Si el ácido era un líquido se añadía puro sino se disolvía en el disolvente dado antes de la adición. Después de mezclar y de la precipitación se continuó agitando durante la noche y se recogió el precipitado por filtración. Antes de secar al vacío a 30°C se retiró una pequeña muestra de referencia y se secó a temperatura ambiente sin vacío. Este procedimiento se incluyó para probar los solvatos. Algunos resultados se presentan en la Tabla 1. Los difractogramas de XRPD se presentan en las figuras 1 a 22 y las posiciones del pico seleccionado se tabulan en la Tabla 2. La Tabla 3 presenta las solubilidades de los compuestos de la presente invención en agua junto con el pH en la solución saturada resultante. La columna "precipitado" muestra si el precipitado aislado después de la determinación de la solubilidad es idéntico al compuesto disuelto, lo que es indicativo de la formación de hidratos.

Tabla 1

Acido (Base: ácido)	P.M. (g/mol)	Cantidad de ácido (mg o µl)	Disolvente	CHN (exp.)	CHN (en teoría)
Ácido palmítico, ácido hexadecanoico 1:1	256,42	90,5	EtOAc	75,36 9,77 2,46	75,64 9,9 2,6
Ácido DL-láctico, ácido DL-2-hidroxi propiónico 1:1	90,1	31,8	EtOAc	66,88 7,26 3,52	67,53 7,29 3,75
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 1:1	146,14	51,6	EtOAc	66,08 7,23 2,98	67,1 7,27 3,26
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 2:1	146,14	25,8	EtOAc	70,66 7,32 3,82	70,75 7,35 3,93
Ácido fumárico 1:1	116,01	40,9	EtOH	65,71 6,41 3,35	66,14 6,31 3,51
Ácido glutárico, ácido 1,5-pentanodioico 1:1	132,12	46,6	EtOAc	66,09 6,97 3,2	66,48 7,03 3,37
Ácido malónico 1:1	104,1	36,7	EtOAc	65,04 6,53 3,54	65,09 6,5 3,62
Ácido oxálico 1:1	90,1	31,8	EtOH	64,28 6,41 3,61	64,32 6,21 3,75
Ácido sebacoínico, ácido 1,8-octanodioico 2:1	202,02	35,6	EtOAc	71,79 7,86 3,58	71,83 7,86 3,64
Ácido succínico, ácido 1,4-butanodioico 2:1	118,1	20,8	EtOAc	65,65 6,86 3,4	65,80 6,78 3,49 (1:1 sal formada)
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico 1:1, α	134,1	47,3	EtOAc	62,87 6,20 3,22	63,29 6,52 3,36
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico 1:1, β	134,1	47,3	EtOH	62,99 6,66 3,13	63,29 6,52 3,36
Ácido D-tartárico, ácido D-2,3-dihidroxi butanodioico, 1:1	150,1	53,0	EtOH	60,67 6,4 3,07	60,95 6,28 3,23
Ácido L-aspártico 1:1	133,1	47,0	EtOH	59,31 6,7 7,1 (contiene exceso de ácido)	63,43 6,78 6,73
Ácido glutámico 1:1	165,15	58,3	EtOH	56,38 6,88 7,35 (contiene exceso de ácido)	56,46 6,94 7,06 (para la sal y el ácido 1:1 monohidratado 1:1)
Ácido cítrico 2:1	192,13	33,9	EtOAc	65,93 6,72 3,44	66,46 6,64 3,69
HCl/Et ₂ O 1:1	2 M	176,4	EtOH		
Ácido fosfórico 1:1	14,7 M	24,0	EtOAc	55,79 6,47 3,43	56,68 6,34 3,67

Tabla 2: Posiciones seleccionadas del pico por raxos X ($^{\circ}2\theta$), 2:1 significa 2 bases para 1 ácido. Todos los valores $\pm 0,1^{\circ}$

Palmitato	7,00	16,34	22,73	28,21
Estearato	6,70	15,52	21,81	28,91
Lactato	5,30	8,18	9,44	17,24
Lactato hidratado	11,67	16,70	18,25	21,76
Hidroxil -isobutirato	5,09	16,60	20,38	27,37
Sal del ácido sebacoínico	7,18	12,53	21,11	24,19
Sal del ácido adipínico 2:1	8,03	13,52	17,90	24,60
Sal del ácido adipínico 1:1 α	9,33	14,01	18,72	20,63
Sal del ácido adipínico 1:1 β	15,69	21,53	25,81	31,18
Glutarato 1:1	9,39	11,70	14,05	14,58
Succinato 1:1	11,74	14,33	17,75	26,84
Fumarato 1:1	8,90	11,47	19,25	22,33
Fumarato 2:1	8,49	12,48	17,78	23,97
Maleato 1:1	12,11	15,51	17,48	22,53
Maleato 1:1 hidratado	12,81	18,76	20,53	27,71
Malonato α	10,77	16,70	19,93	24,01
Malonato β	6,08	10,11	18,25	20,26
Aspartato	11,05	20,01	20,60	25,00
Aspartato hidratado	7,80	13,80	14,10	19,63
Glutamato	7,71	14,01	19,26	22,57
Oxalato	14,68	17,45	19,50	23,90
Malato 1:1 α	8,30	12,04	17,23	20,67
Malato 1:1 β	10,91	12,87	14,14	26,16
Malato hidratado	12,30	15,56	19,56	23,30
D-tartrato (de EtOH)	5,08	17,18	19,42	22,10
Hidrocloreuro	12,44	16,72	19,45	25,02
Hidrobromuro	6,08	14,81	19,26	25,38
Hidrobromuro de I-PrOH	6,57	13,12	19,07	24,77

Tabla 3

Ácido (Base:Ácido)	Solubilidad (mg/ml)	pH resultante	Precipitado
Ácido palmítico, ácido hexadecanoico 1:1	0,4	8,6	= Principio
Ácido DL-láctico, ácido DL-2-hidroxi propiónico 1:1	>150	6,1	= Principio (después de la evaporación)
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 1:1	2,5	4,0	Sal parcialmente 2:1
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 2:1	1,0	7,8	= Principio
Ácido fumárico 1:1	0,2	3,3	= Principio
Ácido glutárico, ácido 1,5-pentanodioico 2:1	13	4,6	= Principio
Ácido malónico 2:1(α)	5,2	4,0	= nueva formulación (β)
Ácido oxálico 1:1	1,1	2,7	= Principio
Ácido sebacoínico, ácido 1,8-octanodioico 2:1	0,7	5,5	= Principio
Ácido succínico, ácido 1,4-butanodioico 2:1	2,0	4,0	Hidrato
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico 1:1, β	2,8	4,0	Hidrato
Ácido D-tartárico, ácido D-2,3-dihidroxi butanodioico, 1:1	1,8	3,5	Hidrato
Ácido L-aspártico 1:1	39	4,3	Hidrato
Ácido glutámico 1:1	> 35	4,6	-
Ácido cítrico 2:1	0,5	4,7	= Principio
Ácido fosfórico 1:1	6,0	2,0	?
HCl	4,5	6,8	= Principio
HBr	2,4	7,0	= Principio

Ejemplo 2A Inhibición de la reabsorción de serotonina (5-HT) y de norepinefrina (NE)

5 Se incubaron previamente durante 10 min a 37°C alícuotas del compuesto de ensayo y una preparación de sinaptosoma cortical de rata y a continuación se añadió [³H]NE o [³H]5-HT (concentración final 10 nM). Se determinó la absorción no específica en presencia de talsupram o citalopram 10 μM y se determinó la absorción total en presencia de tampón. Se incubaron alícuotas durante 15 minutos a 37°C. 10 Tras la incubación [³H]NE o [³H]5-HT absorbidas por los sinaptosomas se separaron por filtración a través de Unifilter GF/C empapado previamente en PEI al 0,1% durante 30 minutos utilizando un programa Tomtec Cell Harvester. Se lavaron los filtros y se hizo el recuento en un contador MicroBeta Wallac.

En NET los compuestos de la presente invención presentan un valor IC₅₀ de 23 mM. En ese SRT los compuestos de la presente invención presentan un valor de IC₅₀ de 8 mM.

Ejemplo 2B Antagonismo 5-HT_{2A}

15 Se determinaron las afinidades para con los receptores de serotonina en los compuestos de la presente invención y se observó que presentan un perfil antagonista con afinidad a los receptores 5-HT_{2A} (K_i 54 nM). La afinidad se calcula a partir de $Y = 100 / (1 + 10^{(X - \log IC_{50})})$ en la que Y indica % de enlace y X indica la concentración del compuesto. Se utilizaron 5 concentraciones del compuesto (1, 10, 20, 30, 100,

1000 nM) para calcular el valor de IC_{50} . Se calculó K_i a partir de la ecuación de Cheng Prusoff $K_i = (IC_{50}/(1+(LJ/Kd)))$. Se determinó en MDL Pharmaservices nº de catálogo 271650.

5 En las células de mamíferos que expresan los receptores 5-HT_{2A} humanos los compuestos de la presente invención presentan propiedades antagonistas competitivas. Los compuestos se unen a receptores 5-HT_{2A} con una $K_i < 100$ nM y en un análisis funcional los compuestos antagonizan la liberación provocada por 5-HT del Ca^{2+} de los almacenes intracelulares con una K_b de 67 nM. Un análisis de Schild dio a conocer el antagonismo competitivo con un K_b de 100 nM.

10 El experimento se realizó de la manera siguiente. 2 o 3 días antes del experimento con las células CHO que expresan 250 fmoles/mg de receptores 5-HT_{2A} humanos se colocan a una densidad suficiente para dar una monocapa confluyente el día del experimento. Las células se cargan con colorante (kit Ca^{2+} de Molecular Devices) durante 90 minutos a 37°C en una incubadora con 5% de CO_2 a 95% de humedad. La fluorescencia de referencia se controló en un lector de placas de detección por la imagen fluorométrica o FLIPR³⁸⁴ de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un intervalo de misión entre 500 y 560 nm. La intensidad del láser se fijó a un nivel apropiado para obtener valores de referencia de aproximadamente 8000 a 10000 unidades de fluorescencia. La variación en la fluorescencia de referencia debería ser inferior al 10%. Los valores de EC_{50} se evalúan utilizando concentraciones crecientes del compuesto de ensayo que abarcan al menos 3 décadas. Se evalúan los valores de pA_2 realizando la prueba de provocación de las curvas de respuesta a las dosis completas de 5-HT con cuatro concentraciones diferentes de compuesto (150, 400, 1500 y 4000 nM). Se evaluaron también los valores de K_b efectuando la prueba de provocación de dos décadas de concentración de sustancias de ensayo con EC_{85} de 5-HT. Se añaden sustancias de ensayo a las células 5 minutos antes del 5-HT. Los valores de K_i se calculan utilizando la ecuación de Cheng Prusoff.

15 Ejemplo 2C. Antagonismo del receptor 5-HT_{3A}

25 En ovocitos que expresan los receptores 5-HT_{3A} homómeros humanos 5-HT activa las corrientes con EC_{50} de 2600 nM. Esta corriente puede antagonizarse con antagonistas de 5-HT clásicos tal como ondansetrón. Ondansetrón presenta un valor K_i inferior a 1 nM en este sistema. Los compuestos de la presente invención presentan potente antagonismo a bajas concentraciones (0,1 nM -100 nM) ($IC_{50} \sim 10$ nM/ $K_b \sim 2$ nM) y las propiedades antagonistas cuando se aplican en concentraciones mayores (100 - 100000 nM) ($EC_{50} \sim 2600$ nM) alcanzando una corriente máxima de aproximadamente 70 a 80% de la corriente máxima producida por el propio 5-HT. En los ovocitos que expresan receptores 5-HT_{3A} homómeros de rata 5-HT activa corrientes con una EC_{50} de 3,3 μ M. Los experimentos se realizaron de la manera que sigue. Los ovocitos se extrajeron quirúrgicamente del *Xenopus laevis* hembra madura anestesiada en MS-222 al 0,4% durante 10 a 15 minutos. Los ovocitos se digirieron a continuación a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas con 0,5 mg/ml de colagenasa (tipo IA Sigma-Aldrich) en tampón OR2 (NaCl 82,5 mM, KCl 2,0 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM y HEPES 5,0 mM, pH 7,6). Los ovocitos desprovistos de la capa del folículo se seleccionaron y se incubaron durante 24 horas en tampón salino modificado Barth [NaCl 88 mM, KCl 1 mM, HEPES 15 mM, $NaHCO_3$ 2,4 mM, $CaCl_2$ 0,41 mM, $MgSO_4$ 0,82 mM, $Ca(NO_3)_2$ 0,3 mM] enriquecido con piruvato sódico 2 mM, 0,1 U/l de penicilina y 0,1 μ g/l de estreptomina. Los ovocitos de la etapa IV-IV se identificaron y se inyectaron con 12 a 48 nl de nucleasa exenta de agua que contenía 14 a 50 pg de ARNc que codifica los receptores de los receptores de 5-HT_{3A} humanos y se incubaron a 10°C hasta que se utilizaron para los registros electrofisiológicos (1 a 7 días después de la inyección). Los ovocitos con expresión de receptores 5-HT_{3A} humanos se colocaron en 1 ml de un baño y se perfundieron con tampón de Ringer (NaCl 115 mM, KCl 2,5 mM, HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, $MgCl_2$ 0,1 mM, pH 7,5). Las células se bloquearon con electrodos de 0,5 a 1 M Ω bloqueados con agar-agar que contenía KCl 3 M y un voltaje enclavado a -90 mV mediante un amplificador GeneClamp 500 B. Los ovocitos se perfundieron continuamente con tampón de Ringer y los fármacos se aplicaron en el perfundido. Se aplicaron soluciones de agonista 5-HT durante 10 a 30 s. Las potencias de los antagonistas del receptor 5-HT₃ se examinaron midiendo la respuesta a la concentración frente a la estimulación de 5-HT 10 μ M.

