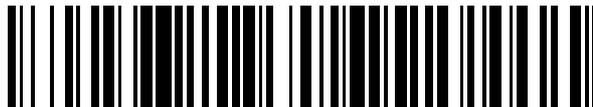


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 260**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/5365** (2006.01)

**A61K 31/424** (2006.01)

**A61P 25/22** (2006.01)

**A61P 25/24** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00959244 .5**

96 Fecha de presentación: **16.08.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1212055**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

54 Título: **COMPOSICIÓN NEUROTERAPÉUTICA QUE COMPRENDE UN COMPUESTO DE BETA-LACTAMA.**

30 Prioridad:  
**16.08.1999 US 149115 P**  
**17.12.1999 US 172452 P**  
**18.01.2000 US 176570 P**  
**04.04.2000 US 194534 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.12.2011**

73 Titular/es:  
**REVAAX PHARMACEUTICALS LLC**  
**P.O. BOX 22476**  
**INDIANAPOLIS, IN 46222-0476, US**

72 Inventor/es:  
**KOPPEL, Gary, A.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 260 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**

Composición neuroterapéutica que comprende un compuesto de beta-lactama

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un mecanismo novedoso de intervención neuropsiquiátrica. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de una variedad de estados de enfermedad neurológica, que incluyen trastornos cognitivos y del comportamiento.

**Antecedentes y resumen de la invención**

10 La industria farmacéutica ha dirigido unos amplios esfuerzos de investigación y desarrollo hacia el descubrimiento y la comercialización de fármacos para el tratamiento de trastornos neurológicos. Tales trastornos normalmente se derivan de desequilibrios químicos en el cerebro. La producción en exceso o la producción en defecto de especies neuroquímicas pertinentes y/o la disfunción de receptores se han identificado con muchos estados de enfermedad reconocidos por neurólogos, psiquiatras, psicólogos y otros médicos expertos en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedad mental. La mayoría del esfuerzo para el descubrimiento de nuevos fármacos neurológicamente activos se ha basado en el estudio de la interacción de fármacos agonistas/antagonistas con uno o más de los numerosos receptores en el cerebro y/o sus ligandos de receptores respectivos.

15 La presente invención proporciona un enfoque novedoso para la intervención de fármacos en el tratamiento de una amplia variedad de estados de enfermedad neurológica y otros estados de enfermedad o estados clínicos de etiología relacionada como se definen en la reivindicación 1. Se basa en parte en el descubrimiento de que los compuestos que contienen  $\beta$ -lactama conocidos por su actividad como inhibidores de peptidasas o proteasas bacterianas, particularmente transpeptidasas y/o carboxipeptidasas, también son potentes inhibidores de ciertas neuropeptidasas de mamífero, que incluyen peptidasas ácidas ligadas a  $\alpha$  N-acetiladas (NAALADAsas), varias de las cuales se han identificado/caracterizado en la bibliografía [Pangalos y col., J. Biol. Chem., 1999, 274, No. 13, 8470-8783]. La presente invención también se basa en parte en el descubrimiento de que las NAALADAsas neurogénicas pueden ser elegidas como dianas con inhibidores de NAALADasa para efectuar una modificación significativa del comportamiento y rendimiento cognitivo potenciado. Estudios preliminares han confirmado que una o más proteasas neurogénicas, que ahora se cree que son NAALADAsas y peptidasas y transferasas relacionadas que pueden reconocer y transformar ciertos neuropéptidos (por ejemplo, N-acetil-L-aspartil-L-glutamato), desempeñan una función significativa, si no dominante, en el nivel neuroquímico de la función cerebral y tienen concomitantemente un impacto sustancial sobre el comportamiento del paciente y el rendimiento cognitivo. Previamente se ha informado que ciertos análogos de glutamato que actúan de inhibidores de NAALADasa pueden usarse para tratar enfermedad de próstata y anomalías de glutamato asociadas a cierto traumatismo del tejido nervioso. Ahora se ha determinado que los inhibidores de NAALADasa, que incluyen particularmente ciertos inhibidores de peptidasa y  $\beta$ -lactamasa bacterianas que contienen  $\beta$ -lactama capaces del transporte a la barrera hematoencefálica, pueden actuar en el cerebro a muy bajas concentraciones como potentes principios activos neuroactivos para reducir los síntomas de una amplia variedad de trastornos neurológicos caracterizados por aberración del comportamiento o disfunción sensorial/cognitiva. Significativamente, se cree que tales inhibidores de enzimas bacterianas son inhibidores eficaces de NAALADasa y peptidasas neurogénicas relacionadas a concentraciones por debajo de aquellas concentraciones conocidas por ser requeridas para la inhibición clínicamente eficaz de enzimas bacterianas. Por tanto, se espera que tales compuestos también puedan usarse eficazmente para tratar enfermedad de próstata y los estados de enfermedad asociados a traumatismo del tejido nervioso previamente descrito como sensible a tratamiento con otros inhibidores de NAALADasa.

La presente invención se refiere a un compuesto de  $\beta$ -lactama seleccionado de:

- 45 i) ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- ii) moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma,

para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de alivio de un trastorno seleccionado de ansiedad, depresión, demencia, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson y una formulación farmacéutica para tratar ansiedad, depresión, demencia, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson en un paciente humano en necesidad de alivio del mismo, en el que la formulación comprende un compuesto de  $\beta$ -lactama seleccionado de:

- 50 i) ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- ii) moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma.

Por consiguiente, una realización de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para el tratamiento de trastornos cognitivos y del comportamiento en vertebrados de sangre caliente administrando compuestos conocidos por su actividad como inhibidores de proteasas o de peptidasas bacterianas, compuestos que, cuando están

presentes a concentraciones eficaces en el cerebro, ahora se ha determinado que pueden inhibir o de otro modo modular la actividad de una o más NAALADAsas neurogénicas y enzimas neurogénicas relacionadas.

En una realización relacionada se desvela un procedimiento para el tratamiento de trastornos cognitivos y del comportamiento en un paciente en necesidad de tal tratamiento. El procedimiento comprende la etapa para inhibir peptidasas neurogénicas que incluyen NAALADAsa y enzimas neurogénicas relacionadas. En una realización, tal inhibición de neuropeptidasas se efectúa administrando una cantidad eficaz de un compuesto de  $\beta$ -lactama reconocido por su capacidad para unirse a e inhibir una enzima bacteriana, por ejemplo, una  $\beta$ -lactamasa o una proteasa bacteriana que participa en la síntesis de la pared bacteriana celular. Tales proteasas bacterianas se conocen en la técnica como "proteínas de unión a penicilina". En otra realización de la presente divulgación, el procedimiento se efectúa por administración de inhibidores de NAALADAsa reconocidos en la técnica que incluyen particularmente ciertos análogos de desaminoglutamato y derivados de glutamato N-sustituídos. Se ha encontrado que la inhibición eficaz de tal actividad de neuropeptidasa en vertebrados de sangre caliente produce un marcado potenciamiento en el rendimiento cognitivo y control del comportamiento.

A modo de ejemplo, trastornos cognitivos y del comportamiento susceptibles al tratamiento según la presente invención incluyen ansiedad y depresión. Datos de animales sugieren que el procedimiento y la formulación tienen potencial como un agente antiagresivo para controlar impulsividad y violencia en autismo, síndrome de Tourette, retraso mental, psicosis, obsesión, demencia senil e individuos con trastornos de personalidad y antecedentes de agresión inadecuada. Las aplicaciones clínicas se extienden al tratamiento de niños con ADHD y trastorno de conducta, como un ansiolítico y como un potenciador de la cognición para la población geriátrica para mejorar el aprendizaje y la memoria y para mejorar la desorientación.

En otra realización se proporciona un procedimiento para tratar un paciente aquejado de una afección, o propenso a desarrollar una afección, caracterizado al menos en parte por concentración extracelular anormal de glutamato en el cerebro u otro tejido nervioso. El procedimiento comprende la etapa de administrar al paciente cantidades eficaces de un compuesto que puede inhibir la actividad de una proteína de unión a penicilina de origen bacteriano. La composición se administra en cantidades eficaces para prevenir o aliviar los síntomas de tal afección. Por tanto, por ejemplo, se ha informado de concentraciones altas de glutamato localizadas en el cerebro en víctimas de accidente cerebrovascular y víctimas de otro traumatismo cerebral. Más recientemente se ha informado de altas concentraciones de glutamato en el cerebro y tejido nervioso periférico que se asocian a esclerosis múltiple.

En todavía otra realización se proporciona un procedimiento para tratar enfermedad de próstata seleccionada de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna en un paciente humano. El procedimiento comprende la etapa de administrar al paciente una composición que comprende un compuesto que puede inhibir la actividad de una proteína de unión a penicilina de origen bacteriano. El compuesto se administra en una cantidad eficaz para retrasar la evolución de la enfermedad o para reducir los síntomas de la enfermedad.

Un grupo de compuestos para su uso según la presente invención son compuestos de  $\beta$ -lactama, es decir, compuestos que tienen un sistema de anillo de  $\beta$ -lactama que incluye ácido clavulánico y moxalactama. Se ha informado de inhibidores de NAALADAsa de no  $\beta$ -lactama en la bibliografía de patentes y de no patentes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.795.877; 5.804.602; 5.968.915; 5.902.817; 5.962.521, 5.863.536 y 6.017.903, para su enseñanza de tales inhibidores de NAALADAsa y el uso generalmente de tales inhibidores de NAALADAsa para el tratamiento de ciertos estados de enfermedad sensibles a la terapia de inhibición de NAALADAsa. Los compuestos antibióticos para su uso en la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más de otros inhibidores de enzimas, por ejemplo, cantidades eficaces de un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (en el que el compuesto activo es un compuesto de  $\beta$ -lactama) u otro inhibidor de NAALADAsa o un inhibidor del flujo de P-glicoproteína para potenciar niveles del compuesto activo en el cerebro. El procedimiento y las realizaciones de formulación de la invención se usan tanto en aplicaciones de salud humana como de veterinaria, por ejemplo, en especies caninas, felinas y equinas.

La descripción desvela que un vertebrado de sangre caliente, lo más normalmente un paciente humano, afectado por un estado de enfermedad neurológica caracterizada por anomalías cognitivas o del comportamiento se trata con una 1-oxa-1-detia-cefalosporina, más preferentemente una 7-metoxi-1-oxa-1-detia-cefalosporina, opcionalmente como un derivado de éster activo en una formulación administrada por vía oral (incluyendo administración bucal o sublingual) o parenteralmente. En una realización, el inhibidor de peptidasas es la moxalactama, [ácido 7- $\beta$ -[2-carboxi-2-(4-hidroxifenil)acetamido]-7 $\alpha$ -metoxi-3-[[[(1-metil-1H-tetrazol-5-il)tio]metil]-1-oxa-1-detia-3-cefem-4-carboxílico], descrita y reivindicada con compuestos relacionados, que incluye sus derivados de éster activo absorbidos por vía oral; en la patente de EE.UU. n° 4.323.567 se ha encontrado que la moxalactama presenta neuroactividad sensible a dosis significativas cuando se administra parenteralmente al menos a aproximadamente 50  $\mu$ g/kg de peso corporal.

En otra realización de la presente invención se proporciona una formulación farmacéutica para el tratamiento con la consiguiente reducción de síntomas de trastornos del comportamiento o cognitivos en pacientes en necesidad de tal tratamiento como se define en la reivindicación 13. La formulación comprende un compuesto caracterizado por su afinidad por bacterias derivadas de las proteínas de unión a penicilina. En una realización, el compuesto puede unirse a e inhibir la función de una proteasa bacteriana conocida por presentar su actividad proteolítica sobre un

5 sustrato de peptidoglicano que comprende la secuencia de péptidos del extremo C acil-D-alanil-D-alanina. En otra realización, el compuesto puede unirse a  $\beta$ -lactamasa, otra proteína bacteriana que puede unirse a penicilina e inhibir la función de tal enzima. La cantidad del inhibidor usado en la formulación es la determinada para ser eficaz en la inhibición de la actividad de NAALADasa endógena. En una realización, la cantidad es eficaz para inhibir NAALADasa en el cerebro a un nivel suficiente para modular características cognitivas y del comportamiento. En esta última realización, el nivel de actividad presentado por el inhibidor de NAALADasa en el presente procedimiento no sólo depende de su afinidad por las proteínas de unión a penicilina y por NAALADasa, también es particularmente dependiente de la capacidad del compuesto de inhibidor para atravesar la barrera hematoencefálica para lograr niveles en el cerebro eficaces para modificar el rendimiento del comportamiento y/o cognitivo del paciente.

10 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica comprende un compuesto que contiene  $\beta$ -lactama seleccionado del grupo que consiste en ácido clavulánico y moxalactama. En los casos en los que el compuesto de  $\beta$ -lactama sea, por ejemplo, un antibiótico comercialmente disponible, la cantidad del compuesto de  $\beta$ -lactama en dicha formulación será inferior a la requerida para producir, tras la administración por el modo de administración comercialmente detallado, niveles en sangre del antibiótico clínicamente eficaces del compuesto. Todavía pueden ser eficaces los niveles de dosificación reducidos de dichos antibióticos, asumiendo propiedades de transporte a la barrera hematoencefálica razonables, para producir niveles en el cerebro y el LCR del compuesto suficientes para inhibir la actividad de proteasas neurogénicas en el cerebro y modificar las características cognitivas y del comportamiento. Además, tales formulaciones pueden incluir opcionalmente cantidades eficaces de uno o más de un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa y un inhibidor de la bomba de eflujo de P-glicoproteína u otro compuesto que pueda inhibir la actividad de NAALADasa y enzimas neurogénicas relacionadas. Mientras que las formulaciones de la presente invención pueden prepararse específicamente para cualquier modo de administración reconocido en la materia que pueda alcanzar las concentraciones inhibitorias de proteasas umbrales en el cerebro, normalmente se formulan para administración parenteral o por vía oral, opcionalmente en forma de liberación prolongada o formulaciones de tipo "liberación lenta de fármaco" muy conocidas en la técnica.

#### **Breve descripción de los dibujos**

15 Las Fig. 1-42 son representaciones gráficas de datos reunidos en la realización de las pruebas de moxalactama, otros antibióticos de  $\beta$ -lactama, ácido clavulánico y otros compuestos neuroactivos en diversos modelos animales aceptados en la materia para la detección de actividad contra agresión ofensiva (Fig. 1-4, 9-14, 24, 29, 31 y 32), actividad motora general, discriminación olfativa (Fig. 5), actividad sexual (Fig. 6), actividad ansiolítica (Fig. 7, 25, 26, 28, 37 y 40) y memoria espacial (Fig. 8 y 29-36). Las Fig. 15 y 16 son ilustraciones gráficas del efecto de proteína precursora del peptidoglicano administrada intracerebralmente sobre la agresión ofensiva y discriminación olfativa en hámsteres.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 La presente invención y las diversas realizaciones descritas y reivindicadas en este documento derivan, en parte, de los descubrimientos de que los compuestos que pueden unirse a e inhibir la actividad enzimática de proteínas de unión a penicilina de origen bacteriano también son potentes inhibidores de la actividad de peptidasas ácidas ligadas a  $\alpha$  N-acetiladas (NAALADasa) y posiblemente de otras enzimas relacionadas en el cerebro, y que cuando se administran para proporcionar concentraciones inhibitorias de NAALADasa umbral eficaces de la misma en el cerebro, los inhibidores de NAALADasa presentan neuroactividad clínicamente significativa evidenciada en parte por la modificación del comportamiento y la cognición y función potenciadas.

25 En una realización, los inhibidores de NAALADasa eficaces para su uso según la presente invención se caracterizan por su capacidad para inhibir una proteasa bacteriana que presenta actividad proteolítica selectiva en una proteína o sustrato de péptido que comprende acil-D-alanil-D-alanina. Expuesto alternativamente, inhibidores de NAALADasa eficaces para su uso en el tratamiento de trastornos del comportamiento y cognitivos según una realización de la presente invención pueden caracterizarse por su afinidad selectiva (por unión asociativa y/o covalente) a proteínas de unión a penicilina; basándose en ensayos en animales de hasta la fecha, tales inhibidores de proteasas bacterianas parecen funcionar a niveles de antibiótico subclínico en el cerebro para inhibir la actividad de neuropeptidasas que pueden funcionar en mediación neuroquímica de comportamiento y rendimiento cognitivo. La inhibición eficaz de la actividad de neuropeptidasas con mediación concomitante del comportamiento y el rendimiento cognitivo también se ha efectuado por la administración de un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, ácido clavulánico, un compuesto que contiene  $\beta$ -lactama que tiene actividad de antibiótico no clínicamente significativa. Se supone que la inhibición de tal actividad de neuropeptidasas (por ejemplo, NAALADasa) permite la modulación de la concentración y/o función de uno o más neurotransmisores o neuromoduladores con mejora concomitante en la función neurológica evidenciada por el potenciamiento del rendimiento cognitivo y la atenuación de fenotipos aberrantes del comportamiento. En un ejemplo de la presente invención, la moxalactama administrada i.p. a 50 microgramos/kg inhibe la agresión en hámster, potencia el aprendizaje espacial en ratas y actúa de ansiolítico en ratas. El ácido clavulánico ha mostrado actividad similar cuando se administra i.p. a menos de 1 microgramo/kg.

30 Históricamente, aquellos informados en el campo de los antibióticos de beta-lactama entienden que el modo de acción como agentes antibacterianos es inhibiendo la síntesis de la pared celular actuando de sustrato para la

proteína de unión a penicilina (PBP); el término PBP se ha extendido para incluir la unión a todas las beta-lactamas que incluyen cefalosporinas. Más recientemente, los investigadores han podido clonar y secuenciar estas PBP, además de cristalizar las enzimas y determinar motivos de sitio activo (véase P. Palomeque y col., J. Biochem., 279, 223-230, 1991). Basándose en estos datos, los cuatro sitios de unión putativos para PBP se han designado sitio activo I, II, III y IV. Los sitios activos, la localización de las secuencias y la secuencia de aminoácidos (AA) son del siguiente modo:

Sitio activo I:

35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

Sitio activo II:

10 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

Sitio activo III:

111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

Sitio activo IV:

41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

15 Con arreglo a la identificación de un sistema de enzimas en el cerebro que inhibiría la moxalactama de un modo similar a la PBP se descubrió que una enzima glutamil-carboxipeptidasa conocida como dipeptidasa ácida ligada a  $\alpha$  N-acetilada (NAALADasa) (véase M.N. Pangalos y col., J. Bio. Chem., 264, 8470-8483, 1999) tiene un solapamiento casi perfecto de los sitios activos putativos de PBP. Este sistema de enzimas es responsable de regular las rutas de neurotransmisión glutamatérgica, cuyos efectos se expresarían en tales resultados del comportamiento como  
20 agresión, memoria/cognición y ansiedad. Como resultado del solapamiento casi perfecto de los sitios activos putativos de PBP y las secuencias conservadas en NAALADasa humana y de rata, se cree que la moxalactama y otros compuestos de  $\beta$ -lactama median en los efectos del comportamiento inhibiendo la NAALADasa a bajas concentraciones. Esto se basa en la siguiente similitud de secuencias de solapamiento entre PBP y NAALADasa I, una de las varias especies de NAALADasa conocidas, como se muestra a continuación:

25 Sitio activo I:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

Sitio activo II:

PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

30 NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

Sitio activo III:

PBP: 111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

Sitio activo IV:

35 PBP: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV

40 Como las beta-lactamas proporcionan su inhibición de la transpeptidación de PBP de la pared celular bacteriana uniéndose a estos cuatro sitios activos, puede deducirse que la similitud conservada en secuencias de sitio activo y la localización conferiría propiedades de unión similares de moxalactama y otros compuestos de  $\beta$ -lactama a NAALADasa y posiblemente otras enzimas neurogénicas que tienen secuencias que se solapan con el motivo de sitio de unión activo cuatro. Ese descubrimiento acoplado a la observación de los significativos efectos de la modificación del comportamiento que se derivan de la administración de muy bajas dosis de ciertos compuestos de unión a la proteína penicilina ha proporcionado la oportunidad de un novedoso enfoque para la prevención y el tratamiento de estados de enfermedad caracterizados por disfunción neurológica.

45 Los únicos perfiles de actividad neurológica de los dos compuestos de  $\beta$ -lactama que se han estudiado más ampliamente hasta la fecha, la moxalactama y el ácido clavulánico, sugieren que aquellos compuestos presentan actividad en múltiples dianas de enzimas neurogénicas, que incluyen NAALADasa y enzimas estructuralmente

## ES 2 370 260 T3

5 relacionadas, particularmente aquellas que podrían compartir el motivo de sitio de unión activo cuatro común a tanto PBP como NAALADasa. Para identificar otras dianas neurogénicas putativas para las actividades del comportamiento y cognitivas descubiertas para moxalactama y ácido clavulánico, la secuencia para NAALADasa II se usó para buscar en la base de datos de genoma humano (NCBI-BLAST). Se identificaron siete secuencias de genes humanos que tienen homología significativa con NAALADasa II y que codifican el motivo de sitio activo cuatro:

1) >dbj/AP001769.2/AP001769 Clon RP11-240F8 map 11q14 del cromosoma 11 de Homo sapiens

Sitio activo I:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

>dbj/AP001769: NSRK

Sitio activo II:

PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

>dbj/AP001769: SFG

Sitio activo III:

PBP:111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

>dbj/AP001769: KLG

Sitio activo IV:

PBP:41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV

>dbj/AP001769: ERSI

2) >dbj/AP000827.2/AP000827 Clon RP del cromosoma 11 de Homo sapiens.

Sitio activo I:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

> dbj/AP000827.2: NSRK

Sitio activo II:

PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

> dbj/AP000827.2: SFG

Sitio activo III:

PBP:111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

> dbj/AP000827.2: KLG

Sitio activo IV:

PBP:41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

## ES 2 370 260 T3

NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV  
> dbj|AP000827.2: ERSI  
3) > dbj|AP000648.2|AP000648 Clon CM del cromosoma 11 de Homo sapiens.  
Sitio activo I:  
PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK  
NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK  
>> dbj|AP000648.2: NSRK  
Sitio activo II:  
PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN  
NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG  
> dbj|AP000648.2: SFG  
Sitio activo III:  
PBP: 111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG  
NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG  
> dbj|AP000648.2: KLG  
Sitio activo IV:  
PBP: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD  
NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV  
> dbj|AP000648.2: ERSI  
4) > gb|AC074003.2|AC074003 Clon RP11 del cromosoma 2 de Homo sapiens.  
Sitio activo I:  
PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK  
NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK  
gb|AC074003.2|AC074003: STQ-  
Sitio activo II:  
PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN  
NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG  
gb|AC074003.2|AC074003: SFG  
Sitio activo III:  
PBP: 111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG  
NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG  
gb|AC074003.2|AC074003: KLG  
Sitio activo IV:  
PBP: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD  
NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV  
gb|AC074003.2|AC074003: ER GV

## ES 2 370 260 T3

5)> emb|AL162372.6|AL162372 Clon RP del cromosoma 13 de Homo sapiens.

Sitio activo I:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

emb|AL162372.6: STQ-

Sitio activo II:

PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

emb|AL162372.6: SFG

Sitio activo III:

PBP:111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

emb|AL162372.6: KLG

Sitio activo IV:

PBP:41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV

emb|AL162372.6 ER GV

6) gb|AC024234.5|AC024234 Clon RP1 del cromosoma 11 de Homo sapiens.

Sitio activo I:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

gb|AC024234.5|AC024234: STQ-

Sitio activo II:

PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

gb|AC024234.5|AC024234: SFG

Sitio activo III:

PBP:111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

gb|AC024234.5|AC024234: KLG

Sitio activo IV:

PBP:41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV

gb|AC024234.5|AC024234 ER GV

7) dbj|AP002369.1|AP002369 Clon RP del cromosoma 11 de Homo sapiens.

Sitio activo 1:

PBP: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N:	STTK
NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N:	STQK
dbj AP002369.1:	STQ-
Sitio activo II:	
PBP: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK:	SGC, SGN o SAN
NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK:	SFG
dbj AP002369.1:	SFG
Sitio activo III:	
PBP:111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC:	KTG
NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG:	KLK
dbj AP002369.1:	KLK
Sitio activo IV:	
PBP:41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC:	ENKD
NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG:	ERGV
dbj AP002369.1	ER GV

La proteína codificada de cada una de aquellas secuencias de genes expresadas en el cerebro son dianas probables para la actividad del comportamiento y cognitiva por  $\beta$ -lactamas y otros inhibidores de NAALADasa. Por tanto, se proporciona un procedimiento para modificar el comportamiento y/o la cognición que comprende la etapa de inhibir la actividad biológica de la(s) proteína(s) no NAALADasa expresada(s) por una o más de las secuencias de genes anteriormente identificadas, administrar una cantidad eficaz de un compuesto de  $\beta$ -lactama u otro compuesto que pueda inhibir NAALADasa.

En una realización, los inhibidores de NAALADasa eficaces para su uso en las diversas realizaciones de formulaciones farmacéuticas y de procedimientos de la presente invención, en términos generales, son compuestos que presentan afinidad selectiva detectable por proteínas de unión a penicilina reconocidas en la materia que incluyen particularmente compuestos que contienen  $\beta$ -lactama (denominados en lo sucesivo "compuestos de  $\beta$ -lactama"). Entre tales compuestos inhibidores de NAALADasa, aquellos preferidos para su uso según la presente invención son compuestos que también presentan buenas propiedades de transporte a la barrera hematoencefálica evidenciadas por relaciones de concentración favorables de líquido cefalorraquídeo (LCR)/cerebro:suero. Además, se apreciará que otros inhibidores de NAALADasa reconocidos en la materia pueden usarse solos o en combinación con compuestos de unión a la proteína penicilina para el tratamiento y la prevención de trastornos del comportamiento y/o cognitivos.

En las realizaciones de la invención referidas a formulaciones farmacéuticas para su uso en la inhibición de NAALADasa neurogénica para modificar el comportamiento y/o mejorar la función cognitiva, los compuestos de  $\beta$ -lactama se formulan normalmente en forma farmacéutica unitaria opcionalmente en combinación con, o como conjugados covalentes de, otros compuestos o entidades moleculares, respectivamente, conocidos por potenciar el transporte de fármaco a través de la barrera hematoencefálica. Tales técnicas de formulación/conjugación de fármacos se describen y se reivindican en la siguiente lista de patentes de Estados Unidos: las patentes de EE.UU. números 5.624.894; 5.672.683; 5.525.727; 5.413.996; 5.296.483; 5.187.158; 5.177.064; 5.082.853; 5.008.257; 4.933.438; 4.900.837; 4.880.921; 4.824.850; 4.771.059; y 4.540.564.

Concentraciones potenciadas de principios activos, que incluyen inhibidores de NAALADasa en el cerebro, también pueden lograrse por co-administración con inhibidores del flujo de P-glicoproteína tales como aquellos descritos en las patentes de EE.UU. números 5.889.007; 5.874.434; 5.654.304; 5.620.855; 5.643.909; y 5.591.715. Alternativamente, los compuestos antibióticos de  $\beta$ -lactama útiles según la presente invención, que incluyen ácido clavulánico y moxalactama, pueden administrarse solos o en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasa reconocidos en la materia, que por sí mismos pueden o pueden no ser compuestos de  $\beta$ -lactama o compuestos que pueden presentar afinidad selectiva por proteínas de unión a penicilina. Ejemplos de inhibidores de  $\beta$ -lactamasa que pueden usarse solos o en combinación con otros inhibidores de neuropeptidasas útiles según la presente invención para el tratamiento y/o la prevención de trastornos cognitivos o del comportamiento son otros compuestos de  $\beta$ -lactama que pueden o pueden no presentar actividad antibacteriana independiente clínicamente significativa tales como ácido clavulánico y tienamicina y análogos de los mismos, sulbactam, tazobactam, sultamicilina, y aztreonam y otras monolactamas.

La bibliografía de patentes y de no patentes está repleta de referencias que describen antibióticos de  $\beta$ -lactama, su preparación, su caracterización, su formulación y su modo de acción. Los antibióticos de  $\beta$ -lactama son conocidos por presentar su actividad antibiótica interfiriendo con una o más rutas biológicas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana; más particularmente, inhiben la actividad de carboxipeptidasas y/o transpeptidasas (o proteasas) implicadas en la reticulación de las cadenas de peptidoglicano usadas como bloques de construcción para la síntesis de la pared celular. Por tanto, se cree que los antibióticos de  $\beta$ -lactama actúan de inhibidores de carboxipeptidasas o transpeptidasas por su unión asociativa covalente y, por algunos informes, no covalente, a uno o más de un grupo de tales enzimas bacterianas generalmente llamadas proteínas de unión a penicilina (PBP). Tales enzimas sirven para completar la síntesis de la pared celular bacteriana reticulando cadenas de peptidoglicano.

Ahora se sugiere una interacción/inhibición de peptidasa-sustrato similar según la presente invención como ruta neuroquímica significativa implicada en la función cerebral fundamental para el fenotipo de rendimiento cognitivo y del comportamiento. Un mecanismo neuroquímico tal también es sugerido por el descubrimiento de que la administración de cantidades eficaces del péptido Ala-D- $\gamma$ -Glu-Lys-D-alanil-D-alanina directamente al cerebro produjo las mismas características de comportamiento modificadas que las logradas por las concentraciones comparables de compuestos de  $\beta$ -lactama en el cerebro. Parece que el péptido sirve de sustrato sustituto para (y por tanto, sirve para inhibir la actividad del mismo) una o más peptidasas neurogénicas (por ejemplo, NAALADAsas) que normalmente presentan su actividad en neurotransmisores o neuromoduladores peptídicos, es decir, NAAD, en el transcurso ordinario de ciertos procesos neuroquímicos que median en el fenotipo del rendimiento cognitivo y del comportamiento.

Basándose en ensayos en animales hasta la fecha, se cree que las clases generales de trastornos del comportamiento que pueden prevenirse o tratarse según la presente invención mediante administración de cantidades eficaces de inhibidores de NAALADasa incluyen ansiedad y depresión. Un inhibidor de NAALADasa seleccionado de aquellos que pueden unirse a la proteína de unión a penicilina, por ejemplo, un antibiótico de  $\beta$ -lactama o inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, y/o aquellos que presentan inhibición de la actividad proteolítica selectiva sobre una proteína bacteriana o sustrato de péptido que comprende la secuencia de aminoácidos acil-D-alanil-D-alanina del extremo C, u otro inhibidor de NAALADasa, se administra como agente antiagresivo para controlar la impulsividad y violencia en un paciente aquejado de autismo, síndrome de Tourette, retraso mental, psicosis, obsesión, demencia senil o en un paciente con trastorno de personalidad y antecedentes de agresión inadecuada. En otra realización, un análogo de desaminoglutamato o un derivado de glutamato N-sustituido se administra en una cantidad eficaz para controlar impulsividad y violencia en pacientes afectados con tales estados de enfermedad.

Otros estados de enfermedad neurológica que pueden tratarse incluyen depresión, que incluye depresión mayor (episodio individual, recurrente, melancólica), atípica, distimia, subsindrómica, agitada, retardada, co-mórbida con cáncer, diabetes, o post-infarto de miocardio, involutiva, trastorno bipolar, depresión psicótica, endógena y reactiva, trastorno obsesivo-compulsivo, o bulimia. Además, los inhibidores de NAALADasa pueden usarse para tratar pacientes que padecen dolor (administrados sola o en combinación con morfina, codeína o dextropropoxifeno), trastorno obsesivo-compulsivo de personalidad, trastorno de estrés postraumático, hipertensión, aterosclerosis, ansiedad, anorexia nerviosa, pánico, fobia social, tartamudeo, trastornos del sueño, fatiga crónica, déficit cognitivo asociado a enfermedad de Alzheimer, consumo excesivo ocasional de alcohol, trastornos del apetito, pérdida de peso, agorafobia, mejora de la memoria, amnesia, cese de fumar, síntomas del síndrome de abstinencia de nicotina, trastornos del estado de ánimo y/o del apetito asociados a síndrome premenstrual, ánimo depresivo y/o deseo de hidratos de carbono asociado a síndrome premenstrual, trastornos del estado de ánimo, trastornos del apetito o trastornos que contribuyen a la reincidencia asociados a la abstinencia de nicotina, trastorno del ritmo circadiano, trastorno fronterizo de personalidad, hipocondriasis, síndrome premenstrual (PMS), trastorno disfórico de fase lútea tardía, trastorno disfórico premenstrual, tricotilomanía, síntomas tras la suspensión de otros antidepresivos, trastorno explosivo agresivo/intermitente, ludopatía, gasto compulsivo, sexo compulsivo, trastorno por el uso de sustancias psicoactivas, trastorno sexual, esquizofrenia, eyaculación precoz o síntomas psiquiátricos seleccionados de estrés, preocupación, cólera, sensibilidad al rechazo y carencia de energía mental o física.

Otros ejemplos de afecciones psicológicas patológicas que pueden tratarse incluyen retraso mental moderado (318.00), retraso mental grave (318.10), retraso mental profundo (318.20), retraso mental de gravedad no especificada (319.00), trastorno autista (299.00), trastorno generalizado del desarrollo no especificado (299.80), trastorno por déficit de atención con hiperactividad (314.01), trastorno de conducta, tipo de grupo (312.20), trastorno de conducta, tipo agresivo solitario (312.00), trastorno de conducta, tipo indiferenciado (312.90), trastorno de Tourette (307.23), trastorno de tics motores o vocales crónicos (307.22), trastorno de tics transitorios (307.21), trastorno de tics no especificados (307.20), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, sin complicaciones (290.00), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, con confusión (290.30), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, con ideas delirantes (390.20), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, con depresión (290.21), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición presenil, sin complicaciones (290.10), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición presenil, con confusión (290.11), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición presenil, con ideas delirantes (290.12), demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición presenil, con depresión (290.13), demencia multi-infarto, sin complicaciones (290.40), demencia multi-infarto, con confusión (290.41),

demencia multi-infarto, con ideas delirantes (290.42), demencia multi-infarto, con depresión (290.4 3), demencia senil no especificada (290.10), demencia presenil no especificada (290.10), confusión por abstinencia alcohólica (291.00), alucinosis alcohólica (291.30), demencia por alcohol asociada a alcoholismo (291.20), intoxicación simpaticomimética por anfetaminas o de acción similar (305.70), trastorno delirante simpaticomimético por anfetaminas o de acción similar (292.11), trastorno delirante por cannabis (292.11), intoxicación por cocaína (305.60), confusión por cocaína (292.81), trastorno delirante por cocaína (292.11), alucinosis por alucinógenos (305.30), trastorno delirante por alucinógenos (292.11), trastorno del estado de ánimo por alucinógenos (292.84), trastorno de percepción postalucinógeno por alucinógenos (292.89), intoxicación por fenciclidina (pcp) o por arilciclohexilaminas de acción similar (305.90), confusión por fenciclidina (pcp) o por arilciclohexilaminas de acción similar (292.81), trastorno delirante por fenciclidina (pcp) o por arilciclohexilaminas de acción similar (292.11), trastorno del estado de ánimo por fenciclidina (pcp) o por arilciclohexilaminas de acción similar (292.84), trastorno mental orgánico no especificado por fenciclidina (pcp) o por arilciclohexilaminas de acción similar (292.90), intoxicación por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (305.90), confusión por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.81), demencia por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.82), trastorno delirante por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.11), alucinosis por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.12), trastorno del estado de ánimo por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.84), trastorno de ansiedad por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.89), trastorno de personalidad por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.89), trastorno mental orgánico no especificado por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.90), confusión (293.00), demencia (294.10), trastorno delirante orgánico (293.81), alucinosis orgánica (293.81), trastorno del estado de ánimo orgánico (293.83), trastorno orgánico de ansiedad (294.80), trastorno orgánico de personalidad (310.10), trastorno mental orgánico (29.80), trastorno obsesivo-compulsivo (300.30), trastorno de estrés postraumático (309.89), trastorno de ansiedad generalizada (300.02), trastorno de ansiedad no especificado (300.00), trastorno dismórfico corporal (300.70), hipocondriasis (o neurosis hipocondríaca) (300.70), trastorno de somatización (300.81), trastorno somatoforme indiferenciado (300.70), trastorno somatoforme no especificado (300.70), trastorno explosivo intermitente (312.34), cleptomanía (312.32), ludopatía (312.31), piromanía (312.33), tricotilomanía (312.39) y trastorno de control de los impulsos no especificado (312.39).

Ejemplos adicionales de afecciones psicológicas patológicas que pueden tratarse usando los inhibidores de las proteasas que contienen  $\beta$ -lactama incluyen esquizofrenia, catatónica, subcrónica, (295.21), esquizofrenia, catatónica, crónica (295.22), esquizofrenia, catatónica, subcrónica con exacerbación aguda (295.23), esquizofrenia, catatónica, crónica con exacerbación aguda (295.24), esquizofrenia, catatónica, en remisión (295.55), esquizofrenia, catatónica, no especificada (295.20), esquizofrenia, desorganizada, crónica (295.12), esquizofrenia, desorganizada, subcrónica con exacerbación aguda (295.13), esquizofrenia, desorganizada, crónica con exacerbación aguda (295.14), esquizofrenia desorganizada, en remisión (295.15), esquizofrenia, desorganizada, no especificada (295.10), esquizofrenia, paranoide, subcrónica (295.31), esquizofrenia, paranoide, crónica (295.32), esquizofrenia, paranoide, subcrónica con exacerbación aguda (295.33), esquizofrenia, paranoide, crónica con exacerbación aguda (295.34), esquizofrenia, paranoide, en remisión (295.35), esquizofrenia, paranoide, no especificada (295.30), esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica (295.91), esquizofrenia, indiferenciada, crónica (295.92), esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica con exacerbación aguda (295.93), esquizofrenia, indiferenciada, crónica con exacerbación aguda (295.94), esquizofrenia, indiferenciada, en remisión (295.95), esquizofrenia, indiferenciada, no especificada (295.90), esquizofrenia, residual, subcrónica (295.61), esquizofrenia, residual, crónica (295.62), esquizofrenia, residual, subcrónica con exacerbación aguda (295.63), esquizofrenia, residual, crónica con exacerbación aguda (295.94), esquizofrenia, residual, en remisión (295.65), esquizofrenia, residual, no especificada (295.60), trastorno delirante (paranoide) (297.10), psicosis reactiva breve (298.80), trastorno esquizofreniforme (295.40), trastorno esquizoafectivo (295.70), trastorno psicótico inducido (297.30), trastorno psicótico no especificado (psicosis atípica) (298.90), trastorno bipolar, mixto, grave, sin características psicóticas (296.63), trastorno bipolar, maníaco, grave, sin características psicóticas (296.43), trastorno bipolar, depresivo, grave, sin características psicóticas (296.53), trastorno bipolar, mixto, con características psicóticas (296.64), trastorno bipolar, maníaco, con características psicóticas (296.44), trastorno bipolar, depresivo, con características psicóticas (296.54), trastorno bipolar no especificado (296.70), depresión mayor, episodio individual, con características psicóticas (296.24), depresión mayor, recurrente con características psicóticas (296.34) trastornos de personalidad, paranoides (301.00), trastornos de personalidad, esquizoides (301.20), trastornos de personalidad, esquizotípicos (301.22), trastornos de personalidad, antisociales (301.70), trastornos de personalidad, fronterizos (301.83).

Los trastornos de ansiedad que pueden tratarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, trastornos de ansiedad (235), trastorno de pánico (235), trastorno de pánico con agorafobia (300.21), trastorno de pánico sin agorafobia (300.01), agorafobia sin antecedentes de trastornos de pánico (300.22), fobia social (300.23), fobia simple (300.29), trastorno orgánico de ansiedad (294.80), trastorno de ansiedad por sustancias psicoactivas (292.89), trastorno de ansiedad por separación (309.21), trastorno de evitación de la infancia o adolescencia (313.21) y trastorno de hiperansiedad (313.00).

Cantidades eficaces de inhibidores de NAALADasa, particularmente los compuestos de  $\beta$ -lactama descritos en este documento, pueden usarse para el tratamiento de las siguientes afecciones psicológicas patológicas: retraso mental moderado; retraso mental grave; retraso mental profundo; trastorno autista; trastorno por déficit de atención con hiperactividad; trastorno generalizado del desarrollo no especificado; trastorno de conducta, tipo de grupo; trastorno

de conducta, tipo agresivo solitario; trastorno de Tourette; demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, con confusión; demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición senil, con ideas delirantes; demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, aparición presenil; esquizofrenia, catatónica, subcrónica; esquizofrenia, catatónica, crónica; esquizofrenia, catatónica, subcrónica con exacerbación aguda; 5 esquizofrenia, catatónica, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, catatónica, en remisión; esquizofrenia, catatónica, no especificada; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica; esquizofrenia, desorganizada, crónica; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, en remisión; esquizofrenia, desorganizada, no especificada; esquizofrenia, paranoide, subcrónica; esquizofrenia, paranoide, crónica; esquizofrenia, paranoide, subcrónica con 10 exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, en remisión; esquizofrenia, paranoide, no especificada; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica; esquizofrenia, indiferenciada, crónica; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, en remisión; esquizofrenia, 15 indiferenciada, no especificada; esquizofrenia, residual, subcrónica; esquizofrenia, residual crónica; esquizofrenia, residual, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, en remisión; esquizofrenia, residual, no especificada; trastorno (paranoide) delirante; psicosis reactiva breve; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo; trastorno psicótico inducido; trastorno psicótico no especificado (psicosis atípica); trastorno bipolar, mixto, con características psicóticas; trastorno bipolar, maníaco, con características psicóticas; trastorno bipolar, depresivo, con características psicóticas; trastorno bipolar 20 no especificado; depresión mayor, episodio individual, o recurrente con características psicóticas; trastornos de personalidad, paranoides; trastornos de personalidad, esquizoides; trastornos de personalidad, esquizotípicos; trastornos de personalidad, antisociales; trastornos de personalidad, fronterizos, trastornos de ansiedad, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, trastorno de pánico sin agorafobia, agorafobia sin antecedentes de trastornos de pánico, fobia social, fobia simple, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés postraumático, 25 trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad no especificado, trastorno orgánico de ansiedad, trastorno de ansiedad por sustancias psicoactivas, trastorno de ansiedad por separación, trastorno de evitación de la infancia o adolescencia y trastorno de hiperansiedad.

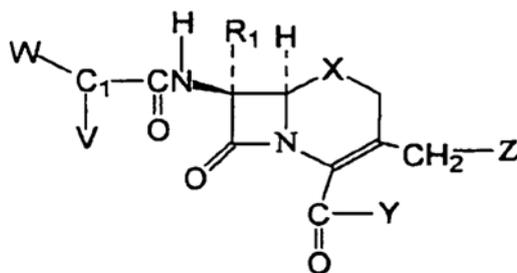
Uno o más inhibidores de NAALADasa neurogénicos, que incluyen particularmente antibióticos de β-lactama neurotrópicos o inhibidores de β-lactamasas, pueden usarse solos, en combinación o en combinación con 30 inhibidores de P-glicoproteínas para tratar las siguientes afecciones psicóticas: esquizofrenia, catatónica, subcrónica; esquizofrenia, catatónica, crónica; esquizofrenia, catatónica, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, catatónica, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, catatónica, en remisión; esquizofrenia, catatónica, no especificada; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica; esquizofrenia, desorganizada, crónica; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, crónica con 35 exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, en remisión; esquizofrenia, desorganizada, no especificada; esquizofrenia, paranoide, subcrónica; esquizofrenia, paranoide, crónica; esquizofrenia, paranoide, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, en remisión; esquizofrenia, paranoide, no especificada; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica; esquizofrenia, 40 indiferenciada, crónica; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, en remisión; esquizofrenia, indiferenciada, no especificada; esquizofrenia, residual, subcrónica; esquizofrenia, residual, crónica; esquizofrenia, residual, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, en remisión; esquizofrenia, residual, no especificada; trastorno (paranoide) delirante; psicosis reactiva breve; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo; trastorno psicótico inducido; trastorno psicótico no especificado (psicosis atípica); trastorno bipolar, mixto, con características psicóticas; trastorno bipolar, 45 maníaco, con características psicóticas; trastorno bipolar, depresivo, con características psicóticas; trastorno bipolar no especificado; trastornos de personalidad, paranoides; trastornos de personalidad, esquizoides; trastornos de personalidad, esquizotípicos; trastornos de personalidad, antisociales; trastornos de personalidad, fronterizos.

