

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 305**

51 Int. Cl.:

A61K 31/451 (2006.01)

C07D 211/20 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08715618 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2139479**

54 Título: **4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina con inhibición combinada de la recaptación de serotonina y norepinefrina para el tratamiento del TDAH, melancolía, depresión resistente al tratamiento o síntomas residuales en la depresión**

30 Prioridad:

20.03.2007 DK 200700423

15.06.2007 WO PCT/DK2007/050076

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2013

73 Titular/es:

H. LUNDBECK A/S (100.0%)

OTTILIAVEJ 9

2500 VALBY, DK

72 Inventor/es:

STENSBØL, TINE BRYAN y

MILLER, SILKE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 305 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

4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina con inhibición combinada de la recaptación de serotonina y norepinefrina para el tratamiento del TDAH, melancolía, depresión resistente al tratamiento o síntomas residuales en la depresión

Antecedentes de la invención

- 5 El compuesto 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina se describe en la solicitud de patente internacional WO 03/029232. Se afirma que el compuesto es un inhibidor del transportador de serotonina y que exhibe afinidad por el receptor de serotonina 2C (5-HT_{2C}) y, como tal, que es de utilidad en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo tales como la depresión mayor y la ansiedad.

El documento WO 2006/007843 describe ciertas indolilsulfanilaril aminas útiles en el tratamiento del TDAH.

- 10 Como se muestra en los ejemplos, sin embargo, dicho compuesto está dotado de un perfil farmacológico más amplio, que determina que el compuesto sea útil en el tratamiento también de otras enfermedades, tratamientos para los que existe una demanda. Este perfil farmacológico se describe igualmente en el documento WO 07/144006, junto con el uso de dicho compuesto en el tratamiento de enfermedades adicionales.

Compendio de la invención

- 15 En una realización, la invención se refiere a 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina y a sales de adición de ácido de la misma (compuesto I) para el uso en el tratamiento del TDAH.

Figuras

- Figura 1: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de HBr del compuesto I
- Figura 2: modelo de difracción por rayos X del solvato de la sal de adición de HBr del compuesto I
- 20 Figura 3: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido palmítico del compuesto I
- Figura 4: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido D,L-láctico del compuesto I
- Figura 5: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido adípico (1:1) del compuesto I (formas $\alpha+\beta$)
- Figura 6: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido adípico (2:1) del compuesto I
- Figura 7: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido fumárico (1:1) del compuesto I
- 25 Figura 8: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido glutárico (1:1) del compuesto I
- Figura 9: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido malónico (1:1) del compuesto I, forma α
- Figura 10: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido malónico del compuesto I, forma β
- Figura 11: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido oxálico (1:1) del compuesto I
- Figura 12: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido sebacoínico (2:1) del compuesto I
- 30 Figura 13: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido succínico (2:1) del compuesto I
- Figura 14: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-málico (1:1) del compuesto I, forma α
- Figura 15: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-málico (1:1) del compuesto I, forma β
- Figura 16: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido D-tartárico (1:1) del compuesto I
- Figura 17: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido L-aspártico (1:1) del compuesto I, mezclado con ácido L-aspártico
- 35 Figura 18: modelo de difracción por rayos X del hidrato de la sal de adición de ácido L-aspártico (1:1) del compuesto I, mezclado con ácido L-aspártico
- Figura 19: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido glutámico (1:1) del compuesto I, mezclado con ácido glutámico monohidrato
- 40 Figura 20: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido cítrico (2:1) del compuesto I

Figura 21: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido HCl del compuesto I

Figura 22: modelo de difracción por rayos X de la sal de adición de ácido fosfórico (1:1) del compuesto I

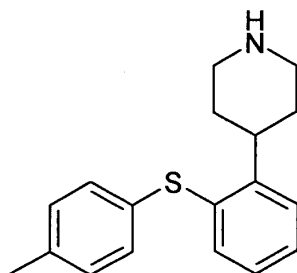
Figura 23: concentraciones de dopamina en la corteza prefrontal tras la administración del compuesto I

Figura 24: concentraciones de acetilcolina en la corteza prefrontal tras la administración del compuesto I

5 Figura 25 a+b: concentraciones de acetilcolina en la corteza prefrontal y el hipocampo ventral tras la administración del compuesto I

Figura 26: efecto del compuesto I sobre los déficits de atención e impulsividad en ratas SHR

Descripción detallada de la invención



10 La presente invención se refiere al uso del compuesto I, que es 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina y sus sales farmacéuticamente aceptables. La estructura de 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina es

15 El perfil farmacológico del compuesto I se representa en los ejemplos, pero se puede resumir del modo siguiente. El compuesto inhibe la recaptación de serotonina y norepinefrina; inhibe los receptores de serotonina 2A, 2C y 3; e inhibe el receptor adrenérgico α -1.

20 En una realización, dichas sales de adición de ácido son sales de ácidos que son atóxicos. Dichas sales incluyen sales preparadas con ácidos orgánicos tales como ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, oxálico, bis-metilensalicílico, metanosulfónico, etanosulfónico, acético, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, málico, malónico, mandélico, cinámico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ácidos teofilina acéticos, así como las 8-haloteofilinas, por ejemplo 8-bromoteofilina. Dichas sales se pueden preparar también a partir de ácidos inorgánicos tales como ácidos bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico y nítrico.

En una realización, el compuesto I es la sal de adición de HBr.

En otra realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido D,L-láctico y, en particular, la sal 1:1.

25 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido L-aspártico y, en particular, la sal 1:1.

En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido glutámico y, en particular, la sal 1:1.

En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido glutárico y, en particular, la sal 1:1.

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

En una realización, el compuesto I está en forma purificada. La expresión "forma purificada" pretende indicar que el compuesto está esencialmente exento de otros compuestos u otras formas, es decir polimorfos de dicho compuesto, según sea el caso.

35 Los pacientes y el médico suelen preferir las formas de dosificación oral y, en particular, comprimidos y cápsulas, por su facilidad de administración y, en consecuencia, mejor cumplimentación. Para los comprimidos y cápsulas es preferible que los ingredientes activos sean cristalinos. En una realización, el compuesto I es cristalino.