30 Ejempl 2D. Antagonismo del receptor α_{1A}

50 En los compuestos de la presente invención se determinaron las afinidades para con el receptor α_{1A} y se observó que presentan un perfil antagonista con afinidad del medio por los receptores de α_{1A} ($K_i = 34$ mM).

55 El día de los experimentos en las membranas (véase a continuación la descripción de la preparación de la membrana) se descongelaron y se homogeneizaron en tampón utilizando una ultra turrax y se diluyeron a la concentración deseada (5 μ g/pocillo \sim 5 μ g/900 μ l, se almacenan en hielo hasta su utilización).

60 El experimento se inicia mezclando 50 μ l de compuesto de ensayo, 50 μ l de [³H]-Prazosin y 900 μ l de membranas, y la mezcla se incuba durante 20 minutos a 25°C. Se determina el enlace no específico en presencia de WB-4101 10 μ M y el enlace total se determina en presencia de tampón. Después de la incubación, el ligando unido se separa del no unido por filtración a través de Unifilter GF/B, empapado

previamente en PBI al 0,1% durante 30 minutos, utilizando el programa Tomtec Cell Harvester (D42..4). 96 pocillos. Se lavaron los filtros 3 veces con 1 ml de tampón enfriado en hielo, se secaron a 50°C y se añade 35 µl de líquido de centelleo/pocillo a los filtros. La radioactividad ligada se cuenta en un Wallac OY 1450 de MicroBeta. Se calcula la afinidad a partir de $Y = 100/(1+10^{(X-\log IC_{50})})$ en la que Y indica % de enlace y X indica la concentración del compuesto. Las concentraciones del compuesto que abarcan dos décadas se utilizaron para calcular el valor de IC_{50} . K_i se calculó a partir de la ecuación de Cheng Prusoff $K_i = (IC_{50}/(1+(L)/Kd))$.

En un análisis funcional los compuestos de la presente invención antagonizan la liberación de Ca^{2+} provocada por adrenalina de los almacenes intracelulares y un análisis funcional puso de manifiesto que los compuestos eran antagonistas.

Estos experimentos se realizaron esencialmente como se describe a continuación.

Se cultivaron todas las células en medio DMEM enriquecido con BCS al 10%, L-glutamina 4 mM (o 2 mM en el caso de COS-7) y 100 unidades/ml de penicilina más 100 µg/ml de estreptomocina, a 37°C en CO_2 al 5%.

Veinticuatro horas antes de los análisis las células CHO que expresan los receptores α_{1A-7} humanos se sembraron en placas del microvalorador con pared negra de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina. Se aspiró el medio de cultivo y las células se cargaron coloreadas con Fluo-4 1,5 µM en tampón de análisis compuesto por la solución salina equilibrada de Hank (NaCl 138 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 1,3 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, $MgSO_4$ 0,4 mM, KH_2PO_4 0,3 mM, Na_2HPO_4 0,3 mM, glucosa 5,6 mM) más HEPES 20 mM, pH 7,4, BSA al 0,05% y probenidica 2,5 mM (50 µl/pocillo) durante 1 hora en CO_2 a 37°C. Una vez descartado el exceso de colorante, se lavaron las células en tampón de análisis y se cubrieron con un volumen final igual a 45 µl/pocillo (o 30 µl/pocillo por análisis del antagonista). En el caso de la evaluación del antagonista, se añadió antagonista o vehículo en este momento en forma de una alícuota de 15 µl en tampón que contiene DMSO al 4% a 4 veces la concentración final (DMSO final = 1%), seguido de unos 20 min de incubación. La fluorescencia de referencia se controló en un lector de placas de detector por la imagen fluorométrico o FLIPR™ de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un intervalo de emisión entre 500 y 560 nm. Se ajustó la energía de excitación de láser de modo que las lecturas de fluorescencia de referencia fueran aproximadamente 8.000 unidades de fluorescencia relativas (UFR). Se estimularon a continuación las células a temperatura ambiente con agonistas diluidos en tampón de análisis (15 µl) y se midieron las UFR a intervalos de 1,5 segundos durante un periodo de 2,5 min. Se calculó el cambio máximo en fluorescencia para cada pocillo. Se analizaron las curvas de respuesta a la concentración procedentes del cambio máximo por regresión no lineal (ecuación de Hill). Para las determinaciones antagonísticas, después de 20 min de incubación del compuesto (como anteriormente) se añadieron concentraciones fijas de serotonina agonista convencional.

Ejemplo 2E Aumento de dopamina

Una sola inyección de compuestos de la presente invención aumentó en función de la dosis de DA extracelular en la corteza frontal de rata. El compuesto de la presente invención a 8,9 mg/kg y 18 mg/kg s.c., aumentó las concentraciones de DA en aproximadamente el 100% y 150%, respectivamente, por encima de las concentraciones de referencia como se representa en la figura 23. Las cantidades están calculadas como base libre.

Método

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban inicialmente 275 a 300 g. Los animales se alojaron en condiciones controladas por el ciclo de luz/oscuridad de 12 h. para regular la temperatura interior ($21 \pm 2^\circ C$) y la humedad ($55 \pm 5\%$) con alimento y agua corriente disponible a discreción. Durante los experimentos de tratamiento de tres días se utilizaron minibombas osmóticas (Alzet, 2 ML1). Las bombas se llenaron en condiciones asépticas y se implantaron por vía subcutánea bajo anestesia de sevoflurano. Los experimentos se realizaron con las minibombas a bordo. Se recogieron muestras de sangre para medir las concentraciones en el plasma del compuesto de ensayo después de 3 días de tratamiento al final de los experimentos.

Cirugía y experimentos de microdiálisis.

Se anestesiaron los animales con hypnorm-dormicum (2 ml/kg) y cánulas con guía intracerebral (CMA/12) se implantaron estereotóxicamente en el hipocampo, colocando la punta de la sonda de diálisis en el hipocampo ventral (coordenadas: 5,6 mm anterior al bregma, lateral -5,0 mm, 7,0 mm ventral a la duramadre o en la corteza frontal (coordenadas: 3,2 mm anterior al bregma; lateral, 3,0 mm; 4,0 mm ventral a la duramadre). Se utilizaron tornillos de anclaje y cemento acrílico para la fijación de las cánulas de guía. La temperatura corporal de los animales se controló mediante sonda rectal y se mantuvo a 37°C. Se dejó a las ratas recuperarse de la intervención quirúrgica durante 2 días, se alojaron cada una en jaulas. El día del experimento se insertó una sonda de microdiálisis (CMA/12, 0,5 mm de diámetro, 3 mm

de longitud) a través de la cánula de guía. Se conectaron las sondas por un canal giratorio doble a una bomba de microinyección. La perfusión de la sonda de microdialisis con la solución de Ringer filtrada (NaCl 145 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,2 mM) se empezó poco antes de la inserción de la sonda en el cerebro y se continuó durante todo el experimento a un caudal constante de 1 (1,3) µl/min. Después de 180 min de estabilización, se iniciaron los experimentos. Se recogieron los dializados cada 20 (30) min.

Después de los experimentos se sacrificaron las ratas por decapitación, se extrajeron sus cerebros, se congelaron y se cortaron en secciones para la verificación de colocación de la sonda.

Análisis de dializados

Se analizó la concentración de dopamina en los dializados mediante HPLC con detección electroquímica. Se separaron las monoaminas por cromatografía líquida en fase inversa (ODS 150 x 3 mm, 3 µM). Dopamina: fase móvil constituida por NaH₂PO₄ 90 mM, citrato de sodio 50 mM, 367 mg/l de ácido 1-octanosulfónico sódico, EDTA 50 µM y acetonitrilo al 8% (pH 4,0) a un caudal de 0,5 ml/min. La detección electroquímica se realizó utilizando un detector colorimétrico; potencial fijado a 250 mV (célula guarda a 350 mV) (Coulchem II, ESA).

15 Ejemplo 2F Aumento en acetilcolina

El experimento se diseñó para evaluar los efectos de los compuestos de la presente invención sobre las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal de ratas que se mueven libremente.

Se utilizaron ratas Wistar macho (280-350 g; Harlan Zeist, Holanda) para los experimentos. Las ratas se alojaron individualmente en jaulas de plástico (30 x 30 x 40 a mm) y tenían acceso a discreción a alimento y agua.

Se anestesiaron las ratas utilizando isoflurano (al 2%, 400 ml/min N₂O, 400 ml/min O₂). Se utilizó lidocaína (10% m/v para anestesia local). Se colocó cada animal en un marco estereotáxico (Kopf Instruments, EE.UU.) y se insertaron sondas en forma de I domésticas (membrana Hospal AN 69, superficie expuesta 4 mm) en la corteza prefrontal media (CPFm) utilizando cerebro de rata atlas de Paxinos y Watson (1982). Las coordenadas de la punta de la sonda eran CPFm [AP = 3,4 mm, L = -0,8 mm, V = 5,0 mm]. La sonda se fijó a continuación al cráneo con cemento dental y un tornillo. Se administró flunixinina (1 mg/kg s.c.) como analgésico posoperatorio. Se realizaron experimentos 24 a 48 horas después de la intervención quirúrgica. El día del experimento se conectaron las ratas con entubado flexible PEEK a bombas de microperfusión (CMA 102) y las sondas de diálisis se perfundieron con un tampón de Ringer que contenía NaCl 147 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM y MgCl₂ 1,2 mM, a un caudal de 1,5 µl/min. Se recogieron muestras de microdialisis a intervalos de 30 min en miniviales que contenían 55 µl de ácido fórmico 0,02 M para la determinación de acetilcolina. Se recogieron las muestras con un recolector de fracciones automático (CMA 142) y se almacenaron a -80°C hasta que se analizaron. Una vez terminados los experimentos se sacrificaron las ratas. Se extrajeron los cerebros y se curaron en solución de paraformaldehído (4% m/v). La colocación de cada sonda se verificó histológicamente según Paxinos y Watson (1982), practicando secciones coronarias del cerebro.

El compuesto de ensayo se disolvió en 10% de 2-OH-propil-beta-ciclodextrina y la administración se produjo mediante inyecciones subcutáneas de volúmenes de 5 ml/kg en diferentes dosis.

La concentración de acetilcolina se determinó por HPLC con detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Se inyectaron alícuotas (25 µl) en la columna de HPLC con un inyector de muestras automático (PerkinElmer Instruments, serie 200). Se realizó la separación cromatográfica en una columna analítica de 150 x 2,00 mm (4 µm) en fase inversa (Phenomenex Synergy MAX-RP, Bester) protegida por una columna guarda de 4 x 2,0 mm (Phenomenex Synergy MAX-RP AJO-6073, Bester), mantenidas ambas a una temperatura de 30°C. La fase móvil (isocrática) constaba de agua ultrapurificada (UP) acetonitrilo (ACN) y ácido trifluoroacético (TFA) (UP:ACN:TFA = 95,0:0,5:0,1 v/v/v%). La fase móvil se realizó a través del sistema a un caudal de 0,300 ml/min con una bomba de HPLC (PerkinElmer Instruments, serie 200 microbomba).