Ejemplos de afecciones psicóticas que son las más preferiblemente tratadas incluyen esquizofrenia, catatónica, subcrónica; esquizofrenia, catatónica, crónica; esquizofrenia, catatónica, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, catatónica, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, catatónica, en remisión; esquizofrenia, 50 catatónica, no especificada; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica; esquizofrenia, desorganizada, crónica; esquizofrenia, desorganizada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, desorganizada, en remisión; esquizofrenia, desorganizada, no especificada; esquizofrenia, paranoide, subcrónica; esquizofrenia, paranoide, crónica; esquizofrenia, paranoide, subcrónica con 55 exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, paranoide, en remisión; esquizofrenia, paranoide, no especificada; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica; esquizofrenia, indiferenciada, crónica; esquizofrenia, indiferenciada, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, indiferenciada, en remisión; esquizofrenia, 60 indiferenciada, no especificada; esquizofrenia, residual, subcrónica; esquizofrenia, residual, crónica; esquizofrenia, residual, subcrónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, crónica con exacerbación aguda; esquizofrenia, residual, en remisión; esquizofrenia, residual, no especificada; trastorno (paranoide) delirante, psicosis reactiva breve; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo; trastornos de personalidad, esquizoides; y trastornos de personalidad, esquizotípicos.

En un aspecto preferido de la presente invención se proporciona un tratamiento para ansiedad. Ejemplos de trastornos de ansiedad que se tratan usando el presente procedimiento y formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen trastornos de ansiedad, trastorno de pánico, trastorno de pánico con agorafobia, trastorno de pánico sin agorafobia, agorafobia sin antecedentes de trastornos de pánico, fobia social, fobia simple, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés postraumático, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad no especificado, trastorno orgánico de ansiedad, trastorno de ansiedad por sustancias psicoactivas, trastorno de ansiedad por separación, trastorno de evitación de la infancia o adolescencia y trastorno de hiperansiedad.

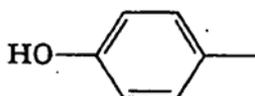
Ejemplos de los trastornos de ansiedad que son los más preferiblemente tratados incluyen trastorno de pánico; fobia social; fobia simple; trastorno orgánico de ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo; trastorno de estrés postraumático; trastorno de ansiedad generalizada; y trastorno de ansiedad no especificado.

Los inhibidores de NAALADasa usados como agente neuroquímicamente funcional en los procedimientos y formulaciones se caracterizan particularmente por su unión a proteínas de unión a penicilina [como se determina usando los procedimientos descritos, por ejemplo, por B.G. Spratt, Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K12, Eur. J. Biochem, 72:341-352(1977) y N. H. Georgopapadakou, S.A Smith, C.M. Cimarusti, y R. B. Sykes, Binding of monolactams to penicillin-binding proteins of Escherichia coli and Staphylococcus aureus: Relation to antibacterial activity, Antimicrob. Agents Chemother., 23:98-104(1983)] y, en el caso de antibióticos, por su inhibición de la actividad de carboxipeptidasa y/o transpeptidasa selectiva en sustratos de péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos Ala-D-γ-Glu-Lys-D-alanil-D-alanina. Tales compuestos incluyen particularmente compuestos de β-lactama.



Ia

en la que



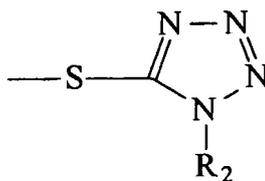
V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única; X=O;

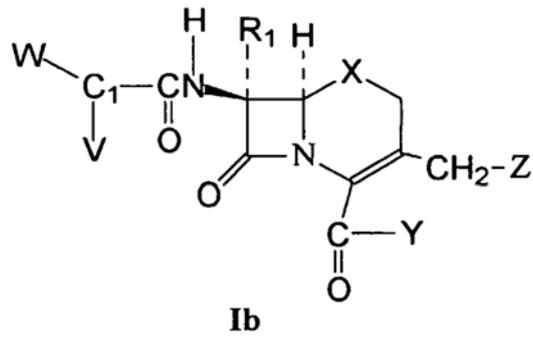
R<sub>1</sub>= alcoxilo inferior, preferentemente metoxi;

Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

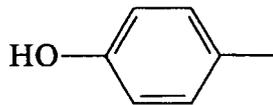
Z=



en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



en la que



5 V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

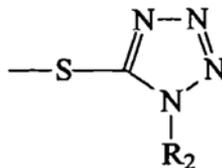
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X=O;

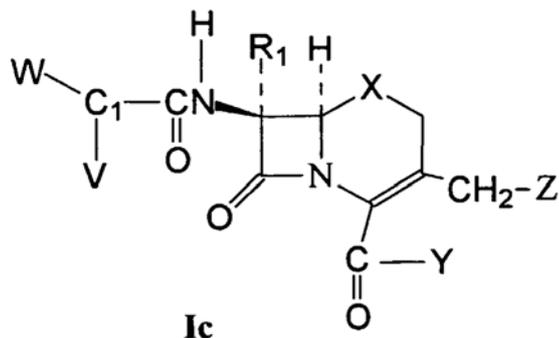
R<sub>1</sub>=H;

10 Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

Z=



en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



15 en la que

V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

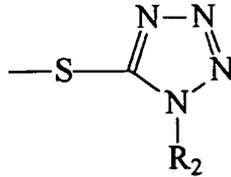
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X= S, S=O, SO<sub>2</sub>;

R<sub>1</sub>= alcoxi inferior, preferentemente metoxi;

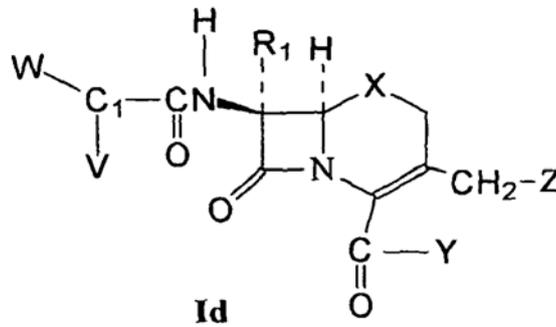
Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

Z=

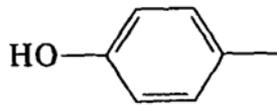


5

en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



en la que



10 V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

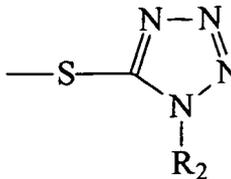
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X= S, S=O, SO<sub>2</sub>;

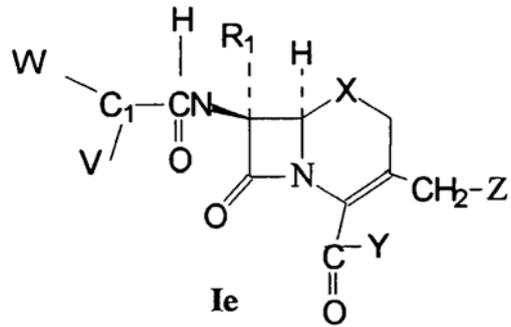
R<sub>1</sub>=H;

15 Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

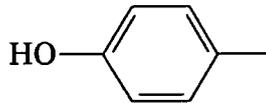
Z=



en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



en la que



5 V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

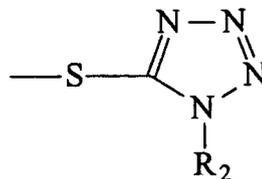
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X= C;

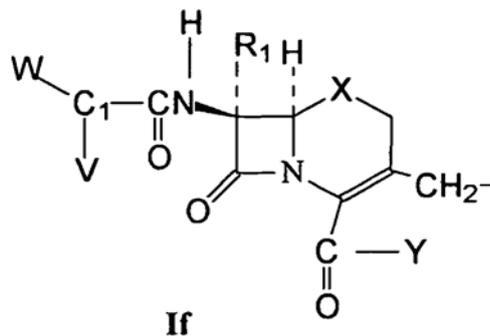
R<sub>1</sub>= alcoxilo inferior, preferentemente metoxi;

10 Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

Z=

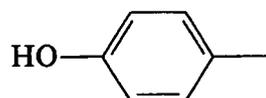


en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



15 en la que

W=



V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

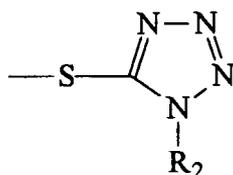
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X=C;

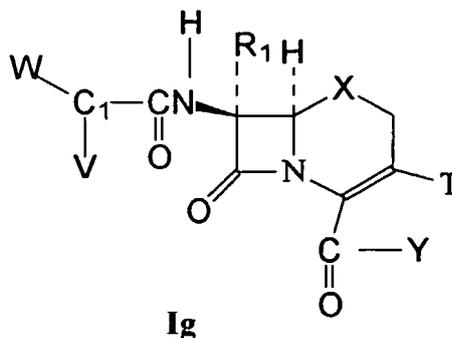
5 R<sub>1</sub>=H;

Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

Z=

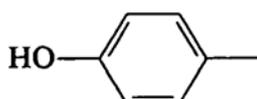


10 en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo inferior ramificado.



en la que

W=



15 V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

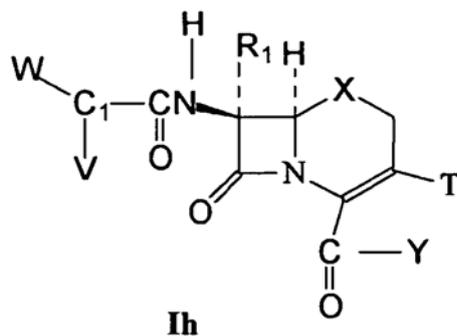
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X= C;

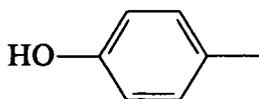
R<sub>1</sub>=H;

20 Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo, etc.; y

T= Cl, F, Br, I, CH<sub>3</sub>, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo que incluye heteroarilo, S-alquilo, S-arilo que incluye S-heteroarilo, SO<sub>3</sub>R (R=H, alquilo, arilo), SO<sub>2</sub>R (R=H, alquilo, arilo), N-alquilo<sub>2</sub>, N-arilo<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R (R=H, alquilo), P-alquilo<sub>2</sub>, P-arilo<sub>2</sub>, PO<sub>3</sub>R<sub>2</sub> (R=H, alquilo, arilo).



en la que



5 V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

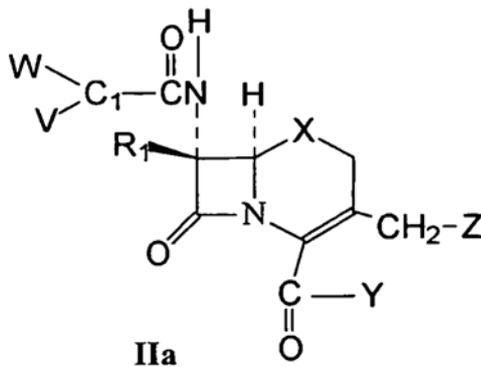
la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X=C;

R<sub>1</sub>= alcoxilo inferior, preferentemente metoxi;

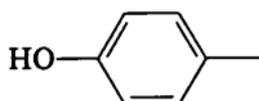
10 Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo, etc.; y

T= Cl, F, Br, I, CH<sub>3</sub>, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, arilo que incluye heteroarilo, S-alquilo, S-arilo que incluye S-heteroarilo, SO<sub>3</sub>R (R=H, alquilo, arilo), SO<sub>2</sub>R (R=H, alquilo, arilo), N-alquilo<sub>2</sub>, N-arilo<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R (R=H, alquilo), P-alquilo<sub>2</sub>, P-arilo<sub>2</sub>, PO<sub>3</sub>R<sub>2</sub> (R=H, alquilo, arilo).



15 en la que

W=



V= -CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, SO<sub>2</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub>M en las que M=H o una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster,

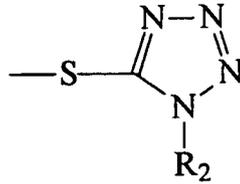
20 la quiralidad en C1 puede ser R o S, teniendo cada epímero actividad biológica única;

X= O;

R<sub>1</sub>= alcoxi inferior, preferentemente metoxi;

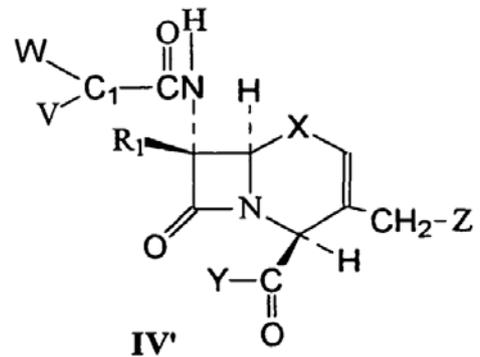
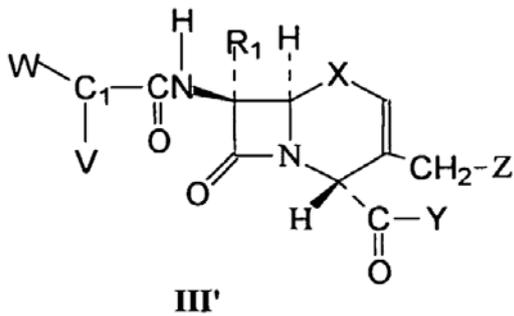
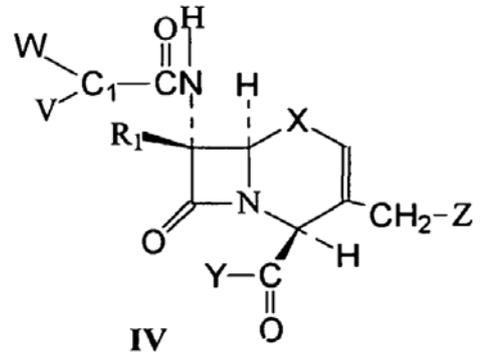
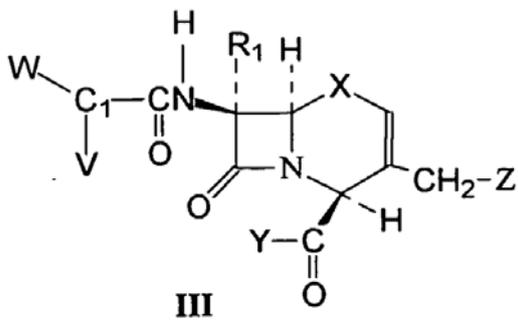
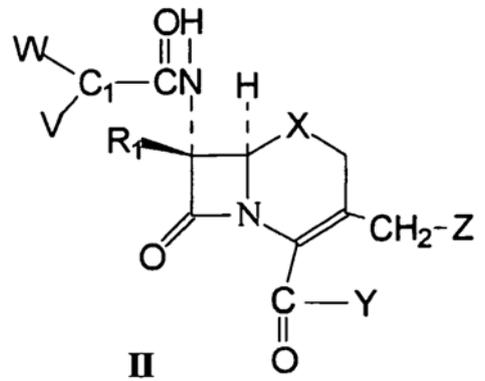
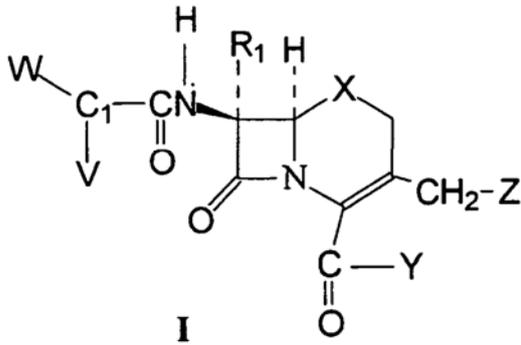
Y= OM, M=H, una sal farmacéuticamente aceptable o grupo formador de éster activo tal como 1-indanilo, pivaloiloximetilo, acetoximetilo; y

Z=

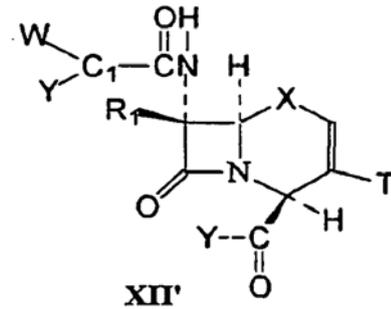
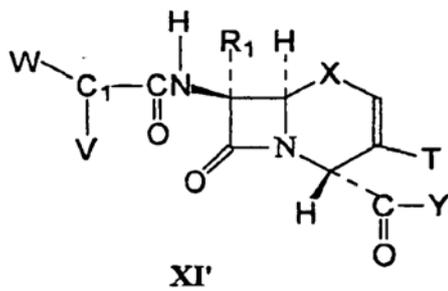
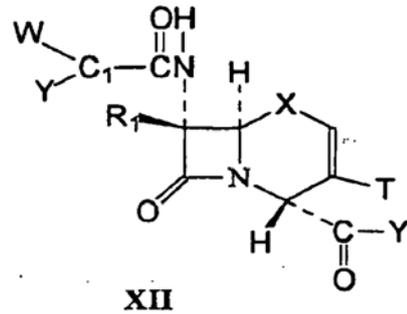
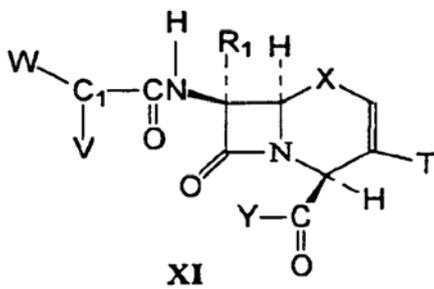
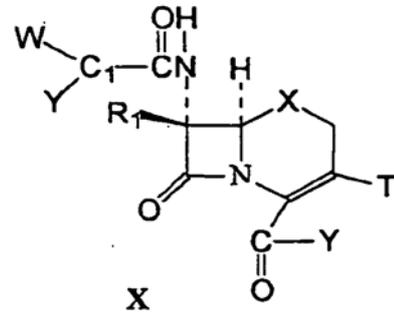
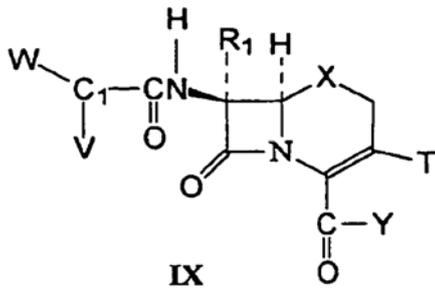


5

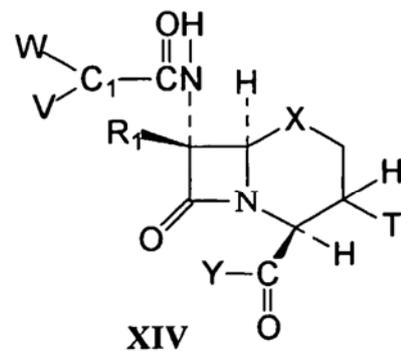
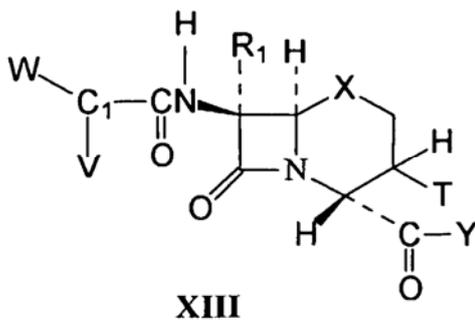
en la que R<sub>2</sub>= alquilo inferior, preferentemente metilo, o alquilo general ramificado.

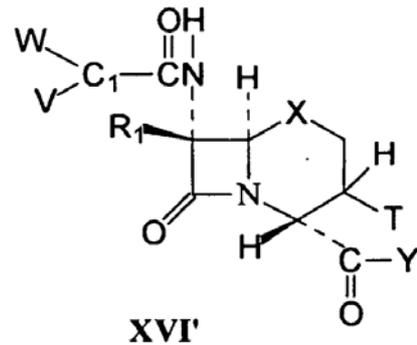
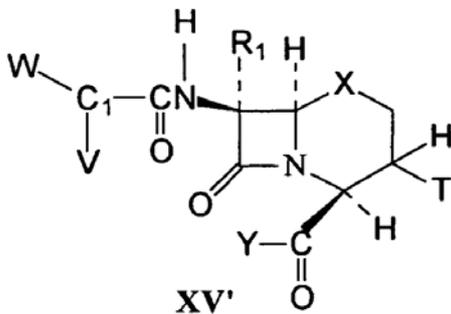
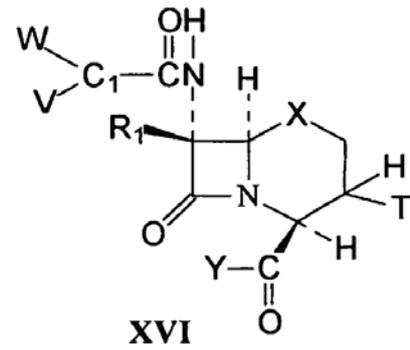
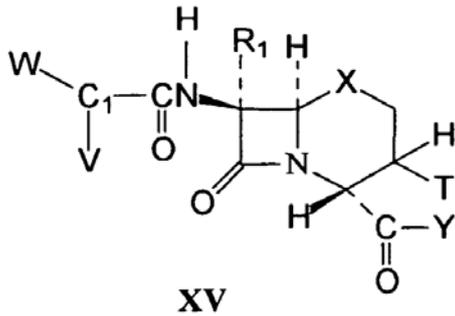


Otros compuestos son aquellos compuestos de fórmulas III, IV, III' y IV', respectivamente, en las que los grupos W, V, X, R<sub>1</sub>, Y, M y Z son como se definen para los compuestos Ia - If, respectivamente.



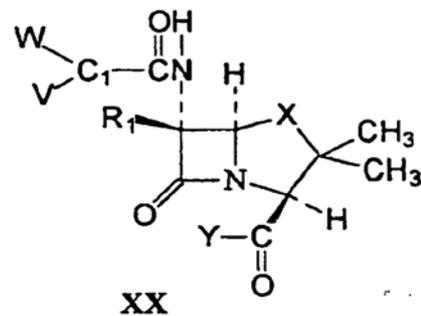
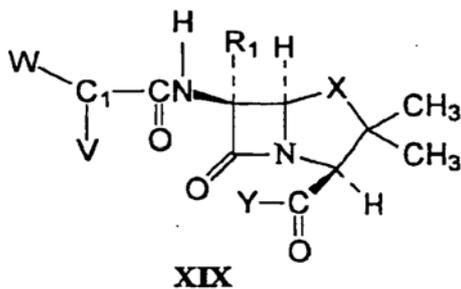
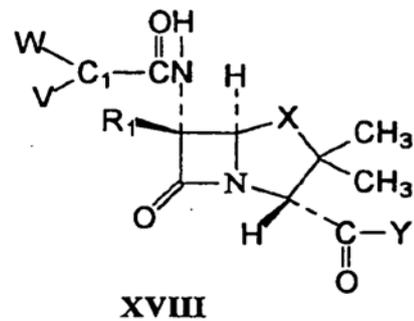
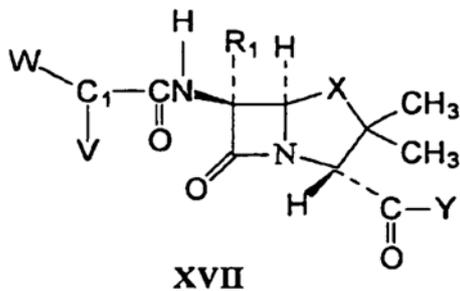
- 5 Otros compuestos preferidos, IXa - IXf; Xa - Xf, XIa - XI'f, XIIa - XII'f, XI'a - XI'f y XII'a - XII'f, son aquellos compuestos de fórmulas IX, X, XI, XII, XI', y XII', respectivamente, en las que los grupos W, V, X, R<sub>1</sub>, Y y M son como se definen para los compuestos Ia - If, respectivamente, y el grupo T se define como para los compuestos Ig y Ih, respectivamente.





Otro grupo de compuestos preferidos XIIIa - XIIIf, XIVa - XIVf, XVa - XVf, XVIa - XVIf, XV'a - XV'f y XVI'a - XVI'f son aquellos compuestos de fórmulas XIII, XIV, XV, XVI, XV' y XVI', respectivamente, en las que los grupos W, V, X, R<sub>1</sub>, Y y M son como se definen para los compuestos Ia - If, respectivamente, y el grupo T se define como para los compuestos Ig y Ih, respectivamente.

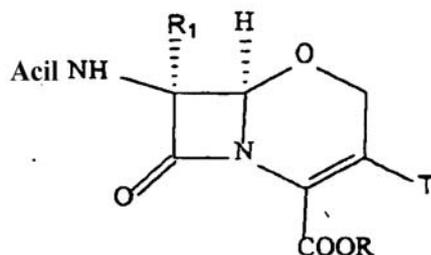
5



Otro grupo de compuestos preferidos son los compuestos XVIIa - XVIIIf, XVIIIa - XVIIIIf, XIXa - XIXf y XXa - XXf, respectivamente, en los que los grupos W, V, X, R<sub>1</sub>, M e Y son como se definen para los compuestos Ia - If, respectivamente.

10

En una realización preferida de la presente invención es moxalactama, un inhibidor de proteasas de fórmula:



en la que R es hidrógeno, un grupo formador de sales o un grupo formador de ésteres activos; R<sup>1</sup> es hidrógeno o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; T es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, halo (incluyendo cloro, flúor, bromo y yodo), hidroxilo, O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -CH<sub>2</sub>B en la que B es el residuo de un B:H nucleófilo, y Acil es el residuo de un ácido orgánico Acil OH.

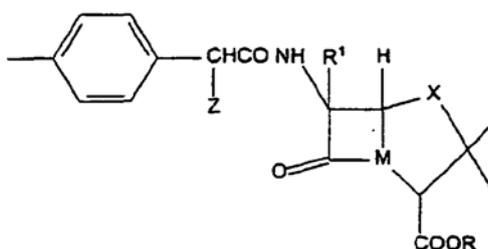
5 Ejemplos de tales compuestos comercialmente disponibles (1-alcoxi-1-detia-cefemas) son moxalactama y flomoxef. La moxalactama se describe y se reivindica en la patente de EE.UU. n° 4.323.567. La moxalactama se prefiere particularmente debido a su buen transporte a la barrera hematoencefálica, proporcionando así una relación de concentración relativamente alta de ese compuesto en el cerebro con respecto a niveles en sangre/suero.

10 En otra realización de la invención, la moxalactama (o derivado o análogo de la misma) detallada para administración parenteral para lograr concentraciones en tejido de antibiótico clínicamente eficaces se convierte en los ésteres mono- o bis-activos correspondientes para mejorar la absorción oral de dichos compuestos a un nivel suficiente para inhibir la actividad de proteasas neurogénicas en el cerebro y concomitantemente efectuar el comportamiento y rendimiento cognitivo, aunque a una concentración en suero insuficiente para la eficacia clínica del antibiótico.

15 Alternativamente, un derivado de glutamato N-sustituido o un análogo de glutamato 2-desamino-2-sustituido se convierten en un derivado de éster activo correspondiente. Ejemplos de grupos éster (activos) hidrolizables *in vivo* adecuados incluyen, por ejemplo, grupos aciloxialquilo tales como acetoximetilo, pivaloioximetilo, β-acetoxietilo, β-pivaloioxietilo, 1-(ciclohexilcarboniloxi)prop-1-ilo y (1-aminoetil)carboniloximetilo; grupos alcóxicarboniloxialquilo tales como etoxicarboniloximetilo y alfa-etoxicarboniloxietilo; grupos dialquilaminoalquilo tales como etoxicarboniloximetilo y β-etoxicarboniloxietilo; grupos dialquilaminoalquilo, especialmente di-alquil inferior-aminoalquilo tales como dimetilaminometilo, dimetilaminoetilo, dietilaminometilo o dietilaminoetilo; grupos 2-(alcóxicarbonil)-2-alqueno tales como 2-(isobutoxicarbonil)pent-2-enilo y 2-(etoxicarbonil)but-2-enilo; grupos lactona tales como ftalidilo y dimetoxiftalidilo; y ésteres ligados a un segundo antibiótico de β-lactama o a un inhibidor de β-lactamasa. Un ejemplo de tal modificación química de un antibiótico de β-lactama parenteral comercialmente disponible es moxalactama (Ia, Y=OH, R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub> y V=COM en la que M=OH), es la preparación de su análogo de éster activo Ia en la que Y=OM, M=H o un éster activo, por ejemplo, 1-indanilo y V=CO<sub>2</sub>M en la que M es H o un éster activo en el que al menos uno de V e Y incluye un resto de éster activo.

30 Sales farmacéuticamente aceptables adecuadas del grupo carboxi de los antibióticos de β-lactama anteriormente identificados o derivados o análogos de glutamato incluyen sales metálicas, por ejemplo, sales de aluminio, de metales alcalinos tales como sodio o potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como calcio o magnesio, y sales de amonio o amonio sustituido, por ejemplo, aquellas con alquil inferior-aminas tales como trietilamina, hidroxialquil inferior-aminas tales como 2-hidroxi-etilamina, bis-(2-hidroxi-etil)amina o tris-(2-hidroxi-etil)amina, cicloalquilaminas tales como dicitclohexilamina, o con procaína, dibencilamina, N,N-dibencil-etilendiamina, 1-efenamina, N-metilmorfolina, N-etilpiperidina, N-bencil-β-fenilamina, deshidroabietilamina, N,N'-bisdeshidroabietilamina, etilendiamina, o bases del tipo piridina tales como piridina, colidina o quinolina, u otras aminas que se han usado para formar sales con penicilinas y cefalosporinas conocidas. Otras sales útiles incluyen la sal de litio y la sal de plata. Las sales dentro de los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse por intercambio de sales de manera convencional.

Una penicilina o análogo de penicilina de fórmula



40 se emplea como inhibidor de NAALADasa en la que en dicha fórmula X = O, S, SO, SO<sub>2</sub> o C; R es H o un grupo

formador de sales o formador de ésteres farmacéuticamente aceptables; R<sup>1</sup> es H o alcoxi inferior, G es hidrógeno o hidroxilo, y Z es amino, acilamino, CO<sub>2</sub>M, SO<sub>3</sub>M, PO<sub>3</sub>M<sub>2</sub> o PO<sub>2</sub>M en las que M es hidrógeno o un grupo formador de sales o formador de ésteres farmacéuticamente aceptables, preferentemente un grupo formador de ésteres activos.

- 5 Penama y cefema o sulfóxidos y sulfonas de cefemas no antibióticos o débilmente antibióticos e inhibidores de β-lactamasas estructuralmente relacionados tales como tazobactam, ácido clavulánico y sulbactam son particularmente útiles en aplicaciones es las que importa el desarrollo de resistencia a antibióticos.

Existe una amplia variedad de antibióticos de β-lactama comercialmente disponibles que pueden usarse, o modificarse o formularse para su uso para optimizar su eficacia. Ejemplos de tales compuestos son:

- nafato de cefamandol (Mandol)
- 10 cefazolina sódica (Zolicef, Ancef, Kefzol)  
 cefmetaxol sódico (Zeegazone)  
 cefonicida sódica (Monocid)  
 cefoperazona sódica (Cefobid)  
 ceforanida (Precef)
- 15 cefotaxima sódica (Claforan)  
 cefotetan sódico (Cefotan, Apatéf)  
 ceftixina sódica (Mefoxin)  
 ceftazidima (Ceptaz, Fortaz, Tazicef, Tazidime)  
 ceftizoxima sódica (Kefurox, Zinacef)
- 20 ceftriaxona (Rocephin)  
 ceftriaxone sodio (Rocephin)  
 cefuroxima inyectable (Kefurox, Zinacef)  
 cefradina inyectable (Velosef inyectable)  
 cefalotina sódica (Keflin, Seffin)
- 25 cefapirina sódica (Cefadyl)  
 moxalactama (Moxam)  
 amoxicilina (Amoxil, Polymox)  
 amoxicilina y clavulanato (Augmentin)  
 ampilina (Omnipen, Principen)
- 30 ampilina y sulbactam (Unasyn)  
 azlocilina (Azlin)  
 bacampicilina (Spectrobid)  
 carbenicilina (Geocillin, Geopen)  
 cefaclor (Ceclor)
- 35 cefadroxilo (Duricef, Ultracef)  
 cefamandol (Mandol)  
 cefazolina sódica (Ancef, Kefzol)  
 cefixina (Suprax)  
 cefmetazol sódico (Zefazone)

- cefonicida (Monocid)
- cefoperazona (Cefobid)
- ceforanida (Precef)
- cefotaxima (Claaforan)
- 5 cefotetan (Cefotan)
- cefoxitina (Mefoxin)
- cefprozil inyectable
- cefprozil oral (Cefzil)
- ceftazidima (Ceptaz, Fortax)
- 10 ceftizoxima (Cefizox)
- ceftriaxona (Rocephin)
- cefuroxima (Ceftin, Zinacef)
- cefalexina (Keflex, Keftab)
- cephalothin (Keflin)
- 15 cefapirina (Cefadyl)
- cefradina (Anspor, Velosef)
- cloxacilina (Cloxapen, Tegopen)
- ciclacilina
- dicloxacilina (Dycill, Pathocil)
- 20 loracarbef inyectable
- loracarbef oral
- metecilina (Staphcillin)
- mezlocilina (Mezlin)
- moxalactama (Moxam)
- 25 nafcilina (Nafcil, Unipen)
- oxacilina (Bactocill, Prostaphlin)
- penicilamina (Cuprimine, Depen)
- penicilina G (Wycillin, Pentids, Bicillin LA)
- penicilina V (Veetids, V-Cillin K)
- 30 piperacilina (Pipracil)
- ticarcilina (Ticar)
- ticarcilina y clavulanato (Timentin)

35 Otros antibióticos de  $\beta$ -lactama comercialmente disponibles incluyen imipenem (primaxin) que se administra normalmente en combinación con cilastatina (que previene cualquier degradación por enzimas renales). Otros antibióticos de  $\beta$ -lactama incluyen meropenem (Meronem/Zeneca) y aztreonam (Azacetam). Otras penemas incluyen biapenem, panipenem, carumonam y ritipenam. Son particularmente útiles los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas reconocidos en la materia que también presentan inhibición cruzada de NAALADasa, y que pueden o no presentar actividad independiente de antibiótico.

Aquellos compuestos antibióticos de  $\beta$ -lactama detallados para administración parental pueden modificarse, como se

indica anteriormente, como sus derivados de éster activo para mejorar la absorción oral con el objetivo de alcanzar niveles en el cerebro del compuesto suficientes para inhibir la proteasa neurogénica, pero no necesariamente suficientes para proporcionar niveles clínicamente eficaces en sangre de antibiótico. También pueden usarse otros antibióticos que pueden basarse para su eficacia antibiótica en la inhibición de la síntesis de la pared celular mediada por proteasa, por ejemplo, gamma-lactonas y/o antibióticos de quinolina.

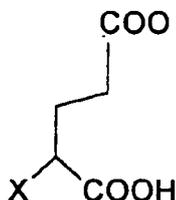
Otros compuestos capaces de la inhibición de peptidasas neurogénicas mediante el mecanismo propuesto para la actividad de compuestos de  $\beta$ -lactama pueden identificarse usando técnicas de descubrimiento molecular reconocidas en la materia, por ejemplo, las descritas en la patente de EE.UU. 5.552.543. Esa patente describió algoritmos para detectar la correlación entre actividad antibacteriana y las interacciones "bajo llave" que tienen lugar entre proteínas de unión a penicilina y los antibióticos de  $\beta$ -lactama. Tales técnicas de modelado molecular pueden guardar relación con otras técnicas de modelado de fármacos (por ejemplo, las descritas en la publicación internacional PCT publicada n° WO 99/10522) para identificar compuestos con buenas eficacias de transporte a la barrera hematoencefálica para identificar compuestos óptimamente eficaces para su uso. Por tanto, para tratamientos según la presente invención que eligen como diana NAALADasa neurogénica no sólo es importante que compuestos útiles en la presente invención sean activos como inhibidores de la proteasa neurológica elegida como diana (NAALADasa), sino que también es importante que tales compuestos puedan administrarse con algún grado de eficiencia umbral a través de la barrera hematoencefálica para proporcionar concentración de inhibición de proteasas eficaz del fármaco en el cerebro. Tales propiedades de transporte a la barrera hematoencefálica pueden derivarse inherentemente de la estructura del compuesto, o tales compuestos pueden formularse y/o conjugarse con otras entidades químicas eficaces para potenciar el transporte a la barrera hematoencefálica. Ha habido un esfuerzo de investigación y desarrollo significativo dirigido a la preparación y la formulación de compuestos para potenciar su transporte a la barrera hematoencefálica, y tales tecnologías pueden aplicarse para potenciar la concentración en el cerebro de los inhibidores de proteasas y adyuvantes para los mismos útiles según la presente invención.

Los ensayos en animales indican una dosis eficaz umbral de moxalactama (administrada parenteralmente) que es aproximadamente 50  $\mu$ g/kg de peso corporal. Basándose en datos de ensayos en animales y en la distribución conocida de la moxalactama parenteralmente administrada entre el cerebro y otros tejidos del cuerpo, la concentración inhibitoria de proteasas neurogénicas mínima eficaz de moxalactama en el cerebro es aproximadamente 30 nM. Se ha mostrado que el ácido clavulánico es un inhibidor eficaz de NAALADasa neurogénica cuando se administra i.p. a menos de 1 microgramo por kilogramo de peso corporal. El intervalo de niveles de dosificación eficaces de los inhibidores de NAALADasa cuando se usan en el tratamiento de trastornos del comportamiento y/o cognitivos según la presente invención dependerá significativamente del peso corporal del paciente, la afinidad del inhibidor por la proteasa neurogénica diana, las características de transporte a la barrera hematoencefálica del compuesto activo, el modo de administración y el uso opcional de tecnologías de formulaciones/conjugación de fármacos disponibles para el potenciamiento del transporte a la barrera hematoencefálica. Para la moxalactama parenteralmente administrada, la dosis eficaz mínima en hámsteres y otras especies de ensayo es aproximadamente 50 microgramos por kg de peso corporal, más o menos. Se estima que el uso de moxalactama en una forma farmacéutica oral, preferentemente modificada o derivatizada en forma de un éster activo, oscila de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 50 mg por dosis, muy inferior a la dosis de moxalactama necesaria para proporcionar concentración de antibiótico terapéuticamente eficaz. Se espera que la dosis oral eficaz de clavulanato sea aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg por dosis. El clavulanato se absorbe por vía oral y presenta buen transporte a la barrera hematoencefálica.

Las dosis eficaces de otros inhibidores de proteasas variarán, de nuevo, dependiendo de su afinidad inherente por la proteasa diana, la vía de administración seleccionada, el peso del paciente y la eficiencia del transporte a la barrera hematoencefálica. Las dosificaciones eficaces de inhibidores de NAALADasa usados según la presente invención pueden determinarse fácilmente empíricamente usando modelos animales acoplados al uso de técnicas analíticas reconocidas en la materia. Normalmente, los niveles de dosificación para los compuestos antibióticos de  $\beta$ -lactama usados en los procedimientos y formulaciones de la presente invención son inferiores a los necesarios para lograr niveles antibacterianos clínicamente eficaces. Las dosificaciones parenterales de compuestos antibióticos de  $\beta$ -lactama pueden oscilar de aproximadamente 1 a aproximadamente 80 mg por dosis. Las dosificaciones orales pueden oscilar de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 150 mg por dosis. Cantidades de dosificación superiores o inferiores pueden ser apropiadas y usarse según la presente invención cuando las circunstancias del paciente dicten eso en el juicio del médico adjunto. Por tanto, por ejemplo, si el paciente/estados clínicos son tales que la actividad antibiótica inherente de los compuestos de  $\beta$ -lactama no se consideren que sean una contraindicación que se complica, pueden usarse dosis mayores del antibiótico hasta o excediendo los niveles de dosificación que pueden proporcionar niveles clínicamente eficaces en sangre de antibiótico umbrales para tratar pacientes en necesidad de terapia efectuada por la inhibición de NAALADasa según la presente invención.

Otros inhibidores de NAALADasa reconocidos en la materia que pueden atravesar la barrera hematoencefálica en cantidades eficaces pueden usarse para el tratamiento de trastornos del comportamiento y cognitivos. Por ejemplo, pueden usarse para mejorar el rendimiento cognitivo en pacientes aquejados de demencia o para reducir agresión. Ejemplos de inhibidores de NAALADasa conocidos incluyen inhibidores de metalopeptidasas generales tales como O-fenantrolina, quelantes metálicos tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y etilenglicol-éter bis(betaminoetilico)-ácido N,N-tetraacético (EGTA) y análogos de péptidos tales como ácido cucsucálico, aspartato-

glutamato (Asp-Glu), Glu-Glu, Gly-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu y beta-N-acetil-L-aspartato-L-glutamato. Otros inhibidores de NAALADasa son los compuestos más recientemente descritos de fórmula



5 en la que X es  $\text{RP(O)(OH)CH}_2$ - [véase la patente de EE.UU. n° 5.968.915];  $\text{RP(O)(OH)NH}$ - [véase la patente de EE.UU. n° 5.863.536];  $\text{RP(O)(OH)O}$ - [véase la patente de EE.UU. n° 5.795.877];  $\text{RN(OH)C(O)Y}$ - o  $\text{RC(O)NH(OH)Y}$  en la que Y es  $\text{CR}_1\text{R}_2$ ,  $\text{NR}_3$  o O [véase la patente de EE.UU. n° 5.962.521]; o X es  $\text{RS(O)Y}$ ,  $\text{RSO}_2\text{Y}$ , o  $\text{RS(O)(NH)Y}$  en la que Y es  $\text{CR}_1\text{R}_2$ ,  $\text{NR}_3$  o O [véase la patente de EE.UU. n° 5.902.817].

10 Cada una de las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas sugiere usos de los inhibidores de NAALADasa descritos en el tratamiento de estados de enfermedad asociados a anomalía de glutamato que incluyen epilepsia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, esquizofrenia; dolor crónico, isquemia y lesión neuronal. El descubrimiento subyacente a la presente invención permite el uso de inhibidores de proteína de unión a penicilina (carboxipeptidasa o transpeptidasa bacteriana), particularmente los antibióticos de  $\beta$ -lactama e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas para desarrollar protocolos terapéuticos para tales estados de enfermedad basados en la actividad previamente no  
15 apreciada de tales compuestos como inhibidores de NAALADasa. Más recientemente, altas concentraciones de glutamato en tejidos nerviosos se han asociado a esclerosis múltiple, y se contempla que la inhibición de NAALADasa en tales tejidos y, por consiguiente, la inhibición de su producción de glutamato puede proporcionar beneficio terapéutico a pacientes aquejados con la enfermedad bien tanto reduciendo la gravedad de los síntomas como reduciendo la frecuencia de su aparición.

20 La presente invención proporciona además ciertas formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos del comportamiento o cognitivos y otros estados de enfermedad asociados a la producción de concentraciones anormales de glutamato en tejidos nerviosos y otros tejidos que albergan actividad de NAALADasa como se define en la reivindicación 13. Generalmente, la formulación comprende un principio neurológicamente activo que incluye un compuesto que puede inhibir una enzima bacteriana y que puede inhibir una peptidasa neurogénica (por ejemplo, NAALADasa) que se sabe, por evidencia empírica, que actúa selectivamente sobre un péptido que comprende la  
25 secuencia de aminoácidos Ala-D- $\gamma$ -Glu-Lys-D-alanil-D-alanina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo. En una realización, la formulación farmacéutica en una forma farmacéutica unitaria comprende una cantidad de un compuesto de  $\beta$ -lactama que puede inhibir la actividad de NAALADasa en un paciente que experimenta o tiene predisposición a desarrollar una afección médica que podría prevenirse o tratarse para reducir sus síntomas por inhibición de NAALADasa. La cantidad de inhibidor de peptidasa (NAALADasa) y la naturaleza del vehículo dependen, por supuesto, de la vía de administración prevista. La cantidad de inhibidor es la cantidad eficaz para proporcionar tras la administración por la vía de administración predeterminada una concentración del inhibidor en el  
30 tejido en el que se desea la inhibición de la NAALADasa, por ejemplo, en el cerebro eficaz para tratar y reducir síntomas de los trastornos del comportamiento o cognitivos elegidos como diana u otros trastornos que puedan tratarse por inhibición de la actividad de NAALADasa. En realizaciones que utilizan compuestos antibióticos de  $\beta$ -lactama, la cantidad de inhibidor de peptidasas en las presentes formulaciones es normalmente inferior a la que puede proporcionar inhibición clínicamente eficaz de proteasas bacterianas, es decir, inferior a la que puede proporcionar niveles antibióticamente eficaces cuando se administra a un paciente en la forma farmacéutica proporcionada. Los inhibidores de peptidasas para su uso según la presente invención pueden combinarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, y pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral en formas tales como comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, polvos dispersables, gránulos, pastillas para chupar, parches para la mucosa, sobres y similares. El inhibidor de NAALADasa puede combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, almidón, lactosa o trehalosa, solo o en combinación con uno o más  
40 excipientes que forman comprimidos y prensarse en comprimidos o pastillas para chupar. Opcionalmente, tales comprimidos, comprimidos oblongos o cápsulas pueden recubrirse entéricamente para minimizar la hidrólisis/degradación en el estómago. Las formulaciones farmacéuticas orales contienen aproximadamente del 1 a aproximadamente el 99% en peso de principio activo y aproximadamente del 1 a aproximadamente el 99% de un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipientes de formulación. Opcionalmente, cuando los antibióticos de  $\beta$ -lactama se usan como inhibidores de NAALADasa, las formas farmacéuticas pueden formularse combinándolas con un inhibidor de P-glicoproteínas para proporcionar una semivida potenciada del fármaco y concentraciones en el cerebro del principio activo. Alternativamente, el inhibidor de proteasas puede simplemente coadministrarse con una P-glicoproteína o inhibidor de  $\beta$ -lactamasa; o la forma farmacéutica puede comprender un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa (por sí mismo también es un inhibidor de NAALADasa) solo o en combinación con una P-glicoproteína y un vehículo.