Los cristales que se usan en la presente invención pueden existir como solvatos, es decir, cristales en los que moléculas de disolvente forman parte de la estructura cristalina. El solvato se puede formar en agua, en cuyo caso

- 5 los solvatos se denominan a menudo hidratos. Alternativamente, los solvatos se pueden formar en otros disolventes tales como, por ejemplo, etanol, acetona o acetato de etilo. La cantidad exacta del solvato depende con frecuencia de las condiciones. Por ejemplo, los hidratos típicamente perderán agua con el aumento de la temperatura o a medida que disminuye la humedad relativa. Los compuestos que no se modifican, o lo hacen escasamente cuando varían las condiciones como, por ejemplo, la humedad, se consideran en general más apropiados para las formulaciones farmacéuticas. Se debe señalar que la sal de adición de ácido HBr no forma hidratos cuando precipita en agua, en tanto que compuestos tales como las sales de adición de ácido de succinato, maleato y tartrato sí lo hacen.
- 10 Algunos compuestos son higroscópicos, es decir, absorben agua cuando están expuestos a la humedad. La higroscopicidad se considera en general una propiedad indeseada para compuestos que se vayan a presentar en una formulación farmacéutica, en particular en formulaciones anhidras tales como comprimidos o cápsulas. En una realización, la invención ofrece cristales con baja higroscopicidad.
- 15 Para las formas de dosificación oral, el uso de ingredientes activos cristalinos también es beneficioso si dichos cristales están bien definidos. En el presente contexto, la expresión "bien definido" significa, en particular, que la estequiometría está bien definida, es decir, que la proporción entre los iones que forman la sal es la proporción entre números enteros bajos tales como 1:1, 1:2, 2:1, 1:1:1, etc. En una realización, los compuestos de la presente invención son cristales bien definidos.
- 20 La solubilidad de un ingrediente activo también es importante para la elección de la forma de dosificación, ya que puede tener un impacto directo sobre la biodisponibilidad. Para las formas de dosificación oral, se estima en general que una solubilidad mayor es beneficiosa porque aumenta la biodisponibilidad. Algunos pacientes, por ejemplo los de edad avanzada, pueden tener dificultades para tragar comprimidos y las soluciones orales en gotas pueden ser una alternativa apropiada para evitar la necesidad de tragar los comprimidos. Con el fin de limitar el volumen de una solución oral en gotas, es preciso disponer de una alta concentración del ingrediente activo en la solución, lo que, por su parte, requiere también una elevada solubilidad del compuesto. Como se muestra en la Tabla 3, las sales de adición de ácidos DL-láctico, L-aspártico, glutámico, glutárico y malónico poseen una solubilidad excepcionalmente alta.
- 25 Las formas cristalinas inciden sobre las propiedades de filtración y procesamiento de un compuesto. Los cristales en forma de aguja tienden a ser más difíciles de manejar en el ámbito de la producción, porque la filtración es más difícil y tarda más tiempo. La forma cristalina exacta de una sal determinada puede depender, por ejemplo, de las condiciones bajo las que ha precipitado la sal. La sal de adición de ácido HBr del compuesto I se desarrolla en cristales solvatados, con forma de aguja, cuando precipita en etanol, ácido acético y propanol, pero cuando la sal de adición de HBr precipita en agua, los cristales de una forma no hidratada, que no presentan forma de aguja, proporcionan propiedades superiores de filtración.
- 30 La Tabla 3 muestra también el pH resultante, es decir, el pH de la solución saturada de la sal. Esta propiedad es importante porque no es posible evitar por completo la humedad durante el almacenamiento, y la acumulación de humedad dará lugar a un descenso del pH en o sobre un comprimido que comprenda una sal de bajo pH resultante, lo cual puede reducir su vida útil. Adicionalmente, una sal con un bajo pH resultante puede provocar la corrosión del equipo de procesamiento si los comprimidos se fabrican por granulación húmeda. Los datos de la Tabla 3 señalan que, a este respecto, las sales de adición de ácidos HBr, HCl y adípico pueden ser superiores.
- 35 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de HBr en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de HBr muestra picos en un difractograma por rayos X de polvo (DRXP) a aproximadamente 6,08°, 14,81°, 19,26° y 25,38°2θ y, de manera particular, dicha sal de HBr tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 1.
- 40 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido D,L-láctico (1:1) en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición de ácido D,L-láctico muestra picos en el DRXP a aproximadamente 5,30°, 8,81°, 9,44° y 17,24°2θ y, de manera particular, dicha sal de adición de ácido DL láctico tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 4.
- 45 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido L-aspártico (1:1) en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición de ácido L-aspártico no está solvatada y muestra picos en un DRXP a aproximadamente 11,05°, 20,16°, 20,60°, 25,00°2θ y, de manera particular, cuando dicha sal de ácido L-aspártico se mezcla con ácido L-aspártico, tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 17. En una realización, dicha sal de adición de ácido L-aspártico es un hidrato, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicho hidrato de la sal de adición de ácido L-aspártico tiene picos en un DRXP a aproximadamente 7,80°, 13,80°, 14,10°, 19,63°2θ y, de manera particular, dicho hidrato de la sal de adición de ácido L-aspártico, cuando se mezcla con ácido L-aspártico, tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 18.
- 50
- 55

En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido glutámico (1:1) en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición de ácido glutámico muestra picos en un DRXP a aproximadamente 7,71°, 14,01°, 19,26°, 22,57°2θ y, de manera particular, dicha sal de ácido glutámico, cuando se mezcla con ácido glutámico monohidrato, tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 19.

5 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido malónico (1:1) en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición de ácido malónico es la forma α y tiene picos en un DRXP a aproximadamente 10,77°, 16,70°, 19,93°, 24,01°2θ, o dicha sal de adición de ácido malónico es la forma β y tiene picos en un DRXP a aproximadamente 6,08°, 10,11°, 18,25°, 20,26°2θ y, de manera particular, dicha sal de adición de ácido malónico tiene un DRXP como el que se muestra en las Figuras 9 o 10.

10 En una realización, el compuesto I es la sal de adición de ácido glutárico (1:1) en forma cristalina, en particular en una forma purificada. En una realización adicional, dicha sal de adición de ácido glutárico tiene picos en un DRXP a aproximadamente 9,39°, 11,70°, 14,05°, 14,58°2θ y, de manera particular, dicha sal de adición de ácido glutárico tiene un DRXP como el que se muestra en la Figura 8.

15 El exclusivo perfil farmacológico del compuesto I lo hace adecuado para el tratamiento de enfermedades distintas de las que se describen en el documento WO 03/029232. Los receptores 5-HT_{2C} están localizados, por ejemplo, en neuronas dopaminérgicas en las que la activación ejerce una influencia inhibitoria tónica sobre la liberación de dopamina, y los antagonistas de 5-HT_{2C} causarán un incremento de la concentración de dopamina. Los datos que se presentan en el Ejemplo 2E demuestran que el compuesto I efectivamente provoca este incremento dependiente de la dosis de las concentraciones extracelulares de dopamina en la corteza prefrontal. Basándose en estos
20 antecedentes, se puede plantear la hipótesis de que los antagonistas de 5-HT_{2C} son especialmente apropiados para el tratamiento de la depresión refractaria al tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) [*Psychopharmacol. Bull.*, 39, 147-166, 2006]. Esta hipótesis ha encontrado apoyo en varios estudios clínicos que demuestran que una combinación de mirtazapina e ISRS es superior al ISRS solo para el tratamiento de
25 pacientes deprimidos con una respuesta clínica inadecuada (depresión resistente al tratamiento, DRT, o depresión refractaria) [*Psychother. Psychosom.*, 75, 139-153, 2006]. Mirtazapina es también un antagonista de 5-HT₂ y de 5-HT₃, lo que indica que los compuestos que inhiben la recaptación de serotonina combinados con el antagonismo de 5-HT₂ y 5-HT₃, como lo hace el compuesto I, son útiles para el tratamiento de la DRT, es decir, aumentarán el índice de remisión en pacientes que sufren depresión resistente al tratamiento.