Los análisis de LC/MS se realizaron utilizando un sistema MS/MS API 4000 constituido por un detector de MS/MS API 4000 y una interfase Turbo Ion Spray (ambos de Applied Biosystems, Holanda). Las adquisiciones se realizaron en modo de ionización positivo, con un voltaje de pulverización iónica fijado a 5,5 kV, la presión del gas nebulizador a 344.750 Pa (50 psig) (en una escala 0-90 de SCIEX) con una temperatura de la sonda de 600°C. El instrumento se operó en modo de control múltiple de reacción (MRM) para la detección de acetilcolina (precursor 146,1 Da, producto 86,8 Da). La energía de colisión era de 21,0 eV y la presión del gas de colisión (nitrógeno) se mantuvo en 7 (en una escala SCIEX de 0 a 12). Los datos se calibraron y cuantificaron utilizando el sistema de datos AnalystTM (Applied Biosystem, versión 1.2).

Se tomaron dos muestras de microdiálisis consecutivas con menos de 50% de variación como niveles de referencias y se fijaron a 100%. Los cambios en la concentración de acetilcolina se expresaron como porcentaje de la referencia del mismo sujeto.

Los datos de presentan en la figura 24.

5 Ejemplo 2G Aumento de acetilcolina

El experimento se diseñó para evaluar los efectos de los compuestos de la presente invención en concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal y el hipocampo ventral de ratas que se mueven libremente.

10 Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, que pesaban inicialmente 275 a 300 g. Los animales se alojaron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. en condiciones controladas para regular la temperatura en el interior ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y la humedad ($55 \pm 5\%$) con el alimento y agua corriente disponible a discreción.

Cirugía y experimentos de microdiálisis

15 Se anestesiaron los animales con hypnorm-dormicum (2 ml/kg) y cánulas con guía intracerebral (CMA/12) se implantaron estereotáxicamente en el hipocampo, apuntando a la sonda de diálisis en el hipocampo ventral (coordenadas: 5,6 mm anterior al bregma, lateral -5,0 mm, 7,0 mm ventral a la duramadre o en la corteza frontal (coordenadas: 3,2 mm anterior al bregma; lateral, 0,8 mm; 4,0 mm ventral a la duramadre). Se utilizaron tornillos de anclaje y cemento acrílico para la fijación de las cánulas de guía. La temperatura corporal de los animales se controló mediante sonda rectal y se mantuvo a 37°C .
20 Se dejó a las ratas recuperarse de la intervención quirúrgica durante 2 días, se alojaron individualmente en jaulas. El día del experimento se insertó una sonda de microdiálisis (CMA/12, 0,5 mm de diámetro, 3 mm de longitud) a través de la cánula de guía.

25 Se conectaron las sondas por un canal giratorio doble a una bomba de microinyección. La perfusión de la sonda de microdiálisis con la solución de Ringer filtrada (NaCl 145 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,2 mM que contenía neostigmina 0,5 μM) se empezó poco antes de la inserción de la sonda en el cerebro y se continuó durante todo el experimento a un caudal constante de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Después de 180 min de estabilización, se iniciaron los experimentos. Se recogieron los dializados cada 20 min.

Después de los experimentos se sacrificaron las ratas, se extrajeron sus cerebros, se congelaron y se cortaron en secciones para la verificación de colocación de la sonda.

Análisis de dializado de acetilcolina

30 Se analizó la concentración de acetilcolina (ACh) en los dializados por medio de HPLC con detección electroquímica utilizando una fase móvil consistente en fosfato básico disódico 100 mM, ácido octansulfónico 2,0 mM, cloruro de tetrametilamonio 0,5 mM y MB al 0,005% (ESA), pH 8,0. Un reactor enzimático con precolumna (ESA) que contiene colina oxidasa inmovilizada eliminó la colina de la muestra inyectada (10 μl) antes de la separación de ACh de la columna analítica (ESA ACH-250); caudal
35 0,35 ml/min, temperatura: 35°C . Después de la columna analítica la muestra pasó a través de un reactor con columna posterior en fase sólida (ESA) que contenía acetilcolinesterasa inmovilizada y colina oxidasa. Este último reactor convirtió la ACh en colina y posteriormente la colina en betaína y H₂O₂. Esta última fue detectada electroquímicamente utilizando un electrodo de platino (célula analítica: ESA, modelo 5040).

40 Presentación de los datos

En los experimentos con una sola inyección el valor medio de 3 muestras de ACh consecutivas que preceden inmediatamente a la administración del compuesto sirvió como concentración de referencia para cada experimento y los datos se convirtieron en % de referencia (valores medios de la inyección previa de referencia normalizados a 100%). En las Figuras 25a y 25b se presentan los datos.

45 Los datos presentados en la Figura 24 muestran gotas inesperadas en los niveles de acetilcolina (véase p. ej., 8 mg/kg) que son difíciles de explicar y que se atribuyen a incertidumbre experimental. En general, ambos conjuntos de datos del ejemplo 2F y 2G presentan lo mismo, es decir un aumento en función de la dosis de las concentraciones de acetilcolina extracelular en el cerebro. Este descubrimiento preclínico es de esperar que se traduzca en una mejora en el conocimiento en una instalación clínica útil,
50 p. ej., en el tratamiento de las enfermedades caracterizadas por una insuficiencia cognitiva, tales como, p. ej., los pacientes de Alzheimer, los pacientes que responden parcialmente, insuficiencia cognitiva, etc.

Ejemplo 3 Efecto sobre el dolor neuropático

5 Para demostrar la eficacia contra el dolor neuropático, el compuesto de la presente invención se probó en el modelo de formalina de dolor neuropático [*Neuropharm.*, 48, 252-263, 2005; *Pain*, 51, 5-17, 1992]. En este modelo, los ratones reciben una inyección de formalina (4,5%, 20 µl) en la superficie de la planta de la pata trasera izquierda y después se coloca en vasos de precipitados de vidrio individuales (2 l de capacidad) para observación. La irritación producida por la inyección de formalina provoca una respuesta característica d comportamiento bifásico cuantificada por la cantidad de tiempo transcurrido lamiendo la pata herida. La primera fase (~ 0 a 10 minutos) representa la irritación química directa y la nocirrepción, mientras que la segunda (~ 20 a 30 minutos) se cree que representa el dolor de origen neuropático. Las dos fases están representadas por un periodo latente en el que el comportamiento vuelve a ser normal. Midiendo la cantidad de tiempo transcurrido lamiendo la pata herida en las dos fases se evalúa la eficacia de los compuestos de la prueba para reducir los estímulos dolorosos.

15 Se probaron ocho ratones C57/B6 (aprox. 25 g) por grupo. La Tabla 4 a continuación presenta la cantidad de tiempo transcurrido lamiendo la pata herida en las dos fases, es decir 0 a 5 minutos y 20 a 30 minutos después de la inyección de formalina. La cantidad de compuesto administrada se calcula referida a la base libre.

Tabla 4

	Vehículo	1,0 mg/kg	2,5 mg/kg	10 mg/kg
0 – 5 minutos (s)	42	37	30	37
20 – 30 minutos (s)	41	43	26	6

20 Los datos en la Tabla 4 demuestran que el compuesto de la presente invención tiene poco efecto en la primera fase que representa la irradiación química directa y la nocirrepción. De forma más destacada, los datos muestran también una disminución clara y en función de la dosis en el tiempo transcurrido lamiendo las patas en la segunda fase lo que indica un efecto del compuesto de la presente invención en el tratamiento del dolor neuropático.

Ejemplo 4 Cápsulas

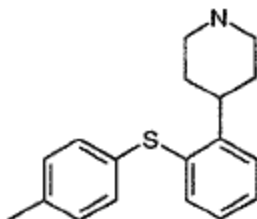
25 Se mezcló hidrobromuro de 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina con celulosa microcristalina en una primera etapa. En una segunda etapa se mezcló estearato de magnesio. Se prepararon cápsulas con cuatro dosis, el ingrediente activo está indicado referido a la base libre.

	1 mg	5 mg	25 mg
Ingrediente activo	12,85 g	64,25 g	321,25 g
Celulosa microcristalina	2026,55 g	2034,55 g	1846,85 g
Estearato de magnesio	20,6 g	21,2 g	21,9 g
Peso del contenido de la cápsula	206 mg	212 mg	219 mg

Se prepararon 10.000 cápsulas de cada lote.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es la sal de adición de HBr de 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina

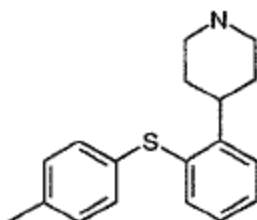


en una forma cristalina.

- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, que está caracterizado por picos en un XRPD a aproximadamente 6,08, 14,81, 19,26 y 25,38°2 θ .

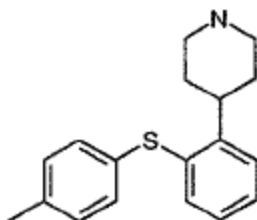
3. Compuesto según la reivindicación 1, que está caracterizado por un XRPD como el representado en la figura 1.

4. Compuesto que es la sal de adición del ácido DL-láctico 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina

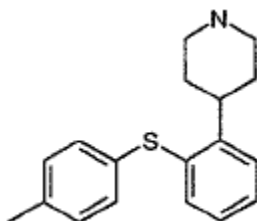


10 en una forma cristalina.

5. Compuesto que es la sal de adición del ácido glutárico 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina (1:1).

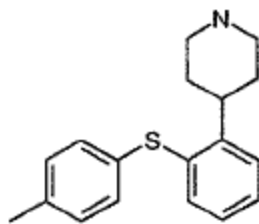


- 15 6. Compuesto que es la sal de adición del ácido malónico 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina (1:1)



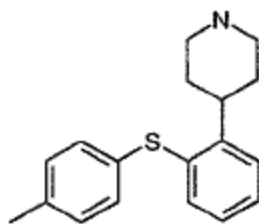
en una forma cristalina.

7. Compuesto que es la sal de adición del ácido L-aspartico 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina (1:1)



o la sal de adición del ácido L-aspártico hidratado (1:1) en una forma cristalina.

8. Compuesto que es la sal de adición del ácido glutámico 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]piperidina (1:1)



o la sal de adición del ácido glutámico monohidratado (1:1) en una forma cristalina.

- 5 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización en terapia.
10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización en el tratamiento del dolor crónico, la depresión en pacientes que responden en parte, la depresión resistente al tratamiento, enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cognitiva, THFA, melancolía, TEPT, rubores, apnea del sueño, alcoholismo, dependencia de nicotina o bulimia de carbohidratos, dependencia de fármacos, alcoholismo o drogodependencia, vómitos, trastornos de la alimentación, IBS, trastornos afectivos, depresión, trastorno depresivo mayor, depresión posnatal, depresión asociada al trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, psicosis o enfermedad de Parkinson, ansiedad, trastorno de ansiedad general, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, ataques de pánico, fobia, fobia social, agorafobia o incontinencia urinaria por estrés.
- 15 12. Compuesto según la reivindicación 11 para su utilización en el tratamiento del dolor crónico.
- 20 13. Compuesto según la reivindicación 12 para su utilización en el tratamiento del dolor del miembro fantasma, el dolor neuropático, la neuropatía diabética, la neuralgia posherpética (NPH), el síndrome del túnel carpiano (STC), la neuropatía por VIH, el síndrome del dolor regional complejo (CPRS), la neuralgia trigémica / neuralgia del trigémino / tic doloroso, intervención quirúrgica (p. ej., analgésicos posoperatorios), vasculopatía diabética, resistencia capilar o síntomas diabéticos asociados a la insulinitis, dolor asociado a la angina de pecho, dolor asociado a la menstruación, dolor asociado al cáncer, dolor dental, jaqueca, migraña, jaqueca de tipo tensión, neuralgia trigémica, síndrome de la articulación temporomandibular, lesión muscular con dolor miofascial, síndrome de fibromialgia, dolor óseo y de articulaciones (osteoartritis), artritis reumatoide, artritis reumatoide y edema asociado al traumatismo asociado a quemaduras, esguinces o dolor por fractura ósea debido a osteoartritis, osteoporosis, metástasis ósea o por razones desconocidas, gota, fibrositis, dolor miofascial, síndromes torácicos externos, dolor de la espalda superior o dolor de la espalda inferior (en el que el dolor de espalda procede de la enfermedad de la columna vertebral general, regional o primaria (radiculopatía), dolor pélvico, dolor cardíaco de pecho, dolor no cardíaco de pecho, dolor asociado a la lesión de la columna vertebral (SCI), dolor central después del ictus, neuropatía del cáncer, dolor por SIDA, dolor depreanocítico o dolor geriátrico.
- 30 14. Compuesto según la reivindicación 13 para su utilización en el tratamiento del dolor neuropático.
- 35 15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que dicho dolor neuropático se selecciona de entre hiperpatía, hiperalgesia, neuropatía, neuropatía diabética, neuritis, neuralgia, hiperestesia, causalgia y alodinia.