55 En otra realización de la invención, las preparaciones farmacéuticas pueden contener, por ejemplo, de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 90% del principio activo en combinación con el vehículo, más

normalmente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 60% en peso de principio activo. Las formulaciones farmacéuticas según una realización de la presente invención se formulan para administración por vía oral, es decir, administración por ingestión oral o administración bucal o sublingual (en forma de sobres, pastillas para chupar y/o parches para la mucosa oral). En otra realización, la forma farmacéutica se formula para administración por vía oral en una forma farmacéutica de liberación prolongada formulada para liberar el principio activo durante un periodo de tiempo predeterminado.

Dentro del alcance de la presente invención también están formas farmacéuticas tópicas que incluyen parches transdérmicos, formulaciones intranasales y formas unitarias de dosificación en supositorio que contienen el inhibidor de proteasa activo y excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales adaptados para tales vías de administración.

Las formulaciones farmacéuticas según la presente invención pueden administrarse alternativamente por vías de administración parenterales que incluyen administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración intramuscular y administración intravenosa. Tales formas farmacéuticas parenterales están normalmente en forma de disoluciones o dispersiones acuosas que utilizan un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina isotónica, 5% de glucosa u otra composición de excipiente líquido farmacéuticamente aceptable muy conocida.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles o liofilizados para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma farmacéutica debe ser estéril y debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento, y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos. El vehículo para formulaciones inyectables puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol o un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas de los mismos y aceite vegetal.

Las formas farmacéuticas parenterales de los inhibidores de peptidasas útiles para el tratamiento de trastornos del comportamiento y cognitivos y otros estados de enfermedad sensibles a la inhibición de peptidasas neurogénicas también pueden formularse como formulaciones de liberación prolongada inyectables en las que el inhibidor de proteasas se combina con uno o más polímeros naturales o biodegradables o biodispersables sintéticos tales como hidratos de carbono que incluyen almidones, gomas y derivados celulósicos eterificados o esterificados, poliéteres, poliésteres (particularmente polilactida, poliglicolida o poli-lactida-glicolidas), poli(alcoholes vinílicos), gelatinas o alginatos. Tales formulaciones de dosificación pueden prepararse, por ejemplo, en forma de suspensiones de microesferas, geles (de constitución hidrófila o hidrófoba), o implantes de matriz polimérica moldeada que son muy conocidos en la técnica por su función como sistemas de administración de fármacos de "tipo liberación lenta" que proporcionan liberación prolongada de los componentes biológicamente activos. Tales composiciones pueden prepararse usando técnicas de formulación reconocidas en la materia y diseñarse para cualquiera de una amplia variedad de perfiles de liberación de fármacos.

La administración de composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención puede ser intermitente o a una tasa gradual, o continua, constante o controlada a un paciente en necesidad de tratamiento. Además, la hora del día y el número de veces al día que la formulación farmacéutica se administra pueden variar dependiendo de la afección del paciente y el entorno. El nivel de eficacia y la dosificación óptima y la forma farmacéutica para cualquier inhibidor de proteasas administrado para su uso dentro del alcance de la presente invención depende del paciente y es ajustable dentro de intervalos razonables en el juicio del médico adjunto. La formulación se administra normalmente durante un periodo de tiempo suficiente para tratar o prevenir el estado de enfermedad del paciente, por ejemplo, para modificar el rendimiento del comportamiento o cognitivo del paciente que está recibiendo tratamiento. Las formulaciones de inhibidor de proteasas pueden continuar administrándose usando el mismo protocolo de dosificación o atenuado para la profilaxis del estado de enfermedad elegido como diana.

Con conocimiento de la existencia y la función de una proteasa o proteasas neurogénicas, tal compuesto o compuestos pueden separarse fácilmente de homogeneizados de cerebro, líquido cefalorraquídeo (LCR) o extractos de tejido de cerebro y purificarse para su uso en la elucidación de estructuras y en aplicaciones de descubrimiento de fármacos. Por tanto, usando técnicas reconocidas en la materia que incluyen específicamente cromatografía de afinidad y/o cromatografía líquida de alta presión, una o más proteasas neurogénicas que tienen una función neuroquímica definida determinante del fenotipo del comportamiento y rendimiento cognitivo pueden aislarse y caracterizarse. Por tanto, por ejemplo, un antibiótico de  $\beta$ -lactama puede unirse covalentemente, opcionalmente mediante un ligador escindible, a un sustrato sólido, por ejemplo, perlas magnéticas o sílice funcionalizada para formar una fase sólida capaz de afinidad/interacción selectiva con la(s) diana(s) de proteasa. El sustrato sólido que lleva el compuesto de  $\beta$ -lactama se pone entonces en contacto con LCR, homogeneizado de cerebro o extracto de cerebro a uno o más niveles de pH durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la reacción (o unión asociativa) de la proteasa neurogénica al compuesto de  $\beta$ -lactama inmovilizado. Alternativamente, un sustrato de proteína o péptido que comprende la secuencia de aminoácidos acil-D-alanil-D-alanina puede inmovilizarse sobre el sustrato sólido y usarse como una sonda de afinidad para la proteasa neurogénica diana.

La proteasa covalentemente o asociativamente unida puede entonces separarse del extracto y después liberarse del sustrato sólido por un técnica dependiente de la naturaleza de la interacción proteasa-sonda inmovilizada. Si la

proteasa forma un enlace covalente con el compuesto de  $\beta$ -lactama inmovilizado, el complejo resultante puede liberarse del sustrato de fase sólida, por ejemplo, escindiendo el ligador escindible para proporcionar una proteasa neurogénica, más particularmente un derivado de la misma, sustancialmente libre de componentes de no proteasa. Alternativamente, y preferentemente, la sonda utilizada para la columna de afinidad por proteasa presenta afinidad asociativa (no covalente) seleccionada por la proteasa de manera que la proteasa puede liberarse posteriormente de la fase sólida cambiando la rigurosidad (fuerza iónica o pH de la fase líquida) para liberar la proteasa del sólido en una forma sustancialmente libre de componentes de no proteasa.

Otro procedimiento para posibilitar e identificar la diana de neuroproteasa de los procedimientos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención implica usar una penicilina o cefalosporina marcada con un radionúclido ( $H^3$ ). Una disolución de aquella se inyecta en el cerebro de un animal de ensayo y después de un periodo de tiempo predeterminado el animal se eutaniza y el cerebro se extrae/homogeneiza inmediatamente. El extracto/homogeneizado de cerebro se somete entonces a uno o más procedimientos de separación tales como centrifugación, diálisis y cromatografía (por ejemplo, cromatografía de filtración en gel). Las especies químicas separadas se analizan para la presencia de la marca, y las especies marcadas se aíslan, opcionalmente se someten a procedimientos de purificación adicionales, y se someten a análisis físico-químicos para la elucidación de la estructura.

Usando técnicas analíticas/secuenciación de aminoácidos de proteínas reconocidas en la materia, la estructura de las proteasas neurogénicas puede elucidarse fácilmente permitiendo así la preparación de sondas de ácido nucleico que codifican al menos una parte de la proteasa. Las sondas pueden entonces usarse para recuperar ADN que codifica la proteasa de bibliotecas de genes disponibles. Las construcciones de genes elegidas como diana se analizan y se clonan usando técnicas de clonación reconocidas en la materia para proporcionar microorganismos manipulados por ingeniería, eucariotas o procariotas, que pueden usarse para expresar cantidades ilimitadas de la proteasa pura que luego puede usarse en aplicaciones de diagnóstico o de cribado de fármacos.

En una realización relacionada, la proteasa está conjugada en forma de un hapteno para inocular especies murinas u otras para la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen uno o más epítopes de la proteasa neurogénica. La producción de anticuerpos puede llevarse a cabo utilizando técnicas de formación de hibridoma reconocidas en la materia muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales procedimientos se resumen, particularmente con respecto a la formación de anticuerpos monoclonales que presentan especificidad para las proteínas de colágeno, en la patente de EE.UU. 4.628.077.

Los anticuerpos pueden por sí mismos estar conjugados por enlace covalente o por enlace por afinidad (tal como mediante un complejo de biotina-avidina) con una marca detectable, por ejemplo, un radionúclido, una enzima o una especie fluorescente o electroluminiscente. Tales anticuerpos marcados pueden usarse en kits de diagnóstico y procedimientos para analizar, por ejemplo, muestras de líquido cefalorraquídeo, para determinar el estado del comportamiento o cognitivo de un paciente en función de las concentraciones de neuroproteasa. Tales pruebas de diagnóstico también pueden utilizarse para evaluar la respuesta del paciente a farmacoterapia y para monitorizar el estado del paciente, de nuevo en función de la concentración de proteasa neurogénica. El procedimiento puede llevarse a cabo usando ensayos de unión específica competitivos o de tipo sándwich reconocidos en la materia muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

Por tanto, según todavía otra realización se desvela un procedimiento para evaluar el estado neuroquímico de un paciente que comprende la etapa de poner en contacto una muestra de líquido cefalorraquídeo con un anticuerpo marcado que puede unirse específicamente a un epítipo de la proteasa o proteasas neurogénicas responsables de la modulación de rutas neuroquímicas determinantes del nivel de rendimiento cognitivo y/o fenotipo del comportamiento del paciente, y finalmente comparar los niveles detectados con los de poblaciones de pacientes de fenotipos cognitivos o de comportamiento predeterminados.

En todavía otra realización se desvela un neuromodulador peptídico o neurotransmisor en forma sustancialmente pura. El neuropéptido se caracteriza por su mediación en el comportamiento del paciente y las habilidades cognitivas, y adicionalmente por su función como sustrato para proteasa neurogénica, que puede inhibirse por sí misma por tanto el isómero D de moxalactama como un péptido que comprende la secuencia acil-D-alanil-D-alanina. La proteasa neurogénica que presenta actividad selectiva sobre el neuromodulador peptídico o neurotrador puede presentar actividad proteolítica que comprende actividad de transproteasa o carboxiproteasa (o actividad de transpeptidasa o carboxipeptidasa alternativamente expuesta). El neuropéptido puede aislarse de líquido cefalorraquídeo u homogeneizado de cerebro usando un procedimiento similar al descrito anteriormente para el aislamiento y la purificación de la proteasa neurogénica. Sin embargo, en lugar de usar un sustrato sólido con antibiótico de  $\beta$ -lactama covalentemente unido como sonda de afinidad para la molécula diana, la proteína de unión a penicilina (o una forma, opcionalmente químicamente modificada, de la propia proteasa neurogénica aislada) se inmoviliza sobre la superficie del sustrato sólido. La proteína de unión a penicilina (PBP) presenta afinidad selectiva por el neuromodulador/neurotransmisor peptídico, y las moléculas diana peptídicas se unen preferencialmente al sustrato sólido cuando la fase sólida que lleva PBP se pone en contacto con homogeneizado de cerebro o líquido cefalorraquídeo bajo una o más condiciones alternativas de fuerza iónica y/o pH. La fase sólida que lleva la PBP puede usarse en forma de una columna cromatográfica, es decir, en una aplicación de cromatografía de afinidad, o el sustrato sólido puede dispersarse simplemente en un homogeneizado o extracto de cerebro o líquido

cefalorraquídeo para unirse selectivamente al neuromodulador/neurotransmisor peptídico que luego puede liberarse de la proteína de unión a penicilina, aislarse y purificarse adicionalmente, si fuera necesario, por cromatografía líquida de alta presión para producir dicho neuromodulador/neurotransmisor peptídico en forma sustancialmente pura libre de otras composiciones proteínicas. El neurotransmisor peptídico puede usarse por sí mismo como principio activo neurológicamente activo o puede usarse como un cabeza de serie para fármacos para el desarrollo de principios activos neuroactivos relacionados. Además, la estructura del neurotransmisor purificado puede determinarse fácilmente por análisis de secuencias de aminoácidos reconocidos en la materia que permitirán que el médico experto prepare una sonda de ácido nucleico (como posiblemente un gen sintético) para aislar secuencias de ADN que codifican el neurotransmisor/neuromodulador peptídico. Finalmente, similar al uso del gen para la proteasa neurogénica descrita anteriormente, la construcción de gen aislada puede clonarse y usarse en la producción de cantidades clínicas del neurotransmisor/neuromodulador peptídico para la intervención de fármacos, para la producción de anticuerpos o en protocolos de descubrimiento de fármacos.

En un aspecto adicional se contempla que un paciente que padece un trastorno cognitivo o del comportamiento puede vacunarse usando una vacuna preparada, por ejemplo, como una proteasa neurogénica conjugada que puede provocar una respuesta del anticuerpo en la inoculación del paciente suficiente para atenuar la función de la proteasa neurogénica y modificar concomitantemente el fenotipo de comportamiento y/o cognitivo del paciente para mejorar otras afecciones de pacientes asociadas a concentración/actividad de glutamato anormal que incluyen, pero no se limitan a, aquellas tratadas anteriormente en este documento. En una realización, el conjugado comprende un conjugado de haptano de uno o más péptidos que comprenden una secuencia de 4 a 20 aminoácidos de NAALADasa que comprende uno o más de los motivos de sitio activo de NAALADasa o PBP, como se ha descrito anteriormente.

Las realizaciones anteriormente descritas de la presente invención se derivan en parte del mecanismo de acción deducido a partir de los datos reunidos en modelos cognitivos de comportamiento y de habilidades en animales descritos más adelante. Otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir del análisis de los datos obtenidos en los siguientes ejemplos experimentales, pero que son ilustrativos de la modificación del comportamiento y el rendimiento cognitivo y la mejoría que puede obtenerse por el uso del procedimiento y las formulaciones de la presente invención.

### Ejemplos experimentales

Comercializada en 1981-1982, la moxalactama (Mox) se empleó ampliamente en el mundo como un antibiótico similar a las cefalosporinas de tercera generación. La eficacia clínica y la seguridad se evaluaron en más de 2200 pacientes con infecciones bacterianas (Jackson y col. 1986). De los 260 pacientes tratados con Mox para meningitis gram-negativa, 241 (93%) mostraron respuesta satisfactoria a terapia con antibióticos. Los pacientes se trataron con 4 g de Mox cada 8 h durante 2-3 semanas. Las concentraciones pico en plasma se producen en el transcurso de una h después de la inyección IM con una semivida de eliminación de 2,3 h. No hay acumulación con múltiples inyecciones que se producen a intervalos de 8-12 h. La moxalactama puede penetrar en la barrera hematoencefálica. Los niveles en líquido cefalorraquídeo (LCR) de Mox oscilan de 25-39 µg/ml tras una dosis IV de 2,0 g de fármaco. Se estima que la concentración en LCR como porcentaje de concentración en suero es del 20%. El isómero D tiene actividad antibacteriana y tiene una fracción sin unir a proteína en plasma mayor que el isómero L.

## ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO CON MOXALACTAMA

### PROCEDIMIENTOS

#### Cuidado de animales

Hámsteres dorados sirios macho (*Mesocricetus auratus*) (140-150 g) obtenidos de Harlan Sprague-Dawley Laboratories (Indianápolis, IN) se alojaron individualmente en jaulas de Plexiglas (24 cm x 24 cm x 20 cm), se mantuvieron en un ciclo inverso de luz:oscuridad (14L:10O; las luces se encienden a las 19:00 h) y se les proporcionó comida y agua a voluntad. Los animales se aclimataron al ciclo inverso de luz:oscuridad durante al menos dos semanas antes de probarse. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante la fase oscura del ciclo circadiano. Todos los animales se adquirieron y se cuidaron según las pautas publicadas en *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publications No. 85-23, revisado en 1985).

#### Agresión ofensiva

El comportamiento agonista puede clasificarse como tanto agresión ofensiva como defensiva (Blanchard y Blanchard, 1977; Adams, 19798; Albert y Walsh, 1984). La agresión ofensiva se caracteriza por el agresor que inicia un ataque sobre un oponente, mientras que la agresión defensiva carece de enfoque activo. Ambos tipos de agresión tienen sus propios sistemas de neurocomportamiento únicos. Los estímulos que provocan el ataque ofensivo y de defensa son diferentes, ya que son las secuencias de comportamientos que acompañan a cada respuesta agonista. Mientras que muchos de los datos empíricos que apoyan la idea de redes neurales ofensivas y defensivas únicas se han recogido de modelos animales, hay similitudes interesantes y convincentes en la agresión humana que sugieren una organización neural similar (Blanchard, 1984). La agresión ofensiva se estudia fácilmente

usando hámsteres dorados macho probados en un paradigma de residente/intruso, un modelo establecido de agresión ofensiva (Ferris y Potegal 1988). Situando un hámster macho extraño en la jaula hogar de otro hámster macho se provoca una secuencia bien definida de comportamientos agonistas del residente que incluyen agresión ofensiva.

## 5 Medidas y análisis del comportamiento

Los hámsteres son nocturnos y como tales todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante las cuatro primeras horas de la fase de oscuridad bajo iluminación roja tenue. El residente se puntuó para agresión ofensiva, por ejemplo, latencia para morder al intruso, el número total de mordiscos, tiempo de contacto total con el intruso y el marcaje de ijadas durante un periodo de prueba de 10 min (Ferris y Potegal, 1988). El marcaje de ijadas es una forma de comunicación olfativa en la que un hámster arquee su lomo y frota las glándulas de la ijada productoras de feromonas contra objetos en el entorno (Johnson, 1986). La frecuencia del marcaje de ijadas está enormemente potenciada durante encuentros agresivos y es particularmente fuerte en animales dominantes que inician y ganan peleas (Ferris y col., 1987).

Los datos paramétricos, es decir, latencias y tiempo de contacto, se analizaron con un ANOVA unilateral seguido de pruebas de Newman-Keuls a posteriori. Los datos no paramétricos, es decir, el número de mordiscos y los marcajes de ijadas, se analizaron con pruebas de Kruskal-Wallis seguidas de pruebas de la U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre grupos. Se analizaron dos comparaciones de muestras con pruebas de la t para datos emparejados e independientes para datos paramétricos y pruebas de Wilcoxon y Mann-Whitney para datos no paramétricos emparejados e independientes, respectivamente.

## 20 RESULTADOS

### I. Moxalactama a alta dosis

En un estudio piloto, la Mox (50 mg/kg en un volumen de aproximadamente 150 µl) se administró intraperitonealmente (IP) a seis hámsteres macho previamente cribados para comportamiento agresivo hacia intrusos más pequeños. Los tratamientos con Mox y vehículo de solución salina se compensaron de forma que cada animal recibiera ambos tratamientos separados por al menos 48 h. Los animales se probaron 90 min después del periodo de tratamiento estimado para reflejar niveles en plasma pico de Mox (Jackson y col. 1986). La moxalactama se disolvió en 0,9% de NaCl y se guardó sobre hielo. Se preparó fresca para cada estudio.

Los animales residentes tratados con vehículo de solución salina mordieron a los intrusos en menos de un min (Fig. 1). Tras el tratamiento con Mox, la latencia media para morder aumentó a más de seis min ( $p < 0,05$ ). Además, el número de mordiscos durante el periodo de observación de 10 min fue significativamente reducido ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el tiempo de contacto, es decir, el tiempo que el residente gasta en oler y explorar al intruso también se redujo significativamente ( $p < 0,01$ ). La disminución en el marcaje de ijadas no alcanzó significancia, pero hubo una tendencia ( $p < 0,07$ ).

### Resumen

La disminución general de todas las medidas del comportamiento asociadas a agresión ofensiva aumenta la posibilidad de que la dosis de 50 mg/kg de Mox tenga efectos depresivos no específicos sobre la actividad motora y activación. Para examinar esta posibilidad fue necesario realizar estudios de respuesta a dosis para encontrar la dosis más baja de Mox que inhibía eficazmente la agresión ofensiva sin alterar otros comportamientos.

### II. Respuesta a dosis de moxalactama

Para encontrar la dosis más baja de Mox que podría reducir significativamente la agresión ofensiva se probó un intervalo de concentraciones (vehículo, 0,5, 5,0, 50, 500 y 5000 µg/kg) en seis animales (Figs. 2 y 3). Los tratamientos se compensaron recibiendo cada animal cada tratamiento separado por al menos 48 h. La latencia para morder fue significativamente diferente entre tratamientos ( $F_{(5,30)} = 5,66$ ;  $p < 0,001$ ). El tratamiento con moxalactama con dosis de 5,0 µg y menos no tuvo efecto sobre ninguna de las medidas de comportamiento de agresión ofensiva. Sin embargo, la dosis de 50 µg/kg retrasó significativamente la latencia para morder más de siete min ( $p < 0,001$ ) con respecto al control de vehículo. Las dosis de 500 µg y 5,0 mg también aumentaron significativamente la latencia para morder. Como era de esperar, la misma dosis que aumentó la latencia para morder también disminuyó el número de mordiscos ( $H = 24,12$ ;  $p < 0,001$ ). Los animales tratados con 50 µg de Mox mostraron una reducción significativa en los mordiscos ( $p < 0,05$ ). De hecho, tres de los seis animales nunca mordieron en absoluto en el periodo de observación de 10 min. El tiempo de contacto fue significativamente diferente entre tratamientos ( $F_{(5,30)} = 2,5$ ;  $p < 0,05$ ). Las dosis de 500 µg y 5 mg redujeron significativamente el tiempo de contacto con respecto al control de vehículo ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). El marcaje de ijadas no fue significativamente diferente entre grupos ( $H = 9,256$ ;  $p < 0,09$ ).

### Resumen

Estos datos identifican la dosis de 50 µg/kg de Mox como muy eficaz en la inhibición de la agresión ofensiva sin

reducir significativamente el tiempo de contacto y el marcaje de ijadas. Dosis mayores de Mox, a la vez que son efectivas en reducir las medidas de la agresión, también redujeron el tiempo de contacto. De ahí que las dosis de 50 µg parecieran ser mejores para futuras pruebas de comportamiento. Habiendo identificado la dosis más efectiva de Mox fue necesario un estudio más profundo usando un mayor número de animales y un mayor espectro de pruebas del comportamiento.

### III. Pruebas de comportamiento con 50 µg de moxalactama

#### Agresión ofensiva

Se probaron trece hámsteres para agresión ofensiva tras el tratamiento con vehículo de solución salina o 50 µg/kg de Mox (Fig. 4). Ambos tratamientos se administraron IP en un volumen de aproximadamente 150 µl. Los animales se probaron 90 min después de la inyección. Cada animal recibió ambos tratamientos. El orden de las inyecciones se compensó con no menos de 48 h entre tratamientos. La moxalactama aumentó significativamente la latencia para morder ( $p < 0,001$ ) y redujo el número de mordiscos ( $p < 0,01$ ). No hubo cambio significativo en el tiempo de contacto o el marcaje de ijadas.

#### Resumen

Este estudio más amplio de baja dosis de Mox corrobora el estudio de respuesta a dosis que confirma que la Mox puede reducir eficazmente la agresión ofensiva sin alterar el comportamiento social como se mide por tiempo pasado con el intruso.

#### Actividad motora en un campo abierto

Se probaron seis animales para actividad motora general en un "campo abierto" tras el tratamiento con vehículo de solución salina o 50 µg/kg de Mox (Fig. 5). El estudio se compensó recibiendo cada animal cada tratamiento. Noventa minutos después de la inyección, un único animal se colocó en una jaula de Plexiglas limpia grande (48 x 32 x 40 cm) carente de cualquier lecho de paja. Este campo abierto se delineó en cuadrantes iguales por cinta adhesiva sobre la parte inferior de la jaula. Los animales se puntuaron para la actividad motora contando el número de cuadrantes atravesados en 1 min. No hubo diferencia significativa entre tratamientos en la actividad en campo abierto.

#### Discriminación olfativa

Se trataron dieciséis animales con vehículo o 50 µg/kg de Mox y se probaron para discriminación olfativa midiendo su latencia para encontrar pipas de girasol escondidas (Fig. 5). Las inyecciones se compensaron recibiendo cada animal cada tratamiento. Antes de la prueba, los animales ayunaron durante 24 h. Noventa minutos después de la inyección los animales se sacaron brevemente de su jaula hogar mientras que seis pipas de girasol se enterraban bajo el lecho de paja en una esquina. Los animales se colocaron de nuevo en su jaula hogar y se puntuaron para la latencia para encontrar las pipas en un periodo de observación de 10 min. La latencia para encontrar la pipa fue significativamente ( $p < 0,001$ ) reducida en animales tratados con Mox con respecto a controles de vehículo. Sorprendentemente, todas las pipas fueron rápidamente consumidas en menos de cinco min tras el tratamiento con Mox, pero no con solución salina. En realidad, ninguno de los dieciséis animales consumió todas las pipas tras la solución salina con respecto a todos los animales tratados con Mox.

#### Actividad sexual

Se probaron seis animales durante un periodo de observación de cinco min para actividad sexual tras el tratamiento con vehículo de solución salina o 50 µg/kg de Mox (Fig. 6). El estudio se compensó recibiendo cada animal cada tratamiento. Noventa min después de la inyección, los animales se puntuaron para latencia para copular y el número de intromisiones, es decir, ataques de copulación, hacia una hembra receptiva situada en su jaula hogar. Hámsteres dorados hembra se ovariectomizaron bajo anestesia general. Tras la recuperación, los animales se trataron con una única inyección SC de 50 mg de benzoato de estradiol durante tres días consecutivos para inducir receptividad sexual. En el día de la prueba, las hembras sensibilizadas con estrógenos se introdujeron en la jaula hogar de los machos experimentales. La primera investigación por los machos produjo rutinariamente lordosis robusta en la hembra. La lordosis es una postura estereotipada caracterizada por una intensa flexión dorsal vertebral sostenida.

Tras el tratamiento con vehículo, los animales copularon y empujaron a una hembra receptiva en aproximadamente 30 s. El tiempo para copular aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) tras el tratamiento con Mox. Aunque ambos tratamientos mostraron un alto ataque de copulación, los animales tratados con Mox mostraron una tendencia hacia una tasa de intromisión reducida ( $p < 0,07$ ).

#### Resumen

La moxalactama parece tener un perfil serénico muy bueno. Los serénicos son fármacos usados para tratar impulsividad y violencia (Olivier y Mos, 1991). Los serénicos deberían suprimir la agresión ofensiva sin interferir con comportamientos sociales, de apetencia y cognitivos. El interés social en un intruso, es decir, el tiempo de contacto,

no se altera por Mox. El marcaje de ijadas y la actividad en un campo abierto también permanecen inalterados con tratamiento con fármaco, evidencia de que la actividad de activación y motora es normal. Los animales en ayunas tratados con Mox pueden encontrar mejor las pipas de girasol escondidas, evidencia de que el tratamiento con fármaco no interfiere con la olfacción o motivación para encontrar comida; en realidad, puede potenciarla. Interesantemente, el tratamiento con Mox redujo la latencia para copular con una hembra receptiva y disminuyó, aunque no significativamente, los ataques de copulación en un periodo de observación de cinco min. Debe observarse que los animales tratados con Mox todavía estaban muy activos sexualmente, excepto que el comportamiento pareció menos intenso. Este efecto antiagresivo de Mox combinado con un aplacamiento de la actividad sexual podría tener valor terapéutico en el tratamiento de delinquentes sexuales violentos.

El desarrollo de eltoprazina, uno de los primeros serénicos, se abandonó en parte debido a que se encontró que aumentaba el miedo y la ansiedad en animales (Olivier y col. 1994). Para controlar esta posibilidad fue necesario probar Mox en un modelo usado para cribar fármacos para su efecto sobre la ansiedad

#### IV. Prueba de moxalactama para actividad ansiolítica

##### Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado se desarrolló para la detección de efectos de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos en la rata (Pellow y col., 1985). El procedimiento se ha validado en lo referente al comportamiento, fisiológicamente y farmacológicamente. El laberinto en cruz consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados. Las ratas harán naturalmente menos entradas en los brazos abiertos que en los brazos cerrados y pasarán significativamente menos tiempo en los brazos abiertos. El confinamiento en los brazos abiertos está asociado a comportamiento relacionado con significativamente más ansiedad y mayores niveles de hormona del estrés que el confinamiento en los brazos cerrados. Ansiolíticos clínicamente eficaces, por ejemplo, clordiazepóxido o diazepam, aumentan significativamente el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos y el número de entradas en los brazos abiertos. En cambio, compuestos ansiogénicos como yohimbina o anfetaminas reducen las entradas en los brazos abiertos y el tiempo pasado en los brazos abiertos.

##### Procedimiento

Ratas Wistar macho que pesaban 250-300 g se alojaron en grupo en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 normal con la luz encendida a las 08:00 h y se les proporcionó comida y agua a voluntad. El laberinto en cruz consistió en dos brazos abiertos, 50 x 10 cm, y dos brazos cerrados 50 x 10 x 40 cm con un tejado abierto, dispuesto de forma que los dos brazos abiertos fueran opuestos entre sí. El laberinto se elevó a una altura de 50 cm.

Se probaron ocho animales en el laberinto en cruz 90 min tras la inyección IP con 50 µg/kg de Mox y vehículo de solución salina. El orden de los tratamientos se compensó con al menos 48 h entre inyecciones. Al inicio del experimento, el animal se colocó en el centro del laberinto en cruz orientado hacia el brazo cerrado. Durante un periodo de observación de cinco min los animales se puntuaron para la latencia para entrar en el brazo cerrado, tiempo pasado en el brazo cerrado y el número de entradas en los brazos abiertos tras la primera ocupación del brazo cerrado (Fig. 7). El tratamiento con Mox aumentó significativamente la latencia para entrar en el brazo cerrado ( $p < 0,05$ ) con respecto al vehículo. El tiempo pasado en el brazo cerrado fue significativamente reducido ( $p < 0,01$ ), mientras que el número de entradas en los brazos abiertos fue significativamente elevado ( $p < 0,05$ ).

##### Resumen

Estos datos muestran que la Mox administrada a una dosis de 50 µg/kg tiene actividad ansiolítica. Este hallazgo potencia el perfil serénico de la Mox y lo delinea de serénicos previos como la eltoprazina que suprimió la agresión ofensiva aumentando, en parte, el miedo y la ansiedad. Estos datos también demuestran que la Mox puede tener valor terapéutico como ansiolítico.

Sin embargo, la actividad ansiolítica de la Mox plantea otras cuestiones sobre la especificidad del comportamiento. Muchos ansiolíticos, particularmente las benzodiazepinas, son sedantes y pueden reducir la actividad motora general y también pueden actuar de amnésicos e interferir con el aprendizaje y la memoria. Como se mostró que la Mox no tenía efecto de marcaje de ijadas ni actividad en un campo abierto es poco probable que actúe de sedante general. Sin embargo, fue necesario probar la Mox para cualquier efecto adverso sobre el aprendizaje y la memoria.

#### V. Prueba de moxalactama para actividad ansiolítica

##### Moxalactama frente a clordiazepóxido

##### Procedimientos

Debido a que la Mox y el CDP tienen perfiles de biodisponibilidad diferentes, por ejemplo, penetrancia en el cerebro, su actividad en el SNC no podría compararse administrando inyecciones sistémicas de concentraciones equimolares de cada fármaco. En su lugar fue necesario administrar ambos fármacos directamente en el sistema cerebroventricular para sortear la barrera hematoencefálica. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico

(50 mg/kg), se les implantaron cánulas guías para microinyección dirigidas al ventrículo lateral y se dejó que se recuperaran durante dos días antes de probarse. Los grupos de seis animales se probaron cada uno con Mox o CDP. Cada animal recibió una inyección de fármaco y 0,9% de vehículo de NaCl en dos días separados. El orden de las inyecciones se compensó y se separó dos días. Tanto la Mox como el CDP se prepararon en 0,9% de NaCl a una concentración de 1 mM. Todas las inyecciones se administraron en un volumen de 2 ul durante 10 s en animales encerrados completamente conscientes. Sesenta min después, los animales se probaron en el laberinto en cruz durante un periodo de observación de 3 min y se puntuaron para comportamientos como se ha anotado previamente.

#### Resultados

El tratamiento con Mox retrasó significativamente ( $p < 0,05$ ) el tiempo que necesitó para entrar en el brazo cerrado con respecto al tratamiento con vehículo (Fig. 17). El tratamiento con Mox hizo que los animales pasaran la mayoría de su tiempo en los brazos con luz del laberinto en cruz. El tiempo pasado en la oscuridad fue significativamente ( $p < 0,01$ ) inferior tras el tratamiento con Mox con respecto a vehículo. El tratamiento de CDP a la concentración 1 mM no tuvo efecto ni sobre la latencia para entrar en el brazo cerrado ni sobre el tiempo pasado en el brazo cerrado con respecto al tratamiento con vehículo.

#### Control de depresión no específica de la actividad motora

Cuando el CDP se administra sistémicamente a roedores en dosis de 5-15 mg/kg es un sedante y reduce la actividad motora. Sin embargo, esta reducción de la actividad motora desaparece tras la administración repetida de CDP durante varios días. Sólo después de insensibilizarse los animales a los efectos motores del CDP se prueban en el laberinto en cruz para actividad ansiolítica. Para controlar cualquier efecto no específico de la Mox y el CDP sobre la actividad motora tras su inyección directa en el cerebro, los animales se probaron en el campo abierto 30 min antes de probarse en la cruz (Fig. 18). No hubo efecto significativo de ningún ansiolítico sobre la actividad motora general.

#### Resumen

El hallazgo de que la Mox es un ansiolítico potencia su perfil serénico y lo delinea de serénicos previos como la eltoprazina que suprimió la agresión ofensiva, aumentando en parte el miedo y la ansiedad. En una base equimolar, la Mox mostró actividad ansiolítica administrada directamente en el cerebro con respecto al CDP que no tuvo ninguna. Estos datos muestran que la Mox puede tener valor terapéutico como ansiolítico, además de como serénico.

Sin embargo, la actividad ansiolítica de la Mox plantea otras cuestiones sobre la especificidad del comportamiento. Muchos ansiolíticos, particularmente las benzodiazepinas, son sedantes y pueden reducir la actividad motora general y también pueden actuar de amnésicos e interferir con el aprendizaje y la memoria. Como la Mox no mostró tener efecto de marcaje de ijadas ni actividad en un campo abierto es poco probable que actúe de sedante general. Sin embargo, fue necesario probar la Mox para cualquier efecto adverso sobre el aprendizaje y la memoria.

#### VI. Prueba de moxalactama para memoria espacial

##### Laberinto de brazo radial

El laberinto de brazo radial es uno de los procedimientos más comúnmente usados para probar el aprendizaje espacial y la memoria en roedores. Desarrollado por Olton y colaboradores (1976), proporciona la elección simultánea de varias trayectorias alternativas para el sujeto de prueba. Los animales deben aprender qué localizaciones proporcionan comida (aprendizaje del sitio) usando señales visuoespaciales.

##### Procedimientos

*Ensayos experimentales:* Los ensayos experimentales consisten en tres fases (descritas más adelante). Los brazos del laberinto se enumeran en el sentido de las agujas del reloj de uno a siete siendo el número de brazo uno el brazo más alejado del lado derecho del laberinto; todos los ensayos duran aproximadamente 12 min. Cuando no se probaron, todos los hámsteres tuvieron acceso ilimitado a agua. Además de las pipas de girasol en el laberinto, a los hámsteres se les da diariamente un gránulo de comida Agway Prolab 3000. Los ensayos dentro de todas las fases se realizan en días sucesivos.

Fase uno: La fase uno consiste en cinco ensayos de 15 min. Antes de empezar cada uno de los cinco ensayos en la fase uno, cuatro pipas de girasol se colocan en los extremos de los brazos uno, dos y tres. Los brazos cuatro, cinco, seis y siete siguen vacíos.

Fase dos: La fase dos de los ensayos experimentales es idéntica a la fase uno, excepto que las pipas se colocan en los brazos dos, cuatro y siete. Los brazos uno, tres, cinco y seis siguen vacíos. La fase dos consiste en cuatro ensayos de 15 min.

Fase tres: La fase tres de los ensayos experimentales consiste en tres ensayos de 15 min, con los brazos dos,

cuatro y siete cebados con pipas de girasol. La fase tres se diferencia de la fase dos en que el laberinto se gira 110° en el sentido de las agujas del reloj en la habitación.

*Codificación de los comportamientos:* Se puntuó una entrada en el brazo cuando las cuatro patas de un hámster atravesaron un umbral del brazo. Una entrada completa en el brazo en un brazo se puntuó cuando el hocico de un hámster toca la parte superior del bloque al final de un brazo o cuando su hocico pasa por el bloque. Estas puntuaciones se hicieron para brazos con cebo y sin cebo. Además, se puntuó el número de pipas guardadas en los abazones por los hámsteres.

### Resultados

Seis hámsteres macho se probaron en el laberinto de brazo radial tras el tratamiento con 0,9% de NaCl o 50 µg/kg de Mox (Fig. 8). Cada animal recibió cada tratamiento y el orden de tratamientos se compensó. La medida más crítica en el laberinto de brazo radial es el número de pipas descubiertas después de invertirse la orientación del laberinto en el día final de la prueba. El tratamiento con moxalactama aumentó significativamente la búsqueda de pipas ( $p < 0,01$ ) con respecto al tratamiento con vehículo.

### Resumen

Estos datos apoyan la idea de que el perfil ansiolítico de la moxalactama no va acompañado de ningún trastorno en el aprendizaje y la memoria como es el caso con ansiolíticos de benzodiazepina. Por el contrario, la moxalactama potencia la memoria espacial, podría actuar de agente psicotrópico para mejorar el rendimiento cognitivo. Este hallazgo sugiere que la moxalactama puede ser un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de ADHD y trastorno de conducta en niños y senilidad en pacientes geriátricos.

### Navegación espacial en el laberinto de agua

El laberinto de agua de Morris al igual que el laberinto de brazo radial se desarrolló para probar la memoria espacial (Morris, 1984). La piscina se divide en cuadrantes normalmente designados Norte, Sur, Este y Oeste. El agua en la piscina se hace opaca con leche en polvo. Escondida justamente debajo de la superficie en uno de los cuadrantes está una plataforma que sirve de ruta de escape para roedores colocados en la piscina. Un animal se coloca en algún sitio en la piscina de una variedad de diferentes puntos de partida y se cronometra para latencia para encontrar la plataforma, el tiempo en porcentaje pasado en cada cuadrante, la distancia recorrida y la velocidad de nado. Los animales no tienen señales visuales ni espaciales en la piscina y deben basarse en señales adicionales del laberinto, es decir, objetos fijados de la piscina que pueden ser observados por el animal que nada. Mediante una serie de ensayos una rata desarrolla "aprendizaje del sitio" o conocimiento sobre la posición de la plataforma basándose en las señales adicionales del laberinto. La plataforma puede moverse cada día a un cuadrante diferente combinando memoria espacial con memoria de trabajo. Este paradigma implica la extinción de la memoria anterior y la resolución de un nuevo problema espacial.

### Procedimientos

El laberinto de agua consistió en una piscina circular de plástico negro de aproximadamente 150 cm de diámetro y 54 cm de altura llena hasta un nivel de 35 cm con agua hecha opaca con leche en polvo. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes con una plataforma de 10 cm de diámetro sumergida 2 cm por debajo de la superficie en el cuadrante noroeste. El agua se mantuvo a una temperatura de 25°C. Alrededor de la piscina hubo varias señales visuales. Encima de la piscina hubo una cámara de vídeo para seguir el movimiento del animal experimental. La recogida de datos se automatizó completamente usando el software desarrollado por HVS Image (Hampton, RU). Antes de la prueba, las ratas se familiarizaron con la piscina y la plataforma colocada en el cuadrante noroeste. Cada día durante 4 días consecutivos, los animales se colocaron en la piscina en sitios aleatorios y se les dio dos min para encontrar la plataforma. Los animales se trataron una h antes de la prueba con 50 µg/kg de Mox (n=11) o vehículo (n=10). Tras estos ensayos de familiarización, los animales se probaron para *navegación espacial*. El primer día de la prueba empezó con la plataforma en el cuadrante noroeste esperado. Todo el comportamiento se grabó en vídeo durante un periodo de observación de dos min. Después de la prueba el animal se secó y se colocó de nuevo en su jaula hogar. En cada día posterior la plataforma se movió a un nuevo cuadrante y la rata empezó en posiciones diferentes. La rata siempre se colocó en la piscina orientada hacia la pared lateral. Las posiciones iniciales con respecto a la plataforma fueron diferentes para cada uno de los cuatro ensayos; sin embargo, la plataforma siempre estuvo en la misma posición relativa en cada cuadrante. Veinte cm desde el lado de la piscina y en la esquina izquierda desde el centro orientado hacia ésta.

### Resultados

Un ANOVA bilateral mostró un efecto principal significativo para el tratamiento ( $F_{(1,20)} = 6,48$ ,  $p < 0,05$ ) y los días de prueba ( $F_{(3,63)} = 5,76$ ,  $p < 0,01$ ) (Fig. 19). También hubo una interacción significativa entre tratamientos y días de prueba ( $F_{(3,63)} = 4,35$ ,  $p < 0,01$ ). Las pruebas de Newman-Keuls a posteriori mostraron una diferencia significativa entre tratamientos en el día dos ( $p < 0,05$ ), día tres ( $p < 0,01$ ) y día cuatro ( $p < 0,05$ ) (Fig. 19). En cada uno de estos días, los animales tratados con Mox mostraron latencias significativamente más cortas para encontrar la plataforma escondida que el grupo tratado con vehículo. De hecho, los animales tratados con vehículo mostraron un aumento

significativo en la latencia en los días 2 ( $p < .05$ ) y 3 ( $p < .01$ ) con respecto al día 1.

La estrategia para encontrar la plataforma fue sorprendentemente similar para ambos tratamientos (Fig. 19, la inferior de las dos gráficas) como se juzga por el porcentaje de tiempo que pasan los animales en cada cuadrante. Para cualquier cuadrante en cualquier día no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Hubo una diferencia significativa entre los días para el porcentaje de tiempo pasado en cualquier cuadrante particular (por ejemplo, Norte,  $F_{(3,63)} = 28,80$ ,  $p < .0001$ ). Los animales pasaron una porción significativa de su tiempo en ciertos cuadrantes en ciertos días. Por ejemplo, en el día 1 tanto los animales con Mox como con vehículo pasaron la mayoría de su tiempo en el cuadrante Norte con respecto a los otros cuadrantes ( $p < .01$ ). Esto era de esperar ya que tuvieron conocimiento de la localización de la plataforma en este cuadrante del procedimiento de familiarización. Interesantemente, los animales con vehículo también pasaron una cantidad significativa ( $p < .05$ ) de tiempo en el cuadrante Oeste en el día 1 con respecto al Sur y Este. Esto fue probablemente debido a que la plataforma se escondió en la parte noroeste del cuadrante Norte. En el día 2, los animales con Mox y con vehículo pasaron una cantidad significativa de tiempo en tanto los cuadrantes Norte como Sur con respecto al Este y al Oeste. En el día 3, los animales con Mox no muestran tendencia particular hacia ningún cuadrante, mientras que los animales con vehículo todavía muestran un interés significativo en el cuadrante Norte con respecto al Sur y al Oeste. El día 4, los animales tanto con Mox como con vehículo pasaron la mayoría de su tiempo en el cuadrante correcto (Oeste) con la mínima cantidad de tiempo en el cuadrante Este en el que la plataforma se escondió el día de antes. Esta estrategia en el día 4 muestra buena memoria espacial, de trabajo y de procedimiento para ambos tratamientos.

La distancia cubierta para alcanzar la plataforma a lo largo de los días no fue significativamente diferente entre los animales con Mox y con vehículo (Fig. 20). Sin embargo, los animales con Mox mostraron velocidad de nado significativamente mayor que los animales con vehículo ( $F_{(1,20)} = 22,94$ ,  $p < .0001$ ) (Fig. 20). Por ejemplo, en el día 2, ambos grupos se desplazaron una distancia similar a la plataforma, excepto que los animales con Mox cubrieron la distancia a casi dos veces la velocidad ( $p < .01$ ). Aunque no hubo efecto principal a lo largo de los días ( $F_{(3,63)} = 2,27$ ,  $p < .09$ ), hubo una interacción entre la velocidad de nado y los días ( $F_{(3,63)} = 2,75$ ,  $p < .05$ ) para el tratamiento con Mox, ya que este grupo disminuyó la velocidad de nado con el tiempo.