30 Los datos que se presentan en los Ejemplos 2F y 2G demuestran que el compuesto I provoca un aumento de la concentración extracelular de acetilcolina en la corteza prefrontal y el hipocampo ventral. Existen pruebas clínicas bien establecidas desde hace tiempo que evidencian que aumentar las concentraciones de acetilcolina en el cerebro es una forma de tratar la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo en general; véase el uso de inhibidores de acetilcolina esterasa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sobre estos fundamentos, se piensa que
35 los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo, así como también de los trastornos del estado de ánimo tales como la depresión asociada con la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo.

Una parte de los pacientes deprimidos responderá al tratamiento con antidepresivos tales como, por ejemplo, ISRS, en el sentido de que mejorarán en las escalas de depresión clínicamente relevantes tales como MADRD y HAMD, pero persistirán otros síntomas tales como los trastornos del sueño y el deterioro cognitivo. En el presente contexto,
40 se afirma que estos pacientes responden parcialmente. Debido a los efectos anteriormente analizados sobre las concentraciones de acetilcolina, se espera que los compuestos según la presente invención sean útiles en el tratamiento del deterioro cognitivo, además de la depresión. Estudios clínicos han demostrado que el compuesto prazosin, que es un antagonista del receptor α -1 adrenérgico, reduce los trastornos del sueño [*Biol. Psychiatry*, 61, 928-934, 2007]. Además, se cree que el antagonismo de 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} de los compuestos de la presente
45 invención tiene un efecto sedante, que mejora el sueño [*Neuropharmacol.*, 33, 467-471, 1994], por lo que el compuesto I es útil para el tratamiento de los pacientes que responden parcialmente o, en otras palabras, que el tratamiento con el compuesto I del paciente deprimido reducirá el número de pacientes que responden parcialmente.

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) es uno de los trastornos neuroconductuales más frecuentes. El TDAH se distingue por la presencia de una tríada de deterioros sociales y de la comunicación, con
50 comportamientos restringidos, repetitivos o estereotipados. El TDAH suele iniciarse en la infancia o la adolescencia, pero los síntomas pueden continuar en la edad adulta. En la actualidad, la atomoxetina es la única sustancia no estimulante aprobada por la FDA para el tratamiento del TDAH [*Drugs*, 64, 205-222, 2004]. La atomoxetina es un inhibidor de la recaptación de norepinefrina que también determina un incremento de la concentración de dopamina en la corteza prefrontal. Se ha propuesto que el aumento de concentración de dichos neurotransmisores actúa como
55 mediador sobre el efecto terapéutico de la atomoxetina en el tratamiento del TDAH [*Eur. Neuropsychopharmacol.*, 12, supl. 3, 418, 2002]. Esto avala la idea de que el compuesto I se puede utilizar en el tratamiento del TDAH. Además, los compuestos de la presente invención pueden tener un efecto sedante debido al antagonismo del receptor α -1 adrenérgico y 5-HT₂ citado anteriormente, lo cual es beneficioso en el tratamiento del TDAH. Como se muestra en el

Ejemplo 3, estudios en ratas demuestran que el compuesto I reduce la hiperactividad, la impulsividad y el déficit de atención.

La melancolía es un subtipo particular de depresión relacionada a menudo con la depresión grave; este tipo de depresión se designa también como depresión melancólica. La melancolía se asocia con ansiedad, miedo al futuro, insomnio y pérdida del apetito. Los compuestos que inhiben la recaptación tanto de serotonina como de norepinefrina tales como, por ejemplo, venlafaxina, han demostrado ser particularmente eficaces en el tratamiento de pacientes con depresión grave y melancolía [*Depres. Anxiety*, 12, 50-54, 2000].

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos que ejercen antagonismo de 5-HT_{2C} incrementan la concentración de dopamina, por lo que cabría esperar que estos compuestos fueran eficaces en el tratamiento de la melancolía [*Psychopharm. Bull.*, 39, 147-166, 2006]. Adicionalmente, se espera que el antagonismo del receptor α -1 adrenérgico y de 5-HT₂ del compuesto de la presente invención contribuya a normalizar el sueño, por lo que dichos compuestos son útiles en el tratamiento de la melancolía.

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

La dosificación oral típica se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal al día, administrada en una o más tomas tales como 1 a 3 tomas. La dosificación exacta dependerá de la frecuencia y del modo de administración, el sexo, edad, peso y estado general del sujeto tratado, de la naturaleza y gravedad del trastorno tratado y de cualquier enfermedad concomitante que se deba tratar, y de otros factores evidentes para los expertos en la técnica.

En el adulto, la dosificación oral típica está en el intervalo de 1 a 100 mg/día de un compuesto de la presente invención, tal como 1 a 30 mg/día, 5 a 25 mg/día o 5 a 60 mg/día. Típicamente, se pueden conseguir con la administración de 0,1 a 60 mg tal como, por ejemplo, 0,1 a 50 mg, 1 a 25 mg, 1 a 35 mg tales como 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 mg del compuesto I, una o dos veces al día.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto, como se usa en esta memoria, significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o interrumpir parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones, mediante una intervención terapéutica que comprende la administración de dicho compuesto. Una cantidad adecuada para lograr este objetivo se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". La expresión incluye también cantidades suficientes para curar, aliviar o interrumpir parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones en un tratamiento que comprende la administración de dicho compuesto. Las cantidades eficaces para cada objetivo dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse usando experimentación rutinaria, mediante la construcción de una matriz de valores y ensayando diferentes puntos de la matriz, todo lo cual se encuentra dentro de las habilidades habituales del médico experto.

Los términos "tratamiento" y "tratar", como se usan en esta memoria, significan el manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir una afección tal como una enfermedad o un trastorno. Los términos pretenden incluir el espectro total de tratamientos para una afección determinada que sufre el paciente, tal como administrar el compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, aliviar o calmar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como prevenir la afección, en donde prevención se debe entender como el manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir la enfermedad, trastorno o afección e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de síntomas o complicaciones. No obstante, los tratamientos profiláctico (preventivo) y terapéutico (curativo) son dos aspectos separados de la invención. El paciente que debe ser tratado es preferiblemente un mamífero, en particular un ser humano.