sal HBr de XRPD

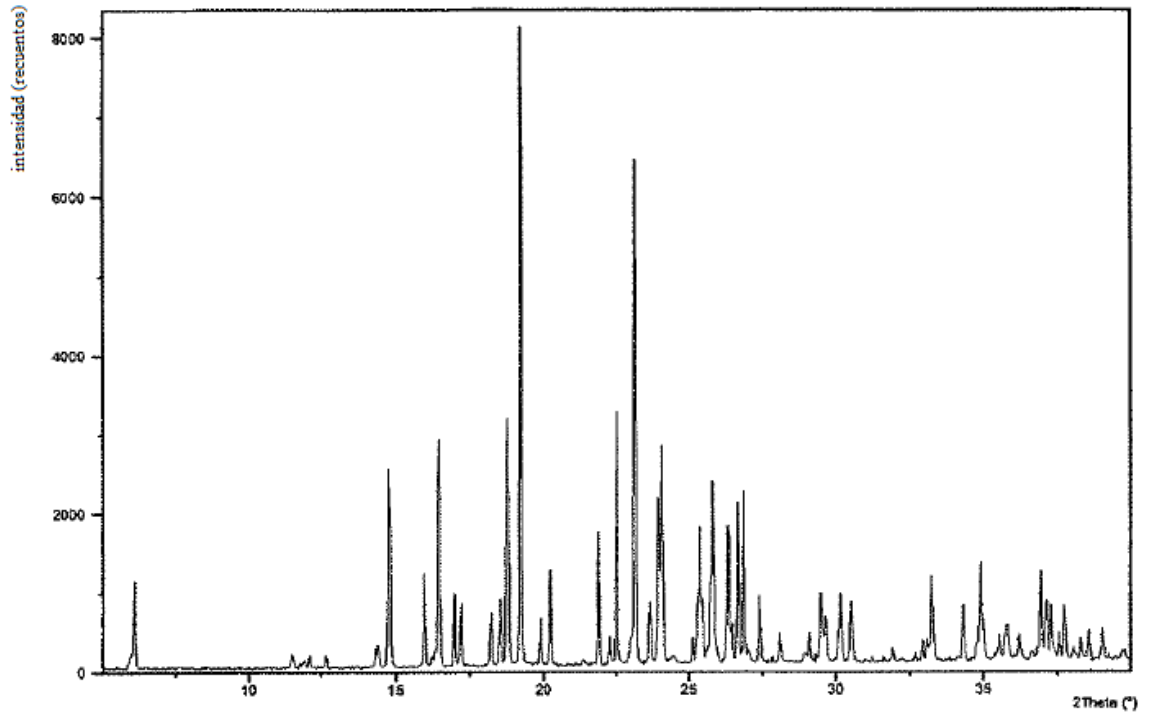


Fig. 1

sal HBr, solvato

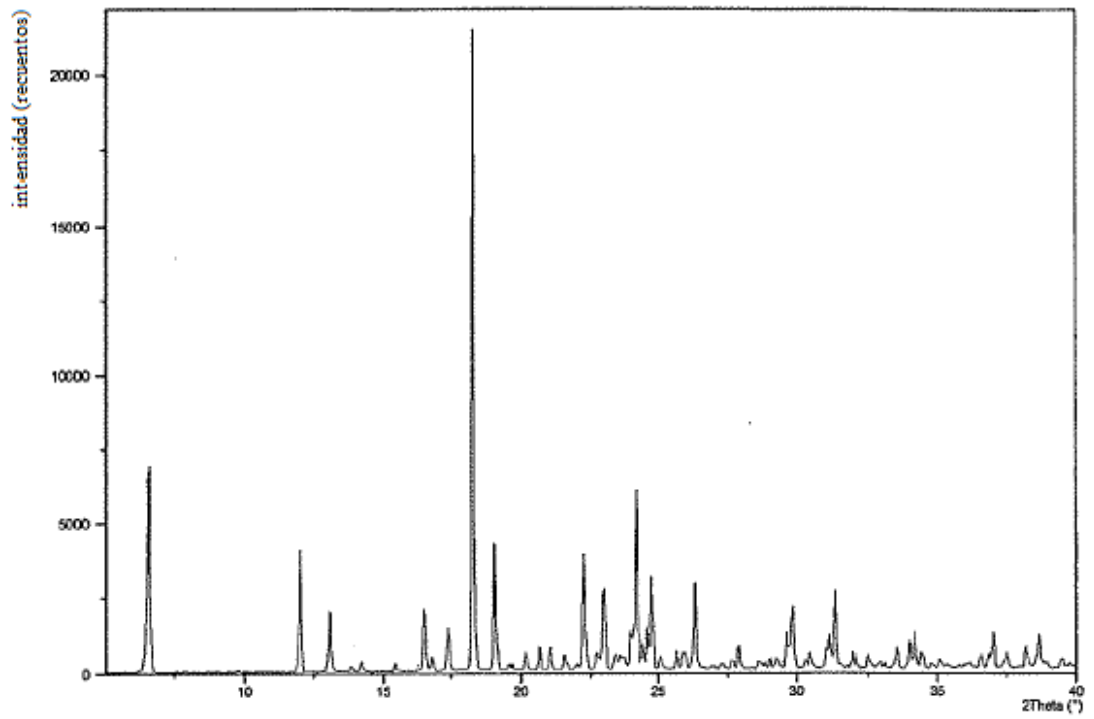


Fig. 2

Sal del ácido palmítico 1:1

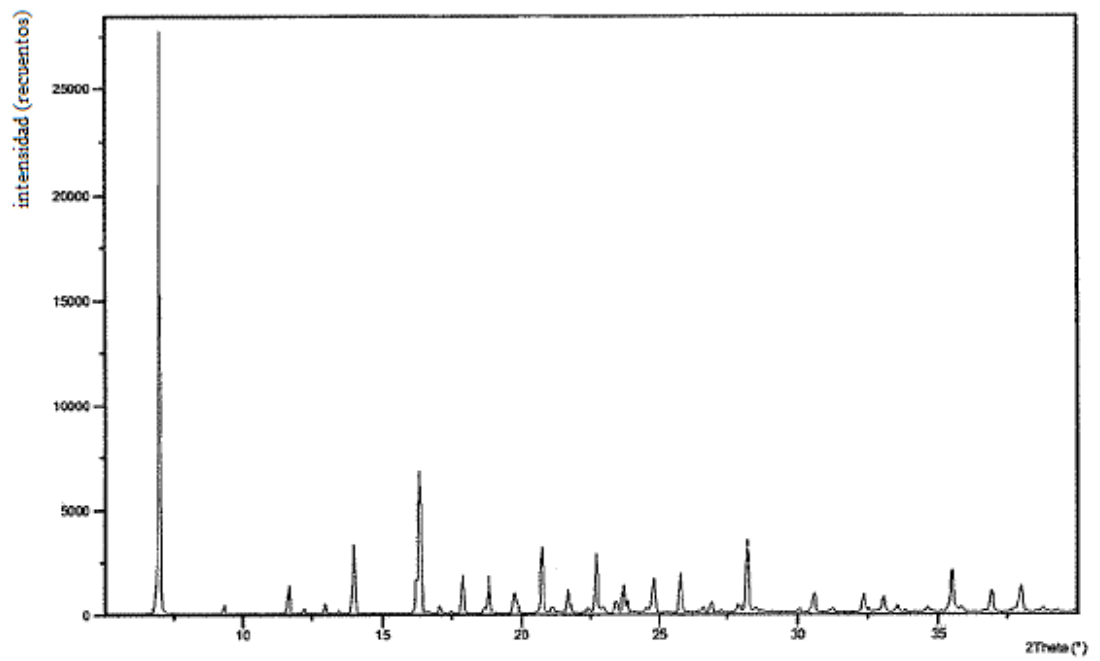


Fig. 3

Sal del ácido DL-láctico 1:1

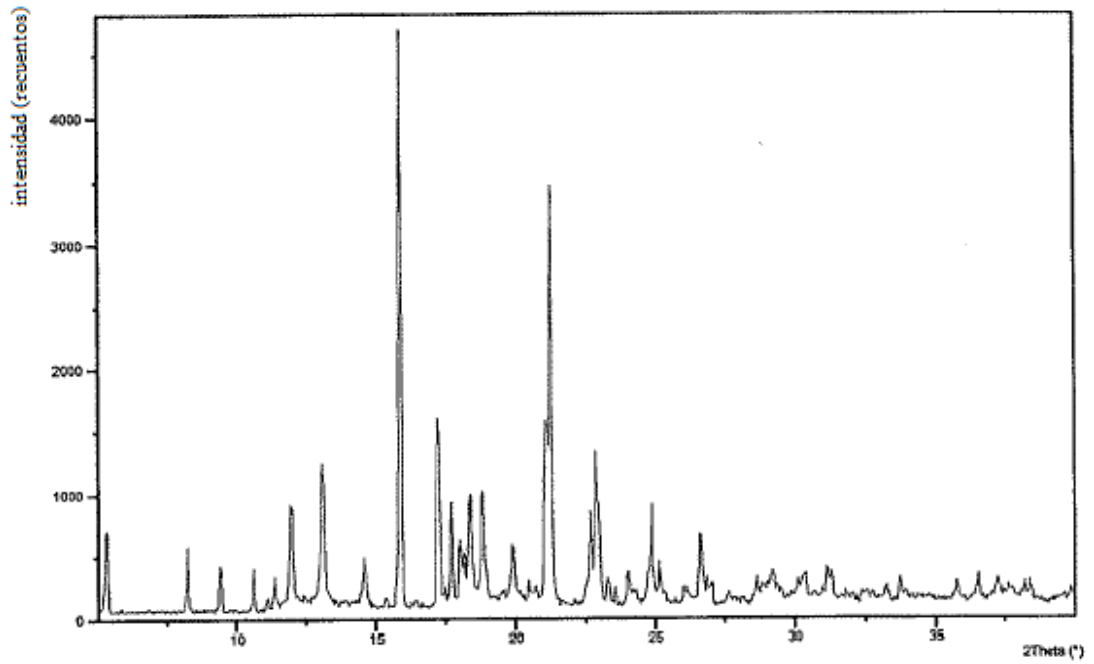


Fig. 4

5/25

Sal de ácido adipico 1:1 (mezcla de la forma α y β)