#### Navegación con señales en el laberinto de agua

##### Procedimiento

Al día siguiente tras el último día (día 4) de la navegación espacial, los animales se probaron para *navegación con señales*. En estas pruebas, la plataforma se elevó sobre el nivel del agua. Una h antes de la prueba, los animales se trataron con Mox o vehículo de solución salina. Los mismos animales que se trataron con Mox durante la navegación espacial se trataron con Mox para navegación con señales. Los animales se sometieron a una serie de ensayos de dos minutos con 45 min entre ensayos. En cada ensayo la plataforma se movió a un cuadrante diferente. El estudio de navegación con señales fue idéntico al de navegación espacial, excepto que la plataforma fue visible y la prueba se hizo durante cinco ensayos consecutivos hechos en un único día. Los animales se puntuaron para latencia para encontrar la plataforma, tiempo en porcentaje pasado en cada cuadrante, distancia de la trayectoria y velocidad de nado para todos los periodos de prueba.

##### Resultados

La latencia para encontrar la plataforma fue diferente entre los animales tratados con Mox y con vehículo ( $F_{(1,20)} = 24,68$ ,  $p < .0001$ ) (Fig. 21). También hubo un efecto principal para los días ( $F_{(4,84)} = 6,53$ ,  $p < .0001$ ), pero no hubo interacción entre tratamiento y días ( $F_{(4,84)} = 0,99$ ,  $p < .0,4$ ). En los ensayos 1, 3 y 4, los animales con Mox mostraron latencias significativamente más cortas que los animales con vehículo.

Como en navegación espacial, la estrategia para encontrar la plataforma fue muy similar para ambos tratamientos (Fig. 21, la inferior de las dos gráficas) como se juzga por el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en cada cuadrante. Para cualquier cuadrante en cualquier ensayo no hubo diferencia significativa entre tratamientos (por ejemplo, Sur,  $F_{(1,20)} = 1,61$ ,  $p < .0,21$ ). Hubo una diferencia significativa entre ensayos para porcentaje de tiempo pasado en cualquier cuadrante particular (por ejemplo, Sur,  $F_{(4,84)} = 16,70$ ,  $p < .0001$ ). Los animales pasaron una porción significativa de su tiempo en ciertos cuadrantes en ciertos ensayos. Por ejemplo, en el ensayo 5, tanto los animales con Mox como con vehículo pasaron una cantidad significativa de tiempo en el cuadrante Norte en el que se escondió la plataforma, y en el cuadrante Oeste en el que la plataforma había estado en el ensayo previo.

A diferencia de la navegación espacial, la distancia recorrida durante la navegación con señales fue significativamente diferente entre los animales con Mox y con vehículo ( $F_{(1,20)} = 44,11$   $p < .0001$ ) (Fig. 22). También hubo un efecto principal significativo para ensayos ( $F_{(4,84)} = 7,90$ ,  $p < .0001$ ) e interacción entre tratamiento y rastros ( $F_{(4,84)} = 2,67$ ,  $p < .0,05$ ). En el ensayo 1 no hubo diferencia en la longitud de la trayectoria entre tratamientos. Sin embargo, en los ensayos 3 y 4, los animales con vehículo se desplazaron significativamente más lejos para encontrar la plataforma que los animales con Mox. La longitud de la trayectoria no cambió significativamente a lo largo de los ensayos para los animales con Mox. Así, la longitud media de recorrido en el ensayo 3 para los animales con vehículo fue significativamente mayor que para cualquier otro rastro para este tratamiento.

A diferencia de la navegación espacial, no hubo diferencia significativa en la velocidad de nado entre los dos

tratamientos ( $F_{(1,20)} = 0,67, p < 0,42$ ) (Fig. 22). Sin embargo, hay un efecto principal a lo largo de los ensayos ( $F_{(4,84)} = 17,18, p < 0,0001$ ) y una interacción entre tratamiento y ensayos ( $F_{(4,84)} = 4,10, p < 0,01$ ). En ambos tratamientos hay un aumento significativo en la velocidad de nado con respecto a cada rastro posterior. Por ejemplo, del ensayo 1 al ensayo 4 los animales con Mox y con vehículo mostraron un aumento significativo en la velocidad de nado ( $p < 0,01$ ).

5 Resumen

Los animales tratados con moxalactama son más efectivos en encontrar la plataforma escondida y visible en el laberinto de agua que los controles tratados con vehículo. Sin embargo, la estrategia para el éxito en cada paradigma de navegación fue sorprendentemente diferente. Durante la navegación espacial, los animales debieron basarse en señales adicionales del laberinto y memoria de procedimiento para encontrar la plataforma en movimiento. Pareció que los animales con Mox y con vehículo mostraban el mismo aprendizaje y memoria ya que no hubo diferencia en el porcentaje de tiempo pasado en cada cuadrante durante cada día de la prueba. No hubo diferencia aparente en los patrones de nado (Figs. 23 y 24). La distancia recorrida entre tratamientos no fue significativamente diferente. Los animales con Mox encontraron la plataforma antes, debido en parte a que nadaron más rápido. Sin embargo, la navegación con señales presentó un perfil diferente. De nuevo, los animales tratados con Mox superaron a los animales con vehículo en la latencia para encontrar la plataforma. De nuevo, la estrategia de búsqueda como se define por el porcentaje de tiempo pasado en cada cuadrante fue sorprendentemente similar. Sin embargo, a diferencia de la navegación espacial, los animales tratados con Mox mostraron una longitud de la trayectoria mucho más corta. Además, ambos grupos de tratamiento nadaron a la misma velocidad.

Estos datos apoyan la idea de que el perfil ansiolítico de la moxalactama no va acompañado de ningún trastorno en el aprendizaje y la memoria como es el caso con ansiolíticos de benzodiazepinas. Por el contrario, la moxalactama potencia la memoria espacial y puede actuar de agente psicotrópico para mejorar el rendimiento cognitivo. Este hallazgo sugiere que la moxalactama puede ser un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de ADHD y el trastorno de conducta en niños y senilidad en pacientes geriátricos.

20 VII. Comportamiento social en primates no humanos

25 Procedimiento experimental

Ocho macacos Rhesus macho adolescentes de dos años de edad se probaron con Mox. Los animales se criaron con sus madres en un grupo que estaba establecido en una estación en el campo. Al año de edad se transfirieron a jaulas individuales. Cada día después de esto se alojaron por parejas durante dos-tres h. Las parejas adolescentes siempre fueron las mismas. Este procedimiento de un año de duración produjo parejas adolescentes o "compañeros de juegos" que tenían antecedentes bien definidos de interacción social con estado dominante y subordinado reconocible. La demostración de comportamientos sociales en esta disposición es muy fuerte debido a la cantidad limitada de tiempo que los monos pasaron juntos.

Durante el experimento, los monos se emparejaron en la "jaula de juegos" en la que se grabaron en vídeo durante una hora. El estudio se diseñó de manera que los datos del comportamiento se obtuvieran para cada mono bajo tratamiento con Mox y con vehículo. El tratamiento fue un programa tipo ABA de administración: Día 1 - un miembro de cada pareja recibió 0,9% de NaCl de vehículo, Día 2 - fármaco, Día 3 - vehículo. Sólo un miembro de una pareja se inyectó en un día de prueba. El otro miembro de una pareja se inyectó una semana después según el mismo programa ABA. La moxalactama se inyectó IM en una dosis de 1 mg/kg. Los animales se grabaron en vídeo sesenta minutos después de la inyección durante un periodo de observación de una h. Los animales se puntuaron para más de cuarenta comportamientos diferentes (Winslow y col., 1988). Sólo se enumeran veintiocho en la Tabla I. Los comportamientos no informados, por ejemplo, auto-mordiscos, vocalizaciones, pegajosidad, montas, huídas, auto-acicalamiento, fueron tan poco frecuentes que se omitieron del análisis. La prueba de la t para datos emparejados se realizó para cada medición del comportamiento.

35 Resultados

La duración de la lucha de juego se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) por el tratamiento con Mox con respecto a vehículo. Este hallazgo no se afectó por la posición social del animal, es decir, animales tanto dominantes como subordinados mostraron una disminución de la lucha de juego tras el tratamiento con Mox. Interesantemente, varias medidas diferentes de comportamiento agonista, por ejemplo, puntuaciones de agresión compuestas, se agruparon juntas a niveles casi significativos. Debe observarse que éstos son monos Rhesus juveniles y, como tales, su expresión de agresión social está principalmente confinada a la lucha de juego. La agresión no tiene la misma valencia emocional que en los adultos. Sin embargo, se cree que la lucha de juego es el antecedente juvenil para la agresión de adultos. El acicalamiento social para monos adolescentes y adultos es la medida primaria de comportamiento afiliativo. Aunque Mox redujo significativamente la duración de la lucha de juego, no tuvo efecto sobre el acicalamiento social.

50 Resumen

La moxalactama administrada en una dosis de 1 mg/kg a monos Rhesus adolescentes reduce significativamente la lucha de juego, una medida de comportamiento agonista. Sin embargo, el acicalamiento social, la medida clave del

comportamiento afiliativo, permanece inalterada. De ahí que el hallazgo de que Mox pueda reducir el comportamiento agonista en roedores se traduzca en primates no humanos.

### VIII. Prueba de isómeros D y L de moxalactama

#### Fundamento

- 5 La estructura 3D de fármacos puede producirse naturalmente como imágenes especulares o isómeros. Estos isómeros se clasifican como D o L basándose en su rotación de la luz. Sólo uno de los isómeros tiene normalmente actividad biológica. Como la preparación de Mox usada en estos estudios es una mezcla de los dos isómeros fue necesario aislar y probar el isómero activo.

#### Procedimientos

- 10 La sal moxalactama sódica (FW 564.4) se obtuvo como un isómero mixto de Sigma Chemical (St Louis MO). Se aislaron D, L-Mox con HPLC usando el procedimiento explicado resumidamente por Ziemniak y col., 1982. La D,L-Mox se recogió en agua y se fraccionó en una columna C18 con un tampón de electroforesis de 1% de MeCN, pH 6,5. El efluente de la columna se monitorizó a 275 nm con un detector de UV. Ambos isómeros salieron como picos individuales. La D-Mox tuvo un tiempo de retención de 6,7 min, mientras que la L-Mox salió a 8,2 min. Los isómeros individuales de Mox proporcionados son relativamente inestables y se reisomerizarían rápidamente durante la liofilización haciendo que fuera difícil tener una muestra razonablemente pura (>98 %). De ahí que fuera necesario ir directamente de la HPLC al animal. El isómero D (aproximadamente 200 µg/ml de tampón de HPLC) se diluyó a 50 µg/ml de solución salina y se mantuvo sobre hielo hasta la inyección IP (50 µg/kg). El isómero L (aproximadamente 150 µg/ml de tampón de HPLC) también se diluyó a 50 µg/ml de solución salina y se trató similarmente.

#### Resultados

Se probaron dos grupos de ocho animales cada uno para agresión ofensiva tras el tratamiento con 50 µg/kg de D- o L-Mox (Fig. 9). Los animales se probaron 90 min después de la inyección. La D-Mox aumentó significativamente la latencia para morder ( $p < 0,01$ ) y redujo el número de mordiscos ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencia significativa en el tiempo de contacto ni el marcaje de ijadas entre los dos isómeros.

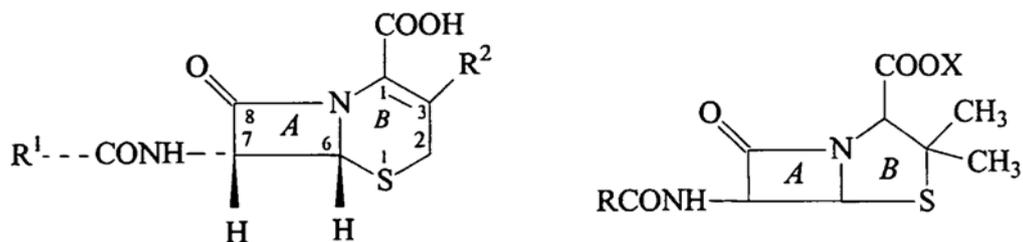
#### Resumen

Estos datos identifican D-moxalactama como el isómero activo que afecta el comportamiento ofensivo-agresivo.

### IX. Prueba de antibióticos relacionados con beta-lactama para efectos antiagresivos

#### Fundamento

- 30 La moxalactama es químicamente y farmacológicamente similar a los antibióticos de cefalosporina y penicilina. De hecho, la moxalactama se clasifica como una cefalosporina. Las estructuras básicas de todas las cefalosporinas y la penicilina se muestran a continuación. Cada una tiene un anillo de beta-lactama (A), a su vez, la cefalosporina tiene un anillo de dihidrotiazina de seis lados (B) y la penicilina un anillo de tiazolidina de cinco lados (B). Estas estructuras básicas que forman el núcleo químico para estos antibióticos se producen naturalmente en hongo. La moxalactama no se encuentra en la naturaleza y se caracteriza por una sustitución del átomo de azufre (S) por oxígeno en la cefalosporina.



Núcleo de cefalosporina

Núcleo de penicilina

A Anillo de  $\beta$ -lactama

A Anillo de  $\beta$ -lactama

B Anillo de dihidrotiazina

B Anillo de dihidrotiazina

- 40 Las cefalosporinas y la penicilina son bactericidas. Su actividad antibacteriana es debida a una inhibición de la síntesis de peptidoglicanos en la pared celular bacteriana. Aunque el mecanismo de acción exacto no se entiende completamente, estos antibióticos se unen a varias enzimas proteolíticas, por ejemplo, carboxipeptidasas y

endopeptidasas, que participan en la síntesis de la estructura reticular del peptidoglicano que refuerza la pared celular bacteriana. La interacción entre estos antibióticos y las enzimas proteolíticas es reversible. Se cree que estos antibióticos de beta-lactama actúan de análogos de sustrato para acil-D-alanil-D-alanina, el sustrato endógeno para estas enzimas. Cuando estas enzimas bacterianas están estrechamente ligadas con antibiótico, no pueden realizar su función y las bacterias se lisan a medida que se replican.

Carboxipeptidasas y endopeptidasas similares están asociadas a membranas celulares de neuronas y la glía en el cerebro de mamífero. Una de sus muchas funciones es degradar rápidamente neuropéptidos que actúan de neurotransmisores. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, por ejemplo, la dopamina y la serotonina, que se basan en mecanismos de recaptación para detener la activación de señales, los neuropéptidos se inactivan por su rápida degradación en el espacio extracelular. Se cree que estos antibióticos relacionados con beta-lactama tienen actividad psicotrópica interfiriendo con el metabolismo (actividad de NAALADasa) en los numerosos neuropéptidos que alteran el medio de neuropéptidos del cerebro.

#### Procedimiento

Se probaron seis animales con concentraciones equimolares (90  $\mu$ M) de moxalactama (Mox), ampicilina (Amp) carbenicilina (Carb), cefoxitina (Cef), amoxicilina (Amox) o vehículo de solución salina. Las concentraciones se ajustaron para igualar la dosis de 50  $\mu$ g/kg usada para MOX en estudios previos. Todas las disoluciones se prepararon en 0,9% de NaCl y se administraron IP. El orden de las inyecciones se compensó. Los animales se probaron para agresión ofensiva 90 min después de la inyección (Fig. 10). Hubo una diferencia significativa entre tratamientos en la latencia para morder ( $F_{(5,30)} = 2,83$ ;  $p < 0,45$ ). Tanto la Mox como la Amp retrasaron significativamente la latencia para morder ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) con respecto al control de vehículo. También hubo una diferencia significativa entre tratamientos en el número de mordiscos ( $H = 10,6$ ;  $p < 0,05$ ). Tanto los fármacos Mox como Amp redujeron significativamente el número de mordiscos ( $p < 0,05$ ). No hubo efecto significativo del tratamiento sobre el tiempo de contacto o el marcaje de ijadas (Fig. 11).

#### Resumen

Estos datos indican que el efecto antiagresivo del antibiótico de beta-lactama Mox puede extenderse para incluir la beta-lactama ampicilina. De todos los antibióticos probados, la Mox tiene la mayor penetrabilidad en el SNC. Los pacientes a los que se les administraron 2,0 g de Mox IV muestran niveles en el líquido cefalorraquídeo de fármaco de aproximadamente 30  $\mu$ g/ml. La relación de niveles en LCR con respecto a en suero de Mox es aproximadamente el 15-20%. Se estima que la concentración en suero de Mox en hámsteres de 140 g a los que se les administró una inyección IP de 14  $\mu$ g de fármaco es 0,1 ng/ml. Esto se reflejaría por una concentración en LCR de 15 ng/ml o niveles en el cerebro de Mox de aproximadamente 30 nM. Estos niveles estarían casi seguro en el intervalo para interactuar eficazmente con receptores de neuropéptidos, la mayoría de los cuales tienen afinidades de unión en el intervalo nanométrico. La interacción con los neurotransmisores clásicos sería menos probable debido a que estos receptores tienen Kd en el intervalo micro y milimolar.

Neonatos con meningitis (condiciones que favorecen la penetrabilidad en el SNC de antibióticos de beta-lactama) muestran una relación de nivel en LCR con respecto a en suero de Amp de aproximadamente el 10%. La cefoxitina, por otra parte, tiene poca penetrabilidad en el SNC incluso cuando las meninges están inflamadas. Quizás muchos de los antibióticos de beta-lactama serían eficaces en la supresión del comportamiento agresivo y están simplemente limitados por su farmacocinética y penetrabilidad en el SNC. Para probar esta idea fue necesario repetir el estudio de antibiótico de beta-lactama usando una mayor dosis de cada fármaco.

#### X. Beta-lactamas a altas dosis

Se probaron seis animales con concentraciones equimolares (aproximadamente 5 mg/kg; 9 mM) de ampicilina (Amp), carbenicilina (Carb) y cefoxitina (Cef) o vehículo de solución salina. Las concentraciones se ajustaron para igualar la dosis de 5 mg/kg usada para en el estudio de respuesta a dosis para Mox. Todas las disoluciones se prepararon en 0,9% de NaCl y se administraron IP. El orden de las inyecciones se compensó. Los animales se probaron para agresión ofensiva 90 min después de la inyección (Fig. 12). Hubo una diferencia significativa entre tratamientos en la latencia para morder ( $F_{(4,25)} = 5,49$ ;  $p < 0,01$ ). Tanto la Amp como la Carb retrasaron significativamente la latencia para morder ( $p < 0,001$ ) con respecto al control de vehículo. También hubo una diferencia significativa entre tratamientos en el número de mordiscos ( $H = 11,7$ ;  $p < 0,05$ ). Tanto la Amp como la Carb redujeron significativamente el número de mordiscos ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). No hubo efecto significativo del tratamiento sobre el tiempo de contacto o el marcaje de ijadas (Fig. 13).

La amoxicilina no se incluyó en este estudio de antibióticos de beta-lactama a altas dosis; en su lugar se realizó en un estudio separado usando una dosis de 1 mg/kg (aproximadamente 2 mM). Se probaron ocho animales para agresión ofensiva 90 min después de la inyección IP tras el tratamiento con Amox o vehículo de solución salina (Fig. 14). A cada animal se le administró cada tratamiento con no menos de 48 h entre inyecciones. Los tratamientos se compensaron. El comportamiento agresivo no se alteró significativamente en animales tratados con 1 mg/kg de Amox.

Resumen

Estos datos indican que la ampicilina y la carbenicilina administradas en dosis suficientemente altas pueden suprimir la agresión ofensiva sin alterar el tiempo de contacto o el marcaje de ijadas. Estos datos elevan la posibilidad de que el efecto psicotrópico de la moxalactama sea compartido por otras beta-lactamas y que los mecanismos de acción biológica puedan ser similares. La biodisponibilidad y la penetrabilidad en el SNC pueden ser en parte el componente principal que contribuya a diferencias en eficacia biológica. De hecho, las pruebas más recientes han demostrado que el ácido clavulánico, un compuesto de  $\beta$ -lactama que tiene actividad antibiótica no clínicamente significativa, pero una actividad de inhibición de  $\beta$ -lactamasa clínicamente importante, presenta una amplia variedad de efectos psicotrópicos, que incluye antiansiedad, antiagresión y potenciamiento de la cognición, a dosis i.p. inferiores a 1  $\mu$ g/kg. Su alta absorción oral y buenas propiedades de transporte a la barrera hematoencefálica hacen que él e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas relacionados sean candidatos preferidos para su uso en los procedimientos y las formulaciones farmacéuticas según la presente invención.

Ahora se cree que el (los) mecanismo(s) de acción para los efectos psicotrópicos de estas beta-lactamas es su interacción con NAALADasa neurogénica. Esto es factible ya que se informa que las cefalosporinas tienen actividad bactericida en concentraciones de tan sólo 10 nM. Obsérvese, la concentración estimada de Mox en el cerebro tras el tratamiento con 50  $\mu$ g/kg es aproximadamente 30 nM.

Otra explicación posible para la actividad psicotrópica de antibióticos de beta-lactama es el posible bloqueo de receptores de neurotransmisores conocidos o proteínas de recaptación. Para probar esta segunda posibilidad fue necesario cribar Mox para la interacción con receptores en un amplio intervalo de ensayos de unión a radioligando.

#### XI. Cribado de moxalactama en receptor y ensayos de unión por transporte

##### Prueba Mox para la interacción con los receptores de la vasopresina $V_{1A}$ y la serotonina $5HT_{1A}$

La vasopresina y la serotonina son ambos neurotransmisores críticos en el control de la agresión ofensiva en hámsteres macho (Ferris y col., 1998). Estos dos neurotransmisores también participan en el control de la agresión humana (Coccaro y col., 1998). La vasopresina facilita el comportamiento agresivo, mientras que la serotonina inhibe la agresión, inhibiendo en parte la actividad del sistema de vasopresina. El bloqueo de los receptores de vasopresina  $V_{1A}$  y la estimulación de los receptores de serotonina  $5HT_{1A}$  en el hipotálamo anterior bloquea la agresión ofensiva (Ferris y col., 1999). Como la Mox suprime significativamente la agresión ofensiva, se planteó como hipótesis que lo hacía interactuando con tanto uno como ambos de estos receptores. Para probar esta idea, la Mox se probó en un ensayo de unión a membrana para la competición por el receptor de  $V_{1A}$  (Ferris y col., 1994) y en un ensayo de autorradiografía para receptores para la competición por los receptores de  $5HT_{1A}$  (Ferris y col., 1999). La moxalactama en una concentración de 1  $\mu$ M no desplazó significativamente la unión de  $^3H$ -HO-LVA (ligando de vasopresina) en una preparación de membrana de hígado de hámster. Similarmente, la Mox fue ineficaz en la reducción de la unión específica de  $^3H$ -DPAT (ligando de serotonina) a secciones de tejido del cerebro de hámster.

Resumen

Estos datos muestran que la moxalactama no tiene interacción directa con los receptores de la vasopresina  $V_{1A}$  ni de la serotonina  $5HT_{1A}$  en el hámster. Esto sugeriría que la moxalactama está afectando el comportamiento alterando la actividad de otras rutas neuroquímicas.

##### Prueba de receptores de aminoácidos, adrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos y sus transportadores

La moxalactama se cribó en treinta y seis ensayos de unión diferentes por NOVASCREEEN, una organización de investigación por contrato con base en Hanover, Mariland. La moxalactama se probó a 100 nM y se ejecutaron muestras por duplicado para cada uno de los ensayos enumerados en la siguiente página. Estos ensayos se eligieron debido a que su receptor o transportador respectivo podrían desempeñar una función en la patofisiología de la enfermedad mental. La moxalactama no tuvo efecto significativo sobre ninguno de estos ensayos de unión.

45

*Dianas de aminoácidos*

Benzodiazepina, periférica

GABA

Sitio de agonista

Benzodiazepina, central

GABA

Glutamato

Sitio de AMPA

Sitio de kainato

NMDA, sitio de agonista

NMDA, sitio de glicina [insensible a estricnina]

Sitio de glicina [sensible a estricnina]

*Dianas aminoadrenérgicas biogénicas*

Adrenérgicas

$\alpha_{1A}$

$\alpha_{1B}$

$\alpha_{2A}$  (células HT-29 humanas)

$\alpha_{2B}$

$\alpha_{2C}$  (recombinantes humanas)

$\beta_1$

$\beta_2$

*Dianas aminoserotonérgicas biogénicas*

Serotonina

5HT<sub>1A</sub> (recombinantes humanas)

5HT<sub>1B</sub>

5HT<sub>1D</sub>

5HT<sub>2A</sub> (anteriormente 5HT<sub>2</sub>)

5HT<sub>2C</sub>

5HT<sub>3</sub>

5HT<sub>4</sub>

5HT<sub>6</sub> (recombinantes de rata)

5HT<sub>7</sub> (recombinantes de rata)

*Dianas aminodopaminérgicas biogénicas*

Dopamina

D<sub>1</sub>

D<sub>2</sub> (recombinantes humanas)

D<sub>3</sub> (recombinantes de rata)

Clozapina

*Dianas de captación/de transportador*

Adrenosina  
Adrenérgicas,  
norepinefrina  
Dopamina  
GABA  
Glutamato  
Muscarínicas,  
colina  
Serotonina

*Dianas de hormona*

Factor liberador de corticotropina

Prueba para el receptor de la hormona liberadora de corticotropina

5 La hormona liberadora de corticotropina (CRH o CRF como se muestra en la siguiente página) es una neurohormona crítica en la regulación de estrés. Como la Mox suprime la impulsividad, la agresión y la ansiedad a la vez que potencia el aprendizaje y la memoria, puede actuar para reducir el estrés. Por este motivo, la Mox se probó por NOVASCREEEN en un ensayo de unión a LCR. La moxalactama a una concentración de 100 nM no tuvo efecto en este ensayo.

10 Resumen

Estos datos muestran que la moxalactama no interactúa directamente con muchos de los receptores y transportadores implicados en la patofisiología de la agresión y enfermedad mental. Esto deja tres posibles mecanismos de acción: 1) interacción con receptores conocidos que no se cribaron, por ejemplo, histamina, acetilcolina y otros neuropéptidos, 2) interacción con receptor desconocido o “receptor huérfano,” o 3) interacción con enzimas peptidolíticas (por ejemplo, NAALADasa) en el SNC que alteran el medio químico del cerebro.

15 XII. Examen del mecanismo de acción

Prueba de péptido precursor del peptidoglicano para efectos sobre la agresión ofensiva

Fundamento

20 Los antibióticos de beta-lactama tienen una estereoquímica que se parece a la de acil-D-alanil-D-alanina, el sustrato natural para las enzimas proteolíticas bacterianas. Supuestamente, estas características estructurales permiten que los antibióticos de beta-lactama se comporten como sustrato competitivo que bloquea la actividad enzimática. Para probar esta hipótesis, un análogo de acil-D-alanil-D-alanina, el péptido precursor del peptidoglicano (Nieto y Perkins 1971; Zeiger y Maurer, 1973) se probó para efectos antiagresivos en el paradigma de hámster residente/intruso.

Procedimiento

25 El péptido precursor del peptidoglicano, Ala-D- $\gamma$ -Glu-Lys-D-Ala-D-Ala, (PPP) se obtuvo de Sigma Chemical y se reconstituyó en DMSO y se diluyó en 0,9% de NaCl a una concentración final de aproximadamente 2 mM. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg), se les implantaron cánulas guías para microinyección dirigidas al ventrículo lateral y se dejó que se recuperaran durante dos días antes de la prueba. En el día de la prueba, los animales (n=6) se inyectaron con vehículo (2% de DMSO en 0,9% de NaCl) o PPP en una dosis de aproximadamente 1 mg/kg en un volumen de 1  $\mu$ l. Sesenta minutos después de la inyección, los animales se volvieron a probar para agresión ofensiva hacia un intruso más pequeño colocado en su jaula hogar. Dos días después, los animales se probaron de nuevo, y se invirtió el orden de los tratamientos.

Resultados

35 El péptido precursor del peptidoglicano aumentó significativamente la latencia para morder ( $p < 0,05$ ) y redujo el número de mordiscos ( $p < 0,05$ ) durante un periodo de observación de 10 min (Fig. 15). No hubo diferencia significativa en el tiempo de contacto o el marcaje de ijadas entre tratamientos (Fig. 15).

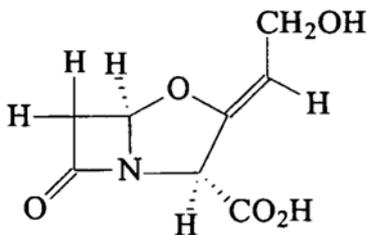
Prueba de péptido precursor del peptidoglicano para efectos de discriminación olfativa

Seis animales recibieron una inyección intracerebroventricular de vehículo o 1 mg/kg de PPP y se probaron para discriminación olfativa midiendo su latencia para encontrar pipas de girasol escondidas (Fig. 16). Las inyecciones se compensaron recibiendo cada animal cada tratamiento. Antes de la prueba, los animales ayunaron durante 24 h. Sesenta min después de la inyección, los animales se sacaron brevemente de su jaula hogar mientras que seis pipas de girasol se enterraban bajo el lecho de paja en una esquina. Los animales se colocaron de nuevo en su jaula hogar y se puntuaron para la latencia para encontrar las pipas en un periodo de observación de cinco min. La latencia para encontrar la pipa fue significativamente ( $p < 0,05$ ) reducida en animales tratados con PPP con respecto a vehículo.

10 Resumen

La inyección directa del péptido precursor del peptidoglicano en el cerebro de hámsteres tiene los mismos resultados de comportamiento que la inyección periférica de Mox. Ambos fármacos y ambas vías de administración reducen significativamente el comportamiento agresivo sin alterar el interés social de la actividad motora, es decir, el tiempo de contacto y el marcaje de ijadas. Además, el potenciamiento de la discriminación olfativa que parece ser el ensayo de comportamiento más simple y el más robusto para cribar antibióticos de beta-lactama está similarmente afectado por el péptido precursor. Estos hallazgos son una prueba de que los antibióticos de beta-lactama afectan el comportamiento: 1) actuando directamente sobre el cerebro, y 2) semejándose al resto del péptido acil-D-alanil-D-alanina.

Aunque el ácido clavulánico contiene un anillo de beta-lactama y es estructuralmente similar a las penicilinas y las cefalosporinas, tiene una débil actividad antibacteriana sin valor terapéutico como antibiótico. Sin embargo, cuando se administra en combinación con algunos antibióticos de beta-lactama como ticarcilina (Timentin®), el ácido clavulánico puede extender el espectro y potenciar la actividad del antibiótico (AHFS, 1991). Esta actividad sinérgica es posible debido a que el ácido clavulánico actúa de inhibidor competitivo irreversible de beta-lactamasas bacterianas que naturalmente degradan e inactivan antibióticos de beta-lactama (Brown y col., 1976; Reading and Cole 1977).



**Ácido clavulánico.**

El ácido clavulánico está comercialmente disponible en los Estados Unidos, pero sólo en combinación fija con otros fármacos. La Timentin® comúnmente recetada se administra normalmente intravenosamente en dosis que oscilan de 200-300 mg/kg/día (basado en contenido de ticarcilina) que se corresponde con una dosis de ácido clavulánico de aproximadamente 7-10 mg/kg/día (AHFS, 1991). No hay reacciones adversas ni contraindicaciones informadas para el ácido clavulánico administrado en este intervalo de dosis (Koyu y col., 1986; Yamabe y col., 1987). Los datos presentados más adelante informan que el ácido clavulánico puede alterar la actividad en el SNC y el comportamiento a dosis que oscilan de 10 ng a 10 µg/kg, o 1000 a 1.00.000 veces inferiores a las usadas en indicaciones antibacterianas.

El ácido clavulánico por sí mismo es activo y estable por vía oral. La biodisponibilidad es aproximadamente del 64 al 75% (Davies y col., 1985; Bolton y col., 1986) con un semivida de eliminación de justamente inferior a dos horas. Las concentraciones pico en plasma se producen entre 45 min y tres horas después de la ingestión (Bolton y col., 1986) con una semivida en plasma de más de 2 h (Nakagawa y col., 1994). El volumen de distribución es aproximadamente 15 litros, sugiriendo que el ácido clavulánico está principalmente confinado al líquido extracelular (Davies y col., 1985). La relación de LCR/plasma es aproximadamente 0,25, prueba de que el ácido clavulánico pasa fácilmente la barrera hematoencefálica (Nakagawa y col., 1994).

ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO CON ÁCIDO CLAVULÁNICOI. Respuesta a dosis de ácido clavulánico en el modelo de búsqueda de pipas de ansiedad45 **Fundamento**

El ácido clavulánico (CLAV) es estructuralmente similar a los antibióticos de beta-lactama. Un bioensayo más robusto y simple para cribar beta-lactamas para actividad en el SNC es el modelo de ansiedad de búsqueda de pipas por hámsteres dorados. Brevemente, los hámsteres se privaron de comida durante la noche. Al día siguiente

se exponen al estrés adicional de ser sacados de la jaula hogar y colocados en un entorno novedoso durante algunos minutos. Esta manipulación estimula la liberación de la hormona del estrés cortisol (Fig. 37). Durante su ausencia de la jaula hogar, pipas de girasol se esconden bajo el lecho de paja en una de las esquinas. Cuando vuelven a la jaula hogar, los hámsteres se ponen rutinariamente de pie a lo largo de las paredes durante 1-2 min antes de acomodarse, localizando y comiendo las pipas. Sin embargo, los animales tratados con el ansiolítico de benzodiazepina clordiazepóxido encuentran las pipas en menos de 10 s. Esta reducción en el tiempo de búsqueda de pipas de minutos a segundos también se produce tras el tratamiento con moxalactama y otros antibióticos de beta-lactama.

#### Protocolo experimental

10 Hámsteres dorados sirios macho (*Mesocricetus auratus*) (120-130 g) obtenidos de Harlan Sprague-Dawley Laboratories (Indianápolis, IN) se alojaron individualmente en jaulas de Plexiglas (24 cm x 24 cm x 20 cm), se mantuvieron en un ciclo inverso de luz:oscuridad (14L:10O; las luces se encienden a las 19:00 h) y se les proporcionó comida y agua a voluntad. Se probó un intervalo de concentraciones de CLAV (vehículo de solución salina, 0,1, 1,0, 10, 100, 1.000 ng/kg) en seis grupos de hámsteres (4-8/grupo) (Fig. 25). Todas las pruebas se  
15 realizaron durante la fase oscura del ciclo circadiano bajo iluminación roja tenue. Antes de la prueba, todos los animales ayunaron durante 20-24 h. Noventa min después de la inyección intraperitoneal (IP) del fármaco, los animales se sacaron de su jaula hogar y se colocaron en una jaula de tenencia durante 2 min. Durante su ausencia, seis pipas de girasol se enterraron bajo el lecho de paja en una esquina de su jaula hogar. Los animales se colocaron de nuevo en su jaula hogar orientados aleatoriamente hacia una cualquiera de las esquinas vacías y se  
20 cronometró su latencia para encontrar las pipas en un periodo de observación de cinco min. Los tiempos de latencia se analizaron con un ANOVA unilateral seguido de pruebas de Scheffe a posteriori. Se probó la suposición de varianzas iguales ( $F_{\text{máx de Hartley}} = 2,1$   $p > 0,05$ )

#### **Resultados**

La latencia para encontrar las pipas de girasol fue significativamente diferente entre dosis ( $F_{(5,30)} = 10,0$ ;  $p < 0,0001$ ).  
25 El CLAV en dosis de 10 ng y superiores redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) los tiempos de latencia a menos de 8,0 s con respecto al vehículo de solución salina con una latencia media de 104 s. La dosis de 1 ng/kg no fue significativamente diferente de la del control de vehículo.

#### Resumen

Los datos muestran que el CLAV administrado en una dosis de 10 ng/kg de peso corporal tiene eficacia máxima en la prueba de búsqueda de pipas. Los hámsteres macho adultos usados en estos estudios pesaron aproximadamente 125 g. De ahí que a estos animales se les administraran aproximadamente 1,25 ng de CLAV. El CLAV tiene un volumen de distribución que se aproxima al volumen de líquido extracelular. El contenido de agua extracelular de la masa corporal magra es aproximadamente el 22%. La concentración de 1,25 ng de CLAV en 27,5 ml de agua es 0,045 ng/ml o aproximadamente 200 pM (el peso fórmula de la sal de potasio de CLAV es aproximadamente 240).  
30 Como la relación de LCR/plasma es 0,25, la concentración estimada en el cerebro sería aproximadamente 50 pM.

El modelo de ansiedad de búsqueda de pipas parece tener validez empírica (McKinney 1989), es decir, fármacos como las benzodiazepinas que se usan para tratar ansiedad clínica son eficaces en el modelo animal. Sin embargo, un espectro más amplio de ansiolíticos y fármacos no eficaces debe cribarse para evaluar la incidencia de falsos negativos y falsos positivos antes de adoptar la búsqueda de pipas como modelo de ansiedad. De ahí que fuera necesario validar el potencial de actividad ansiolítica del CLAV en el laberinto en cruz elevado tradicional.  
40

#### II. Prueba de ácido clavulánico en el laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado se desarrolló para cribar efectos de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos en la rata (Pellow y col., 1985). El procedimiento se ha validado en lo referente al comportamiento, fisiológicamente y farmacológicamente. El laberinto en cruz consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados. Las ratas harán naturalmente menos entradas en los brazos cerrados que en los brazos abiertos y pasarán significativamente menos tiempo en los brazos abiertos. El confinamiento en los brazos abiertos está asociado a comportamiento relacionado con significativamente más ansiedad y mayores niveles de hormona del estrés que el confinamiento en los brazos cerrados. Ansiolíticos clínicamente eficaces, por ejemplo, clordiazepóxido o diazepam, aumentan significativamente el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos y el número de entradas en los brazos abiertos. En cambio,  
45 compuestos ansiogénicos como yohimbina o anfetaminas reducen las entradas en los brazos abiertos y el tiempo pasado en los brazos abiertos.  
50

#### **Protocolo experimental**

Ratas Wistar macho que pesaban 250-300 g se alojaron en grupo en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 normal con la luz encendida a las 08:00 h y se les proporcionó comida y agua a voluntad. El laberinto en cruz consistió en dos brazos abiertos, 50 cm de longitud, 10 cm de ancho, con paredes de 40 cm de altura hechas de Plexiglas transparente. Los dos brazos cerrados tuvieron las mismas dimensiones, pero incluyeron un tejado. El Plexiglas para los brazos cerrados fue negro pintado. Cada par de brazos se dispuso opuesto entre sí para formar el laberinto en  
55

cruz. El laberinto se elevó a una altura de 50 cm. Se probaron dieciocho animales en el laberinto en cruz 90 min tras la inyección IP de 1,0 µg/kg de CLAV, 50 o control de vehículo en un volumen de aproximadamente 0,3 ml. El orden de tratamientos se compensó con al menos 48 h entre inyecciones. Al inicio del experimento, el animal se colocó al final de uno de los brazos abiertos. Durante un periodo de observación de cinco min, los animales se puntuaron para la latencia para entrar en el brazo cerrado, tiempo pasado en el brazo cerrado y el número de entradas en los brazos abiertos tras la primera ocupación del brazo cerrado. El estudio produjo tablas de medidas repetidas. Los datos entre tratamientos se compararon con un ANOVA bilateral de medidas repetidas seguido por pruebas de Bonferroni a posteriori.

### Resultados

Hubo una diferencia significativa entre tratamientos para latencia para entrar en la oscuridad ( $F_{(1,18)} = 8,53$ ;  $p < 0,01$ ). Cuando se trataron con CLAV ( $p < 0,05$ ), los animales permanecieron en la posición con luz abierta inicial más tiempo que cuando se trataron con vehículo (Fig. 26). El tiempo pasado en el brazo abierto fue altamente significativo entre tratamientos ( $F_{(1,18)} = 144$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 26). El tiempo pasado en el brazo abierto aumentó significativamente para CLAV ( $p < 0,01$ ) con respecto al vehículo. Finalmente, las entradas en los brazos abiertos fueron significativamente diferentes entre tratamientos ( $F_{(1,18)} = 44,0$   $p < 0,0001$ ) con CLAV ( $p < 0,01$ ), tratamiento que muestra un aumento del movimiento hacia los brazos abiertos iluminados con respecto al vehículo (Fig. 26).

### Resumen

Estos datos muestran que el CLAV administrado a una dosis de 1 µg/kg tiene actividad ansiolítica en el laberinto en cruz. Estos datos son alentadores; sin embargo, muchos ansiolíticos tales como las benzodiazepinas reducen la actividad motora. Como los animales tratados con CLAV necesitaron más tiempo para moverse del brazo abierto iluminado al brazo cerrado protegido oscuro, podría argumentarse que esta beta-lactama no redujo la ansiedad, en lugar de eso sedó al animal y retrasó el movimiento. Para controlar esta posibilidad fue necesario cribar CLAV para actividad motora general en un paradigma de campo abierto.

### III. Actividad motora en un campo abierto

#### Protocolo experimental

Inmediatamente después de cada una de las pruebas en el laberinto en cruz informadas anteriormente en la sección II, los animales se probaron para actividad motora general en un "campo abierto". Los animales se colocaron en una jaula de Plexiglas limpia grande (48 x 32 x 40 cm) carente de lecho de paja. Este campo abierto se delineó en cuadrantes iguales por cinta adhesiva sobre la parte inferior de la jaula. Los animales se puntuaron para la actividad motora contando el número de cuadrantes atravesados en 1 min. No hubo diferencias significativas entre tratamiento con CLAV y con vehículo en la actividad en campo abierto (Fig. 27).

### Resumen

No hay indicios en la prueba de campo abierto de que el CLAV reduzca la actividad motora. Este hallazgo se corrobora en otro estudio del comportamiento, el marcaje de ijadas informado en la sección VII. El marcaje de ijadas es un comportamiento motor estereotipado complejo usado por hámsteres para diseminar feromonas para la comunicación olfativa (Fig. 39). El marcaje de ijadas no está afectado por tratamientos con CLAV. Parecería que esta beta-lactama tiene una ventaja con respecto a los ansiolíticos de benzodiazepina más convencionales ya que no reduce la actividad motora. Sin embargo, ¿es comparable la actividad ansiolítica del CLAV con la de las benzodiazepinas clínicamente recetadas?

### IV. Ácido clavulánico frente a clordiazepóxido en el laberinto en cruz

#### Protocolo experimental

El clordiazepóxido (Librium®) es un ansiolítico comúnmente recetado que se ha caracterizado rigurosamente en estudios preclínicos. La dosis ansiolítica eficaz en el laberinto en cruz es 10-25 mg/kg (Lister 1987; File y Aranko 1988; Shumsky y Lucki 1994). En este intervalo de dosis, el clordiazepóxido (CDP) es un sedante y reduce la actividad motora, complicando la interpretación de cualquier ensayo de comportamiento que requiera locomoción (McElroy y col., 1985). Sin embargo, se descubrió que los animales desarrollaban una tolerancia a la depresión motora con administración diaria repetida de CDP durante varios días (Shumsky y Lucki 1994). De ahí que en estos estudios a las ratas (n=6) se les administrara una única inyección IP de CDP (10 mg/kg) cada día durante siete días antes del inicio del experimento. Aunque el CLAV no tiene efecto sobre la actividad motora, fue necesario tratar un número igual de ratas con inyecciones diarias de CLAV (100 ng/kg) para asegurar un diseño experimental equilibrado. Además, hubo un tercer grupo de ratas (n=6) que recibió inyecciones diarias de vehículo de solución salina. El estudio informado en la sección II probó CLAV a 1 µg/kg en el laberinto en cruz. Los datos del ensayo de búsqueda de pipas de ansiedad mostrado en la sección I sugiere que el CLAV debería ser eficaz entre dosis de 10 ng a 1 µg/kg. Por este motivo el CLAV se probó a 100 ng/kg en estos estudios.

## Resultados

Hubo una diferencia significativa entre tratamientos ( $F_{(2,15)} = 21,45$ ,  $p < 0,001$ ) para la latencia para entrar en la oscuridad. La latencia para entrar en los brazos cerrados oscuros fue significativamente mayor para animales tratados con CLAV y CDP ( $p < 0,01$ ) con respecto al control de vehículo (Fig. 28A). También hubo una diferencia significativa entre tratamientos ( $F_{(2,15)} = 17,14$ ,  $p < 0,001$ ) para el tiempo pasado en la luz. El tiempo pasado expuesto a la luz en los brazos abiertos también fue significativamente mayor para los animales tratados con CLAV y CDP ( $p < 0,01$ ) con respecto al vehículo (Fig. 28A). No hubo diferencia significativa entre tratamientos para entradas en los brazos abiertos (Fig. 28B).