En una realización, la invención se refiere a 4-[2-(4-metilfenilsulfanyl)-fenil]-piperidina y sus sales de adición de ácido (compuesto I) para usar en el tratamiento del TDAH.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar solos, como un compuesto puro, o en combinación con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier adyuvante o excipiente conocido, de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, E. d., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera específica para su administración por cualquier vía adecuada tales como oral, rectal, nasal, pulmonar, tópica (incluidas bucal y sublingual), transcutánea, intracisternal, intraperitoneal, vaginal y parenteral (incluidas las vías subcutánea, intramuscular, intratecal, intravenosa e

- intradérmica), siendo preferible la vía oral. Se observará que la vía preferida dependerá del estado general y la edad del sujeto que se debe tratar, de la naturaleza de la afección que se debe tratar y del ingrediente activo elegido.
- 5 Las composiciones farmacéuticas para administración oral incluyen formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, comprimidos, grageas, píldoras, pastillas, polvos y gránulos. Cuando sea apropiado, se pueden preparar con recubrimientos.
- Formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires.
- 10 Composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones, dispersiones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas y no acuosas, inyectables, así como polvos estériles para reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles antes del uso.
- Otras formas de administración adecuadas incluyen supositorios, vaporizadores, ungüentos, cremas, geles, inhaladores, parches cutáneos, implantes, etc.
- 15 De manera conveniente, los compuestos de la invención se administran en una forma de dosificación unitaria que contiene dichos compuestos en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 50 mg tales como 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 o 35 mg del compuesto I.
- Para las vías parenterales tales como las administraciones intravenosa, intratecal, intramuscular y similares, las dosis típicas son de aproximadamente la mitad de la dosis empleada para la administración oral.
- 20 Para la administración parenteral se pueden emplear soluciones del compuesto de la invención en solución acuosa estéril, propilenglicol acuoso, vitamina E acuosa o aceite de sésamo o de cacahuete. Tales soluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas en caso necesario y el diluyente líquido se debe isotonzar en primer lugar con cantidades suficientes de solución salina o glucosa. Las soluciones acuosas son particularmente apropiadas para las administraciones intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Todos los medios acuosos estériles usados son fácilmente disponibles mediante métodos convencionales para los expertos en la técnica.
- 25 Vehículos farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes o cargas sólidas inertes, soluciones acuosas estériles y diversos disolventes orgánicos. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, *terra alba*, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y éteres de alquilo inferior de celulosa. Ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno y agua. Las composiciones farmacéuticas formadas por la combinación del compuesto de la invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables se administran, entonces, fácilmente en una variedad de formas de dosificación adecuadas para las vías de administración descritas.
- 30 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos, en donde cada una contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, y que pueden incluir un excipiente apropiado. Adicionalmente, las formulaciones disponibles para la vía oral pueden estar en forma de un polvo o gránulos, una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite.
- 35 Si se utiliza un vehículo sólido para la administración oral, la preparación puede ser un comprimido situado, por ejemplo, en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o granulado, o en forma de pastilla. La cantidad de vehículo sólido puede variar, pero habitualmente puede ser de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g.
- 40 Si se utiliza un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.
- Los comprimidos se pueden preparar mezclando el ingrediente activo con adyuvantes y/o diluyentes convencionales, y la posterior compresión de la mezcla en una máquina de fabricación de comprimidos habitual. Ejemplos de adyuvantes o diluyentes comprenden: almidón de maíz, almidón de patata, talco, estearato de magnesio, gelatina, lactosa, gomas y similares. Se puede utilizar cualquier otro adyuvante o aditivo usado habitualmente con estos fines, tales como colorantes, saborizantes, conservantes, etc. con la condición de que sean compatibles con los ingredientes activos.
- 45 Las cápsulas que comprenden un compuesto de la presente invención se pueden preparar mezclando un polvo que comprende dicho compuesto con celulosa microcristalina y estearato de magnesio, y depositando dicho polvo en una cápsula de gelatina dura. Opcionalmente, dicha cápsula se puede colorear mediante un pigmento adecuado.
- 50 Típicamente, las cápsulas comprenderán 0,25 a 20% de un compuesto de la presente invención, tales como 0,5 a 1,0%, 3,0 a 4,0%, 14,0 a 16,0% de un compuesto de la presente invención. Estas potencias se pueden usar para suministrar de manera conveniente 1, 5, 10, 15, 20 y 25 mg de un compuesto de la presente invención en una forma de dosificación unitaria.

Las soluciones para inyección se pueden preparar disolviendo el ingrediente activo y los posibles aditivos en una parte del disolvente para inyección, preferiblemente agua estéril, ajustar la solución al volumen deseado, esterilizar la solución y envasarla en ampollas o viales apropiados. Es posible agregar cualquier aditivo adecuado que se use convencionalmente en la técnica tales como agentes de tonicidad, conservantes, antioxidantes, etc.

- 5 El compuesto I se puede administrar solo o en combinación con otro compuesto terapéuticamente activo, en donde los dos compuestos se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Ejemplos de compuestos terapéuticamente activos que se pueden combinar ventajosamente con el compuesto I incluyen sedantes o hipnóticos tales como benzodiazepinas; anticonvulsivantes tales como lamotrigina, ácido valproico, topiramato, gabapentina, carbamazepina; estabilizantes del estado de ánimo tales como litio; medicamentos dopaminérgicos
- 10 tales como agonistas de la dopamina y L-dopa; medicamentos para tratar el TDAH tales como atomoxetina; psicoestimulantes tales como modafinilo, ketamina, metilfenidato y anfetamina; otros antidepresivos tales como mirtazapina, mianserina y bupropion; hormonas tales como T3, estrógeno, DHEA y testosterona; antipsicóticos atípicos tales como olanzapina y aripiprazol; antipsicóticos típicos tales como haloperidol; medicamentos para tratar la enfermedad de Alzheimer tales como inhibidores de la colinesterasa y memantina; folato; S-adenosil-metionina;
- 15 inmunomoduladores tales como interferones; opiáceos tales como buprenorfina; antagonistas del receptor I de angiotensina II (antagonistas de ATI); inhibidores de la ECA; estatinas; y antagonistas alfa-I adrenérgicos tales como prazosin.

- 20 El compuesto I se puede preparar de la forma descrita en los documentos WO 2003/029232 o WO 2007/144006. Se pueden obtener diferentes sales mediante la adición de un ácido apropiado a la base libre, seguido de precipitación. La precipitación se puede lograr, por ejemplo, por refrigeración, retirada del disolvente, adición de otro disolvente o una mezcla de los mismos.

- 25 El uso de los términos “un” y “una”, “el” y “la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención se debe considerar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en esta memoria o el contexto lo contraindique claramente. Por ejemplo, la frase “el compuesto” se debe entender que hace referencia a varios “compuestos” de la invención o a un aspecto particular descrito, salvo que se indique lo contrario.

- 30 Excepto que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en esta memoria son representativos de valores aproximados (por ejemplo, se puede considerar que todos los valores exactos que se ofrecen como ejemplo en relación con un factor o medición particular proporcionan también una medición aproximada correspondiente, modificada por el término “aproximadamente” cuando sea apropiado).