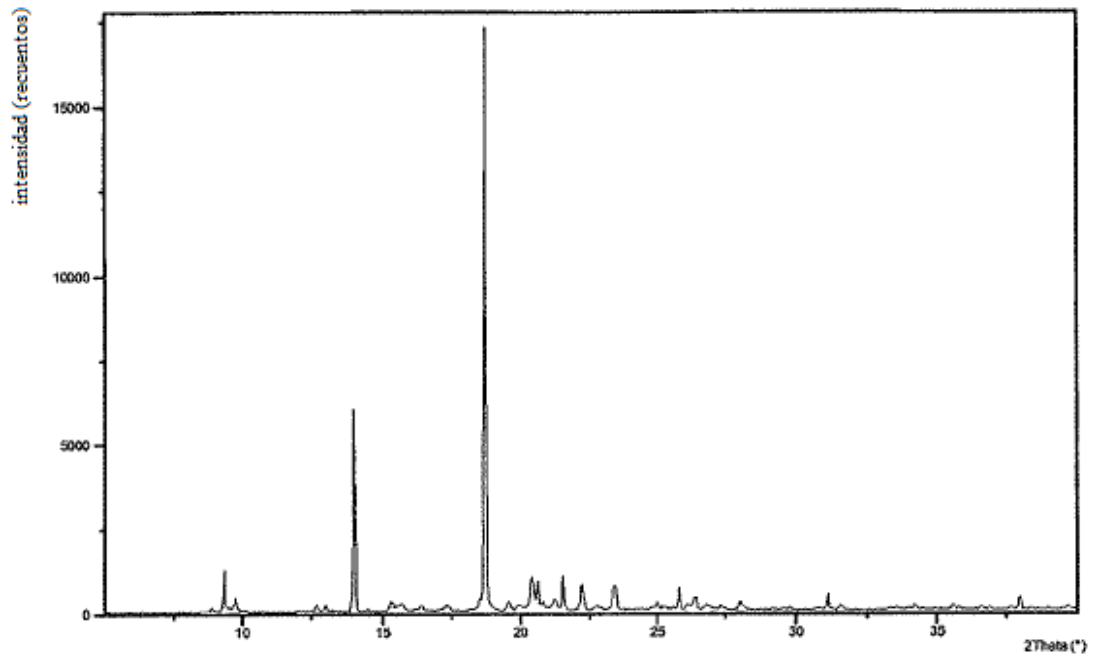


Fig. 5

Sal del ácido adipico 2:1

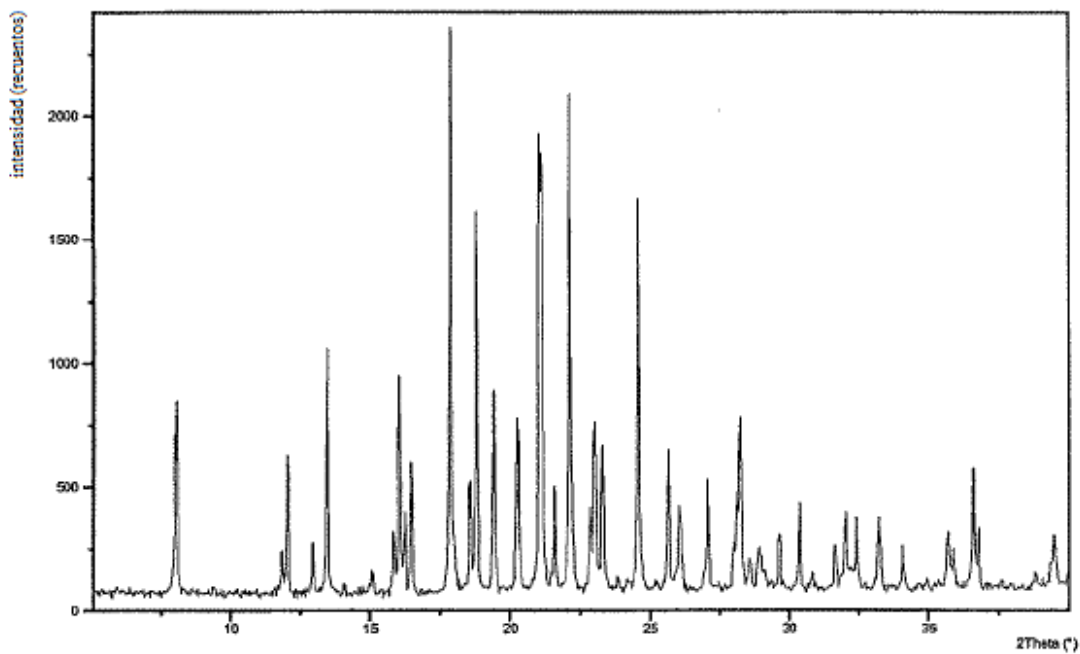


Fig. 6

7/25

Sal del ácido fumárico 1:1

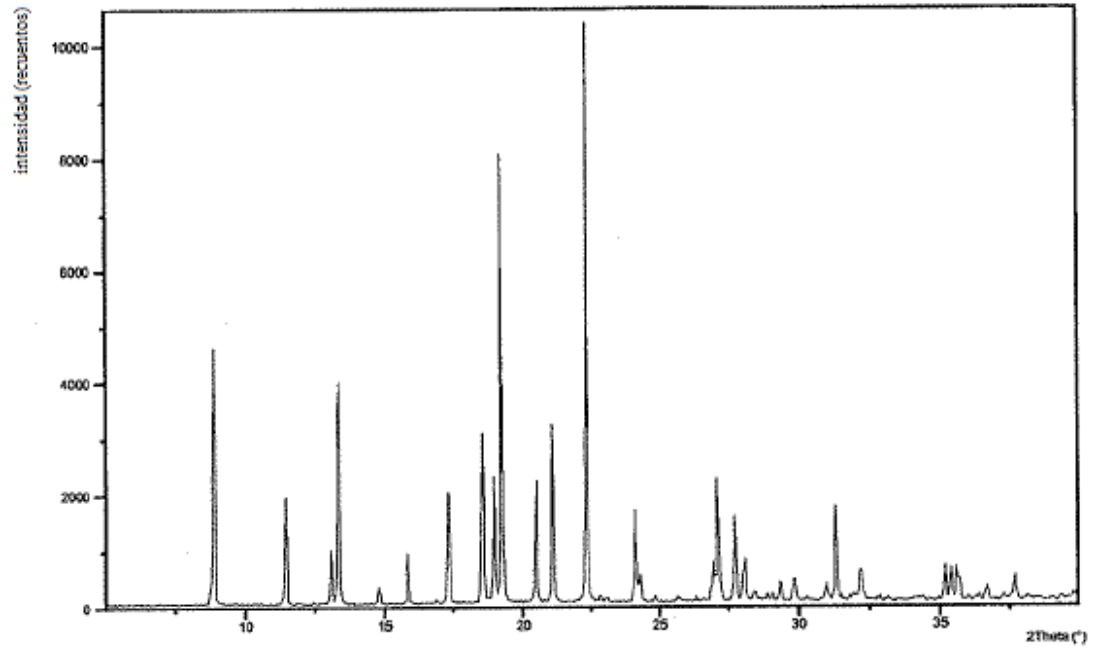


Fig. 7

Sal del ácido glutámico 1:1

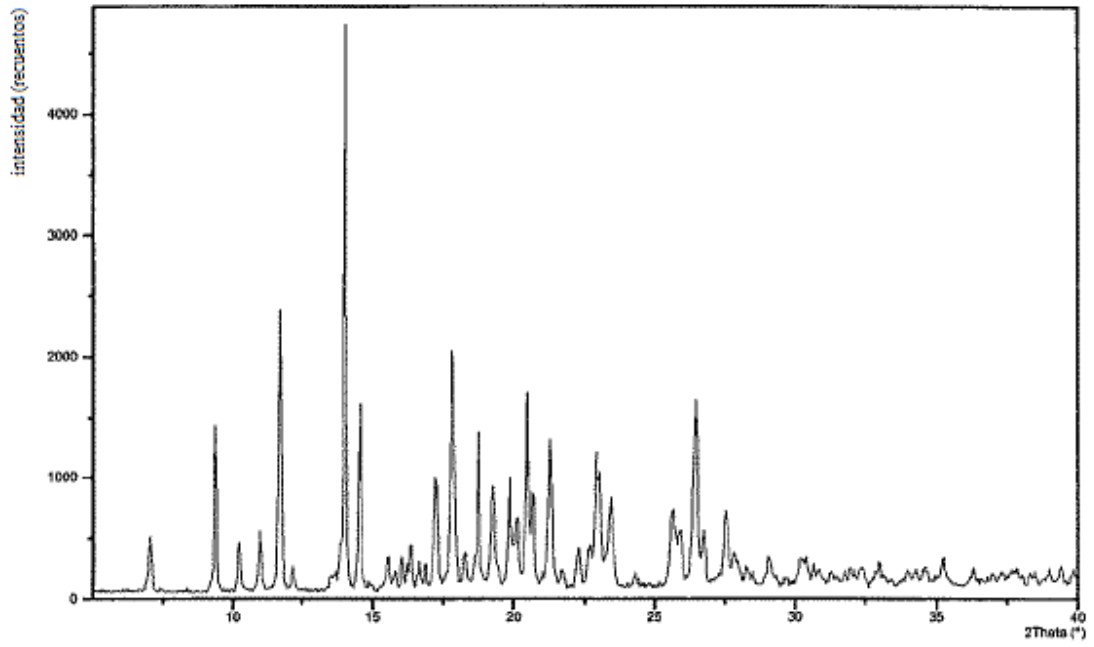


Fig. 8

Sal del ácido malónico 1:1, forma α

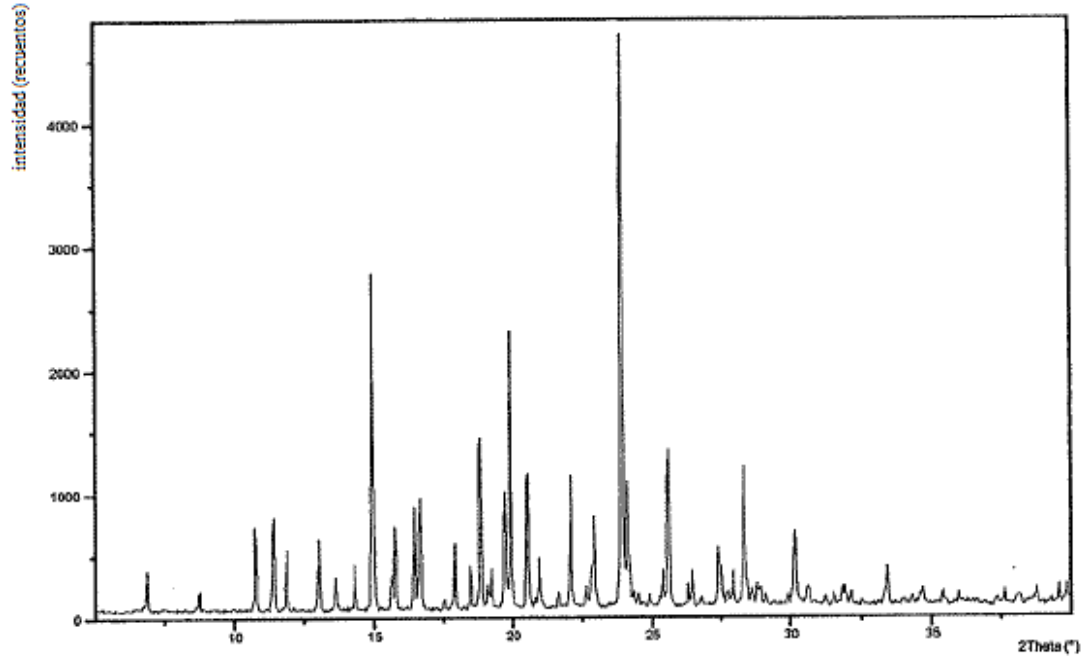


Fig. 9

10/25

Sal del ácido malónico 1:1, forma β

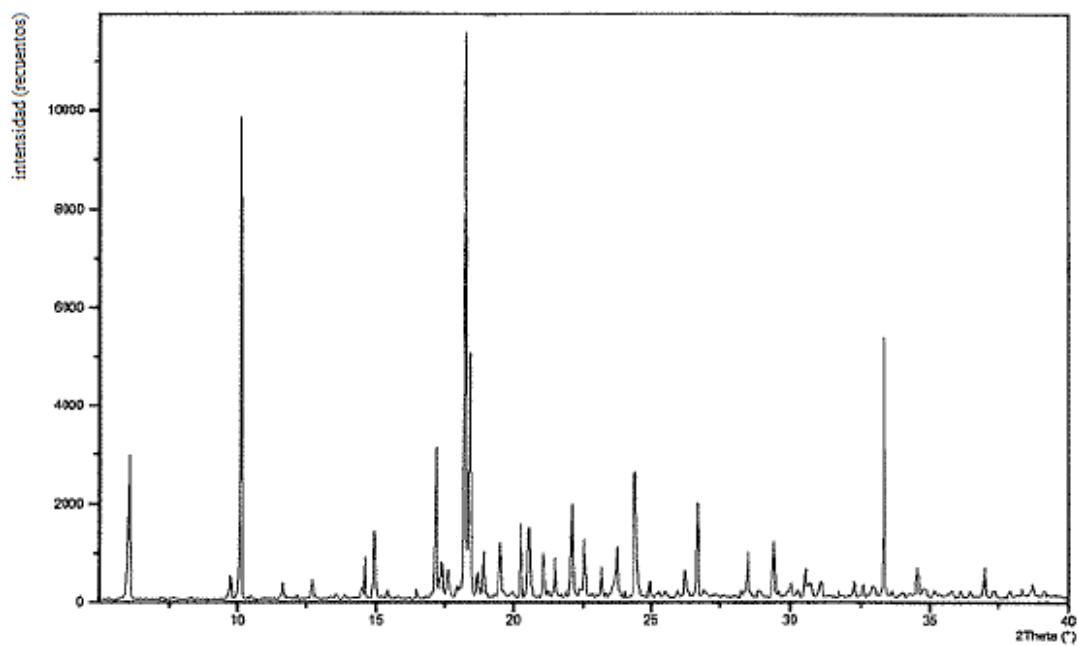