## Resumen

Estos datos muestran que el CLAV y el CDP tienen actividad ansiolítica similar en el laberinto en cruz elevado. Sin embargo, el CLAV tiene mayor potencia, siendo más eficaz a dosis 100.000 veces inferiores a CDP. Además, el CLAV no tiene la actividad depresiva motora sedante de los ansiolíticos de benzodiazepina convencionales. Los efectos ansiolíticos del CLAV son inmediatos y no requieren el desarrollo de tolerancia para darse cuenta de la eficacia del comportamiento. Sin embargo, un punto de aviso, las benzodiazepinas tienen otro efecto secundario no deseable para el que no hay desarrollo de tolerancia - amnesia (Shumsky y Lucki 1994). Por ejemplo, el diazepam (Valium®) afecta selectivamente la memoria y la atención a corto plazo mientras que evita la memoria a largo plazo (Liebowitz y col., 1987; Kumar y col., 1987). Por tanto, fue necesario probar CLAV para cualquier efecto adverso sobre el aprendizaje y la memoria.

### V. Ácido clavulánico y la memoria espacial en el laberinto de agua

El laberinto de agua de Morris se desarrolló para probar la memoria espacial (Morris, 1984). La piscina se divide en cuadrantes normalmente designados Norte, Sur, Este y Oeste. El agua en la piscina se hace opaca con leche en polvo. Escondida justamente debajo de la superficie en uno de los cuadrantes está una plataforma que sirve de ruta de escape para roedores colocados en la piscina. Un animal se coloca en algún sitio en la piscina de una variedad de diferentes puntos de partida y se cronometra para latencia para encontrar la plataforma, el tiempo en porcentaje pasado en cada cuadrante, la distancia recorrida y la velocidad de nado. Los animales no tienen señales visuales ni espaciales en la piscina y deben basarse en señales adicionales del laberinto, es decir, objetos fijados de la piscina que pueden ser observados por el animal que nada. Mediante una serie de ensayos una rata desarrolla "aprendizaje del sitio" o conocimiento sobre la posición de la plataforma basándose en las señales adicionales del laberinto. La plataforma puede moverse cada día a un cuadrante diferente combinando memoria espacial con memoria de trabajo. Este paradigma implica la extinción de la memoria anterior y la resolución de un nuevo problema espacial.

### 1. Navegación espacial

#### Procedimientos

El laberinto de agua consistió en una piscina circular de plástico negro de aproximadamente 150 cm de diámetro y 54 cm de altura llena hasta un nivel de 35 cm con agua hecha opaca con leche en polvo. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes con una plataforma 10 cm de diámetro sumergida 2 cm por debajo de la superficie en el cuadrante noroeste. El agua se mantuvo a una temperatura de 25°C. Alrededor de la piscina hubo varias señales visuales. Encima de la piscina hubo una cámara de vídeo para seguir el movimiento del animal experimental. La recogida de datos se automatizó completamente usando el software desarrollado por HVS Image (Hampton, RU). Antes de la prueba, las ratas se familiarizaron con la piscina y la plataforma colocada en el cuadrante noroeste. Cada día durante 4 días consecutivos, los animales se colocaron en la piscina en sitios aleatorios y se les dio dos min para encontrar la plataforma. Los animales se trataron una h antes de la prueba con 1,0  $\mu$ /kg CLAV ( $n=9$ ) o vehículo ( $n=9$ ). Tras estos ensayos de familiarización, los animales se probaron para *navegación espacial*. El primer día de la prueba empezó con la plataforma en el cuadrante noroeste esperado. Todo el comportamiento se grabó en vídeo durante un periodo de observación de dos min. Después de la prueba el animal se secó y se colocó de nuevo en su jaula hogar. En cada día posterior la plataforma se movió a un nuevo cuadrante y la rata empezó en posiciones diferentes. La rata siempre se colocó en la piscina orientada hacia la pared lateral. Las posiciones iniciales con respecto a la plataforma fueron diferentes para cada uno de los cuatro ensayos; sin embargo, la plataforma siempre estuvo en la misma posición relativa en cada cuadrante. Se posicionó 20 cm desde el lado de la piscina y en la esquina izquierda desde el centro orientado hacia ésta. La latencia para encontrar la plataforma escondida, la longitud de la trayectoria, la velocidad de nado y los tiempos por cuadrante entre animales tratados con CLAV y con vehículo se compararon con un ANOVA bilateral de medidas repetidas seguido de pruebas de Bonferroni a posteriori.

#### Resultados

No hubo efecto principal para el tratamiento con fármaco ( $F_{(1,16)} = 4,17$ ,  $p < 0,057$ ), días de prueba ( $F_{(3,48)} = 0,51$ ,  $p > 0,5$ ) o interacción entre factores ( $F_{(3,48)} = 1,92$ ,  $p > 0,1$ ) (Fig. 29) para latencia para encontrar la plataforma. Sin embargo, los animales tratados con CLAV mostraron latencias más cortas para encontrar la plataforma en los días 1 y 4 con una tendencia hacia la significancia.

La estrategia para encontrar la plataforma fue similar para ambos tratamientos (Figs. 30A y B) como se juzga por el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en cada cuadrante. Para cualquier cuadrante en cualquier día no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Hubo una diferencia significativa entre días para el porcentaje de tiempo pasado en cualquier cuadrante particular (por ejemplo, CLAV, cuadrante Norte,  $F_{(3,32)} = 38,81$ ,  $p < 0,0001$ ). Los animales pasaron una porción significativa de su tiempo en ciertos cuadrantes en ciertos días. Por ejemplo, en el día 1, tanto los animales con CLAV como con vehículo pasaron la mayoría de su tiempo en el cuadrante Norte con respecto a los otros cuadrantes ( $p < 0,01$ ). Esto era de esperar ya que tuvieron conocimiento de la localización de la plataforma en este cuadrante del procedimiento de familiarización.

Aunque la estrategia para encontrar la plataforma como se mide por el porcentaje de tiempo pasado en cada cuadrante fue similar entre CLAV y vehículo, hubo una diferencia pequeña, pero obvia. Los animales tratados con CLAV pasaron más tiempo en el cuadrante correcto que los animales tratados con vehículo. Esta diferencia es particularmente cierta en el día 2 cuando los animales con CLAV pasaron más del 50% ( $p < 0,01$ ) de su tiempo en el cuadrante correcto (Sur). Los animales con vehículo pasaron menos del 40% de su tiempo en el cuadrante correcto, un tiempo no significativamente diferente del de los otros cuadrantes. El día 4, tanto CLAV como vehículo pasaron la mayoría de su tiempo en el cuadrante correcto (Oeste). Esta estrategia en el día 4 muestra buena memoria espacial, de trabajo y de procedimiento para ambos tratamientos.

Hubo un efecto principal significativo para el tratamiento ( $F_{(1,16)} = 8,40$ ,  $p > 0,01$ ) sobre la longitud de la trayectoria para encontrar la plataforma. En el día 1, los animales tratados con CLAV ( $p < 0,05$ ) se desplazaron una distancia mucho más corta durante la búsqueda de la plataforma que los animales con vehículo (Fig. 31). No hubo diferencia significativa entre CLAV y vehículo en la velocidad de nado (Fig. 32).

## 2. Navegación con señales

### Procedimiento

Al día siguiente tras el último día (día 4) de la navegación espacial, los animales se probaron para *navegación con señales*. En estas pruebas, la plataforma se elevó sobre el nivel del agua. Una hora antes de la prueba animales se trataron con CLAV o vehículo de solución salina. Los mismos animales tratados con CLAV durante navegación espacial se trataron con CLAV para navegación con señales. Los animales se sometieron a una serie de ensayos de dos minutos con 45 minutos entre ensayos. En cada ensayo la plataforma se movió a un cuadrante diferente. El estudio de navegación con señales fue idéntico al de navegación espacial, excepto que la plataforma fue visible y la prueba se hizo durante cinco ensayos consecutivos hechos en un único día. Los animales se puntuaron para latencia para encontrar la plataforma, tiempo en porcentaje pasado en cada cuadrante, distancia de la trayectoria y velocidad de nado para todos los periodos de prueba.

### Resultados

No hubo efecto principal para el tratamientos ( $F_{(1,16)} = 0,553$ ,  $p > 0,1$ ), ensayos ( $F_{(4,64)} = 0,9745$ ,  $p > 0,1$ ) o interacción entre factores ( $F_{(4,64)} = 0,7433$ ,  $p > 0,5$ ) para latencia para encontrar la plataforma durante la navegación con señales (Fig. 33).

Como en la navegación espacial, la estrategia para encontrar la plataforma fue muy similar para ambos tratamientos (Figs. 34A y B) como se juzga por el porcentaje de tiempo que los animales pasaron en cada cuadrante. Para cualquier cuadrante en cualquier ensayo no hubo diferencia significativa entre tratamientos (por ejemplo, Ensayo 1, Norte,  $F_{(1,16)} = 0,099$ ,  $p > 0,5$ ). Hubo una diferencia significativa para el porcentaje de tiempo pasado en cualquier cuadrante particular para cualquier tratamiento para la mayoría de los ensayos, el más notable para CLAV.

La distancia recorrida para encontrar la plataforma no fue significativamente diferente entre los animales tratados con CLAV y con vehículo ( $F_{(1,16)} = 0,23$ ,  $p > 0,5$ ) (Fig. 35). Aunque no hubo efecto principal significativo para el tratamiento sobre la velocidad de nado ( $F_{(1,16)} = 0,926$ ,  $p > 0,1$ ), hubo un efecto de rastro significativo ( $F_{(4,64)} = 7,87$ ,  $p < 0,001$ ) e interacción entre factores ( $F_{(4,64)} = 2,56$ ,  $p < 0,05$ ). Ambos tratamientos, pero particularmente el CLAV, mostraron velocidades de nado reducidas por el ensayo 4 ( $p < 0,01$ ) y el ensayo 5 ( $p < 0,05$ ). Esto refleja probablemente el hecho de que supieran dónde buscar la plataforma como se muestra en las Figs. 34A y B.

### Resumen

Los animales tratados con ácido clavulánico no muestran ninguna pérdida en el aprendizaje y la memoria cuando se prueban para navegación espacial y con señales en el laberinto de agua de Morris. De hecho, en la distancia recorrida a la plataforma escondida y el porcentaje de tiempo pasado en el cuadrante correcto para tanto navegación espacial como con señales, los animales tratados con CLAV mostraron mejor rendimiento que el vehículo. Estos datos muestran que el perfil ansiolítico de CLAV no va acompañado de ningún trastorno en el aprendizaje y la memoria como es el caso con ansiolíticos de benzodiazepina.

## ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN

### VI. Ácido clavulánico y respuesta al estrés

#### Fundamento

5 La capacidad del CLAV para reducir la ansiedad en situaciones estresantes, es decir, la privación de comida y el entorno novedoso en el ensayo de búsqueda de pipas, y la exposición a la luz y a entorno novedoso en el laberinto en cruz elevado, sin alterar la actividad motora o la función cognitiva, es un hallazgo significativo. El potencial del CLAV como ansiolítico y terapéutico en el tratamiento de numerosos trastornos afectivos podría ampliarse si  
 10 tuviéramos un entendimiento más claro de su mecanismo de acción. Por ejemplo, ¿podría estar el CLAV alterando la ansiedad suprimiendo la respuesta al estrés natural? Los ansiolíticos de benzodiazepina comúnmente recetados bloquean tanto la liberación circadiana normal como la liberación mediada por el estrés de la hormona cortisol (Gram y Christensen, 1986; Petraglia y col., 1986; Hommer y col., 1986).

#### Protocolo experimental

15 El simple procedimiento de colocar un hámster macho adulto en un entorno novedoso durante 5 min produce un aumento predecible significativo en niveles en sangre de cortisol (Weinberg y Wong 1986). Esta novedosa prueba se usó para evaluar los efectos del CLAV sobre la liberación inducida por estrés de cortisol. Se trataron IP dos grupos de hámsteres macho con tanto CLAV (10 µg/kg, n=6) como vehículo de solución salina (n=4). Un tercer grupo (n=4) no recibió tratamiento ni estrés por aislamiento y sirvió de control para niveles basales de cortisol. Sesenta min  
 20 después del tratamiento, los animales se sacaron de su jaula hogar y se colocaron en una jaula novedosa durante 5 min. Los animales se sacrificaron después por decapitación y la sangre del tronco se recogió para el radioinmunoensayo de cortisol. Todos los animales se probaron bajo condiciones de luz:oscuridad inversas cuatro h en el ciclo oscuro. Los datos se compararon con un ANOVA unilateral seguido de pruebas de Fisher PLSD a posteriori.

#### Resultados

25 Hubo una diferencia significativa en la liberación por estrés de cortisol entre tratamientos ( $F_{(2,11)} = 10,03$   $p < 0,01$ ). El vehículo ( $p < 0,05$ ) y el CLAV ( $p < 0,01$ ) mostraron más de dos veces el nivel en sangre de cortisol con respecto al control sin estresar no tratado (Fig. 37).

#### Resumen

30 Los datos muestran que el ansiolítico de beta-lactama CLAV no tiene un efecto aparente sobre la liberación de cortisol en respuesta al leve estrés de exposición a un entorno novedoso. Este detalle, combinado con la ausencia de depresión motora y deterioro cognitivo hace que el CLAV sea único entre los ansiolíticos y sugiere un novedoso mecanismo de acción altamente específico. A primera vista podría pensarse que sería ventajoso suprimir la respuesta al estrés. De hecho, el hipercortisolismo participa en la patofisiología de la depresión (Sacher y col., 1973). El estrés psicosocial crónico que conduce a glándulas suprarrenales hiperactivas disfuncionales puede ser potencialmente mortal. Sin embargo, un eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal sensible es crítico para la fisiología y el  
 35 comportamiento normal. Estresantes que normalmente ayudarían a los animales a adaptarse al entorno pueden ser mortales sin la liberación apropiada de cortisol.

### VII. Agresión territorial u ofensiva

#### Fundamento

40 El continuar estudiando la actividad en el SNC del CLAV en modelos de comportamiento más complejos puede ayudar a aclarar su(s) mecanismo(s) de acción. Por ejemplo, las interacciones sociales antagonistas entre animales requieren evaluación del riesgo, comportamientos comunicativos y agonistas para zanjar disputas por el territorio, parejas, comida, etc. Los neurotransmisores serotonina y vasopresina son fundamentales en la organización del SNC y la expresión de estos comportamientos en animales y seres humanos (Ferris y col., 1997; Coccaro y col., 1998; Ferris 2000). Para este fin, el CLAV se probó para los efectos sobre la agresión territorial u ofensiva, es decir,  
 45 defensa de la madriguera hogar contra intrusos.

El comportamiento agonista puede clasificarse tanto como agresión ofensiva como defensiva (Blanchard y Blanchard, 1977; Adams, 19798; Albert y Walsh, 1984). La agresión ofensiva se caracteriza por un agresor que inicia un ataque sobre un oponente, mientras que la agresión defensiva carece de enfoque activo. Ambos tipos de agresión tienen sus propios sistemas de neucomportamiento únicos. Los estímulos que provocan el ataque ofensivo y de defensa son diferentes, ya que son las secuencias de comportamientos que acompañan a cada respuesta agonista. Mientras que muchos de los datos empíricos que apoyan la idea de redes neurales ofensivas y defensivas  
 50 únicas se han recogido de modelos animales, hay similitudes interesantes y convincentes en la agresión humana que sugieren una organización neural similar (Blanchard, 1984). La agresión ofensiva se estudia fácilmente usando hámsteres dorados macho probados en un paradigma de residente/intruso, un modelo establecido de agresión ofensiva (Ferris y Potegal 1988) en el contexto de defender la madriguera hogar. Situando un hámster macho  
 55

extraño en la jaula hogar de otro hámster macho se provoca una secuencia bien definida de comportamientos agonistas del residente que incluye agresión ofensiva.

### Protocolo experimental

5 Los hámsteres son nocturnos y como tales todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante las cuatro primeras horas de la fase de oscuridad bajo iluminación roja tenue. El residente se puntuó para agresión ofensiva, por ejemplo, latencia para morder al intruso, el número total de mordiscos, tiempo de contacto total con el intruso y el marcaje de ijadas durante un periodo de prueba de 10 min (Ferris y Potegal, 1988). El marcaje de ijadas es una forma comunicación olfativa en la que un hámster arquea su lomo y frota las glándulas de la ijada productoras de feromonas contra objetos en el entorno (Johnson, 1986). La frecuencia del marcaje de ijadas está enormemente  
10 potenciada durante encuentros agresivos y es particularmente fuerte en animales dominantes que inician y ganan peleas (Ferris y col., 1987).

A cinco hámsteres macho dorados (130 -140 g) se les administraron inyecciones IP de CLAV (200 µg/kg) y vehículo de solución salina en un volumen de aproximadamente 0,2 ml. En estudios piloto se descubrió que el CLAV administrado IP a 1,0 µg/kg no tuvo efecto sobre el comportamiento agresivo. Por tanto, fue necesario probar CLAV a una mayor concentración, pero en un intervalo de dosis que todavía fue aceptable para estudios farmacéuticos en el comportamiento agresivo. Los tratamientos con vehículo y CLAV se compensaron y se aleatorizaron de manera que los cinco animales recibieran cada tratamiento separado por al menos 48 h. Los animales se probaron 90 min después del tratamiento durante un periodo de observación de 10 min. Las latencias y el tiempo de contacto se analizaron con un ANOVA bilateral. Los datos no paramétricos, es decir, el número de mordiscos y las marcas de las ijadas se analizaron por la prueba de Wilcoxon con signo de pares emparejados.

### Resultados

Aunque no hubo efecto principal significativo para el tratamiento con fármaco ( $F_{(1,3)} = 7,40$ ,  $P < 0,07$ ) para la latencia para morder al intruso, hubo una tendencia hacia la significancia (Fig. 38). No hubo efecto principal significativo para tratamiento con fármaco ( $F_{(1,3)} = 2,85$ ,  $p > 0,1$ ) en el tiempo de contacto con el intruso (Fig. 38). Hubo una diferencia significativa entre tratamiento con fármacos ( $T = 3,0$ ,  $p < 0,05$ ,  $N=8$ ) y el número de mordiscos en el intruso. El tratamiento con CLAV redujo la mediana del número de mordiscos a seis con respecto a trece para los animales tratados con vehículo (Fig. 39). No hubo efecto significativo del tratamiento con fármaco ( $T = 4,0$ ,  $p > 0,1$ ,  $N=5$ ) en el comportamiento de marcaje de ijadas del residente (Fig. 39).

### Resumen

30 El ácido clavulánico tiene modestas propiedades antiagresivas o similares a serénicos. Los serénicos son fármacos usados para tratar impulsividad y violencia (Olivier y Mos, 1991). Los serénicos deberían suprimir la agresión ofensiva sin interferir con comportamientos sociales, de apetencia y cognitivos. El interés social en un intruso, es decir, el tiempo de contacto, no se altera por CLAV. El desarrollo de eltoprazina, uno de los primeros serénicos, se abandonó en parte debido a que se encontró que aumentaba el miedo y la ansiedad en animales (Olivier y col.,  
35 1994). La potente actividad ansiolítica de CLAV excluye esta posibilidad.

### VIII. Interacciones con glutamil-carboxipeptidasa

El CLAV tiene una afinidad de unión muy alta por las beta-lactamasas. Se plantea como hipótesis la presencia de homologías de mamífero con estas enzimas bacterianas y que estas proteínas homólogas participen en la regulación de niveles de neurotransmisores en el SNC. La TEM beta-lactamasa de *E. coli* se ha secuenciado  
40 clonada y se cristalizó para determinar los motivos de sitio activo. Los cuatro sitios de unión putativos sobre la beta-lactamasa que podrían acomodar al CLAV se designan sitio activo I, II, III y IV. Estos sitios activos, la localización de secuencias y las secuencias de aminoácidos (AA) son del siguiente modo:

#### Sitio activo I:

35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK

#### 45 Sitio activo II:

57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN

#### Sitio activo III:

III AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG

#### Sitio activo IV:

50 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD

Cribado para las homologías de secuencias de aminoácidos entre estos sitios de unión a beta-lactamasa y enzimas

de mamífero. Los científicos de Revaax identificaron un sistema de enzimas en el cerebro al que el CLAV se uniría posiblemente de un modo similar a beta-lactamasa. La enzima glutamil-carboxipeptidasa (N-acetilo, ligada en alfa, dipeptidasa ácida) o NAALADasa (Pangalos y col., 1999) es responsable de la regulación de las rutas de neurotransmisión glutamatérgica cuyos efectos se expresarían en tales resultados de comportamiento como agresión, memoria/cognición y ansiedad. Como resultado del solapamiento casi perfecto de los sitios activos putativos de beta-lactamasa y las secuencias conservadas en NAALADasa humana y de rata se planteó la hipótesis de que el CLAV afectaba el comportamiento inhibiendo la actividad de NAALADasa. A continuación se muestra la similitud de secuencias de solapamiento entre beta-lactamasa y NAALADasa:

**Sitio activo I:**

Beta-lactamasa: 35 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STTK  
 NAALADasa: 38 AA en la dirección 3' a partir del extremo N: STQK

**Sitio activo II:**

Beta-lactamasa: 57 AA en la dirección 3' a partir del motivo STTK: SGC, SGN o SAN  
 NAALADasa: 59 AA en la dirección 3' a partir del motivo STQK: SFG

**Sitio activo III:**

Beta-lactamasa: 111 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: KTG  
 NAALADasa: 110 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: KLG

**Sitio activo IV:**

Beta-lactamasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SGC: ENKD  
 NAALADasa: 41 AA en la dirección 3' a partir del motivo SFG: ERGV

El ácido clavulánico inhibe enzimas beta-lactamasa gram-negativas en el intervalo de 15-34 nM. El CLAV es eficaz a una dosis de 10 ng/kg en el modelo de ansiedad de búsqueda de pipas (pg 3). Si la NAALADasa fuera el homólogo humano para beta-lactamasa, entonces se predeciría que el CLAV sería un sustrato de alta afinidad.

IX. Búsqueda de pipas tras el bloqueo de la actividad de NAALADasa

**25 Fundamento y procedimiento experimental**

Se planteó la hipótesis de que el CLAV funcionara de ansiolítico en el ensayo de búsqueda de pipas bloqueando la actividad de NAALADasa en el cerebro. Si esta idea fuese verdadera, entonces se predeciría que los fármacos conocidos por bloquear la NAALADasa también potenciarían la búsqueda de pipas. Para este fin, los animales se trataron con ácido N-acetil-beta-aspartil-glutámico (beta-NAAG), un inhibidor competitivo de la NAALADasa (Serval y col., 1992), y se probaron en el modelo de ansiedad de búsqueda de pipas. El estudio fue similar al explicado resumidamente en la sección I con una excepción notable. Como la beta-NAAG no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, tuvo que inyectarse directamente en el ventrículo lateral en el que podría ser transportado por el líquido cefalorraquídeo a través del cerebro por el sistema ventricular. La beta-NAAG (FW 304) se administró en una dosis de 3 ng en un volumen de 1 µl de solución salina ICV. El cerebro de hámster adulto promedio pesa aproximadamente 1,2 g de los que el 22% es líquido extracelular. La concentración de beta-NAAG estimada fue 11 ng/ml o 36 nM.

Dos grupos de seis animales cada uno ayunaron durante la noche como se describe previamente y se probaron al siguiente día. Un grupo se trató con beta-NAAG y el otro con vehículo de solución salina y una h después se cronometró la latencia para buscar las pipas de girasol escondidas. Para las comparaciones estadísticas se usó una prueba de la t de Student para datos independientes.

**Resultados**

La diferencia en latencia para encontrar las pipas fue significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente entre tratamientos (Fig. 40). De hecho, ninguno de los seis animales microinyectados con vehículo de solución salina encontró las pipas en el periodo de observación de cinco min. Sin embargo, tres días después, cuando estos mismos animales se microinyectaron con beta-NAAG (3 ng/µl) y se probaron para la búsqueda de pipas, mostraron una latencia media de  $21,8 \pm 9,7$  s.

**Resumen**

Los datos muestran que la beta-NAAG, un inhibidor de NAALADasa específico, puede reducir espectacularmente la latencia para buscar pipas de girasol escondidas, una actividad biológica compartida por CLAV. Como la beta-NAAG

5 fue activa en el modelo de ansiedad de búsqueda de pipas, entonces no se rechaza la hipótesis de que la beta-NAAG y el CLAV compartan un mecanismo de acción común. A partir de estos datos la hipótesis puede expandirse para predecir que la beta-NAAG y el CLAV muestran efectos similares sobre un intervalo de medidas biológicas y del comportamiento. Para este fin, los animales se probaron para agresión ofensiva en el paradigma de intruso residente como se describe en la sección VII. Como se informa antes, cuando se administra en altas concentraciones, el CLAV sólo tiene un modesto efecto sobre la ofensiva. Aunque el CLAV puede potenciar la búsqueda de pipas a una dosis de 10 ng/kg, sólo tiene un modesto efecto sobre la agresión ofensiva incluso con dosis de hasta 200 µg/kg. Si la beta-NAAG y el CLAV comparten un mecanismo común, entonces la beta-NAAG debería tener poco o ningún efecto sobre la agresión.

10 X Efecto del bloqueo de NAALADasa sobre la agresión ofensiva

**Procedimiento experimental**

15 Los animales probados en este estudio fueron los usados en la sección IX. Después del ensayo de búsqueda de pipas, los animales tratados con beta-NAAG (n=6) y el vehículo de solución salina (n=6) siguieron en su jaula hogar y se les presentó un intruso macho más pequeño. El residente se puntuó para latencia para morder, mordiscos, tiempo de contacto y marcaje de ijadas durante un periodo de observación de 10 min. La latencia para morder y el tiempo de contacto entre tratamientos se compararon con pruebas de la t de Student. Las medidas no paramétricas de mordiscos y marcas de las ijadas para beta-NAAG frente al vehículo se compararon con Mann-Whitney.

**Resultados**

20 No hubo diferencias significativas entre animales tratados con beta-NAAG y con vehículo para ninguna medida de agresión ofensiva (Figs. 41 y 42).

**Resumen**

25 El bloquear la actividad de NAALADasa con beta-NAAG no altera la agresión ofensiva como se prueba en el paradigma de intruso residente. Este hallazgo es coherente con la idea de que el CLAV y la beta-NAAG comparten un mecanismo común – el bloqueo de la actividad de NAALADasa.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Revaax Pharmaceuticals, LLC

Gary, Koppel A.

<120> Composición neuroterapéutica y procedimiento

5 <130> 00290/EP

<150> EP00959244.5-2112

<151> 16/08/2000

<150> US 60/194.534

<151> 04/04/2000

10 <150> US 60/176.570

<151> 18/01/2000

<150> US 60/172.452

<151> 17/12/1999

<150> US 60/149.115

15 <151> 16/08/1999

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Thr Thr Lys  
1

<210> 2

25 <211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Asn Lys Asp  
1

30 <210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 370 260 T3

Ser Thr Gln Lys  
1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Arg Gly Val  
1

<210> 5

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Ser Arg Lys  
1

<210> 6

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Arg Ser Ile  
1

20

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de  $\beta$ -lactama seleccionado de:
  - i) ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
  - ii) moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma,

para su uso en el tratamiento de un paciente en necesidad de alivio de un trastorno seleccionado de ansiedad, depresión, demencia, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
2. El compuesto de  $\beta$ -lactama para su uso como en la reivindicación 1, en el que el trastorno es ansiedad.
3. El compuesto de  $\beta$ -lactama para su uso como en la reivindicación 2, en el que la ansiedad es trastorno de ansiedad, trastorno de pánico con agorafobia, trastorno de pánico sin agorafobia, agorafobia sin antecedentes de trastornos de pánico, fobia social, fobia simple, trastorno orgánico de ansiedad, trastorno de ansiedad por sustancias psicoactivas, trastorno de ansiedad por separación, trastorno de evitación de la infancia o adolescencia, o trastorno de hiperansiedad.
4. El compuesto para su uso como en la reivindicación 1, en el que el trastorno es depresión.
5. El compuesto para su uso como en la reivindicación 4, en el que la depresión es depresión mayor o depresión psicótica.
6. El compuesto para su uso como en la reivindicación 1, en el que el trastorno es demencia.
7. El compuesto para su uso como en la reivindicación 6, en el que la demencia es demencia presenil, demencia senil, demencia multi-infarto, demencia por alcohol, demencia por sustancias psicoactivas o demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer.
8. El compuesto para su uso como en la reivindicación 1, en el que el trastorno es enfermedad de Alzheimer.
9. El compuesto para su uso como en la reivindicación 1, en el que el trastorno es enfermedad de Parkinson.
10. El compuesto para su uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto de  $\beta$ -lactama es moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma.
11. El compuesto para su uso como en la reivindicación 10, en el que se administra menos de una cantidad antibióticamente eficaz de moxalactama.
12. El compuesto para su uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto de  $\beta$ -lactama es ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
13. Una formulación farmacéutica para su uso para tratar ansiedad, depresión, demencia, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson en un paciente humano en necesidad de alivio de la misma, en la que la formulación comprende un compuesto de  $\beta$ -lactama seleccionado de:
  - i) ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
  - ii) moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma.
14. La formulación farmacéutica para su uso como en la reivindicación 13, en la que la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica oral.
15. La formulación farmacéutica para su uso como en la reivindicación 13 ó 14, en la que el compuesto de  $\beta$ -lactama es moxalactama o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o una forma de éster activo de la misma.
16. La formulación farmacéutica para su uso como en la reivindicación 13, en la que el compuesto de  $\beta$ -lactama carece sustancialmente de actividad antibiótica.
17. La formulación farmacéutica para su uso como en la reivindicación 13 ó 14, en la que el compuesto de  $\beta$ -lactama es ácido clavulánico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
18. La formulación farmacéutica para su uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en la que la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica de liberación prolongada.
19. La formulación farmacéutica para su uso como en la reivindicación 13, en la que la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica parenteral.

EFFECTO DE ALTAS DOSIS DE MOXALACTAMA SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

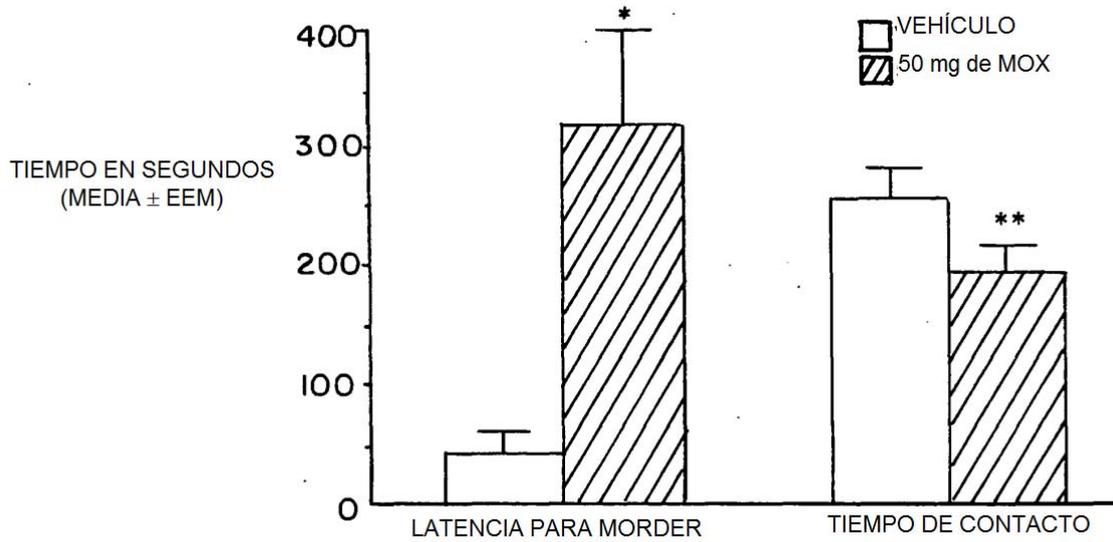


FIG. 1a

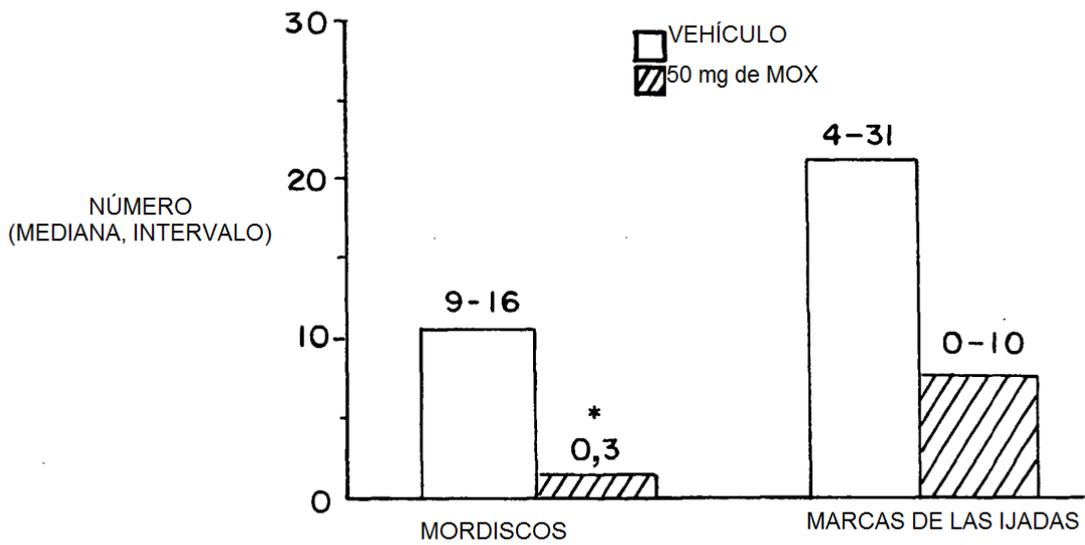


FIG. 1b

EFFECTOS DEPENDIENTES DE LA DOSIS DE MOXALACTAMA SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

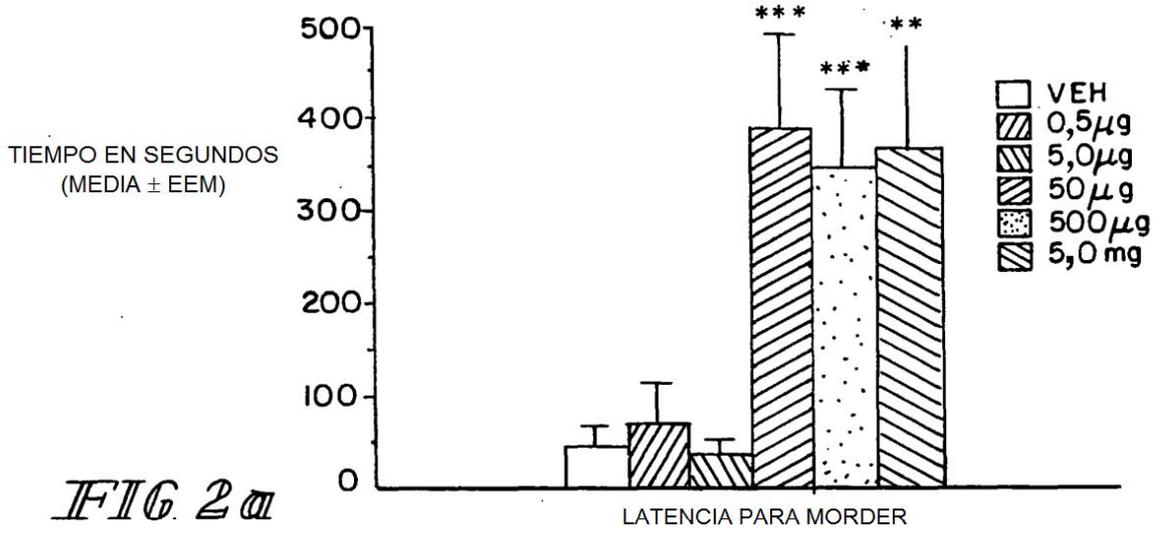


FIG 2a

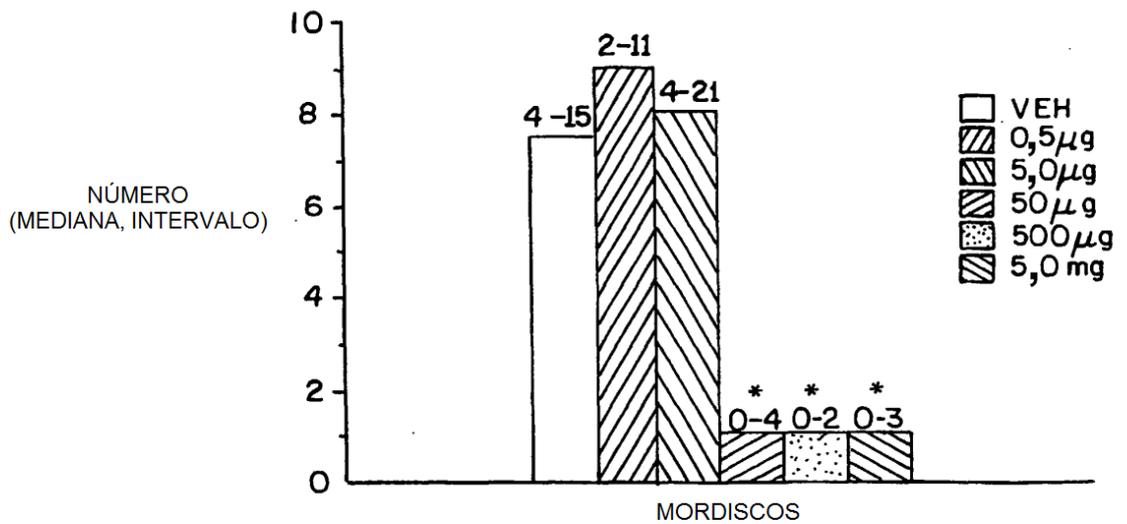


FIG 2b

EFFECTOS DEPENDIENTES DE LA DOSIS DE MOXALACTAMA  
SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

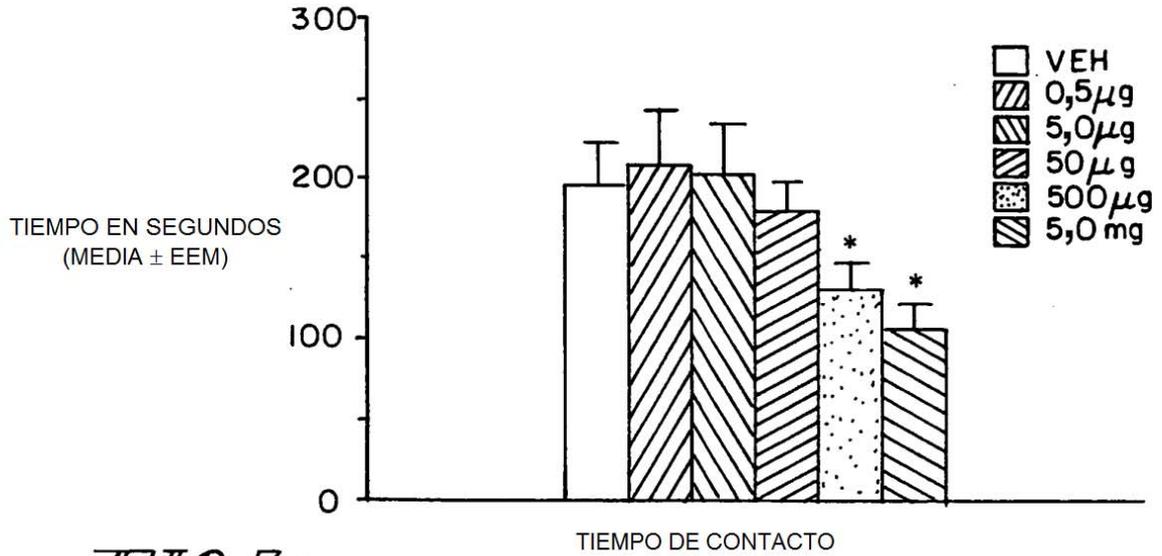


FIG. 3a

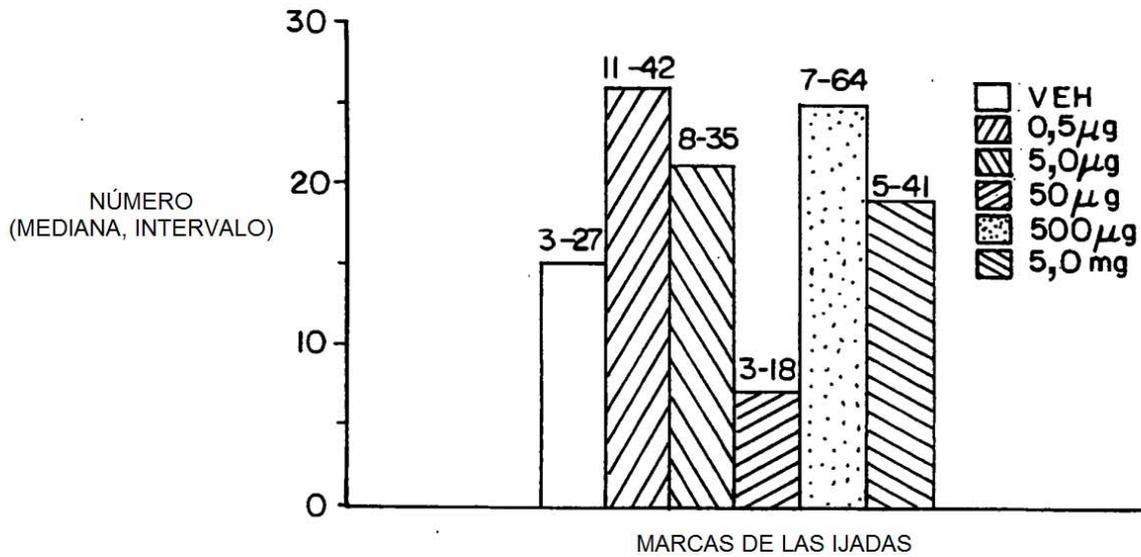


FIG. 3b

EFFECTO DE MOXALACTAMA SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

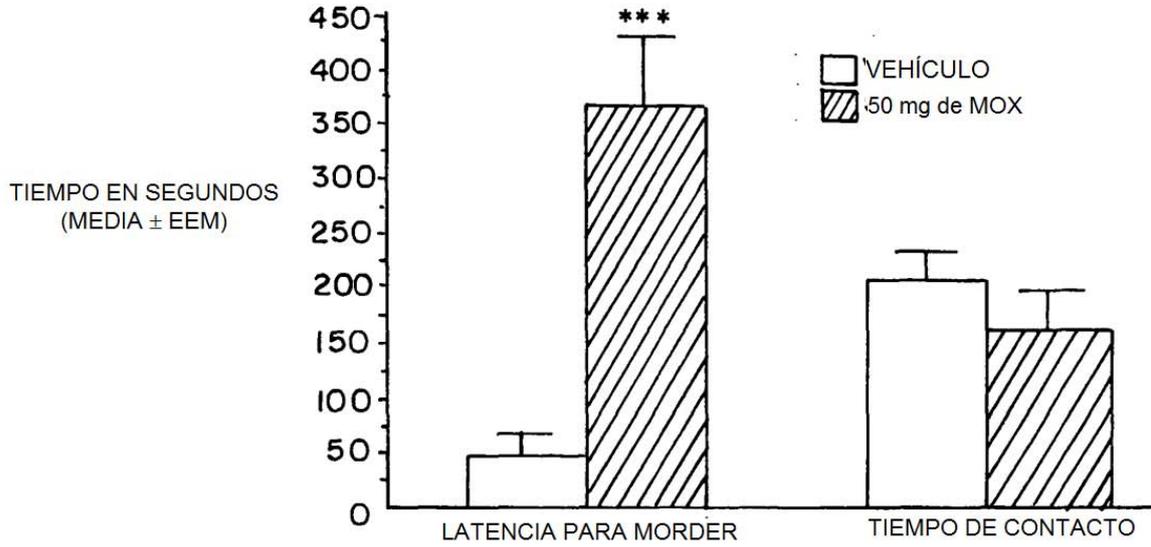


FIG. 4a

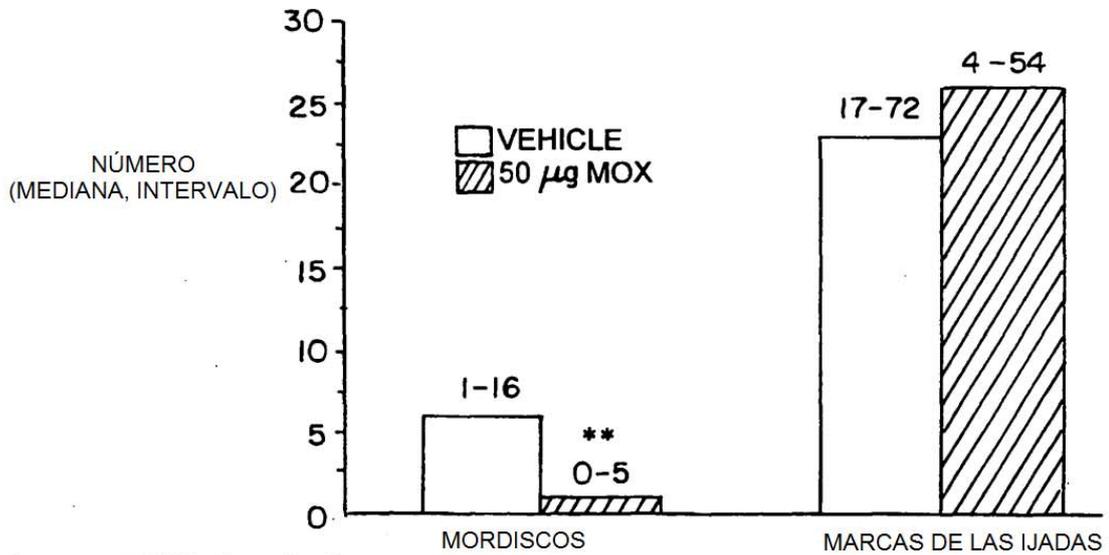
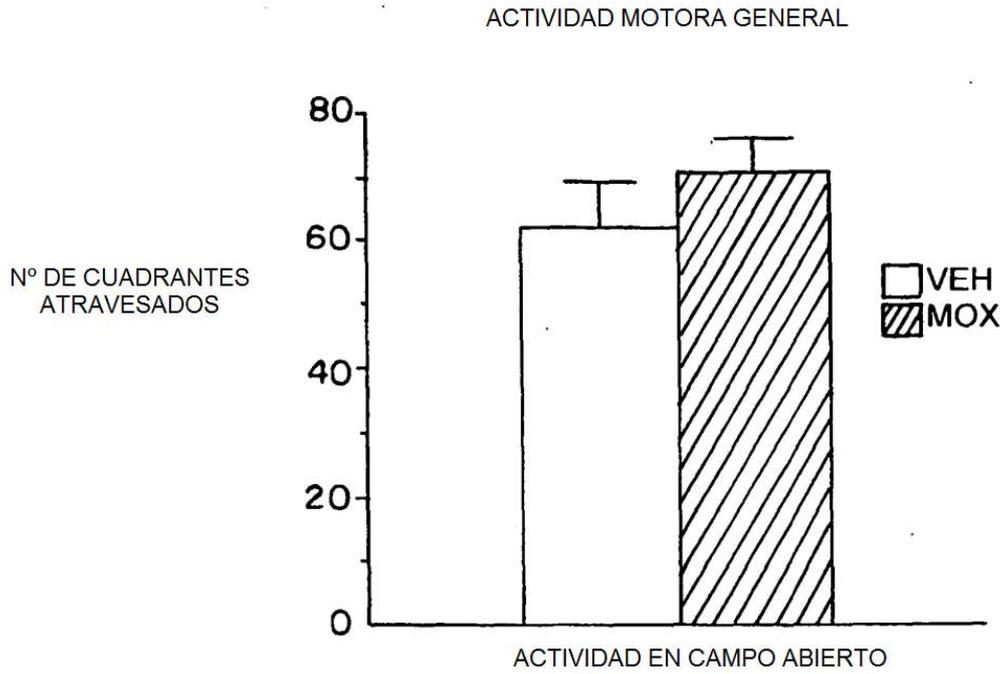
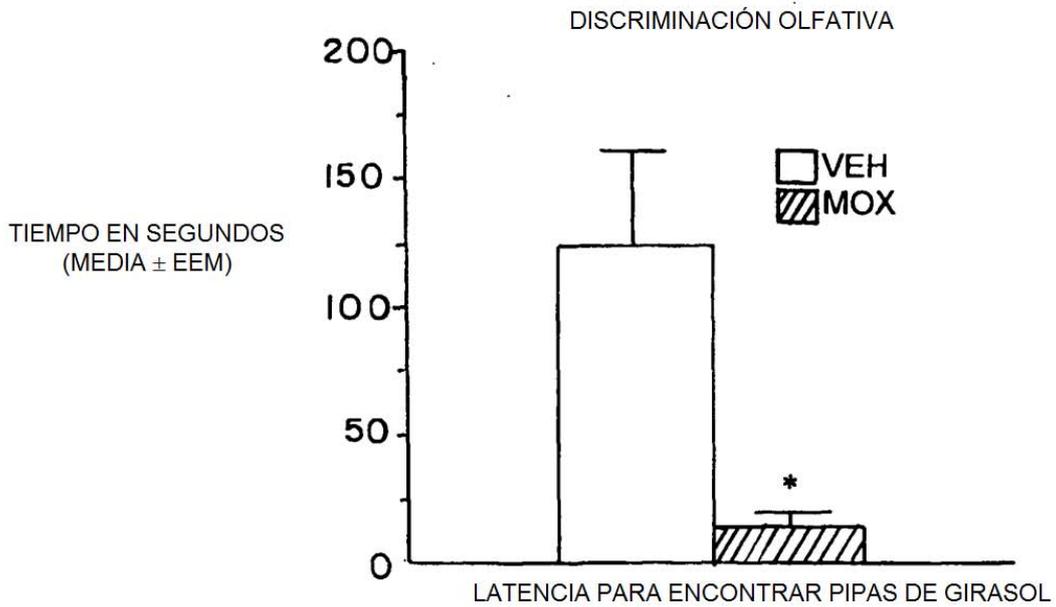