- 35 La descripción en esta memoria de cualquier aspecto o aspectos de la invención, en la que se utilicen expresiones tales como “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” o “que contiene” con referencia a uno o múltiples elementos, pretende ofrecer una base para un aspecto o aspectos similares de la invención que “consisten en”, “consisten esencialmente en” o “comprenden sustancialmente” esos elementos particulares, a menos que se indique lo contrario o esté claramente contraindicado por el contexto (por ejemplo, cuando se describe una composición en esta memoria, diciendo que comprende un elemento particular, se debe entender que se describe también una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique lo contrario o esté claramente contraindicado por el contexto).

Ejemplos

Métodos analíticos

- 40 Los difractogramas por rayos X de polvo (DRXP) se midieron en un difractómetro de rayos X PANalytical X'Pert PRO, utilizando la radiación $\text{CuK}_{\alpha 1}$. Se midieron las muestras en modo de reflexión en el intervalo 2θ 5 a 40° utilizando un detector X'celerator.

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

Ejemplo 1a: Sal de HBr del compuesto I

- 50 A 442 gramos de éster etílico de ácido 4-(2-p-tolilsulfanil-fenil)-piperidina-1-carboxílico, agitado y calentado ligeramente (aprox. a 45°C), en forma de aceite, se agregaron 545 ml de HBr al 33% en peso en AcOH (5,7 M, 2,5 eqv.). Esta mezcla da una exoterma de 10°C . Tras la adición final, la mezcla de reacción se calienta a 80°C y se deja durante 18 horas. Se extrae una muestra y se analiza por HPLC y, si no está completa, se debe agregar más HBr al 33% en peso en AcOH. De lo contrario, la mezcla se enfría a 25°C , provocando la precipitación del producto hidrobromuro de 4-(2-p-tolilsulfanil-fenil)-piperidina. Después de una hora a 25°C , se agregan a la suspensión espesa 800 ml de éter dietílico. Se continúa agitando durante una hora más antes de aislar el producto por filtración, se lava con 400 ml de éter dietílico y se seca al vacío a 40°C durante la noche. El hidrobromuro del compuesto I se aisló como un sólido blanco.
- 55

Ejemplo 1b: Sal de HBr del compuesto I

Bromuro de 2-(4-tolilsulfanil)-fenilo

5 En un reactor agitado, con recubrimiento de nitrógeno, se purgó N-metil-pirrolidona (NMP) (4,5 l) con nitrógeno durante 20 minutos. Se agregó 4-metil-bencenotiol (900 g, 7,25 mol) y, a continuación, 1,2-dibromo-benceno (1.709 g, 7,25 mol). Finalmente, se agregó terc-butóxido de potasio (813 g, 7,25 mol) como último reactante. La reacción fue exotérmica, provocando un aumento de temperatura de la mezcla de reacción a 70°C. Seguidamente, la mezcla de reacción se calentó a 120°C durante 2 a 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se agregó acetato de etilo (4 l) y solución acuosa de cloruro sódico (al 15%, 2,5 l). La mezcla se agitó durante 20 minutos. Se separó la fase acuosa y se extrajo con otra porción de acetato de etilo (2 l). Se separó la fase acuosa y las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con solución de cloruro sódico (al 15%, 2,5 l). Se separó la fase orgánica, se secó con sulfato sódico y se evaporó a presión reducida hasta formar un aceite de color rojo que contiene 20 a 30% de NMP. El aceite se diluyó hasta el doble de su volumen con metanol y la mezcla se sometió a reflujo. Se agregó más metanol hasta obtener una solución de color rojo claro. La solución se enfrió lentamente a temperatura ambiente mientras se sembraba. El producto cristaliza en forma de cristales de color blancuzco, que se aislaron por filtración y se lavaron con metanol y se secaron a 40°C en un horno de vacío hasta peso constante.

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

20 En un reactor agitado, bajo recubrimiento de nitrógeno, se suspendió bromuro de 2-(4-tolilsulfanil)-fenilo (600 g, 2,15 mol) en heptano (4,5 l). A temperatura ambiente se agregó BuLi 10 M en hexano (235 ml, 2,36 mol) durante 10 minutos. Sólo se observó una pequeña exoterma. La suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, se enfrió a -40°C. Se agregó 1-carboetoxi-4-piperidona (368 g, 2,15 mol) disuelto en THF (1,5 l) a una velocidad no mayor que la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de -40°C. Cuando se completó la reacción, se calentó a 0°C y se agregó HCl 1 M (1 l), manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. La fase acuosa ácida se separó y se extrajo con acetato de etilo (1 l). Las fases orgánicas se combinaron y se extrajeron con solución de cloruro sódico (al 15%, 1 l). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó hasta una masa semi-cristalina. Se suspendió con éter etílico (250 ml) y se retiró por filtración. Se secó en un horno al vacío a 40°C hasta peso constante.

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

30 En un reactor equipado con un agitador eficaz se cargaron ácido trifluoroacético (2,8 kg, 24,9 mol) y trietilsilano (362 g, 3,1 mol). A través de un embudo para polvo se agregó en porciones 4-hidroxi-4-(2-(4-tolilsulfanil)-fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo (462 g, 1,24 mol). La reacción fue ligeramente exotérmica. La temperatura aumentó a 50°C. Después de finalizar la adición, la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron tolueno (750 ml) y agua (750 ml). Se aisló la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con otra porción de tolueno (750 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con solución de cloruro sódico (al 15%, 500 ml) y se secaron sobre sulfato sódico. El sulfato sódico se retiró por filtración a presión reducida hasta obtener un aceite de color rojo que se procesó adicionalmente en la etapa siguiente.

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

40 El 4-(2-(4-tolilsulfanil)-fenil)-piperidin-1-carboxilato de etilo crudo, en forma de aceite de color rojo, del Ejemplo 3, se mezcló en un reactor agitado con ácido bromhídrico en ácido acético (al 40%, 545 ml, 3,11 mol). La mezcla se calentó a 80°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento, el producto cristalizó. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se agregó éter etílico (800 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla durante una hora adicional. El producto se retiró por filtración, se lavó con éter etílico y se secó en un horno al vacío a 50°C hasta peso constante.

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

45 Una mezcla de 10,0 gramos de la sal de HBr del compuesto I, preparada por ejemplo de la forma indicada anteriormente, se calentó a reflujo en 100 ml de H₂O. La mezcla adquirió un aspecto transparente y se disolvió por completo a 80-90°C. A la solución transparente se agregó 1 gramo de carbón y se continuó el calentamiento a reflujo durante 15 minutos, antes de filtrar y dejar enfriar de forma espontánea a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento tuvo lugar la precipitación de un sólido de color blanco y la suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La filtración y la desecación al vacío a 40°C durante la noche produjeron 6,9 gramos (69%) de la sal de adición de ácido HBr del compuesto I. Véase el DRXP en la Figura 1. Análisis elemental: 3,92% N, 59,36% C, 6,16% H (teórico: 3,85% N, 59,34% C, 6,09% H).