Fig. 10

11/25

Sal del ácido oxálico 1:1

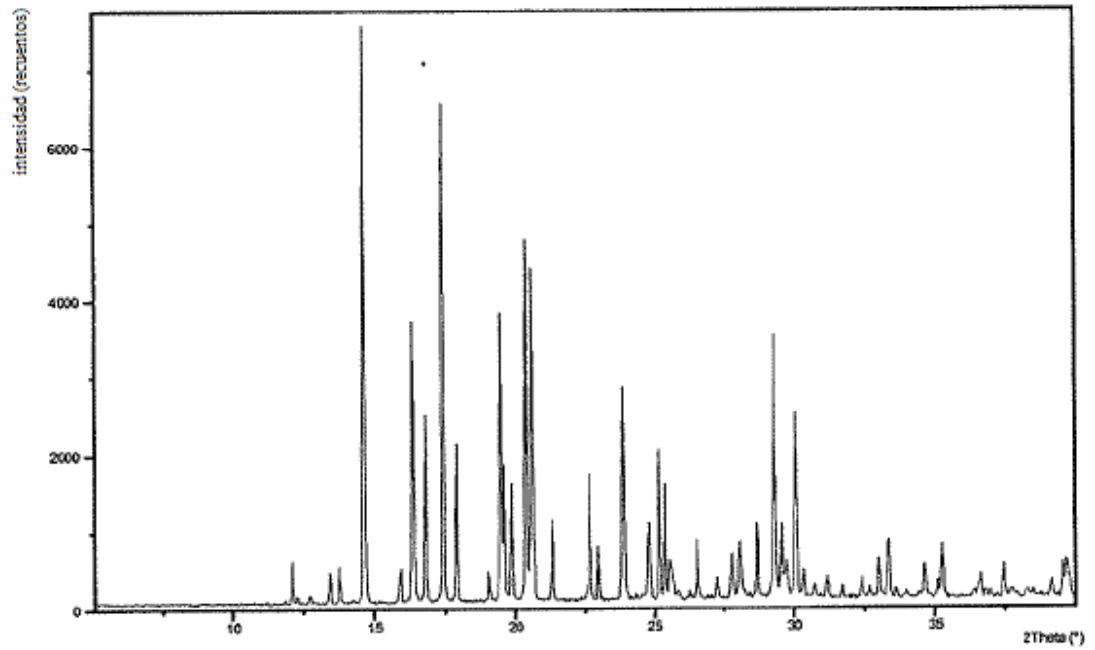


Fig. 11

12/25

Sal del ácido sebacoínico 2:1

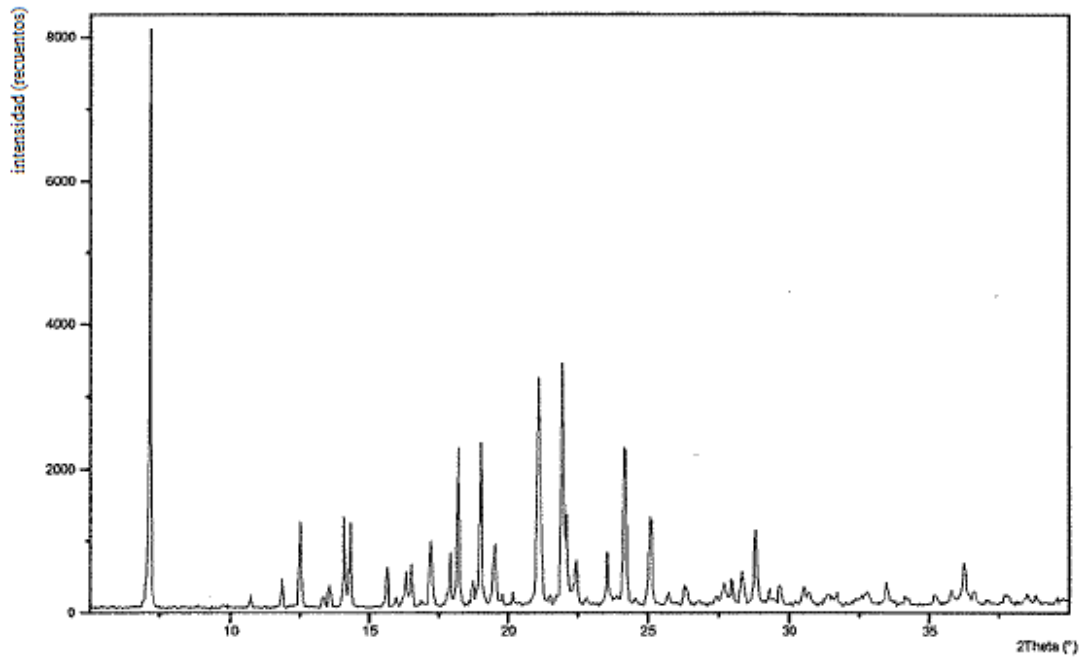


Fig. 12

Sal del ácido succínico 2:1

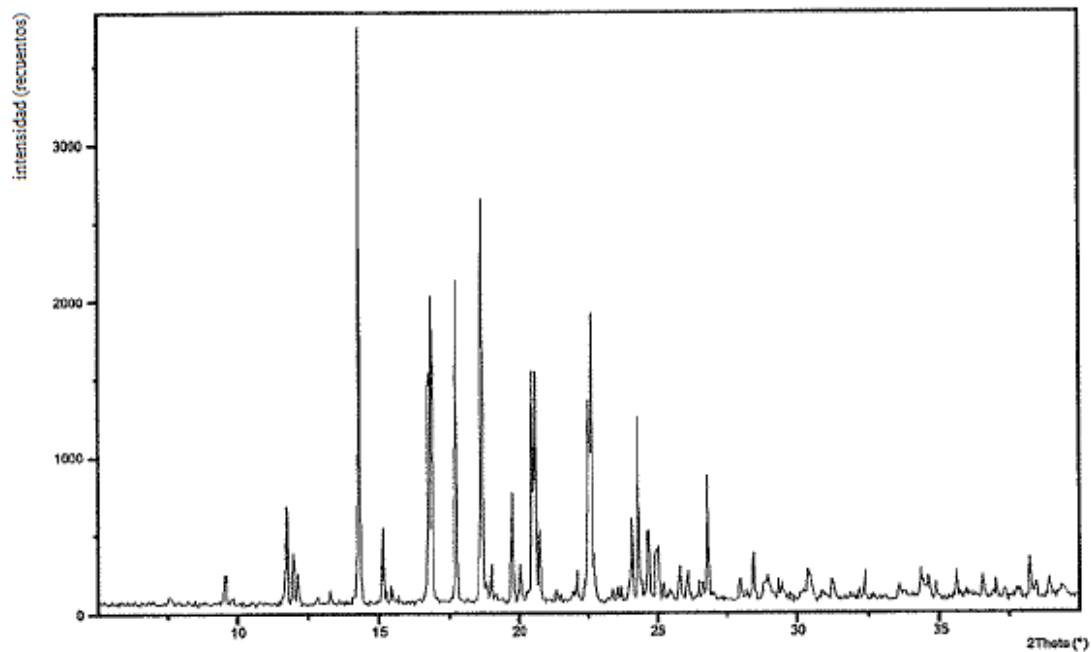


Fig. 13

Sal del ácido L-málico 1:1, forma α

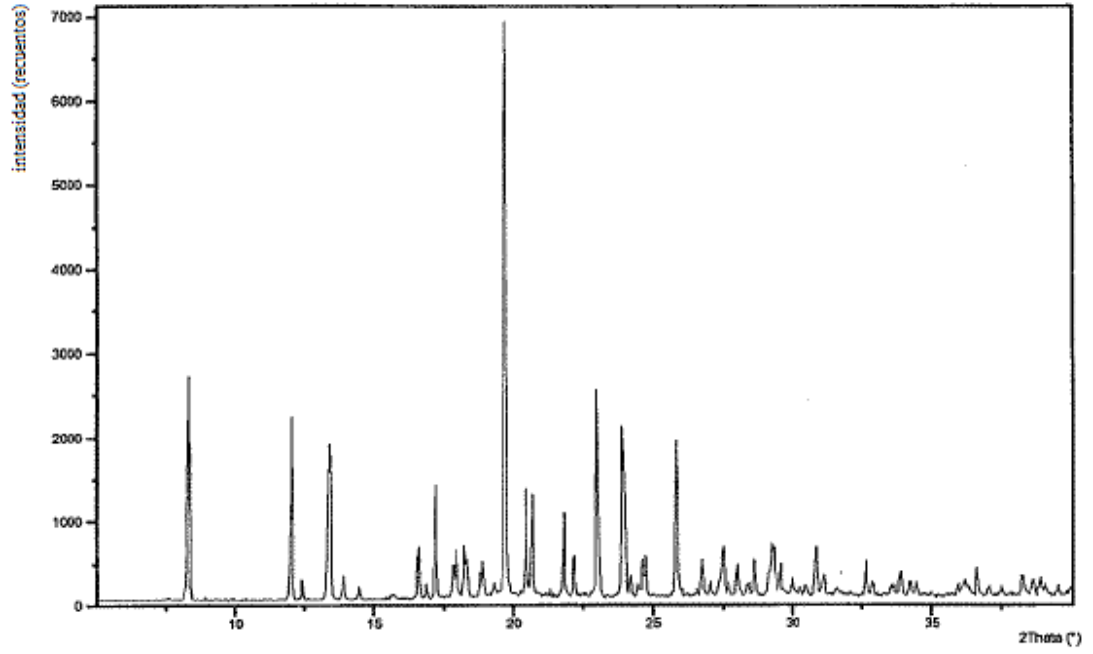


Fig. 14

15/25

Sal del ácido L-málico 1:1, forma β

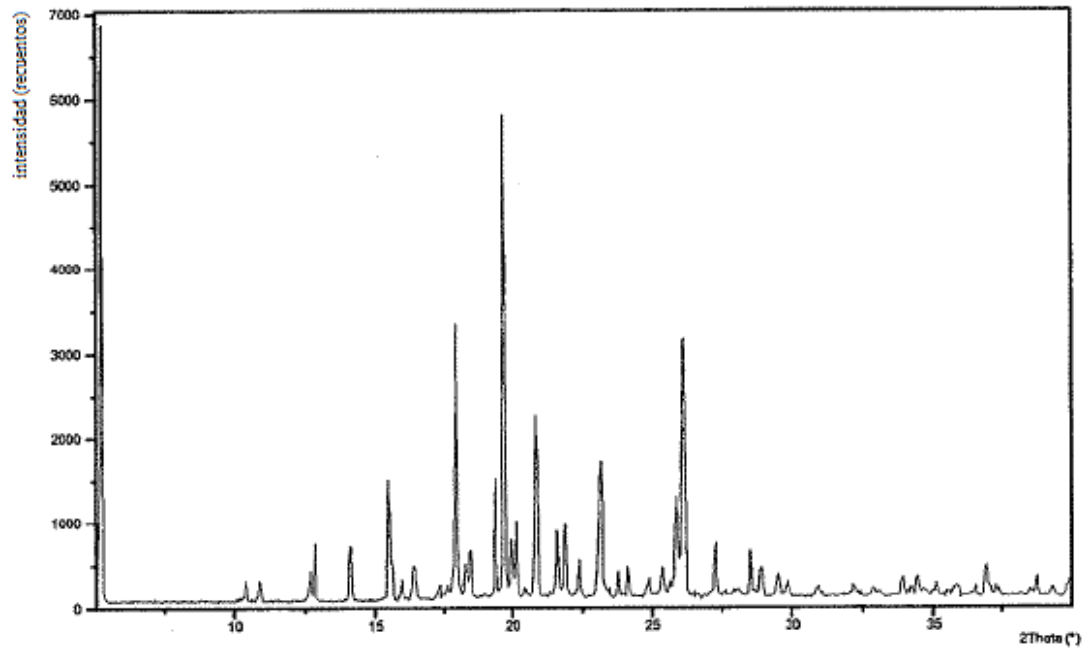


Fig. 15