FIG. 4b



*FIG. 5a*



*FIG. 5b*

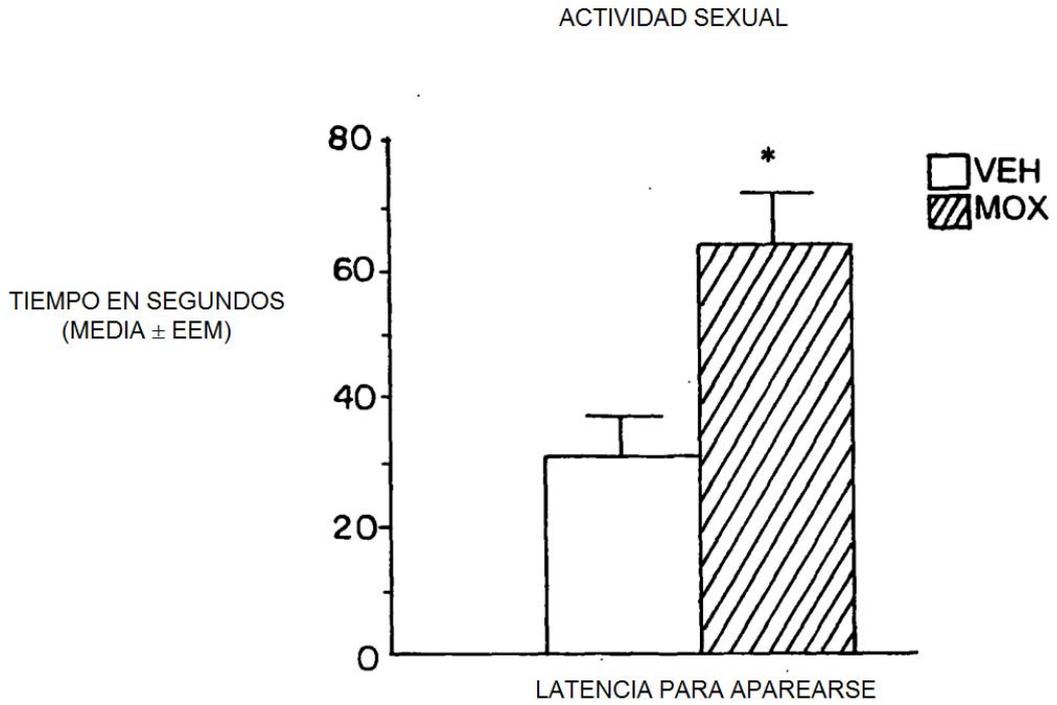


FIG. 6a

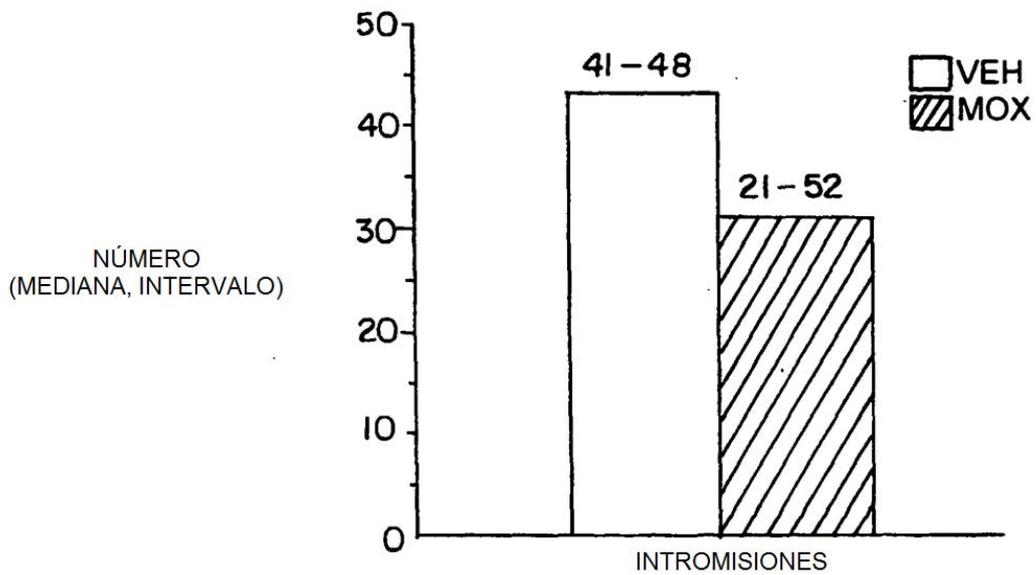


FIG. 6b

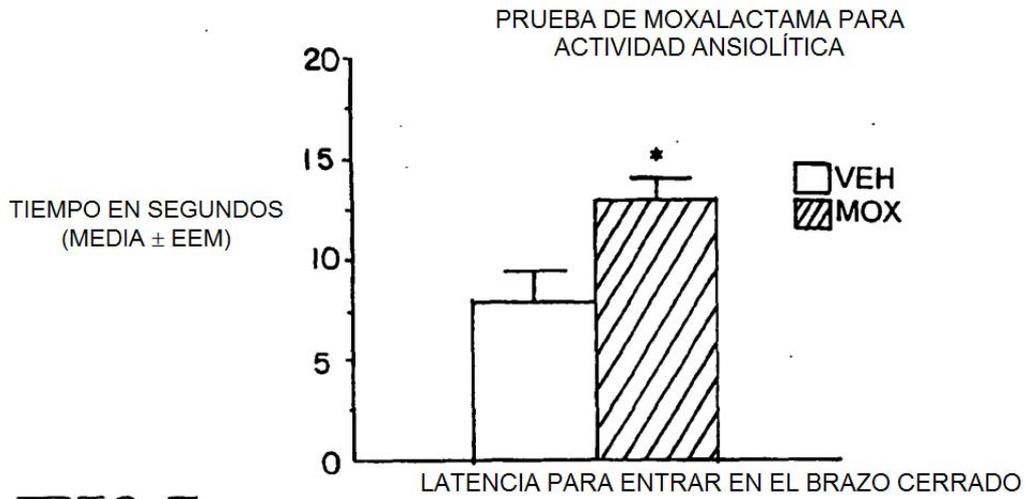


FIG. 7a

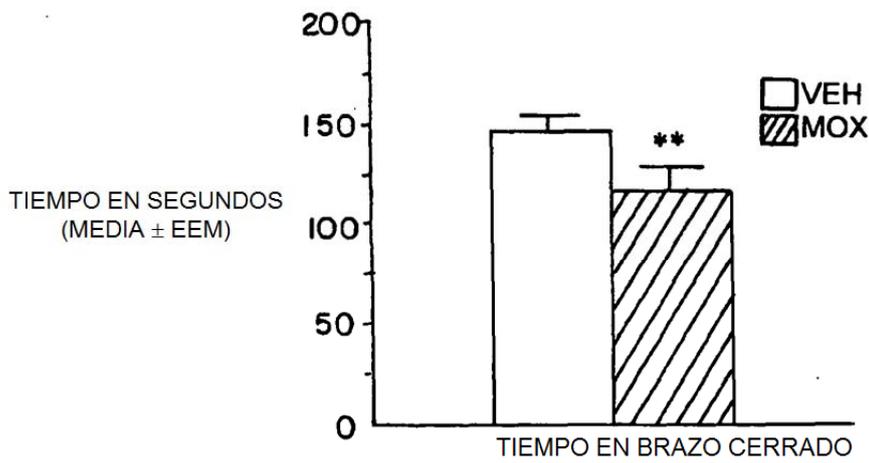


FIG. 7b

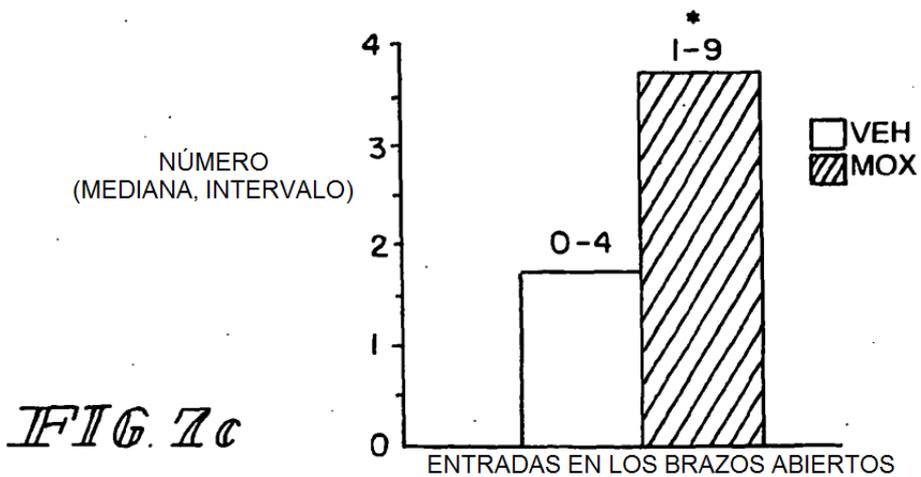
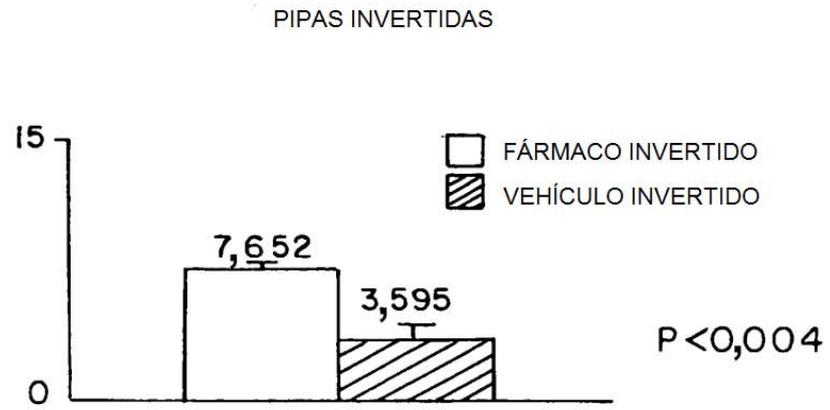
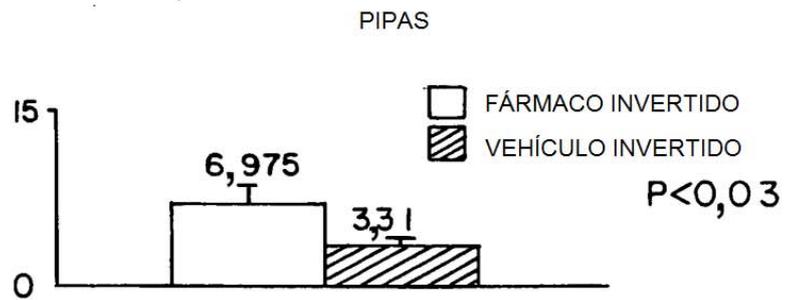


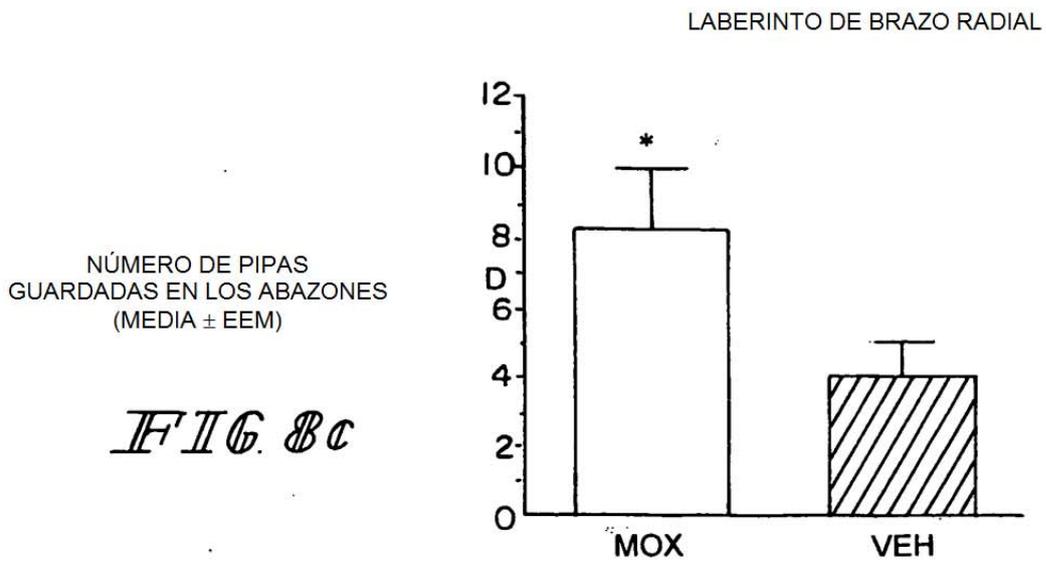
FIG. 7c



*FIG. 8a*



*FIG. 8b*



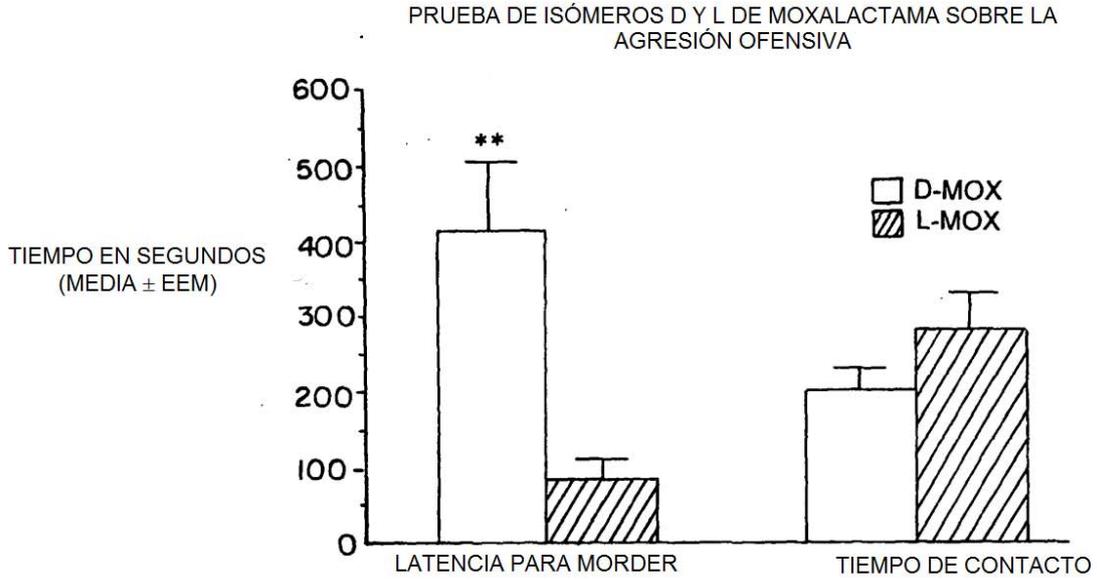


FIG 9a

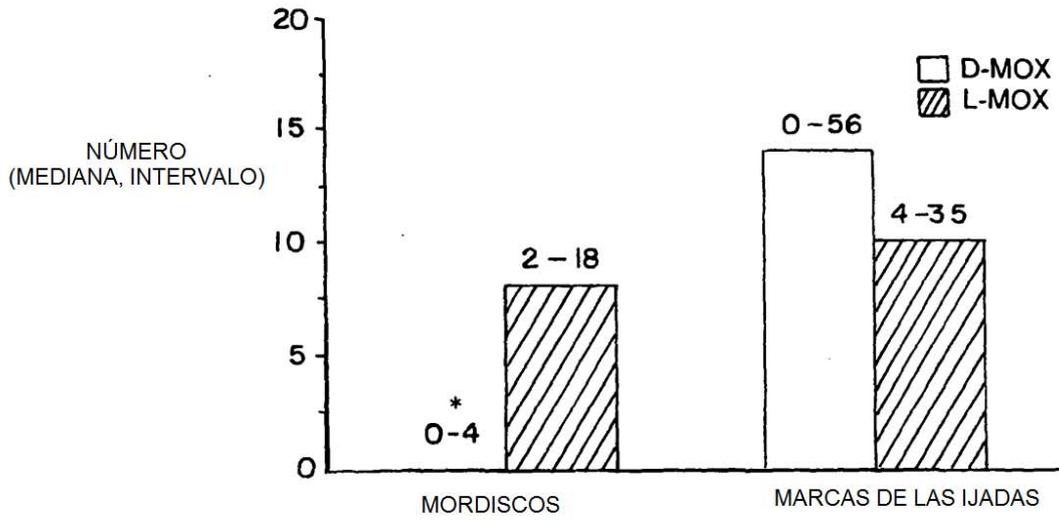


FIG. 9b

EFFECTO DE ANTIBIÓTICOS RELACIONADOS CON BETA-LACTAMA SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

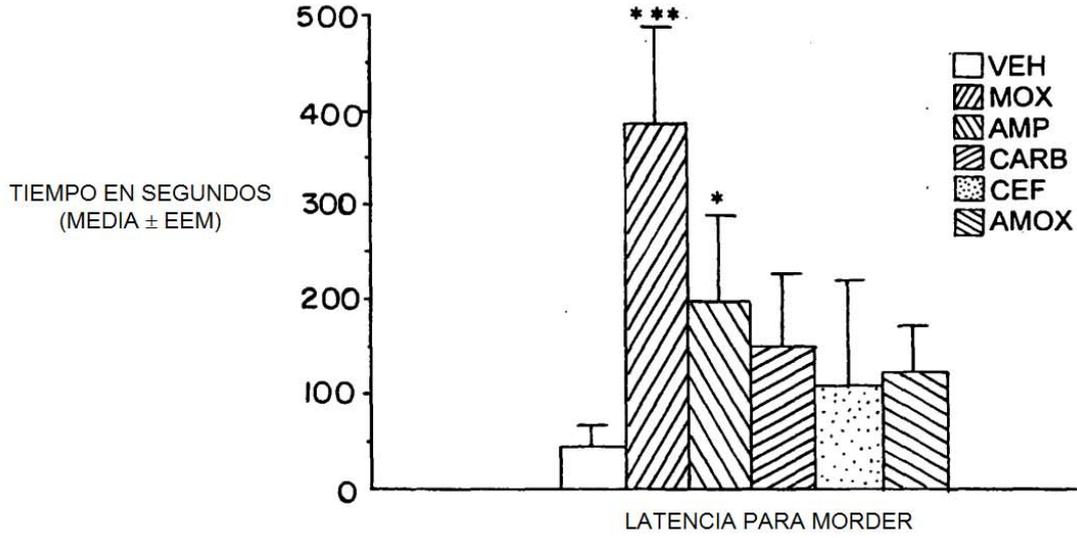


FIG. 10a

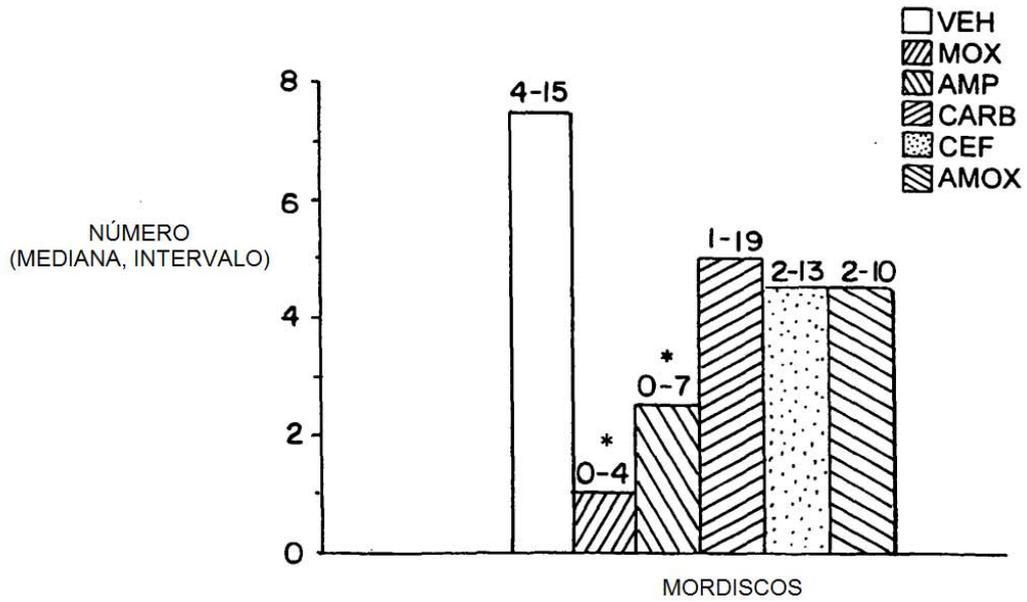


FIG. 10b

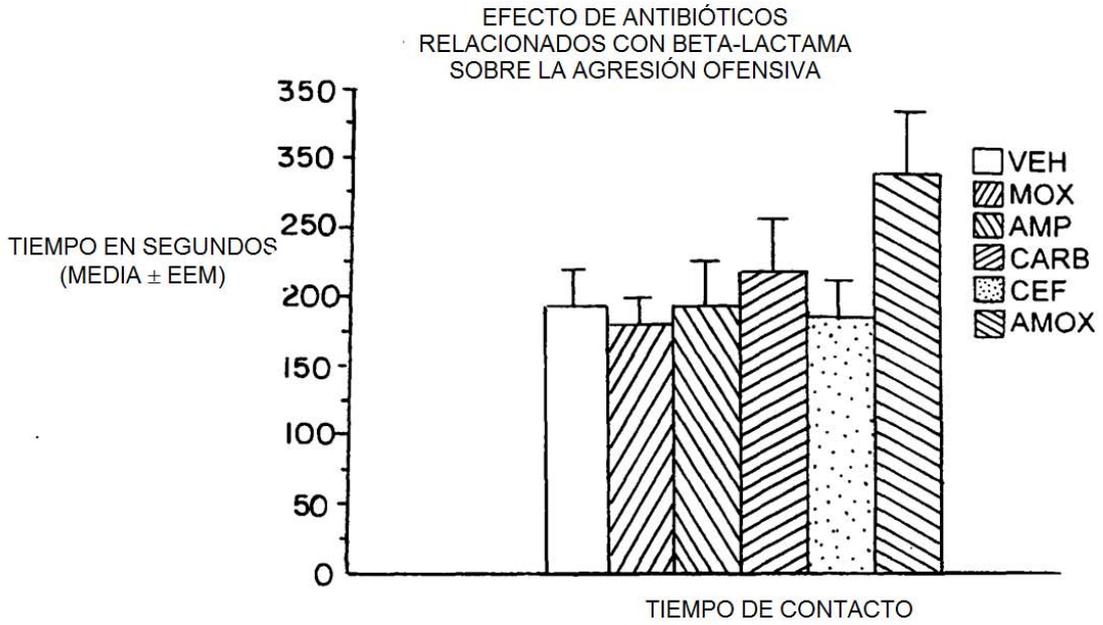


FIG. 11a

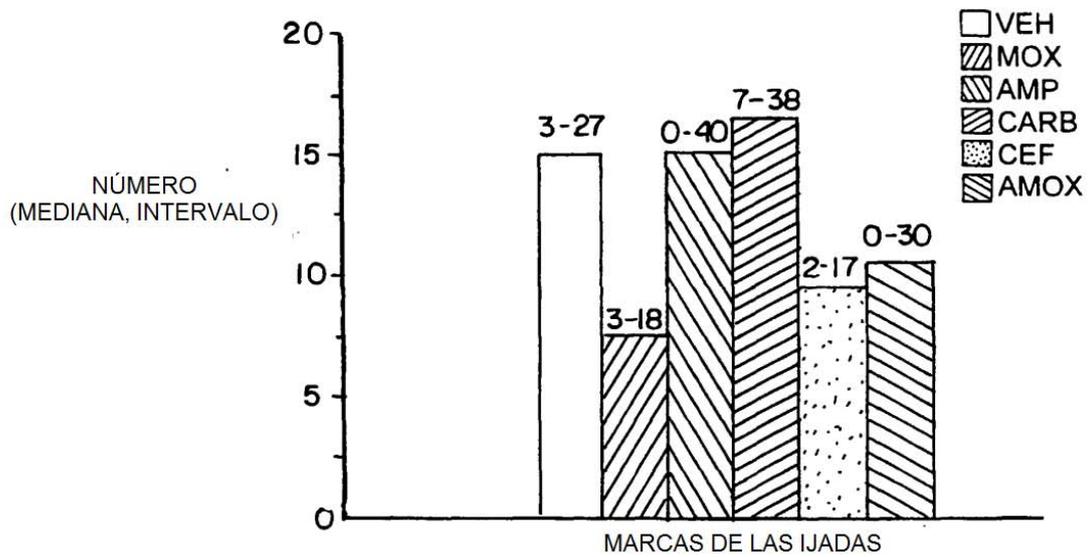


FIG. 11b

AFECTACIÓN DE LA AGRESIÓN OFENSIVA CON ANTIBIÓTICOS RELACIONADOS CON BETA-LACTAMA A ALTAS DOSIS

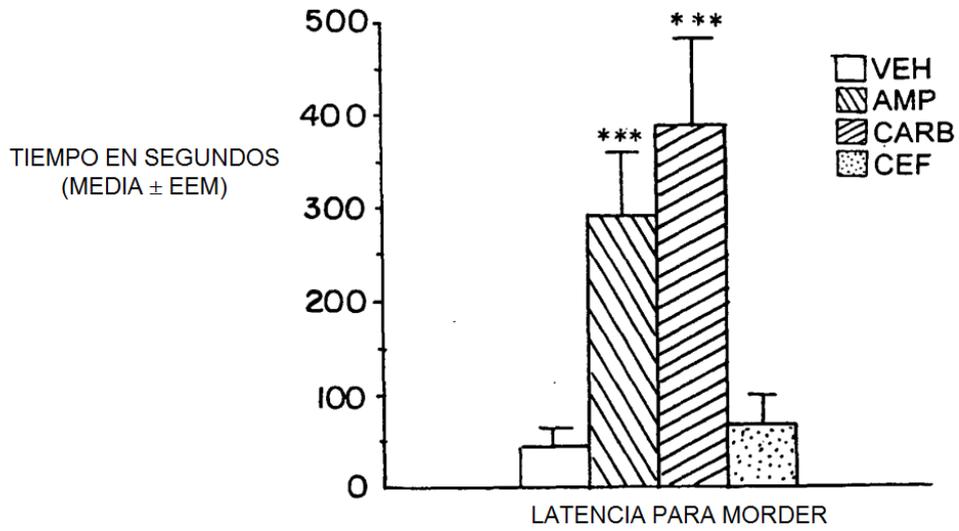


FIG. 12a

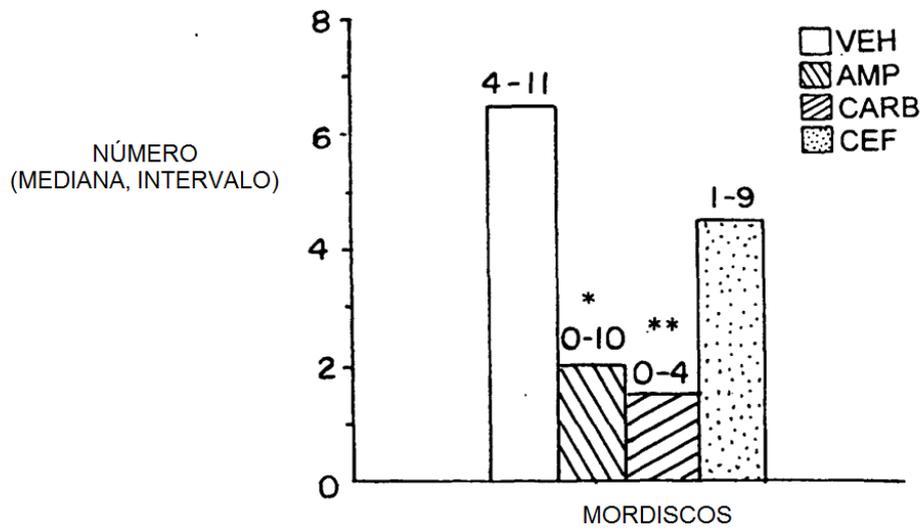


FIG. 12b

AFECCIÓN DE LA AGRESIÓN OFENSIVA CON ANTIBIÓTICOS  
RELACIONADOS CON BETA-LACTAMA A ALTAS DOSIS

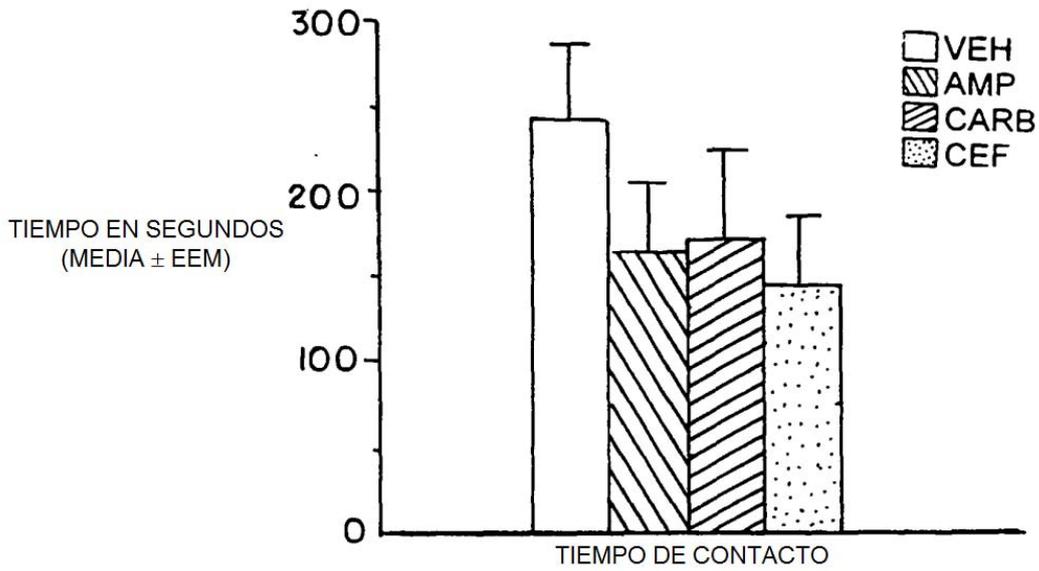


FIG. 13a

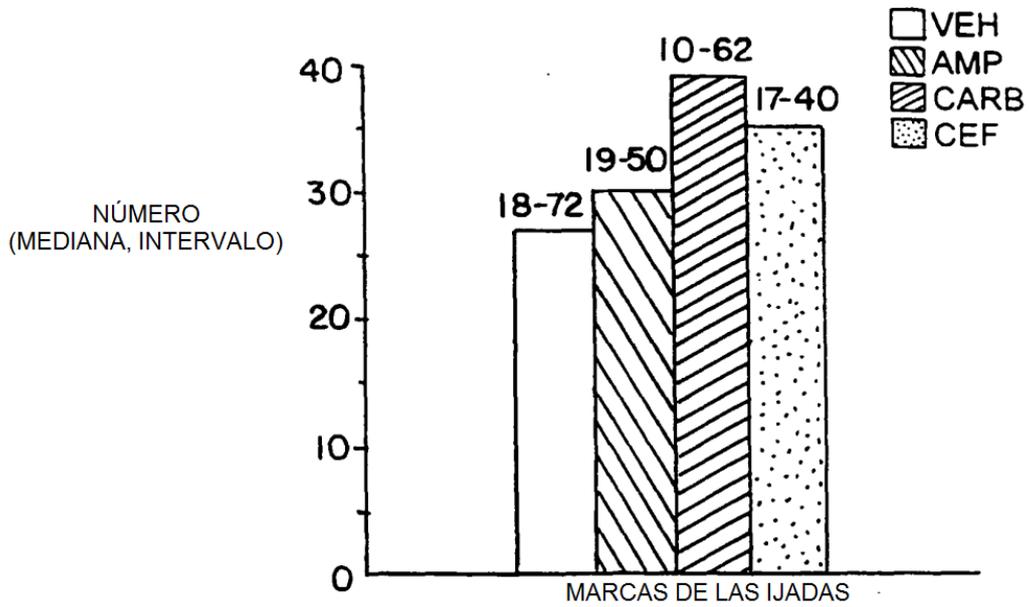


FIG. 13b

AMOXICILINA Y AGRESIÓN OFENSIVA

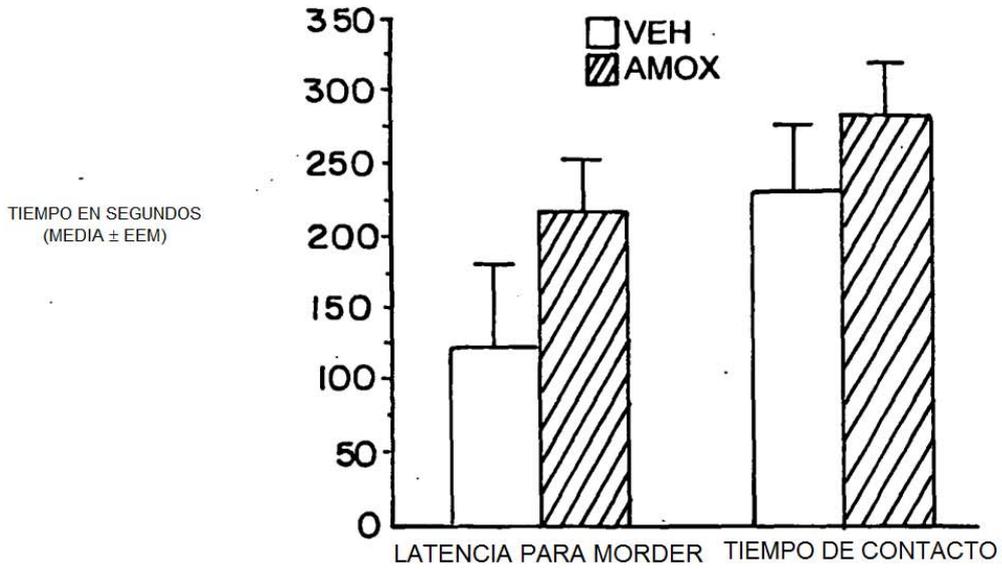


FIG. 14.a

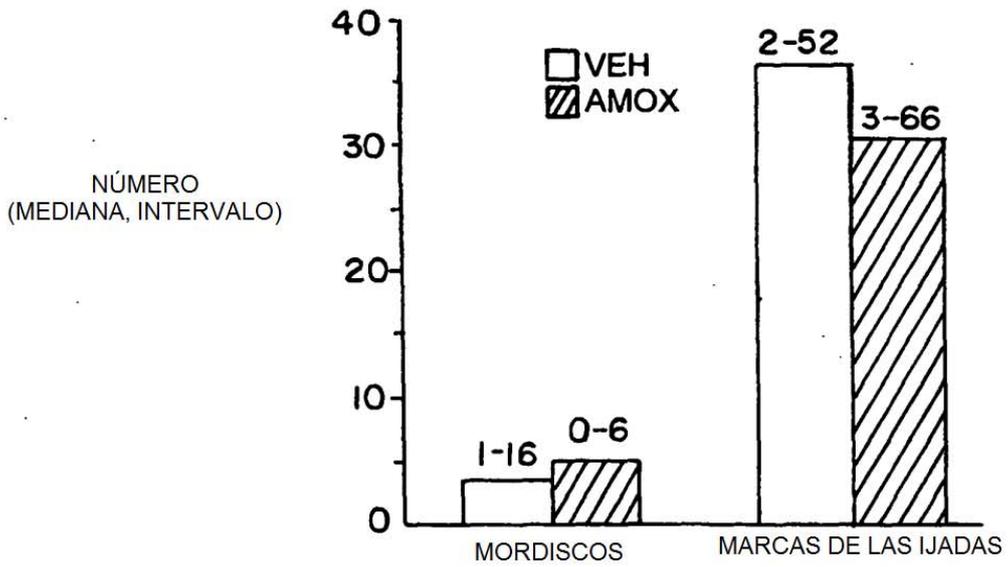
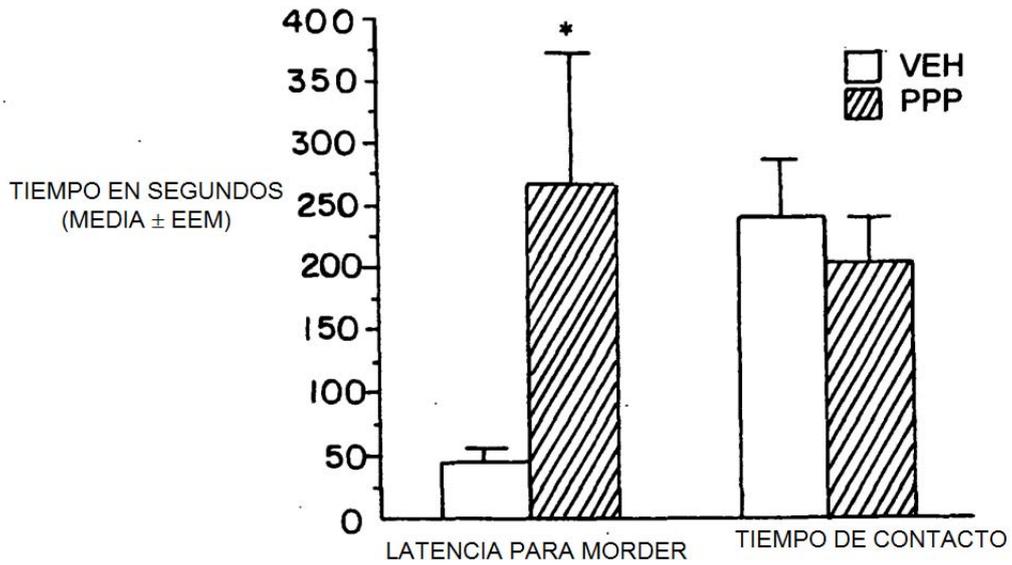
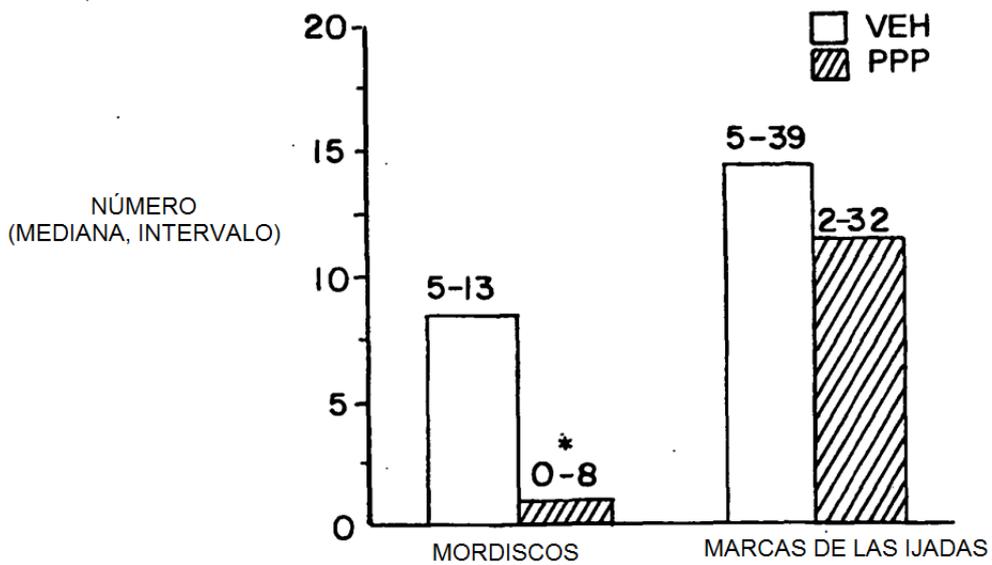