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

A una mezcla de 500 ml de acetato de etilo y 200 ml de H₂O se agregaron 50 gramos de la sal de HBr del compuesto I, produciendo una suspensión en dos fases. A esta suspensión se agregaron aproximadamente 25 ml

de NaOH conc. que determinó la formación de una solución transparente en dos fases (pH medido de 13-14). La solución se agitó vigorosamente durante 15 minutos y se separó la fase orgánica. La fase orgánica se lavó con 200 ml de H₂O, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó al vacío a 60°C, produciendo la base libre con un rendimiento de 38 gramos (99%) en forma de un aceite casi incoloro.

- 5 La disolución de 10 gramos del aceite y el ajuste del volumen a 150 ml usando acetato de etilo produjo una solución madre 0,235 M en acetato de etilo, de la cual se utilizaron partes alícuotas de 1,5 ml (100 mg de la base libre).

La disolución de 10 gramos del aceite y el ajuste del volumen a 100 ml usando EtOH al 96% en volumen produjo una solución madre 0,353 M en EtOH, de la cual se utilizaron partes alícuotas de 1,0 ml (100 mg de la base libre).

Ejemplo 1e: Formación de sales usando soluciones madre de la base libre

- 10 Las partes alícuotas suministradas se depositaron en tubos de ensayo y se agregó, con agitación, la cantidad apropiada de ácido, como se indica en la Tabla 1. Cuando el ácido estuvo en forma líquida, se agregó puro; en caso contrario, se disolvió en el disolvente indicado antes de la adición. Después de mezclar y precipitar, se continuó la agitación durante la noche y se recogió el precipitado por filtración. Antes de secar al vacío a 30°C, se retiró una pequeña muestra de referencia, que se secó a temperatura ambiente sin vacío. Este procedimiento se incluyó con el fin de analizar la presencia de solvatos. En la Tabla 1 se muestran algunos resultados. Los difractogramas por DRXP se muestran en las Figuras 1 a 22 y en la Tabla 2 se tabulan posiciones de picos seleccionados. La Tabla 3 muestra las solubilidades en agua de los compuestos de la presente invención, junto con el pH de la solución saturada resultante. La columna "Precipitado" muestra si el precipitado aislado tras la determinación de solubilidad es idéntico al compuesto disuelto, lo que indica la formación de hidratos.

- 20 Tabla 1

Ácido (Base:Ácido)	PM (g/mol)	Cantidad de ácido (mg o µl)	Disolvente	CHN (esperado)	CHN (teórico)
Ácido palmítico, ácido hexadecanoico 1:1	256,42	90,5	EtOAc	75,35 / 9,77 / 7,46	75,64 / 9,9 / 2,6
Ácido DL-láctico, ácido DL-2-hidroxi propiónico 1:1	90,1	31,8	EtOAc	66,88 / 7,26 / 3,52	67,53 / 7,29 / 3,75
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 1:1	146,14	51,6	EtOAc	66,08 / 7,23 / 2,98	67,1 / 7,27 / 3,26
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 2:1	146,14	25,8	EtOAc	70,66 / 7,32 / 3,82	70,75 / 7,35 / 3,93
Ácido fumárico 1:1	116,01	40,9	EtOAc	65,71 / 6,41 / 3,35	66,14 / 6,31 / 3,51
Ácido glutárico, ácido 1,5-pentanodioico 1:1	132,12	46,6	EtOAc	66,09 / 6,97 / 3,2	66,48 / 7,03 / 3,37
Ácido malónico 1:1	104,1	36,7	EtOAc	65,04 / 6,53 / 3,54	65,09 / 6,5 / 3,62
Ácido oxálico 1:1	90,1	31,8	EtOH	64,28 / 6,41 / 3,61	64,32 / 6,21 / 3,75
Ácido sebacoínico, ácido 1,8-octanodioico 2:1	202,02	35,6	EtOAc	71,79 / 7,86 / 3,58	71,83 / 7,86 / 3,64
Ácido succínico, ácido 1,4-butanodioico 2:1	118,1	20,8	EtOAc	65,65 / 6,86 / 3,4	65,80 / 6,78 / 3,49 (formación de sal 1:1)
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico	134,1	47,3	EtOAc	62,87 / 6,20 /	63,29 / 6,52 /

ES 2 399 305 T3

Ácido (Base:Ácido)	PM (g/mol)	Cantidad de ácido (mg o µl)	Disolvente	CHN (esperado)	CHN (teórico)
1:1, α				3,22	3,36
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico 1:1, β	134,1	47,3	EtOH	62,99 / 6,66 / 3,13	63,29 / 6,52 / 3,36
Ácido D-tartárico, ácido D-2,3-dihidroxi butanodioico 1:1	150,1	53,0	EtOH	60,67 / 6,4 / 3,07	60,95 / 6,28 / 3,23
Ácido (Base:Ácido)	PM (g/mol)	Cantidad de ácido (mg o µl)	Disolvente	CHN (esperado)	CHN (teórico)
Ácido L-aspartico 1:1	133,1	47,0	EtOH	59,31 / 6,7 / 7,1 (contiene exceso de ácido)	63,43 / 6,78 / 6,73
Ácido glutámico 1:1	165,15	58,3	EtOH	56,38 / 6,88 / 7,35 (contiene exceso de ácido)	56,46 / 6,94 / 7,06 (para la sal 1:1 y monohidrato ácido 1:1)
Ácido cítrico 2:1	192,13	33,9	EtOAc	65,93 / 6,72 / 3,44	66,46 / 6,64 / 3,69
HCl/Et ₂ O 1:1	2 M	176,4	EtOH		
Ácido fosfórico 1:1	14,7 M	24,0	EtOAc	55,79 / 6,47 / 3,43	56,68 / 6,34 / 3,67

Tabla 2: Posiciones de picos por rayos X seleccionados (°2θ), 2:1 significa 2 bases por 1 ácido. Todos los valores ± 0,1°

Palmitato	7,00	16,34	22,73	28,21
Estearato	6,70	15,512	21,81	28,91
Lactato	5,30	8,18	9,44	17,24
Lactato hidrato	11,67	16,70	18,25	21,76
Isobutirato de hidroxilo	5,09	16,60	20,38	27,37
Sal de ácido sebacoínico	7,18	12,53	21,11	24,19

ES 2 399 305 T3

Sal de ácido adipínico 2:1	8,03	13,52	17,90	24,60
Sal de ácido adipínico 1:1 α	9,33	14,01	18,72	20,63
Sal de ácido adipínico 1:1 β	15,69	21,53	25,81	31,18
Glutarato 1:1	9,39	11,70	14,05	14,58
Succinato 1:1	11,74	14,33	17,75	26,84
Fumarato 1:1	8,90	11,47	19,25	22,33
Fumarato 2:1	8,49	12,48	17,78	22,53
Maleato 1:1	12,11	15,51	17,48	22,53
Maleato 1:1 hidrato	12,81	18,76	20,53	27,31
Malonato α	10,77	16,70	19,93	24,01
Malonato β	6,08	10,11	18,25	20,36
Aspartato	11,05	20,1	20,60	25,00
Aspartato hidrato	7,80	13,80	14,10	19,63
Glutamato	7,71	14,01	19,26	22,57
Oxalato	14,68	17,45	19,50	23,90
Malato 1:1 α	8,30	12,04	17,23	20,67
Malato 1:1 β	10,91	12,87	14,14	26,16
Malato hidrato	12,30	15,56	19,56	23,20
D-tartrato (a partir de EtOH)	5,08	17,18	19,42	22,10
Hidrocloreuro	12,44	16,72	19,45	25,02
Hidrobromuro	6,08	14,81	19,26	25,38
Hidrobromuro de l-PrOH solvato	6,57	13,12	19,07	24,77