Sal del ácido D-tartárico 1:1

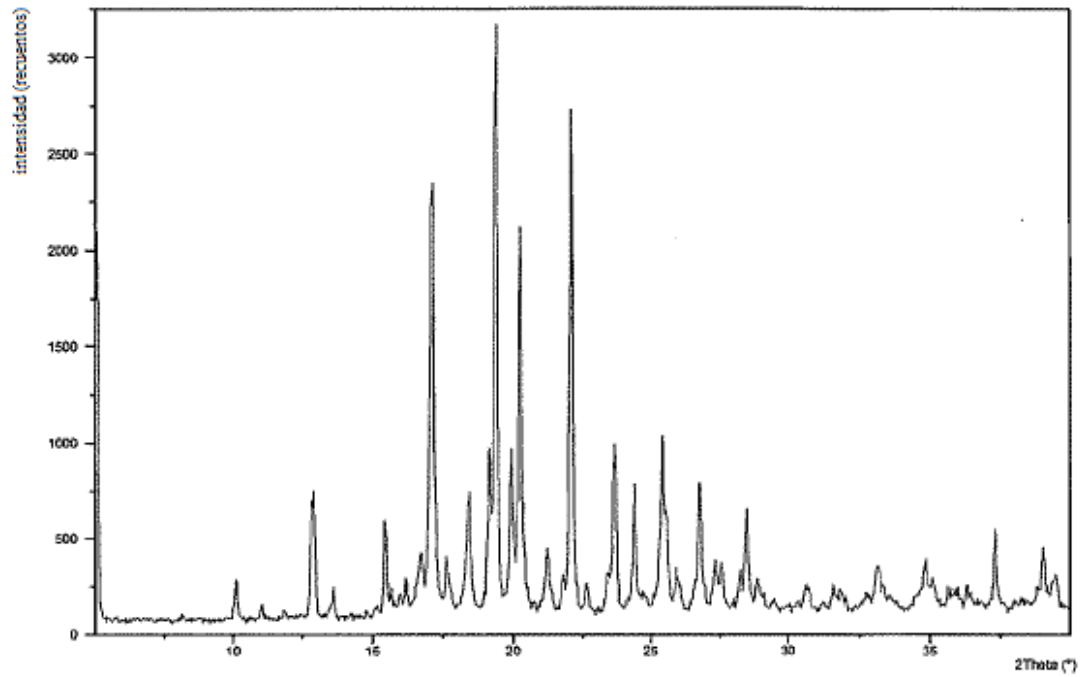


Fig. 16

17/25

Sal del ácido L-aspártico 1:1 + ácido L-aspártico

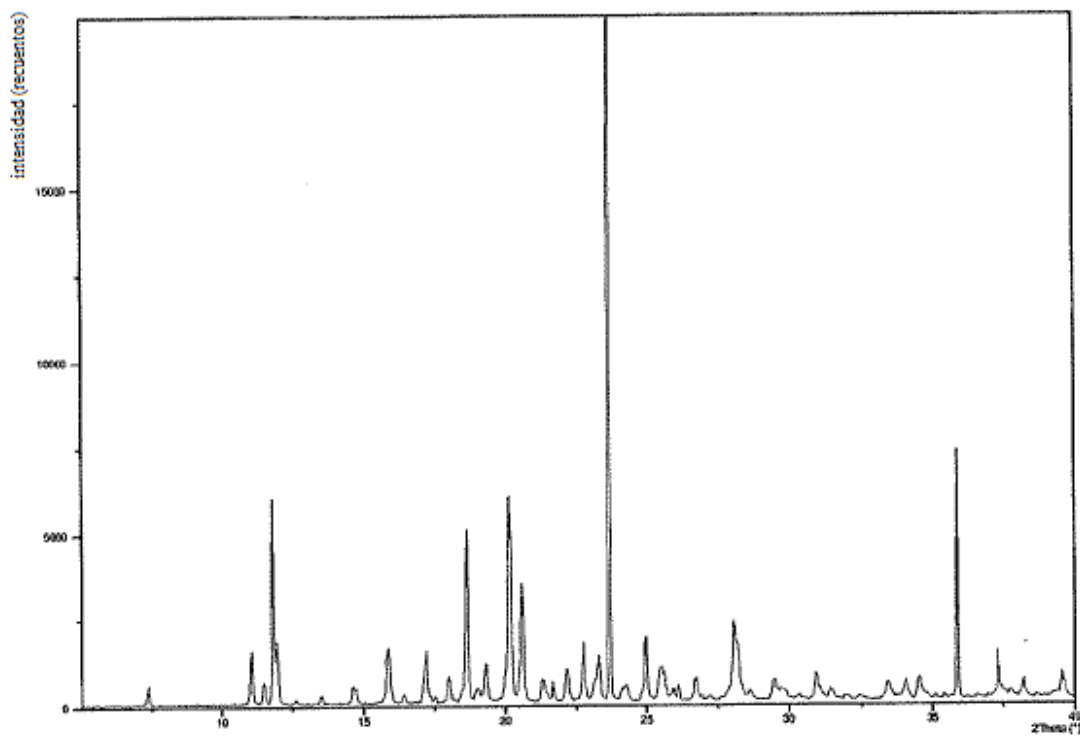


Fig. 17

18/25

Sal hidratada del ácido L-aspártico 1:1 + ácido L-aspártico

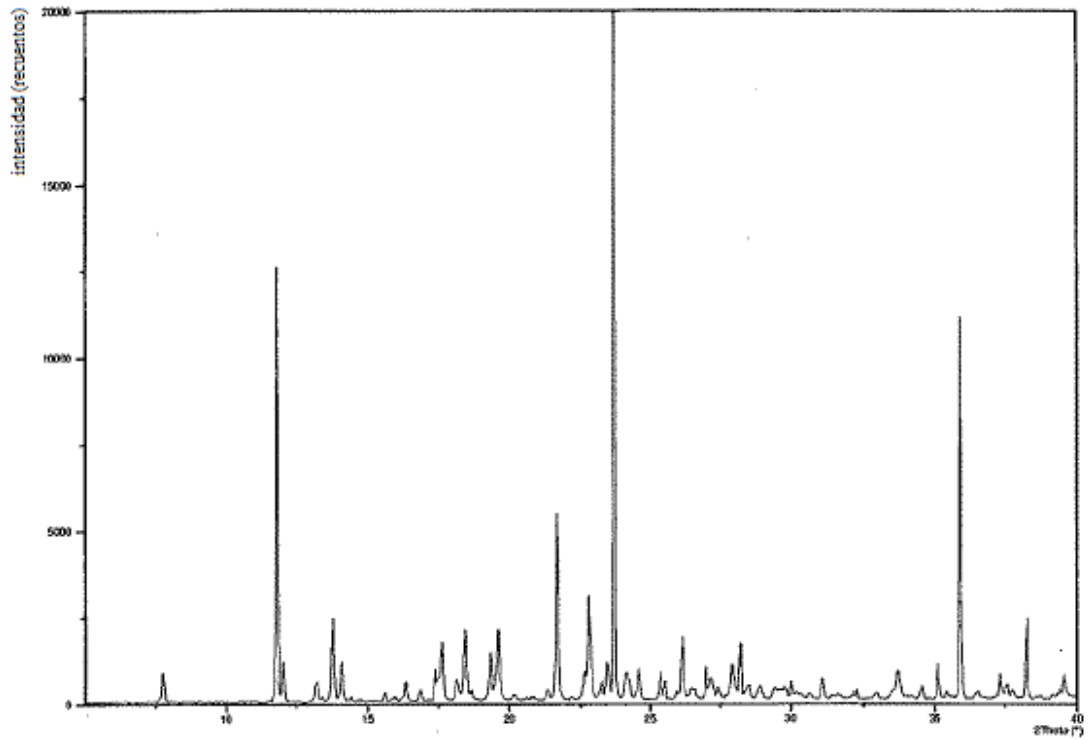


Fig. 18

19/25

Sal del ácido glutámico 1:1 + ácido glutámico monohidratado

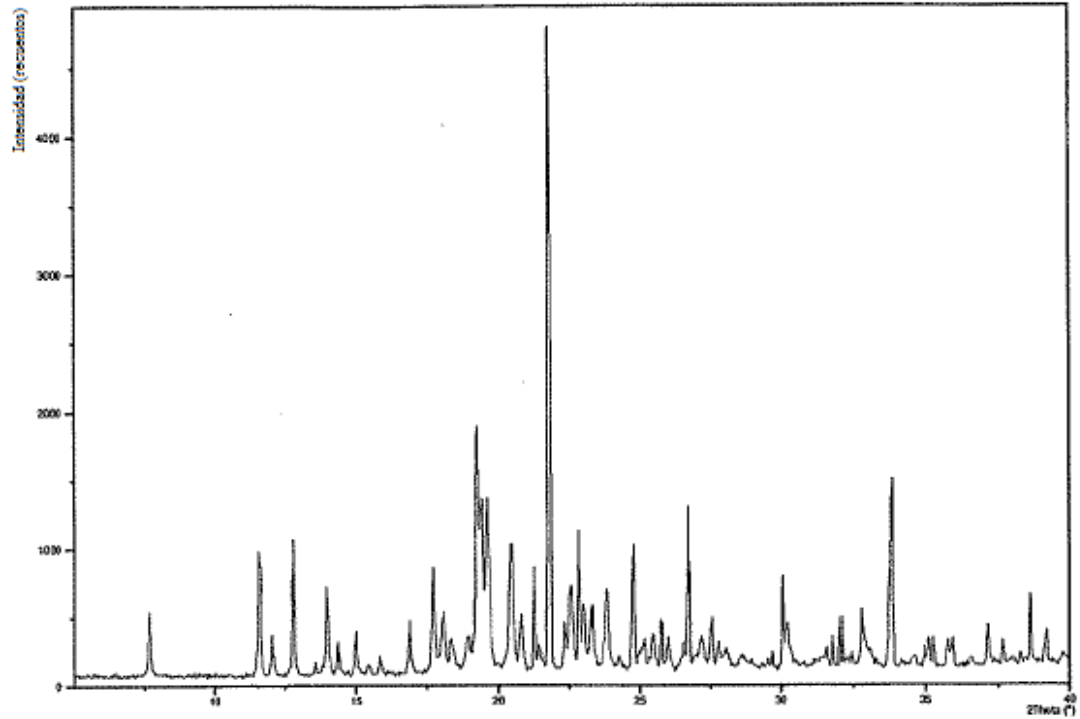


Fig. 19

20/25

Sal del ácido cítrico 2:1