FIG. 14.b

EFFECTO DE PROTEÍNA PRECURSORA DEL PEPTIDOGLICANO  
SOBRE LA AGRESIÓN OFENSIVA

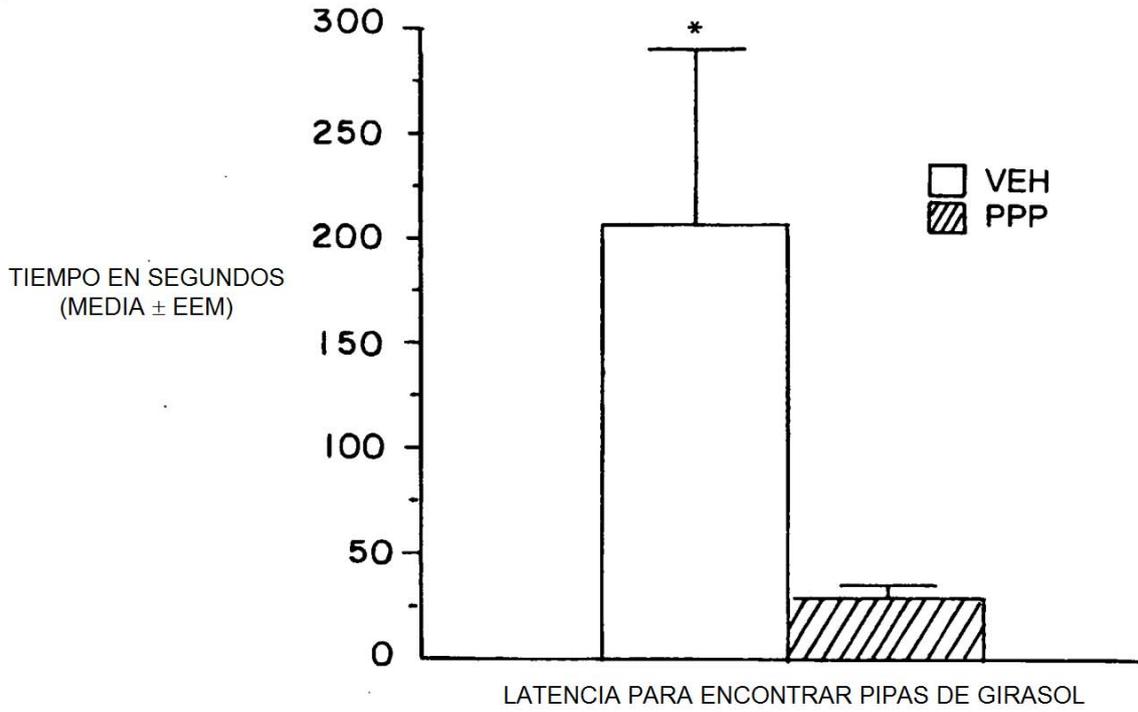


*FIG. 15a*



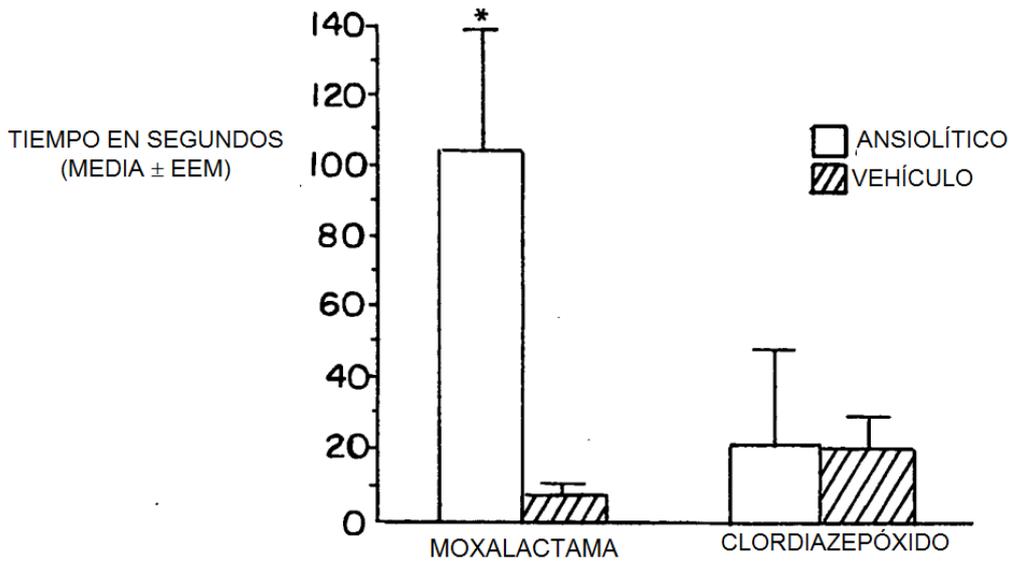
*FIG. 15b*

EFFECTO DE PROTEÍNA PRECURSORA DEL PEPTIDOGLICANO SOBRE LA DISCRIMINACIÓN OLFATIVA

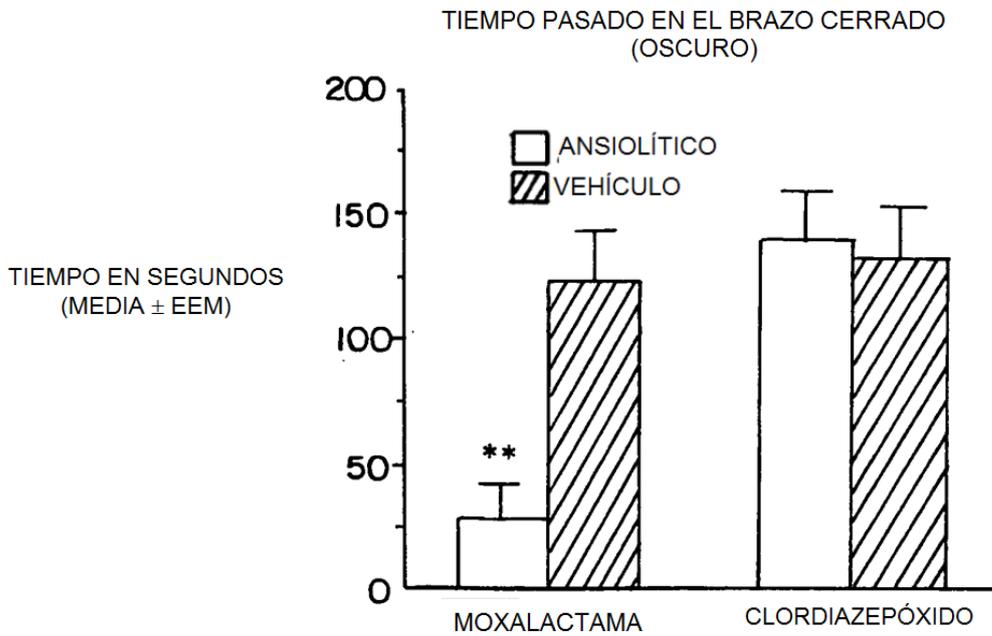


*FIG. 16*

MOXALACTAMA FRENTE A CLORDIAZEPÓXIDO  
LATENCIA PARA ENTRAR EN EL BRAZO CERRADO (OSCURO)

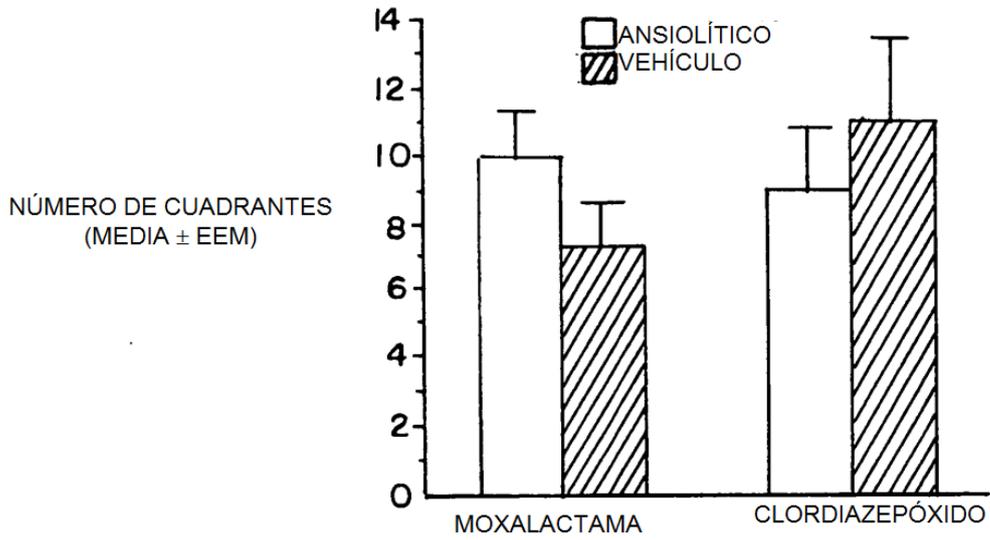


*FIG. 17a*



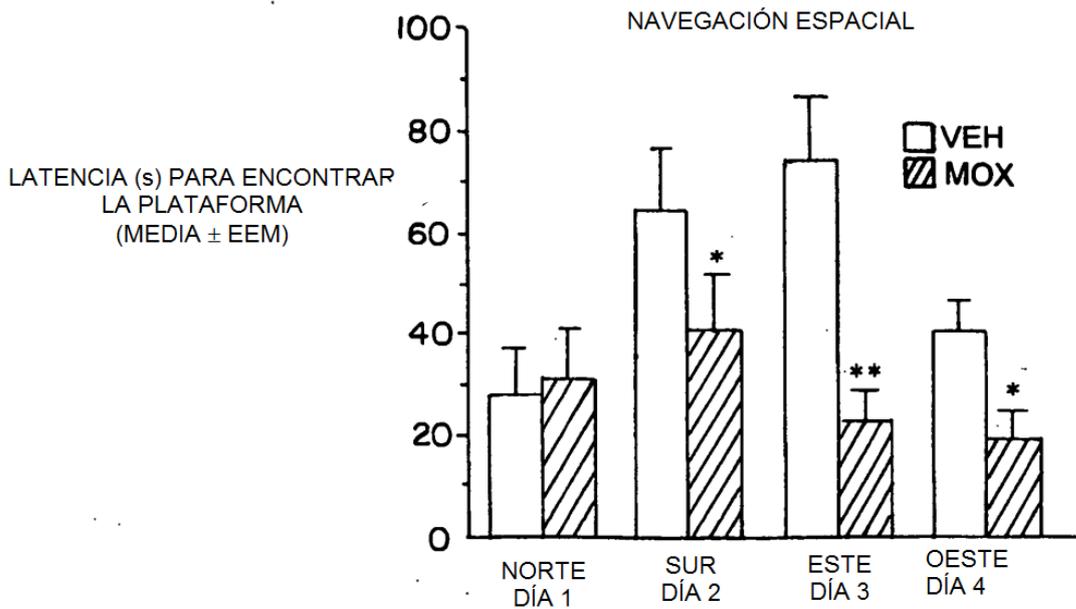
*FIG. 17b*

MOXALACTAMA FRENTE A CLORDIAZEPÓXIDO  
ACTIVIDAD MOTORA EN UN CAMPO ABIERTO

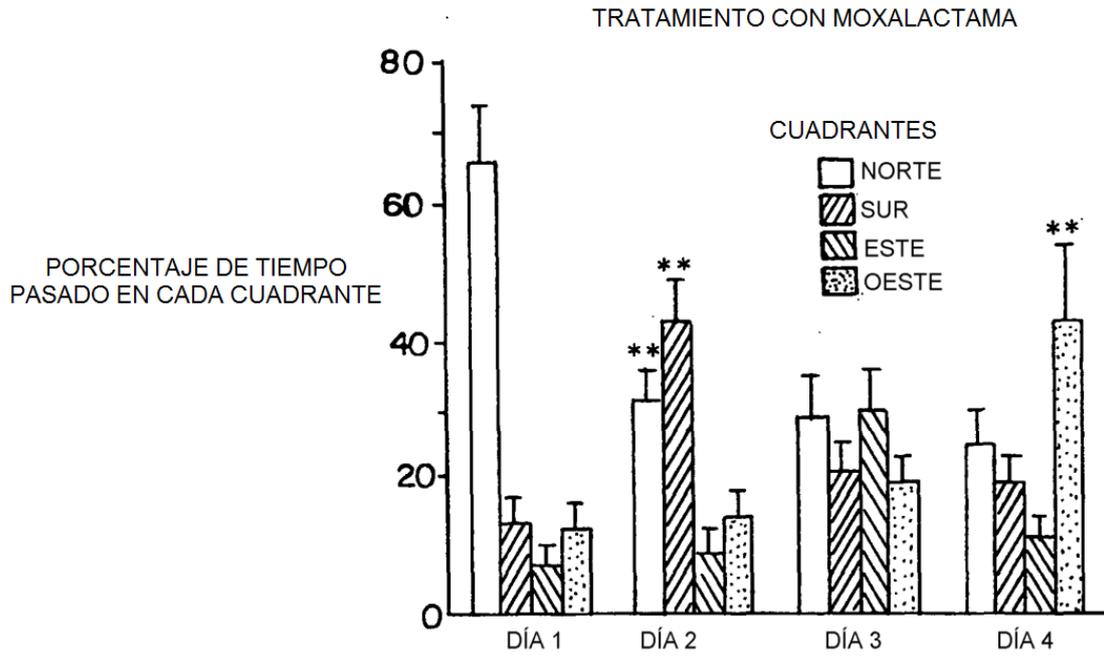


*FIG. 18*

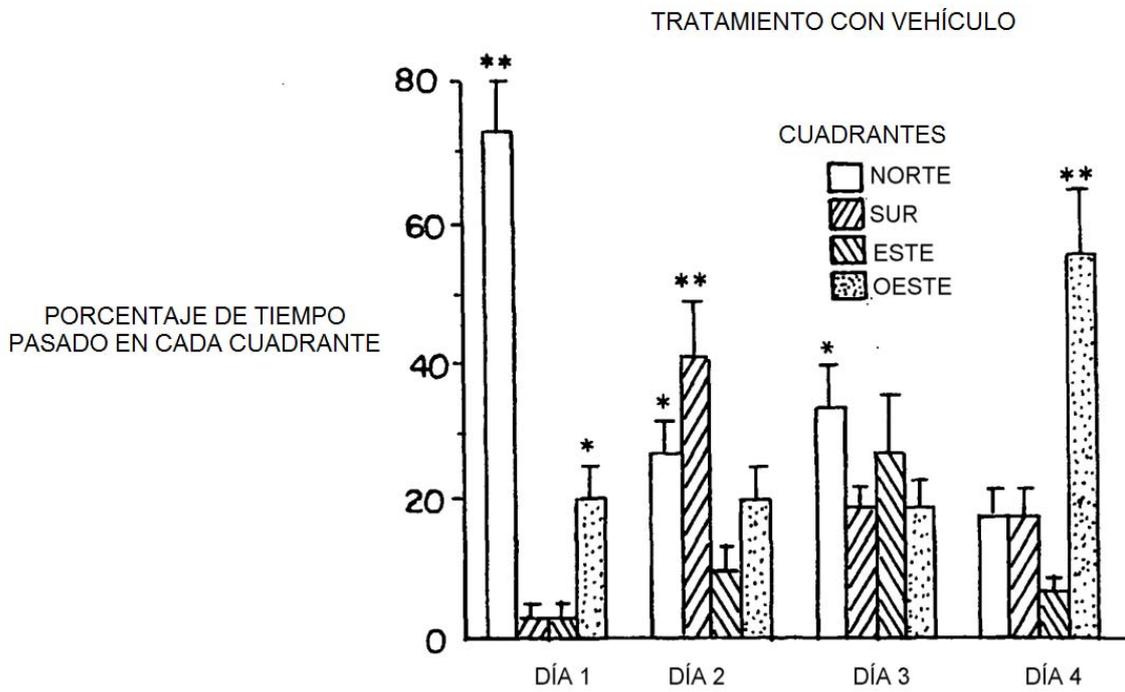
LA MOXALACTAMA POTENCIA LA MEMORIA ESPACIAL EN EL  
LABERINTO DE AGUA DE MORRIS



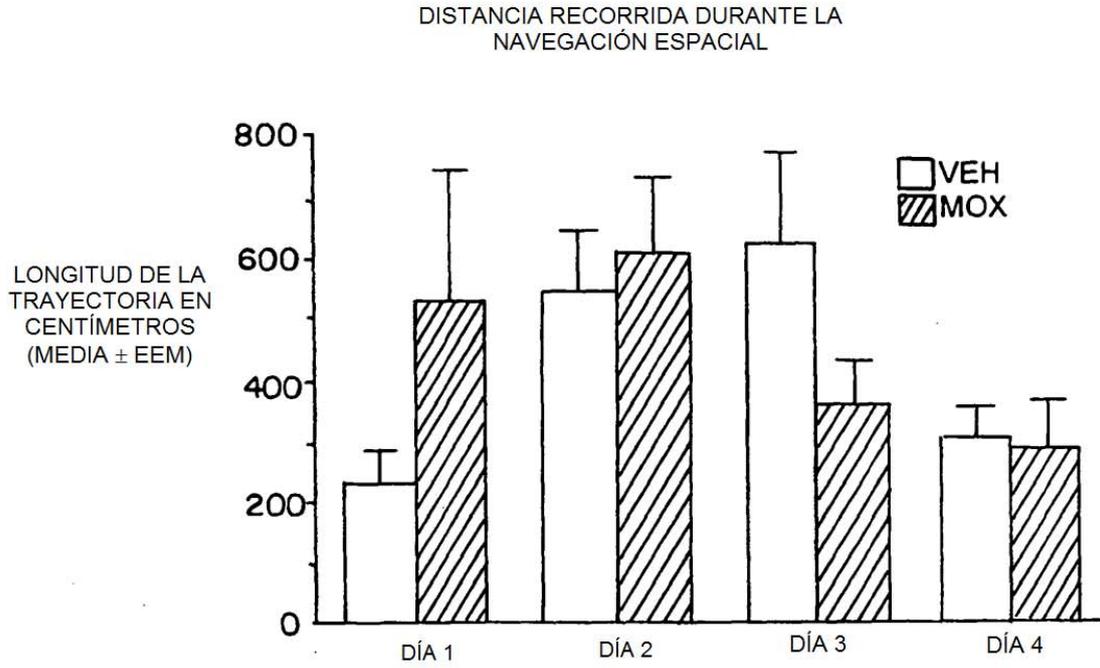
*FIG. 19a*



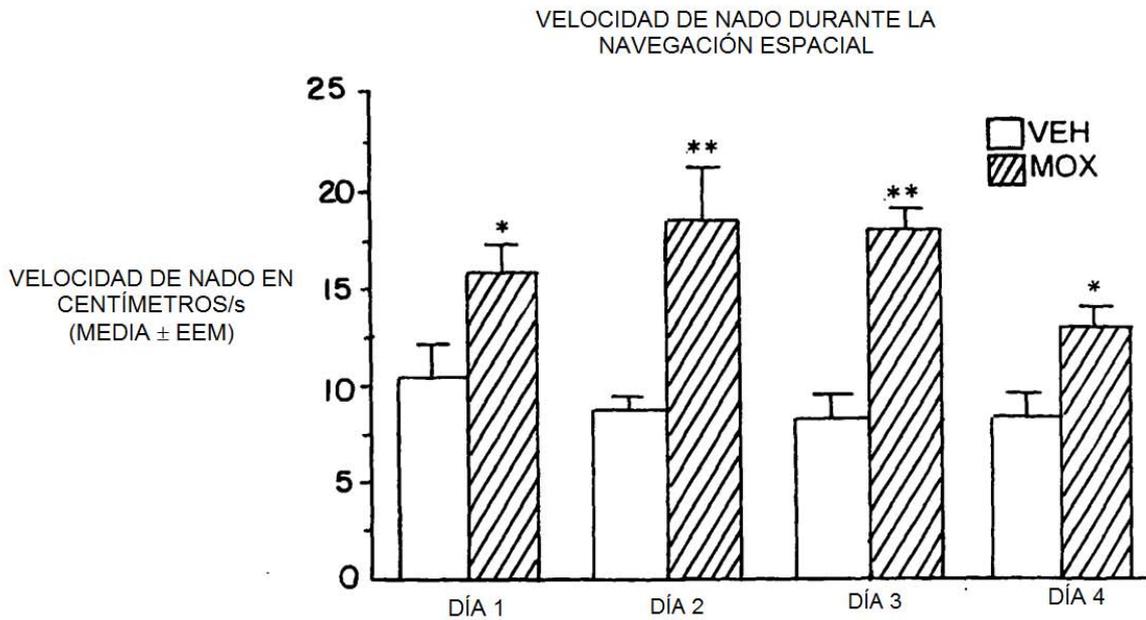
*FIG. 19b*



*FIG. 19c*

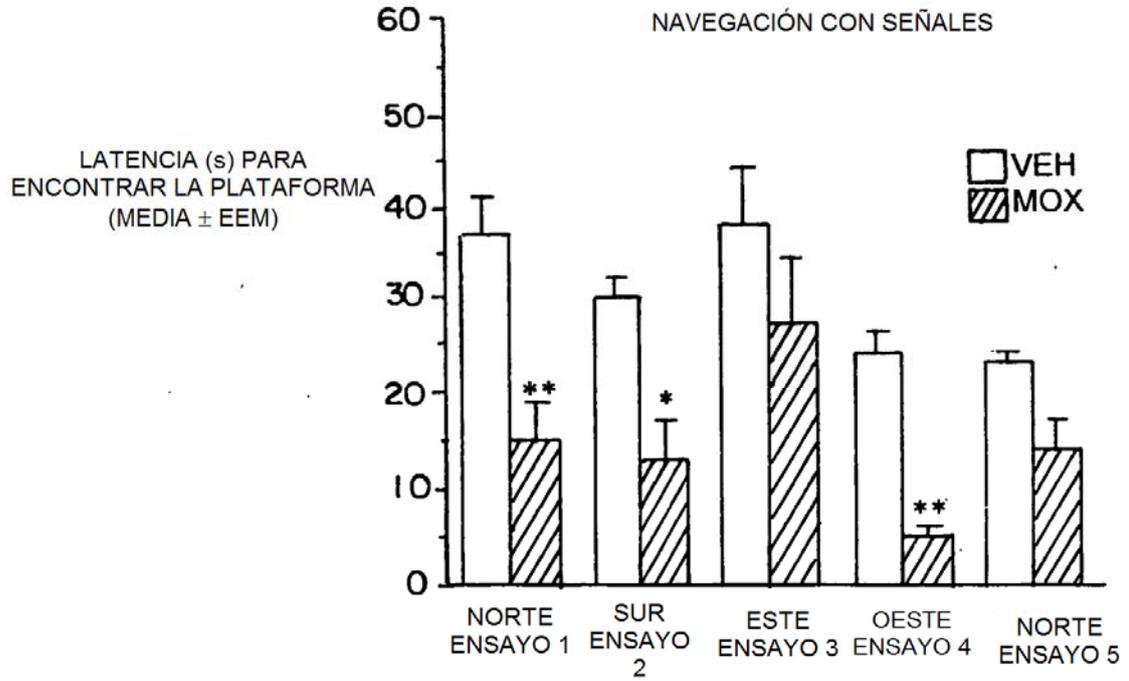


*FIG. 20a*

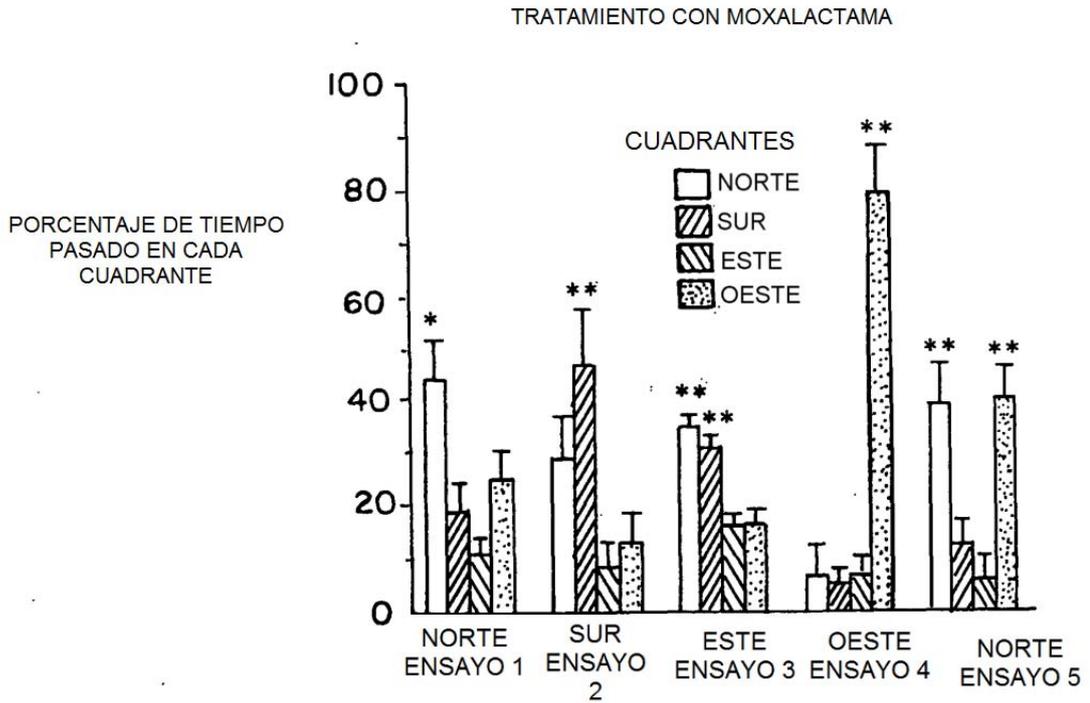


*FIG. 20b*

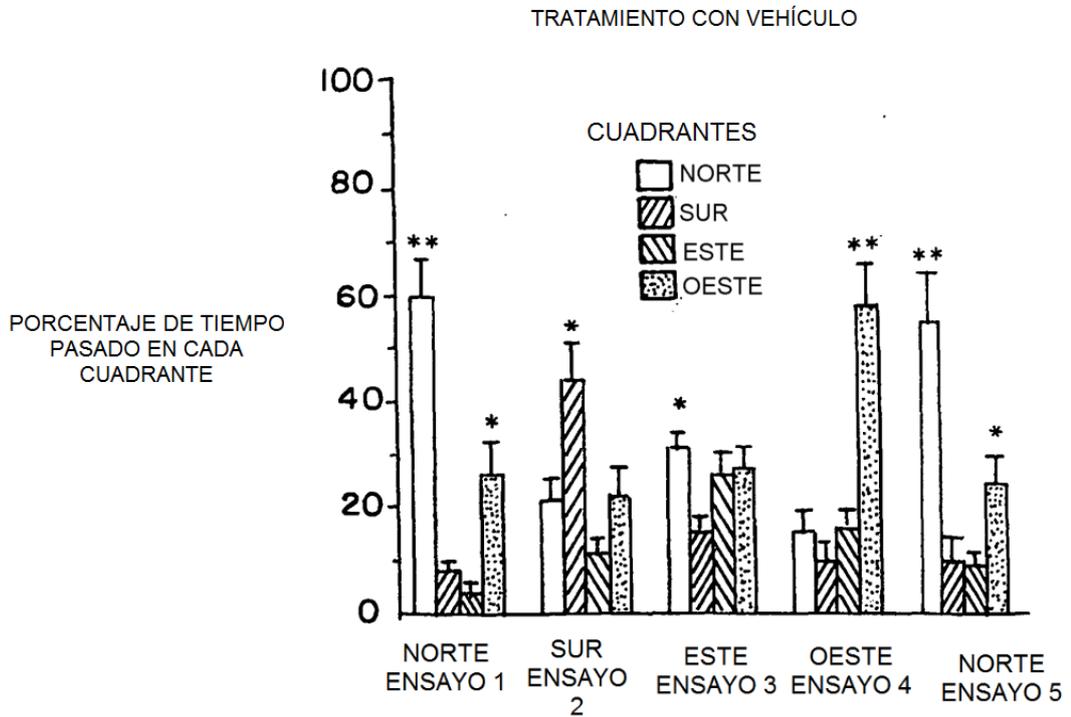
LA MOXALACTAMA POTENCIA LA MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS



*FIG. 21a*



*FIG. 21b*



*FIG. 21c*

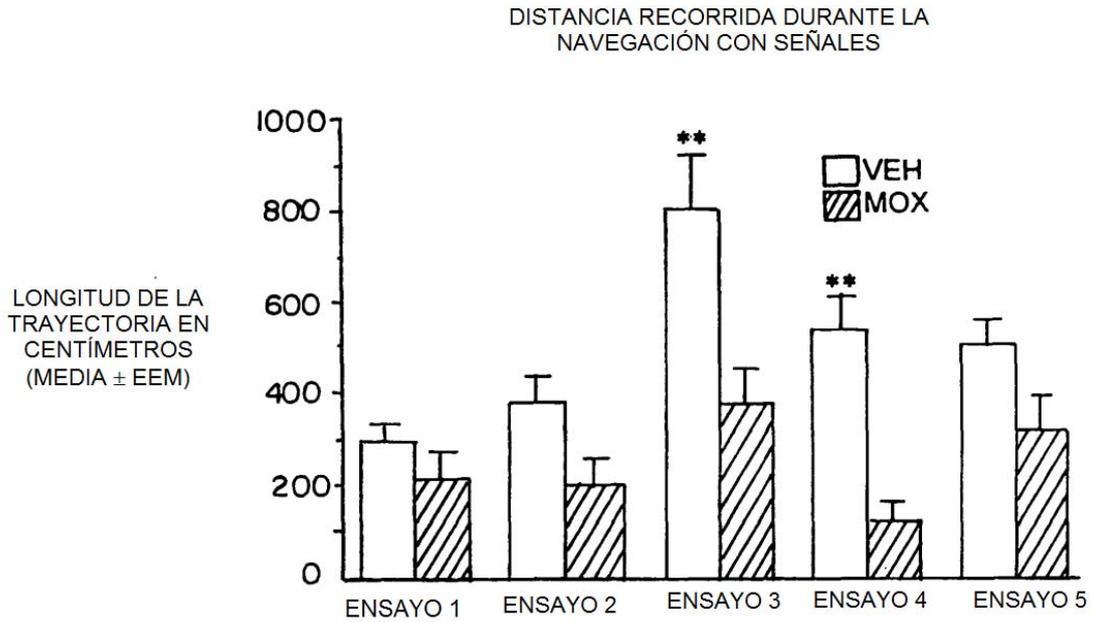


FIG. 22a

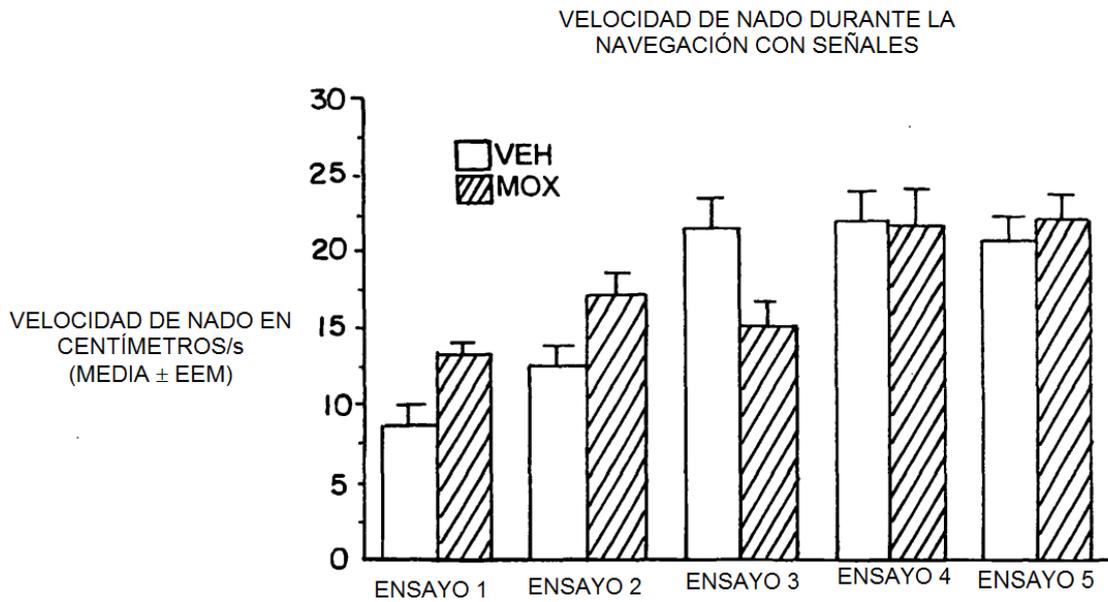


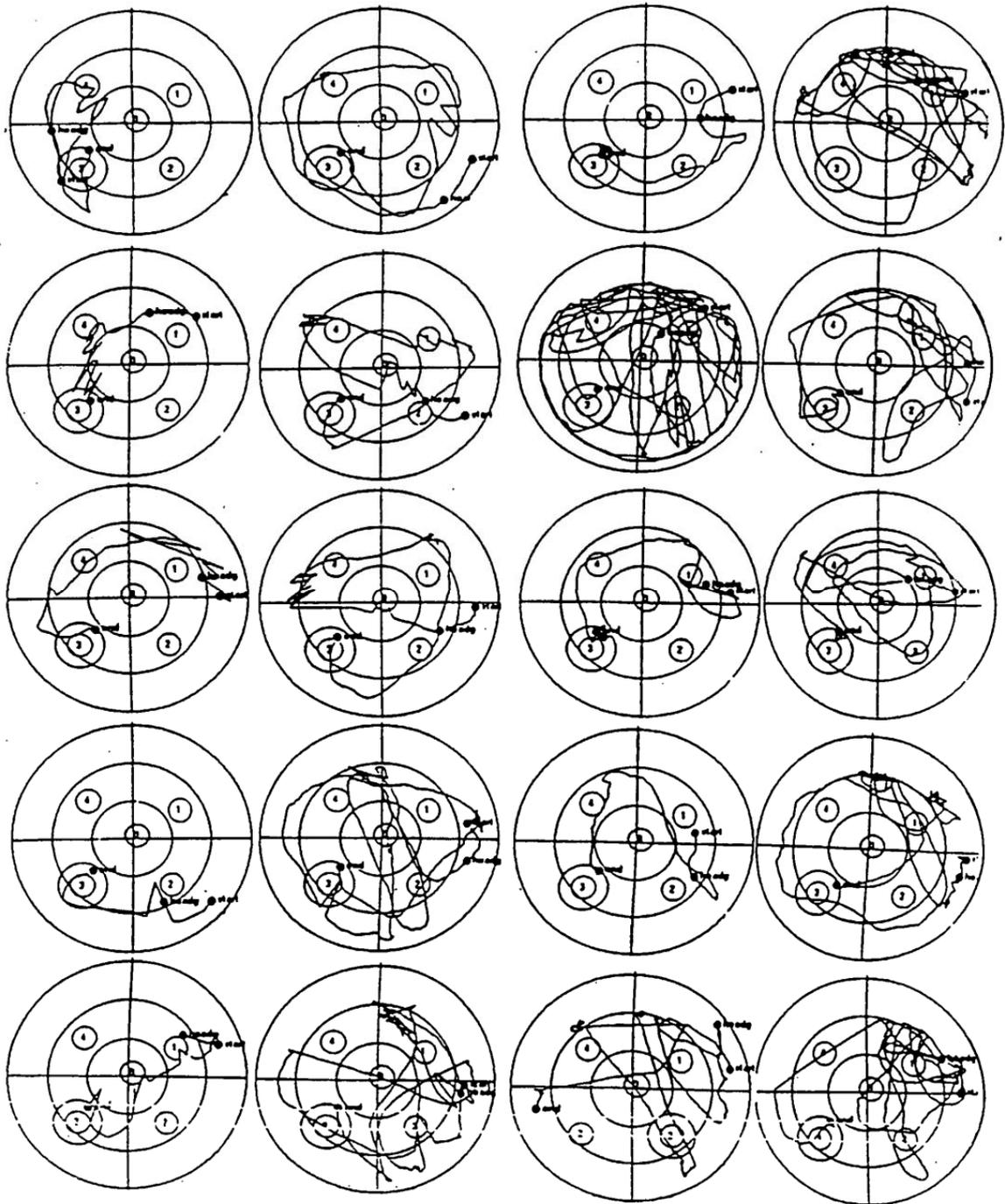
FIG. 22b

NAVEGACIÓN ESPACIAL

DÍA 3

MOXALACTAMA

VEHÍCULO

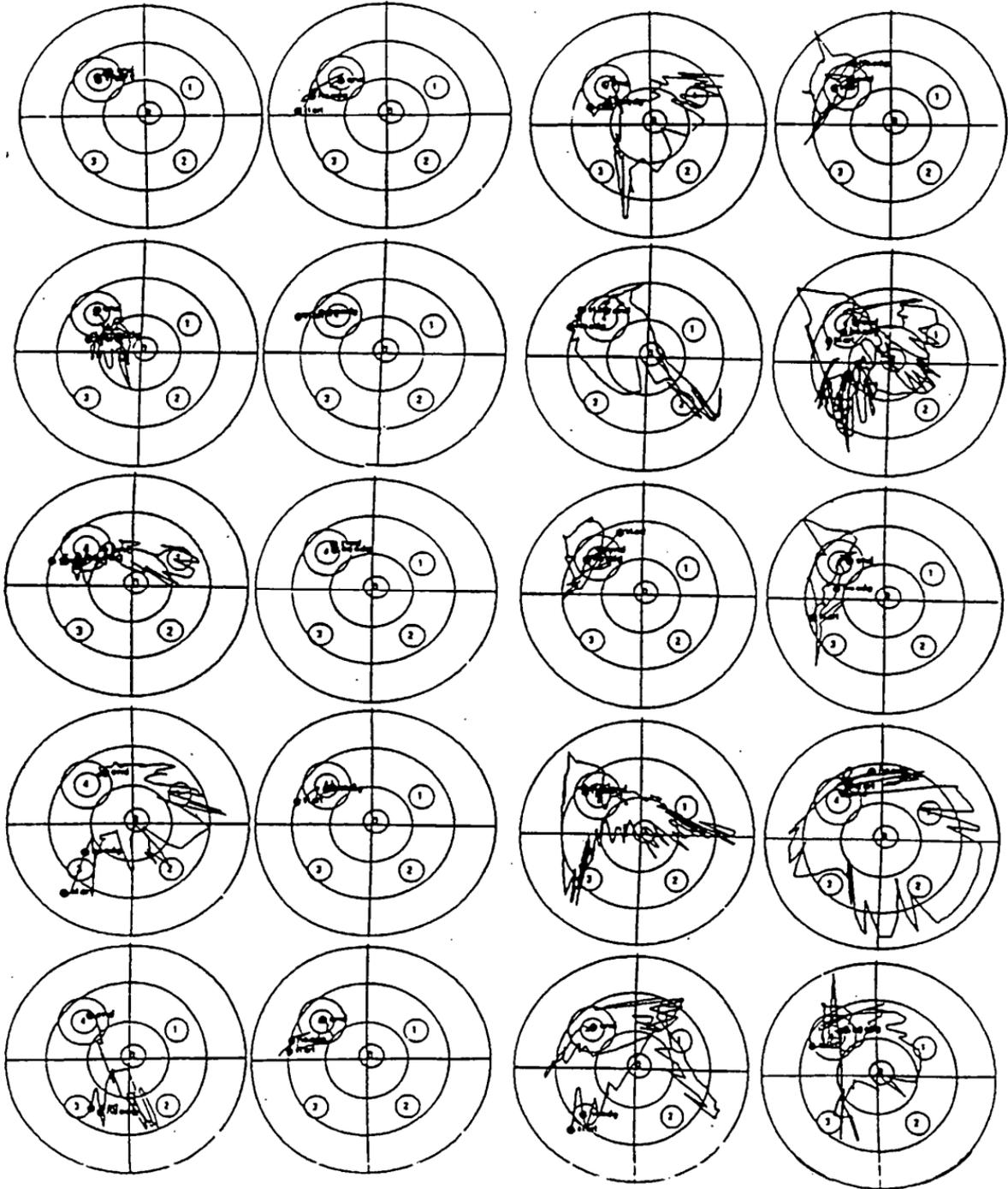


*FIG 23*

NAVEGACIÓN CON SEÑALES  
ENSAYO 4

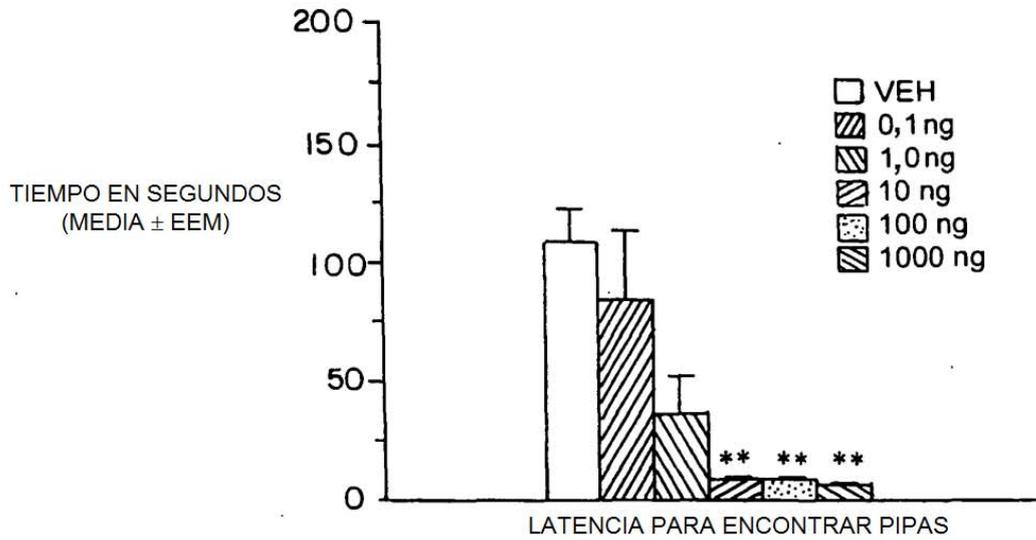
MOXALACTAMA

VEHÍCULO



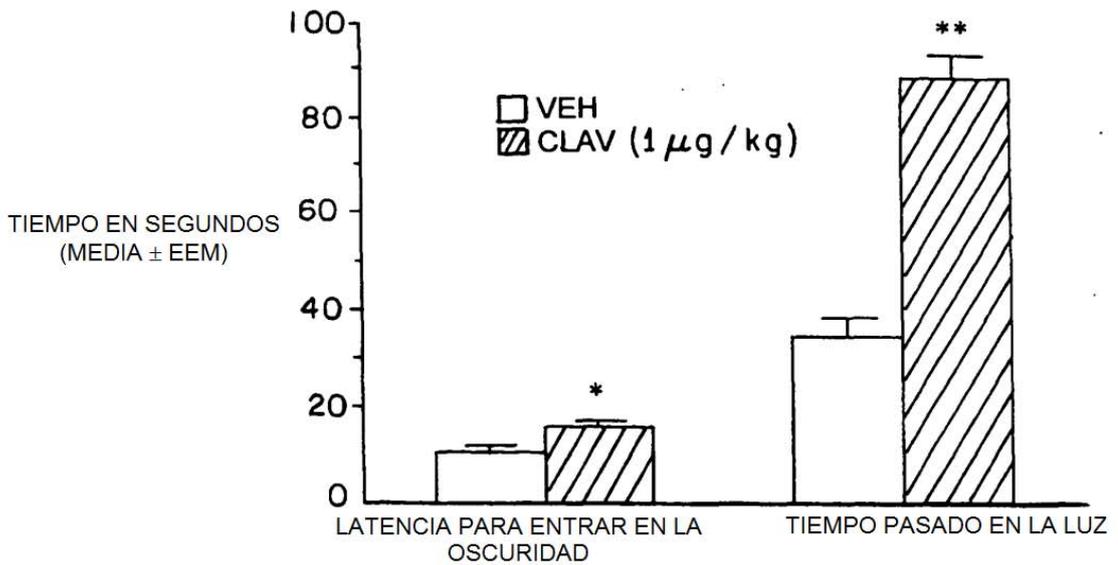
*FIG. 24*

EFEECTO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO SOBRE EL MODELO DE ANSIEDAD DE BÚSQUEDA DE PIPAS

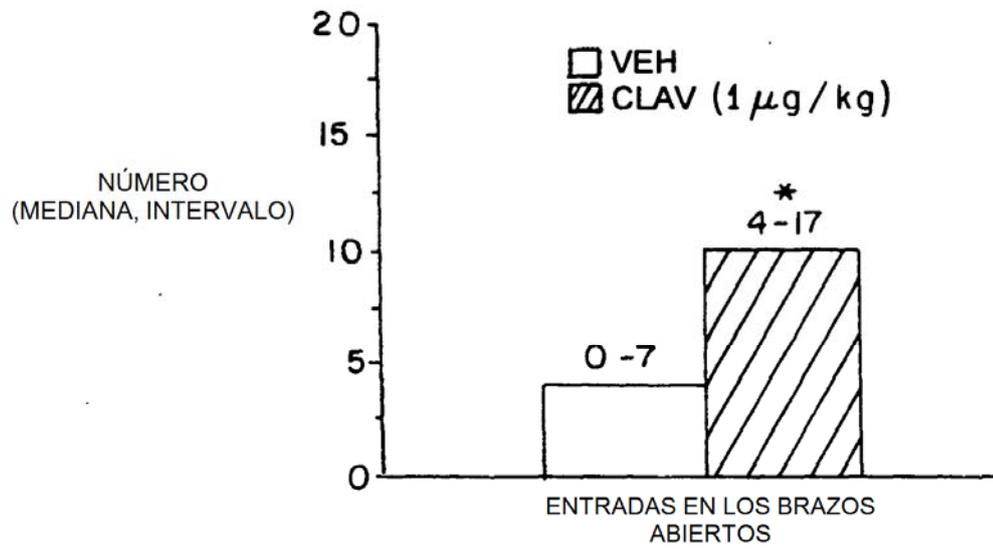


*FIG 25*

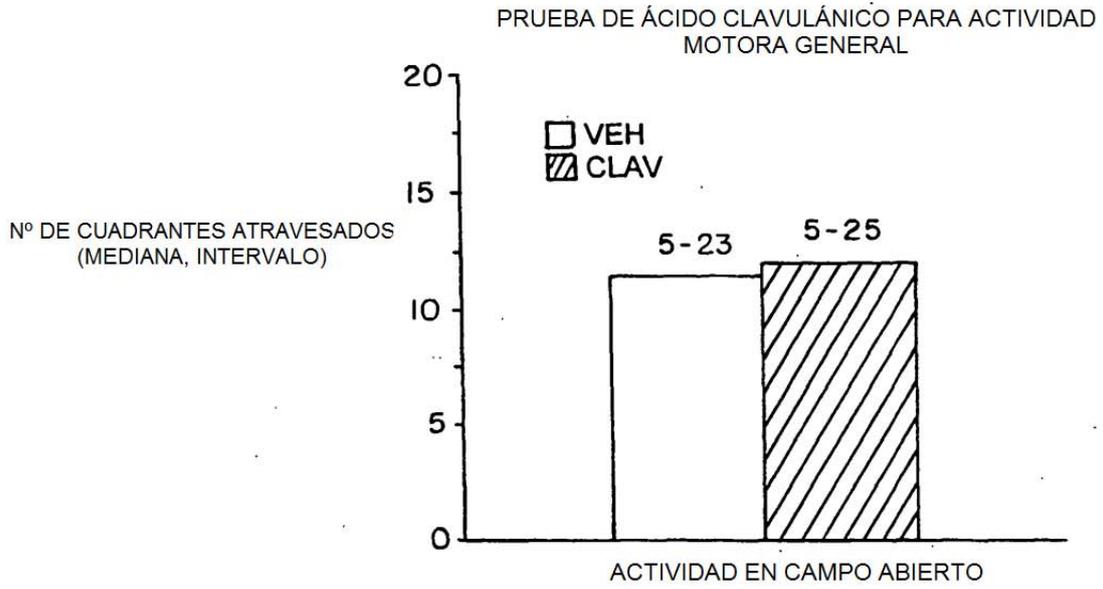
PRUEBA DE ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO EN EL LABERINTO EN CRUZ ELEVADO