Tabla 3

Ácido (Base : Ácido)	Solubilidad (mg/ml)	pH resultante	Precipitado
Ácido palmítico, ácido hexadecanoico 1:1	0,4	8,6	= inicio
Ácido DL-láctico, ácido DL-2-hidroxi propiónico 1:1	>150	6,1	= inicio (después de evaporar)
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 1:1	2,5	4,0	Parcialmente sal 2:1
Ácido adípico, ácido 1,6-hexanodioico 2:1	1,0	7,8	= inicio
Ácido fumárico 1:1	0,2	3,3	= inicio
Ácido glutárico, ácido 1,5-	13	4,6	= inicio

Ácido (Base : Ácido)	Solubilidad (mg/ml)	pH resultante	Precipitado
pentanodioico 1:1			
Ácido malónico 1:1 (α)	5,2	4,0	= nueva forma (β)
Ácido oxálico 1:1	1,1	2,7	= inicio
Ácido sebacoínico, ácido 1,8-octanodioico 2:1	0,7	5,5	= inicio
Ácido succínico, ácido 1,4-butanodioico 2:1	2,0	4,0	Hidrato
Ácido L-málico, ácido L-2-hidroxi butanodioico 1:1, β	2,8	4,0	Hidrato
Ácido D-tartárico, ácido D-2,3-dihidroxi butanodioico 1:1	1,8	3,5	Hidrato
Ácido L-aspartico 1:1	39	4,3	Hidrato
Ácido glutámico 1:1	>35	4,6	-
Ácido cítrico 2:1	0,5	4,7	= inicio
Ácido fosfórico 1:1	6,0	2,0	?
HCl	4,5	6,8	= inicio
HBr	2,4	7,0	= inicio

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

- Partes alícuotas del compuesto de ensayo y una preparación de sinaptosoma cortical de rata se preincubaron durante 10 min/37°C y, a continuación, se agregó [³H]NE o [³H]5-HT (concentración final 10 nM). Se determinó la captación inespecífica en presencia de talsupram o citalopram 10 μ M y se determinó la captación total en presencia de una solución tampón. Se incubaron partes alícuotas durante 15 min a 37°C. Después de la incubación, la [³H]NE o [³H]5-HT captada por los sinaptosomas se separó por filtración usando un GF/C Unifilter pre-empapado en PEI al 0,1% durante 30 minutos, empleando un programa Tomtec Cell Harvester. Los filtros se lavaron y se sometieron a recuento en un contador Wallac MicroBeta.
- 5 En NET, el compuesto I muestra un valor de CI_{50} de 23 nM. En SERT, el compuesto I muestra un valor de CI_{50} de 8 nM.

Ejemplo 2B: Antagonismo 5-HT_{2A}

- Se estudió la afinidad del compuesto I por los receptores de serotonina y se demostró que exhibía un perfil antagonista con afinidad por los receptores 5-HT_{2A} (K_i 54 nM). La afinidad se calcula a partir de $Y = 100/(1+10^{(X-\log CI_{50})})$, en donde Y representa el % de unión y X representa la concentración del compuesto. Se utilizaron 5 concentraciones del compuesto (1, 10, 30, 100, 1000 nM) para calcular el valor de CI_{50} . K_i se calculó a partir de la ecuación de Cheng Prusoff, $K_i = (CI_{50}/(1+([L]/K_d)))$. La afinidad se determinó en MDL Pharmaservices, número de catálogo 271650.
- 15 En células de mamífero que expresan receptores de 5-HT_{2A} humanos, el compuesto I exhibe propiedades antagonistas competitivas. El compuesto se une a los receptores de 5-HT_{2A} con una K_i de <100 nM y, en un ensayo funcional, los compuestos antagonizan la liberación de Ca²⁺ provocada por 5-HT desde los depósitos intracelulares con una K_b de 67 nM. Un análisis de Schild reveló un antagonismo competitivo con una K_b de 100 nM.
- 20

- El experimento se llevó a cabo de la siguiente forma: 2 o 3 días antes del ensayo, se siembran en placa células CHO que expresan 250 fmol/mg de receptores de 5-HT_{2A} humanos, con una densidad suficiente para dar una monocapa confluyente el día del experimento. Se cargan las células con tinción (kit de Ca²⁺ de Molecular Devices) durante 60
- 25

minutos a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ a 95% de humedad. En un lector de placa fluorométrico o FLIPR³⁸⁴, de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) se analizó la fluorescencia basal, con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un intervalo de emisión de 500 a 560 nm. La intensidad del láser se estableció en un nivel adecuado para obtener valores basales de aproximadamente 8.000 a 10.000 unidades de fluorescencia. La variación de fluorescencia basal debe ser menor de 10%. Los valores de CE₅₀ se evalúan usando concentraciones crecientes del compuesto de ensayo que abarcan al menos 3 décadas. Los valores de pA₂ se evalúan mediante una prueba de estimulación de las curvas de respuesta a la dosis completa de 5-HT con cuatro concentraciones diferentes del compuesto (150, 400, 1.500 y 4.000 nM). También se evaluaron los valores de K_b mediante la estimulación de 2 décadas de concentraciones de las sustancias de ensayo con CE₈₅ de 5-HT. Las sustancias de ensayo se agregan a las células 5 minutos antes de la 5-HT. Los valores de K_i se calculan usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Ejemplo 2C: Antagonismo del receptor de 5-HT_{2A}