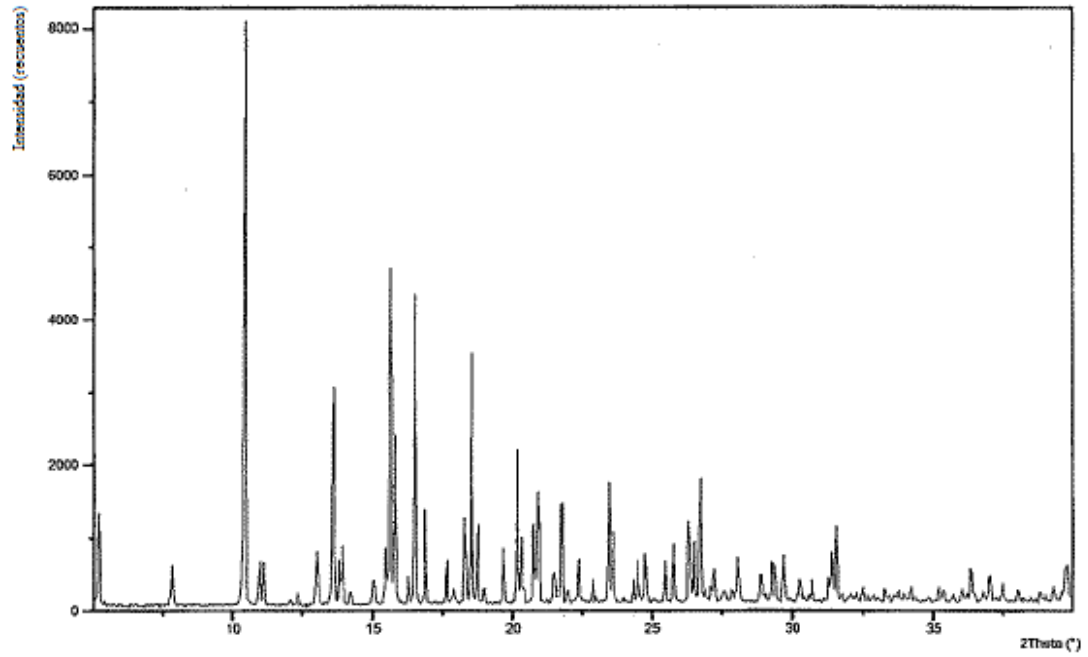


Fig. 20

21/25

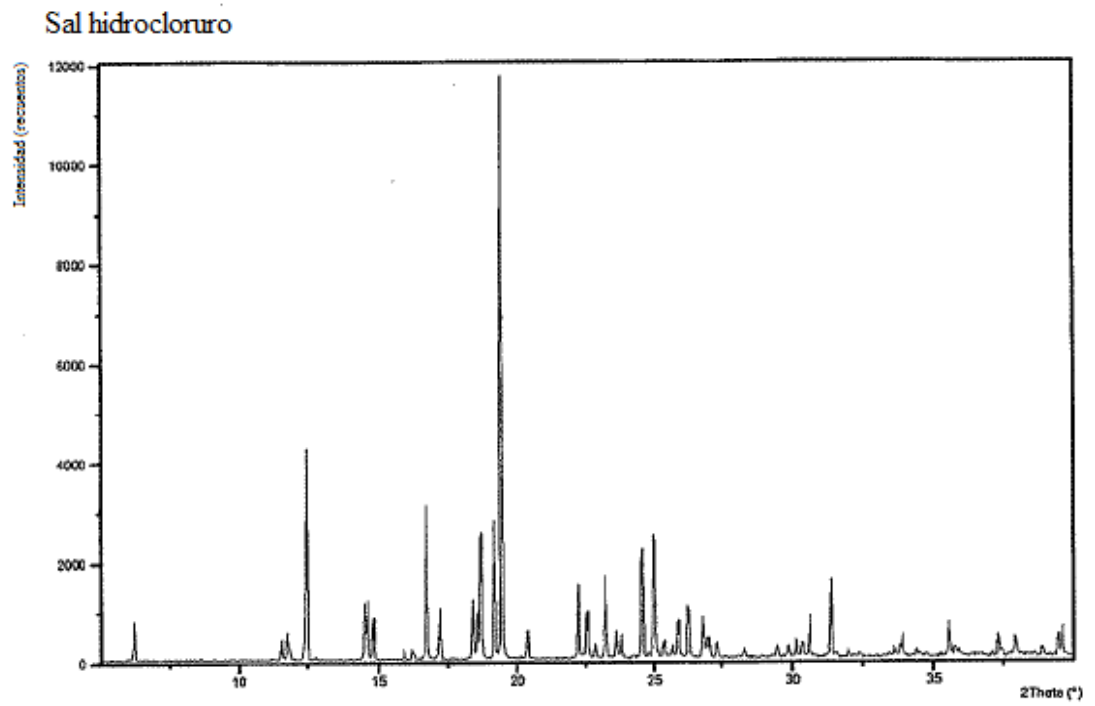


Fig. 21

22/25

Sal del ácido fosfórico 1:1

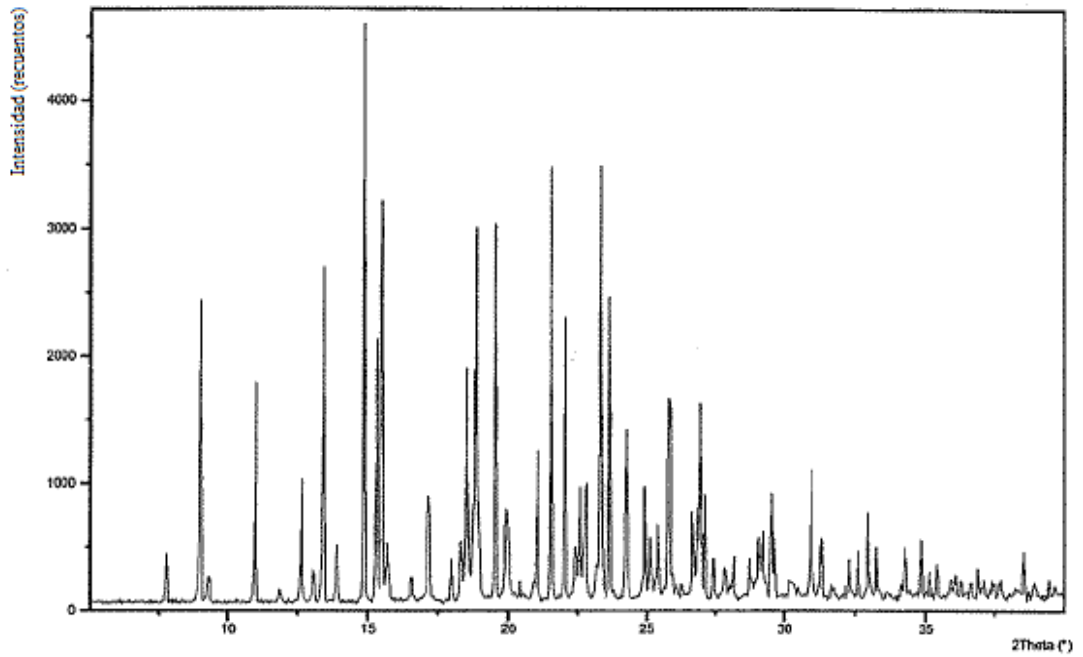


Fig. 22

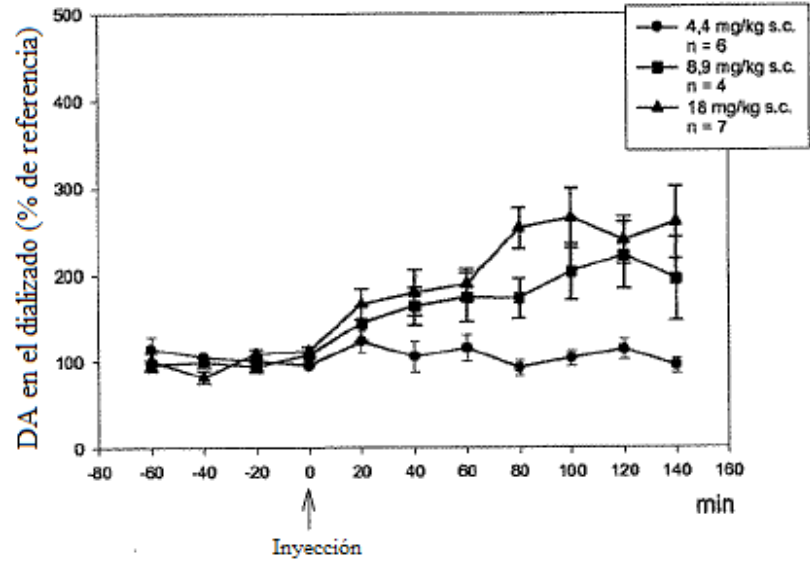


Fig. 23

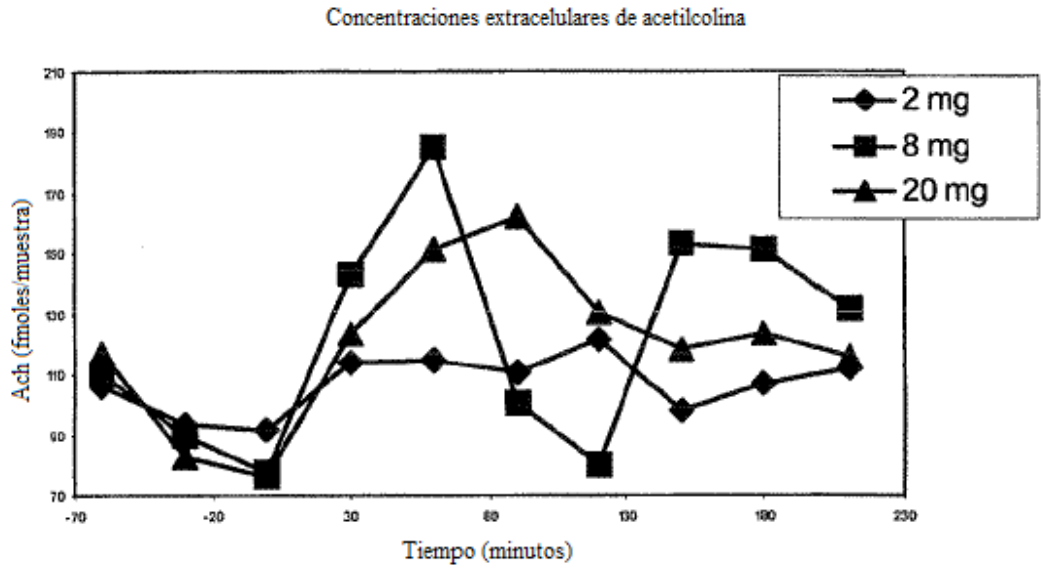


Fig. 24

25/25

Ach en la corteza prefrontal

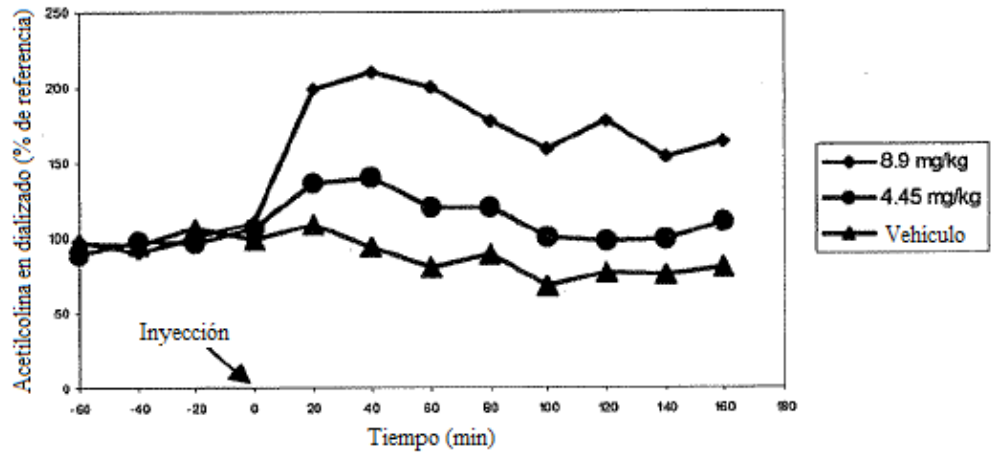


Fig. 25a

Ach en el hipocampo ventral

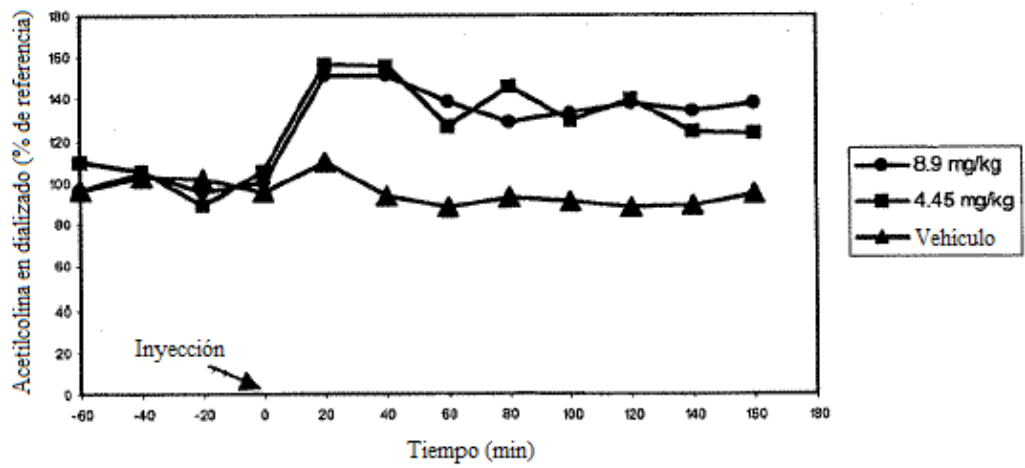


Fig. 25b