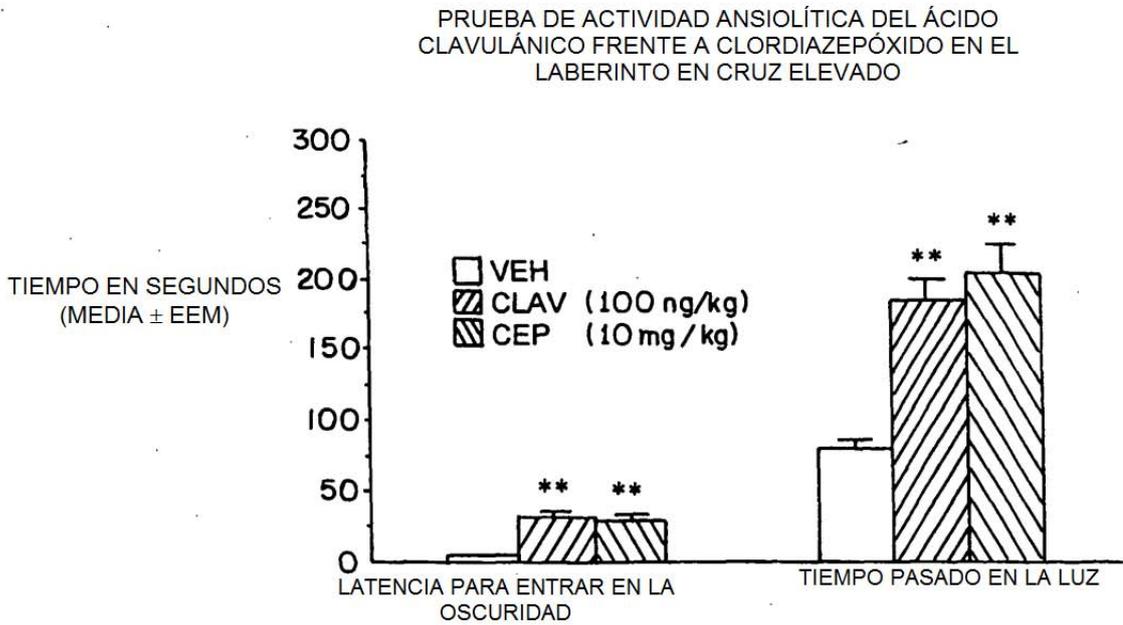
*FIG 26A*



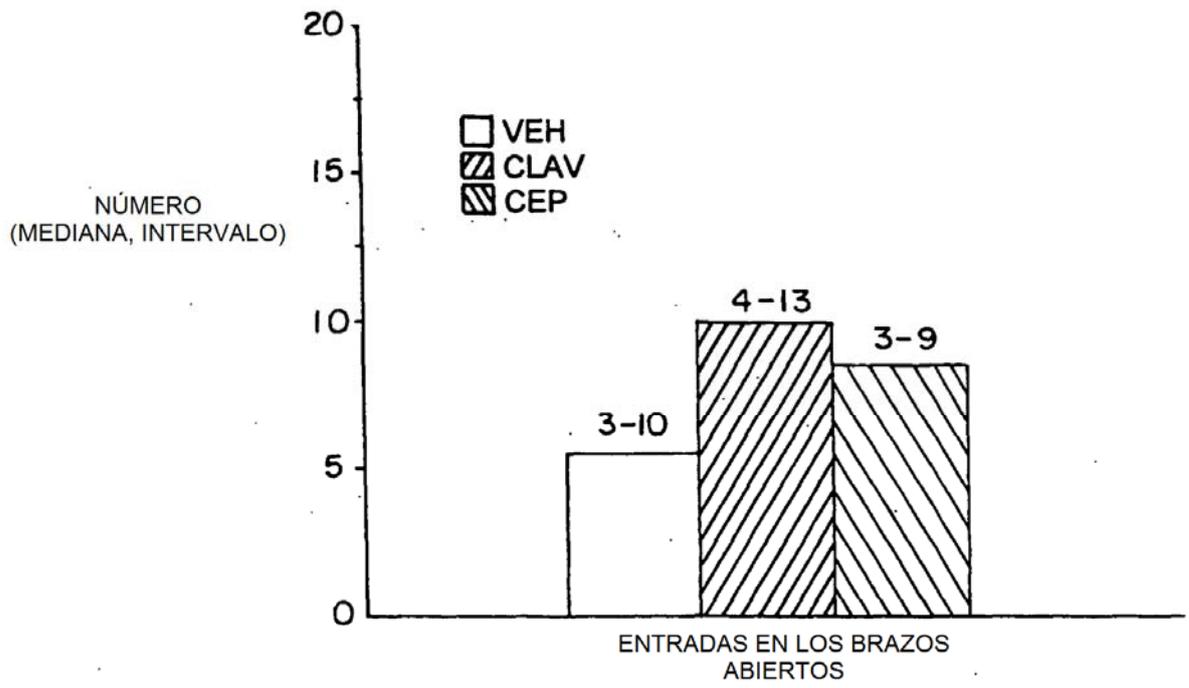
*FIG. 26B*



*FIG. 27*



*FIG. 28A*



*FIG. 28B*

EFFECTO DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

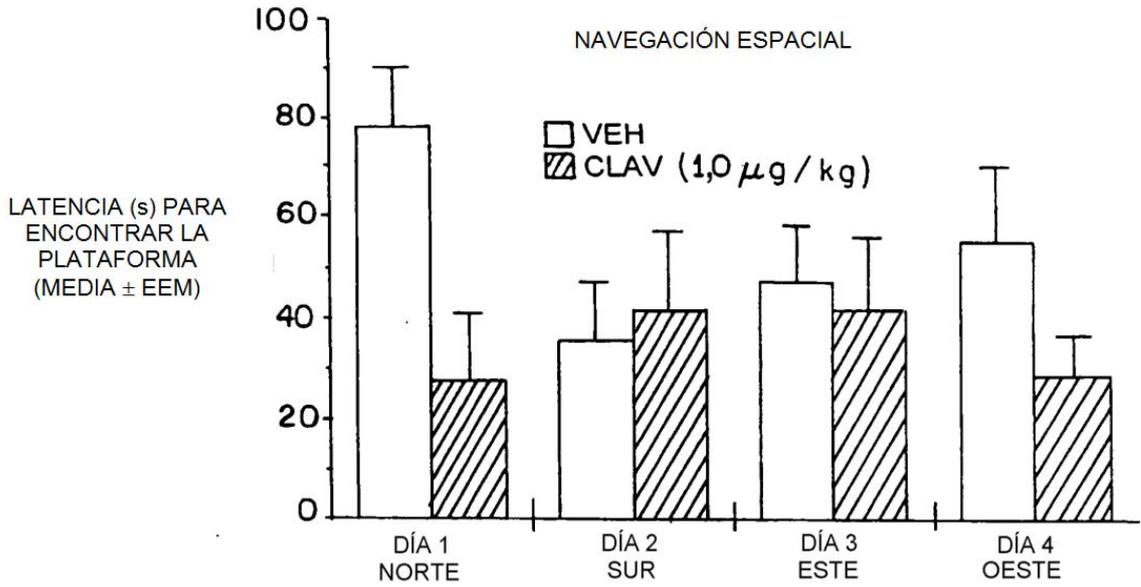


FIG. 29

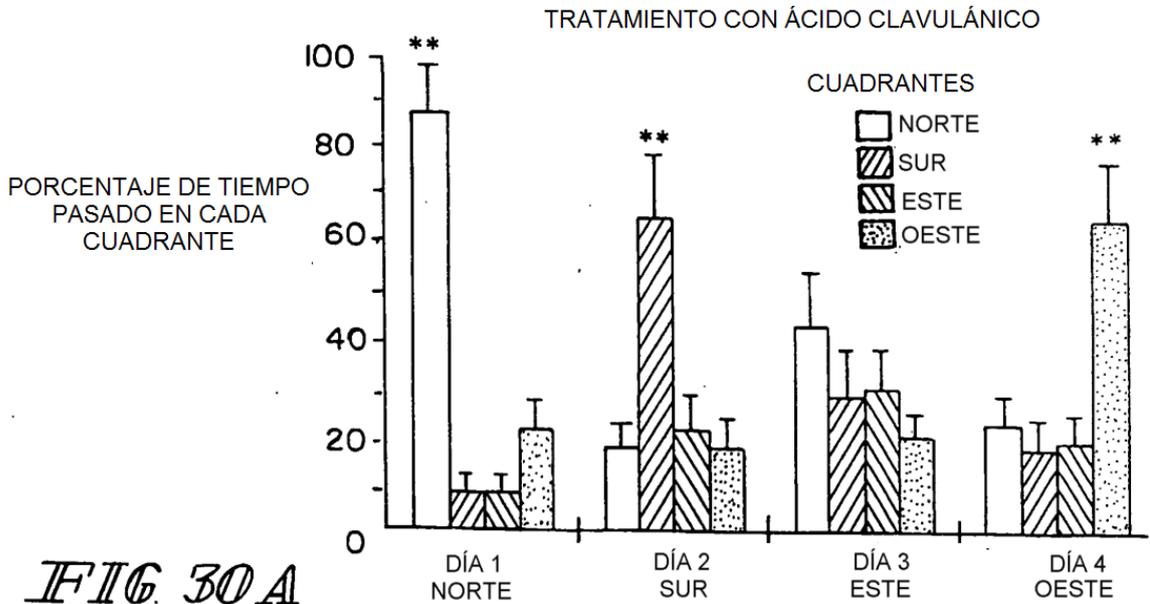
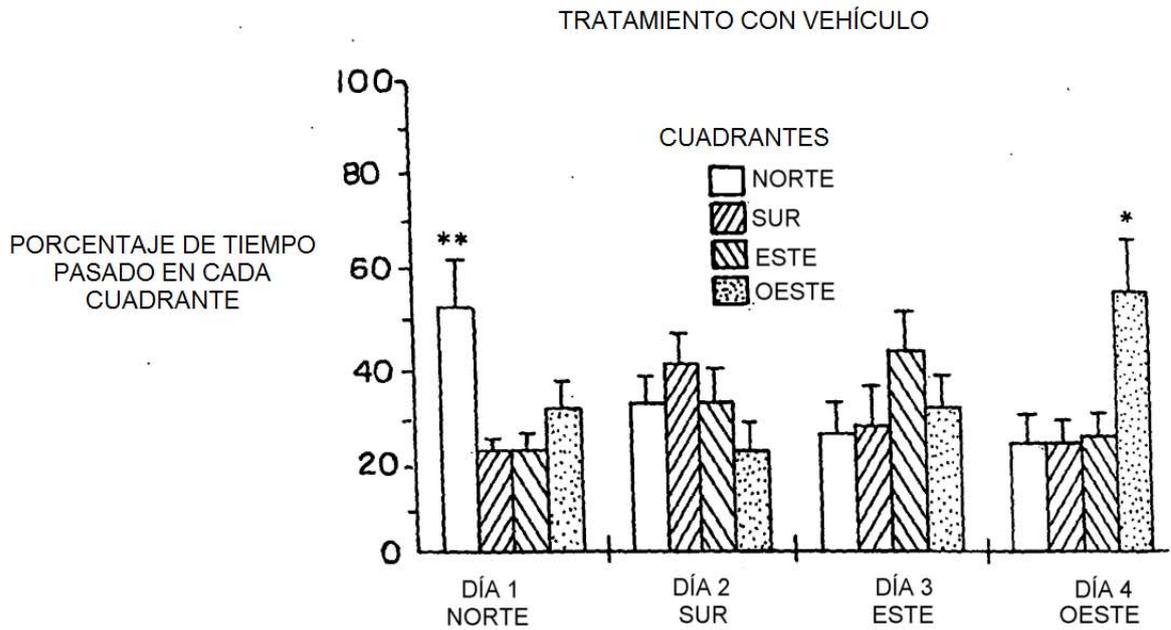
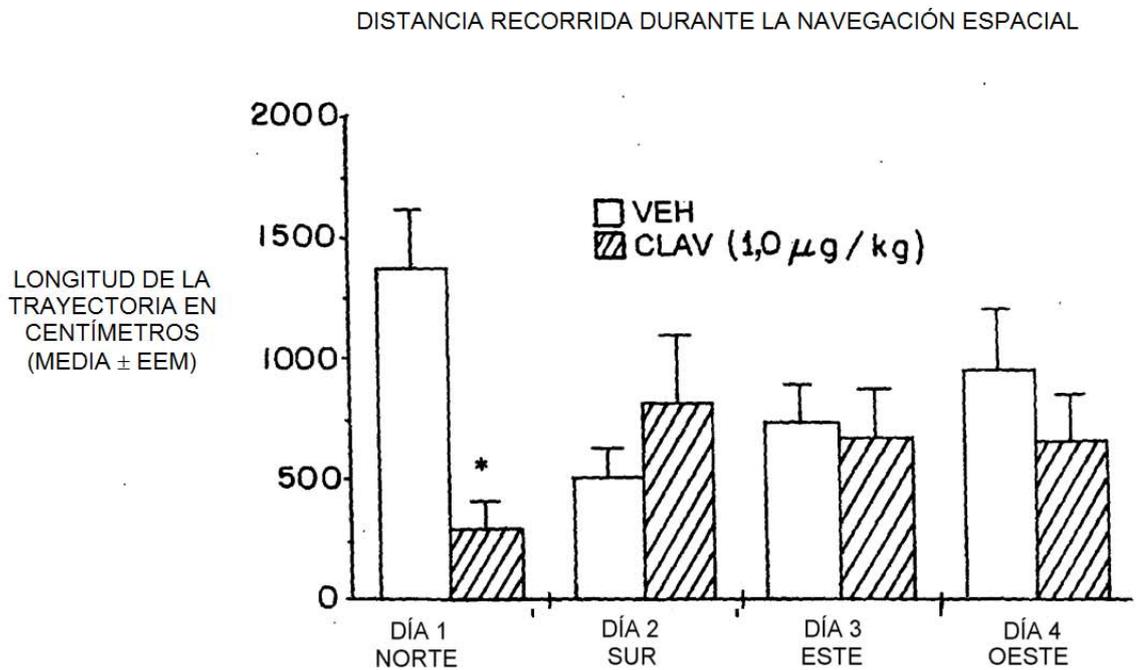


FIG. 30A



*FIG. 30 B*



*FIG. 31*

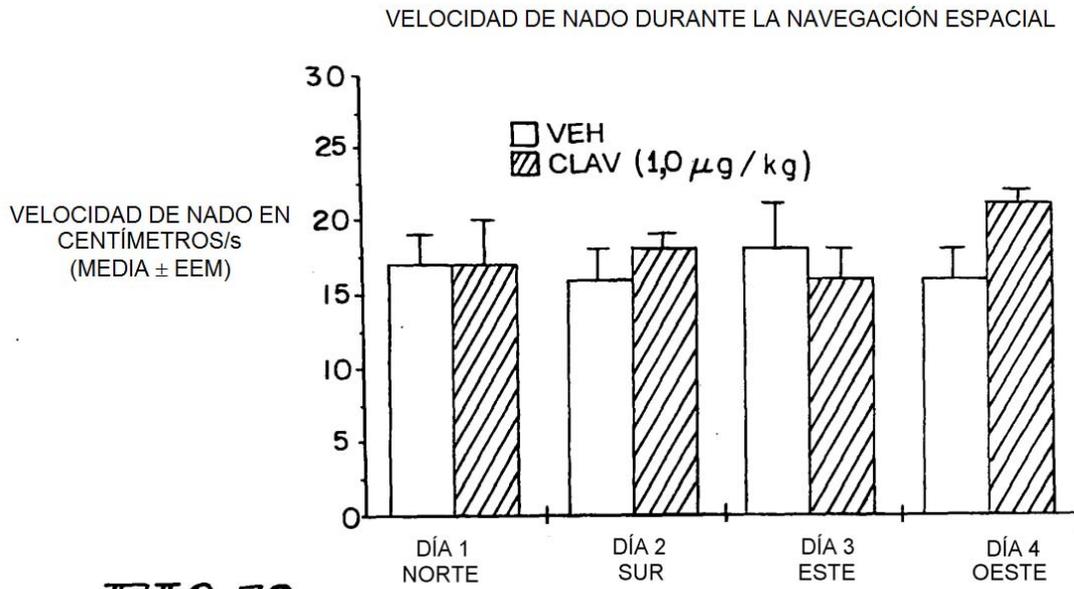


FIG. 32

EFFECTO DEL ÁCIDO CLAVULÁNICO SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

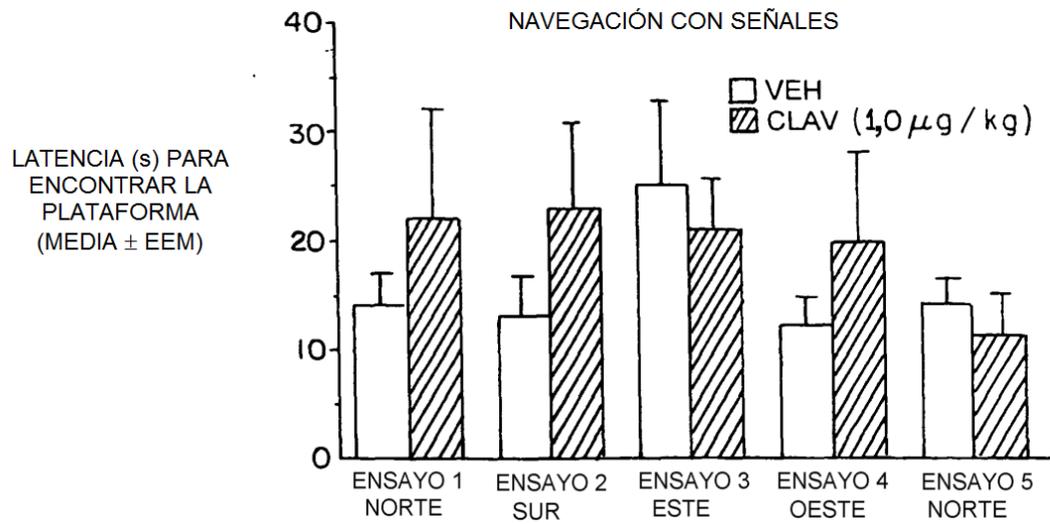
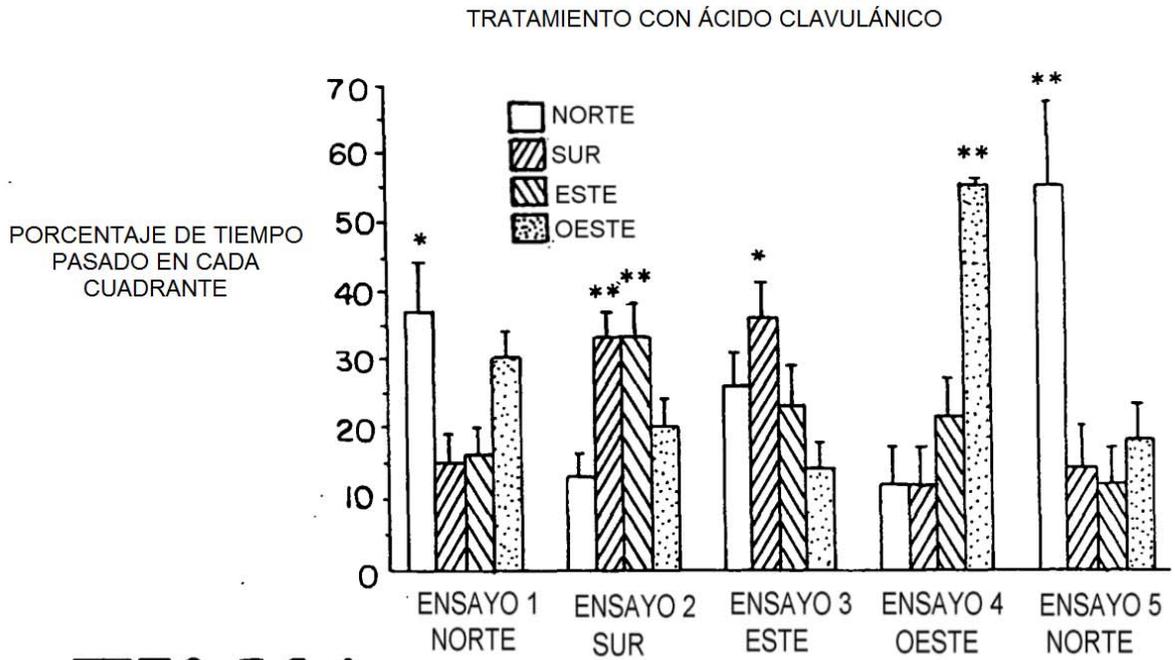
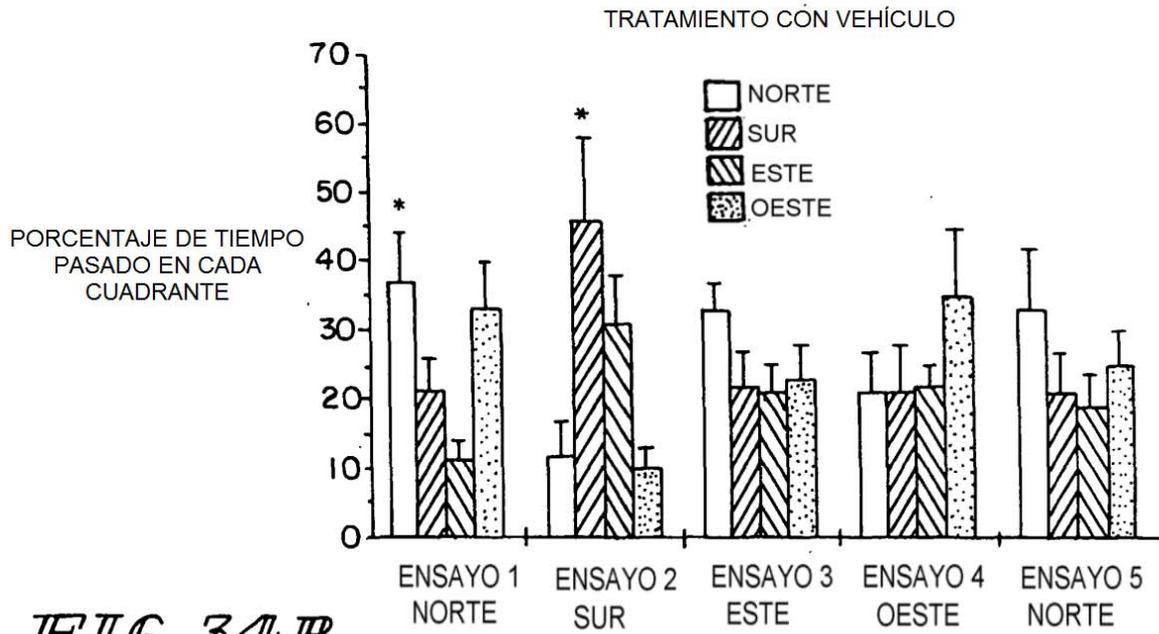


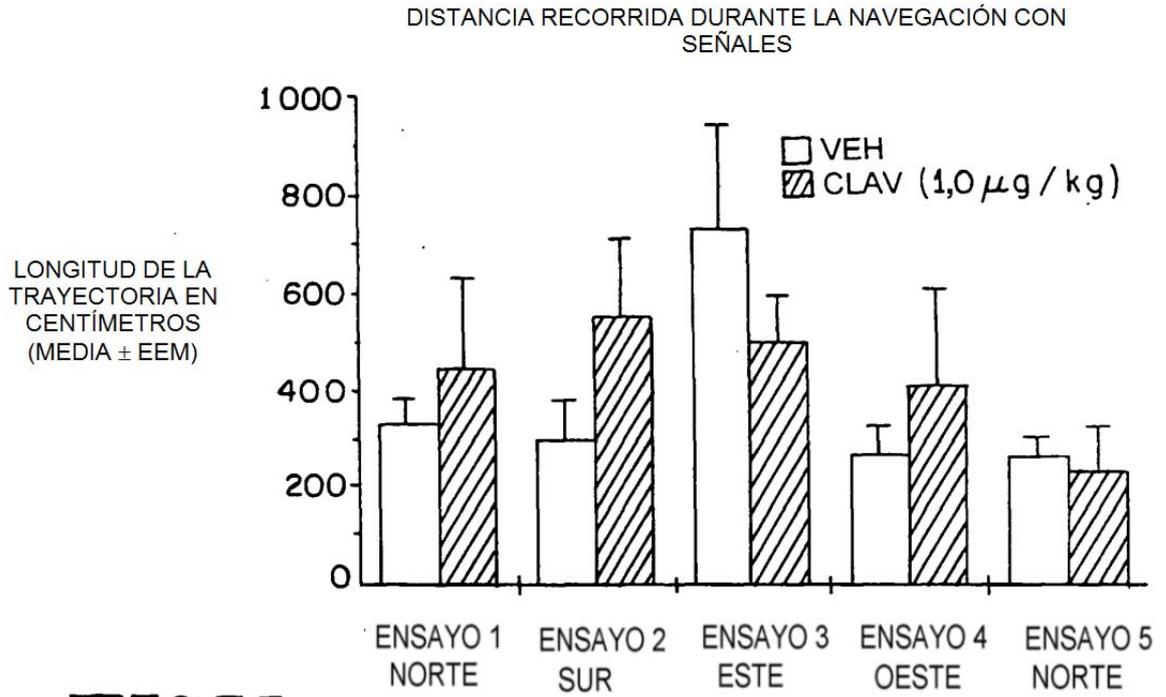
FIG. 33



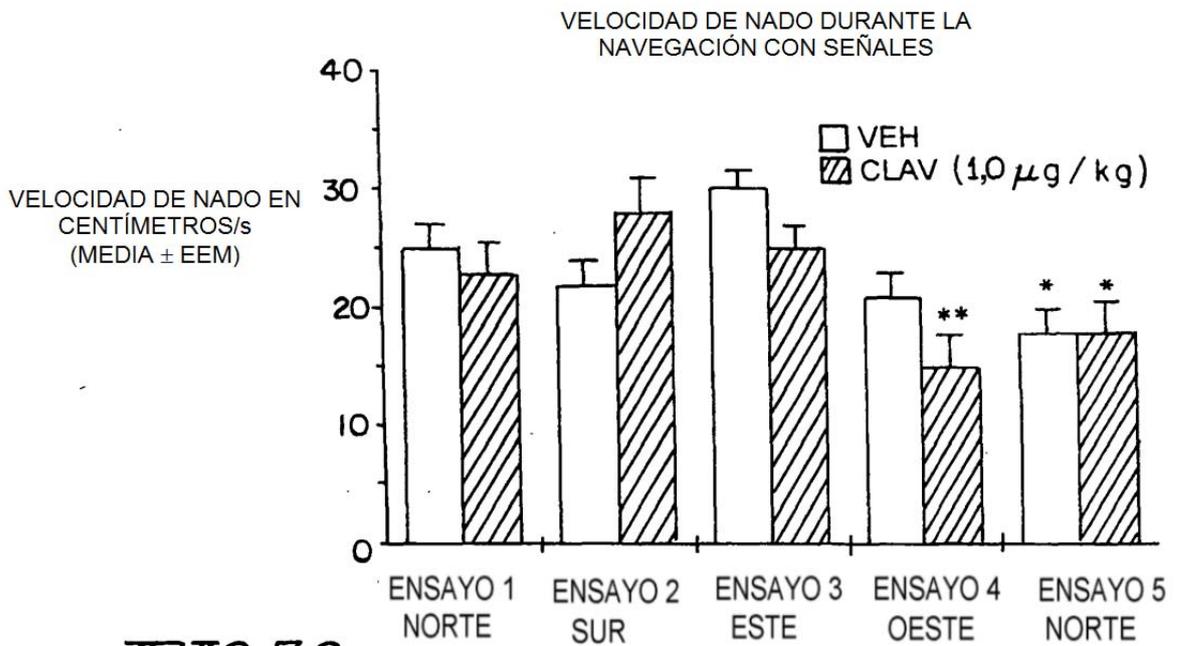
*FIG. 34A*



*FIG. 34B*



*FIG. 35*



*FIG. 36*

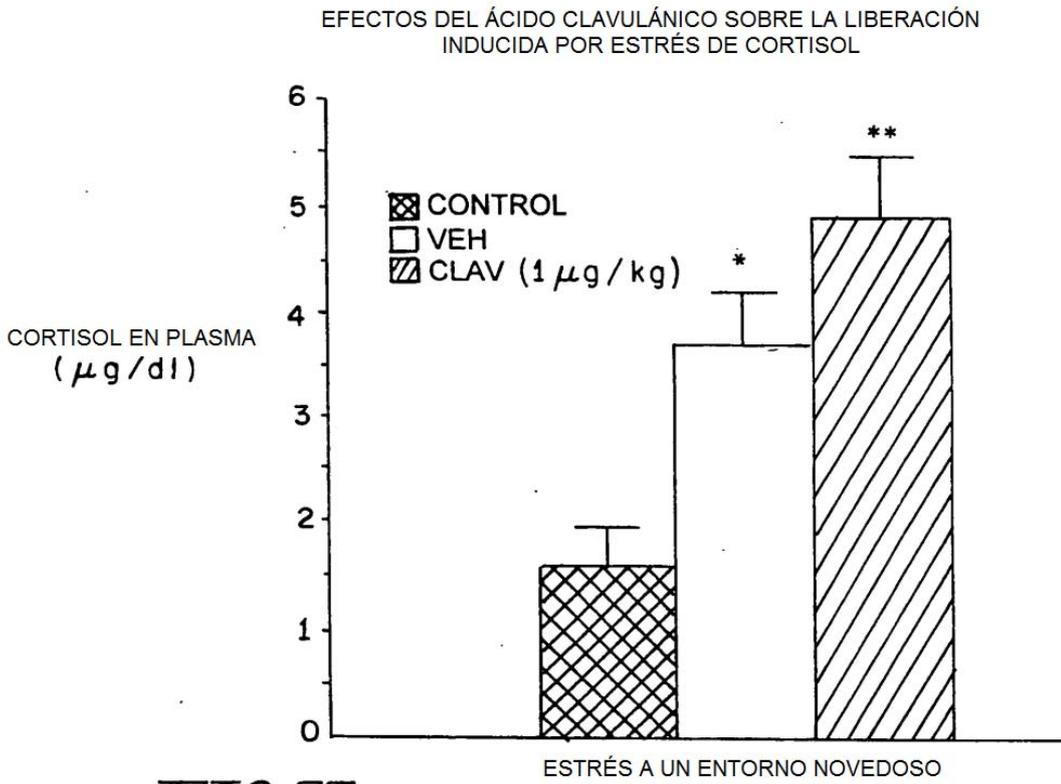


FIG. 37

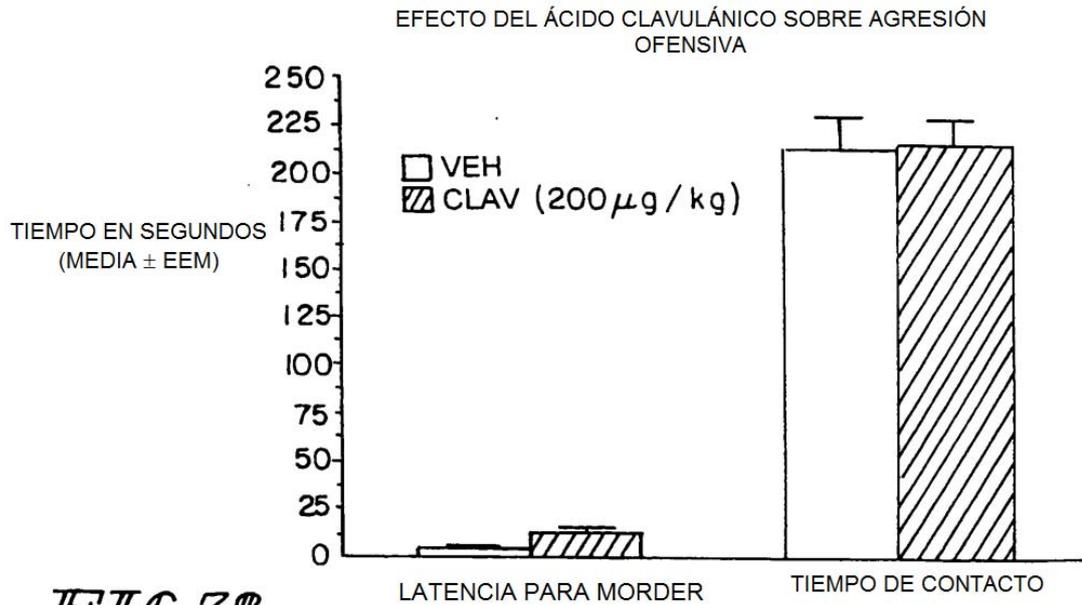
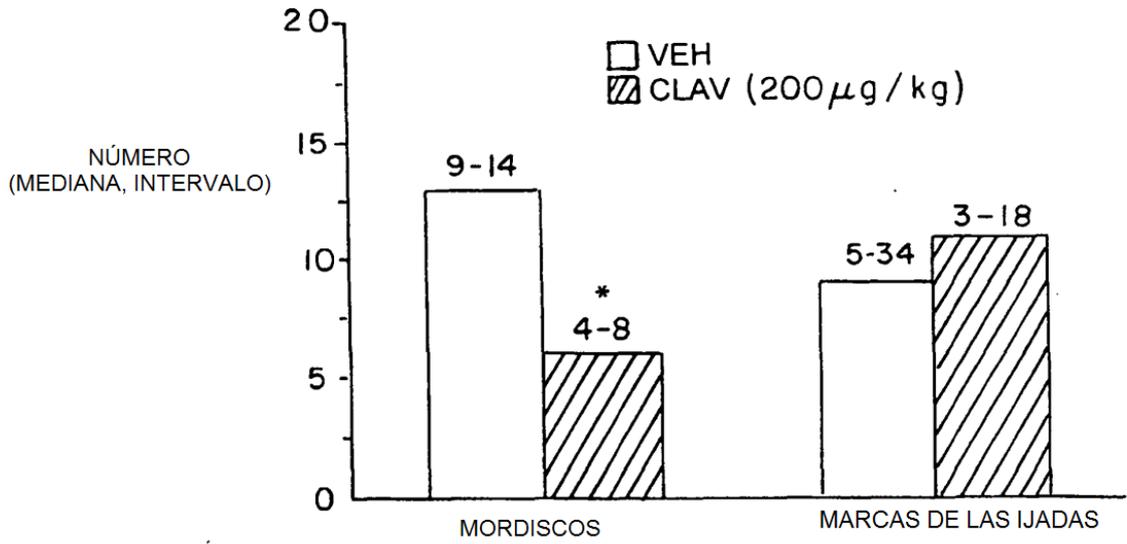
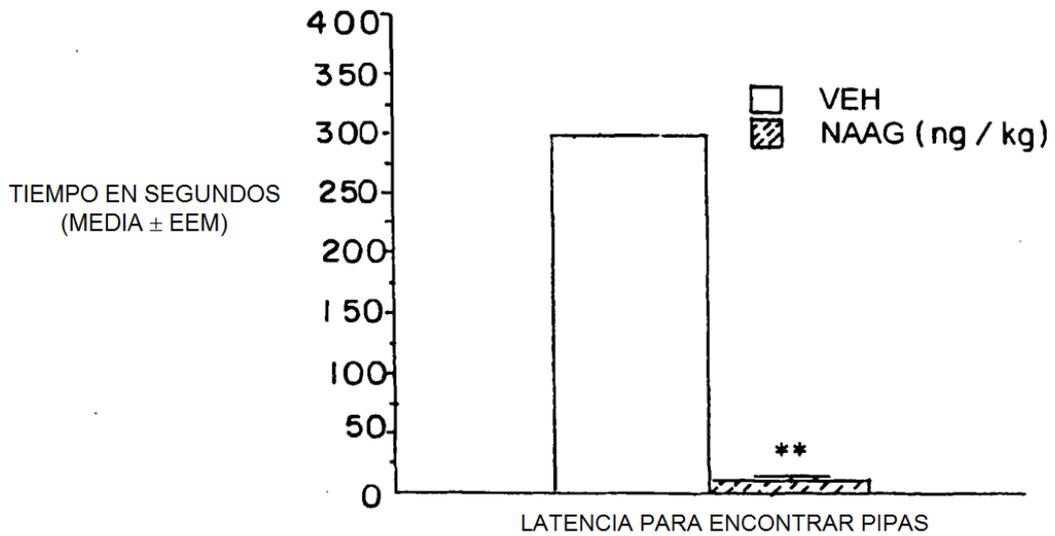


FIG. 38



*FIG. 39*

EFFECTO DE BETA-NAAG SOBRE LA BÚSQUEDA DE PIPAS



*FIG. 40*

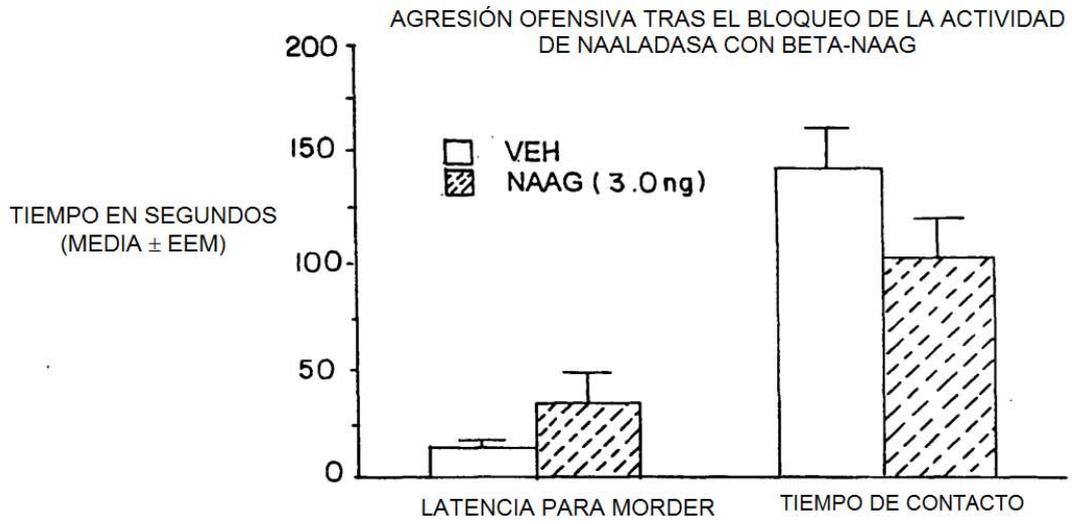


FIG. 41

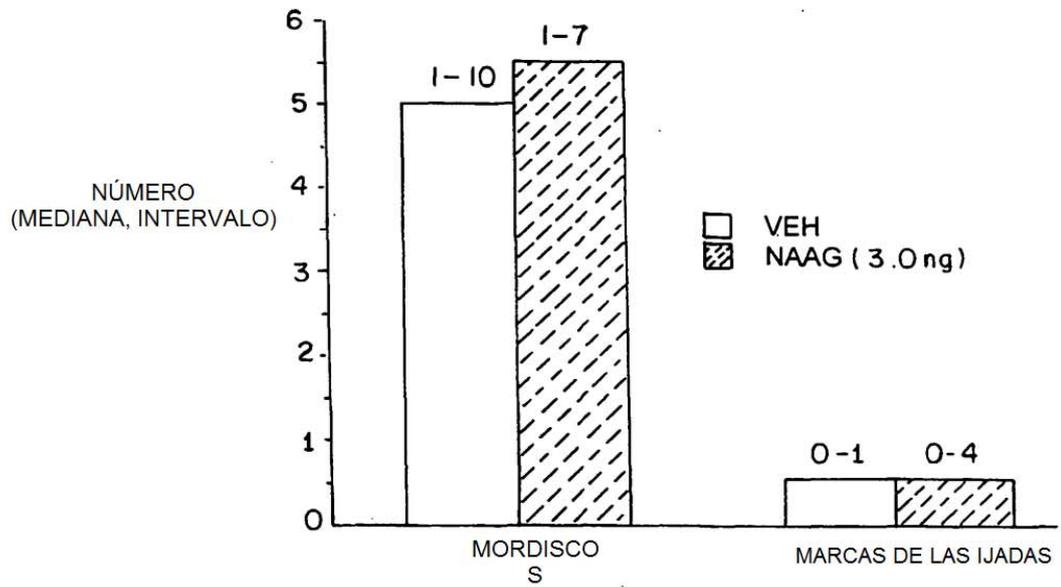


FIG. 42