En oocitos que expresan receptores de 5-HT_{3A} homómeros humanos, 5-HT activa las corrientes con una CE₅₀ de 2.600 nM. Esta corriente se puede antagonizar con antagonistas clásicos de 5-HT₃ tales como ondansetron. Ondansetron exhibe un valor de K_i menor que 1 nM en este sistema. Los compuestos de la presente invención muestran un potente antagonismo a concentraciones bajas (0,1 nM – 100 nM) (CI₅₀ ~ 10 nM/K_b ~ 2 nM) y propiedades agonistas cuando se aplican en concentraciones mayores (100 a 100.000 nM) (CE₅₀ ~ 2.600 nM), alcanzando una corriente máxima de aproximadamente 70 a 80% de la corriente máxima generada por la propia 5-HT. En oocitos que expresan receptores de 5-HT_{3A} homómeros de rata, 5-HT activa las corrientes con una CE₅₀ de 3,3 nM. Los experimentos se llevaron a cabo del modo siguiente: Se extrajeron quirúrgicamente oocitos de ranas hembras maduras *Xenopus laevis* anestesiadas en MS-222 al 0,4% durante 10 a 15 min. Seguidamente, los oocitos se sometieron a digestión a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas con 0,5 mg/ml de colagenasa (tipo IA, Sigma-Aldrich) en solución tampón OR2 (NaCl 82,5 mM, KCl 2,0 mM, MgCl₂ 1,0 mM y HEPES 5,0 mM, pH 7,6). Se seleccionaron oocitos desprovistos de la capa folicular y se incubaron durante 24 horas en solución tampón Salina de Barth Modificada [NaCl 88 mM, KCl 1 mM, HEPES 15 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, Ca(NO₃)₂ 0,3 mM], suplementada con piruvato sódico 2 mm, 0,1 U/l de penicilina y 0,1 µg/l de estreptomicina. Se identificaron los oocitos en Estadio IV-IV y se inyectaron 12 a 48 nl de agua exenta de nucleasa que contuvo 14 a 50 pg de ARNc que codifica los receptores de los receptores de 5-HT_{3A} humanos, y se incubaron a 18°C hasta que fueron utilizados para los registros de electrofisiología (1 a 7 días después de la inyección). Los oocitos que expresaron receptores de 5-HT_{3A} humanos se depositaron en un baño de 1 ml y se perfundieron con solución tampón de Ringer (NaCl 115 mM, KCl 2,5 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,1 mM, pH 7,5). Las células se insertaron en electrodos de 0,5 a 1 MΩ bloqueados con agar que contuvieron KCl 3 M y el voltaje fijado a -90 mV por medio de un amplificador GeneClamp 500B. Los oocitos se sometieron a una perfusión continua con solución tampón de Ringer y los medicamentos se aplicaron sobre el perfundido. Se aplicaron soluciones de agonista de 5-HT durante 10 a 30 segundos. Se examinaron las potencias de los antagonistas del receptor de 5-HT₃ midiendo la respuesta a la concentración frente a una estimulación de 5-HT 10 µM.

Ejemplo 2D: Antagonismo del receptor α_{1A}

Se examinó la afinidad del compuesto I por el receptor α_{1A} y se encontró que muestra un perfil antagonista con una afinidad media por los receptores α_{1A} (K_i = 34 nM).

El día de los experimentos, las membranas (véase más adelante la descripción de la preparación de las membranas) se descongelan y homogeneizan en solución tampón usando un dispositivo Ultra Turrax, y se diluyen hasta la concentración deseada (5 µg/pocillo ~ 5 µg/900 µl, conservar en hielo hasta su uso).

El experimento se inicia mezclando 50 µl del compuesto de ensayo, 50 µl de [H³]-prazosin y 900 µl de membranas; la mezcla se incuba durante 20 minutos a 25°C. Se determina la unión no específica en presencia de WB-4101 10 µM y se determina la unión total en presencia de la solución tampón. Después de la incubación, el ligando fijado se separa del no fijado por filtración a través de GF/B Unifilter pre-empapado en PEI al 0,1% durante 30 minutos, usando un programa Tomtec Cell Harvester (D4.2.4). 96 pocillos. Los filtros se lavan 3 veces con 1 ml de solución tampón helada, se secan a 50°C y se agregan 35 µl de líquido de escintilación/pocillo a los filtros. Se realiza un recuento de la radiactividad fijada en un sistema Wallac OY 1450 MicroBeta. La afinidad se calcula de $Y = 100 / (1 + 10^{(X - \log CI_{50})})$, en donde Y representa el % de unión y X representa la concentración del compuesto. Se usaron concentraciones del compuesto que abarcan 2 décadas para calcular el valor de CI₅₀. K_i se calculó a partir de la ecuación de Cheng-Prusoff ($K_i = (CI_{50} / (1 + ([L] / K_d)))$).

En un ensayo funcional, el compuesto I antagoniza la liberación de Ca²⁺ provocada por la adrenalina desde los depósitos intracelulares, y un ensayo funcional demostró que los compuestos fueron antagonistas.

Estos experimentos se llevaron a cabo esencialmente de la forma descrita a continuación.

Todas las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de BCS, L-glutamina 4 mM (o 2 nM en el caso de COS-7), y 100 unidades/ml de penicilina más 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C, en CO₂ al 5%.

24 horas antes de los ensayos, se sembraron células CHO que expresan receptores alfa_{1A-7} humanos en placas de microtitulación de pared negra, de 384 pocillos, recubiertas con poli-D-lisina. Se aspiró el medio de cultivo y las células se cargaron con tinción con Fluo-4 1,5 μ M en solución tampón de ensayo compuesta por Solución Salina Equilibrada de Hank (NaCl 138 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 0,5 mM, MgSO₄ 0,4 mM, KH₂PO₄ 0,3 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, glucosa 5,6 mM) más HEPES 20 mM, pH 7,4, 0,05% de SBF y probenecid 2,5 mM (50 μ l/pocillo) durante 1 hora en 5% de CO₂ a 37°C. Después de desechar el exceso de tinción, las células se lavaron en solución tampón de ensayo y se depositaron formando capas con un volumen final igual a 45 μ l/pocillo (o 30 μ l/pocillo para el ensayo de antagonismo). En el caso de la evaluación del antagonista, se agregó en este momento antagonista o vehículo, como una parte alícuota de 15 μ l en solución tampón que contuvo 4% de DMSO a 4 veces la concentración final (DMSO final = 1%), seguido de una incubación de 20 min. Se monitorizó la fluorescencia basal en un lector de placas de imágenes fluorométricas o FLIPR® de Molecular Devices (Sunnyvale, CA), con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un intervalo de emisión de 500 a 560 nm. La energía de excitación láser se ajustó de modo que las lecturas de fluorescencia basal fueron de aproximadamente 8.000 unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés). Seguidamente, las células se estimularon a temperatura ambiente con agonista diluido en solución tampón de ensayo (15 μ l) y se midieron las RFU a intervalos de 1,5 segundos durante un periodo de 2,5 minutos. Se calculó la variación máxima de fluorescencia para cada pocillo. Las curvas de respuesta a la concentración, derivadas de la variación máxima de fluorescencia, se analizaron por regresión no lineal (ecuación de Hill). Para las determinaciones antagonistas, después de 20 min de incubación del compuesto (como antes), se agregaron concentraciones fijas del agonista convencional serotonina.

20 Ejemplo 2D: Incremento de dopamina

Una única inyección de compuesto I aumentó de forma dependiente de la dosis las concentraciones extracelulares de DA en la corteza frontal de la rata. El compuesto de la presente invención a 8,9 mg/kg y 18 mg/kg, por vía s.c., reforzó las concentraciones de DA en aproximadamente 100% y 150%, respectivamente, por encima de los niveles basales, tal como se muestra en la Figura 23. Las cantidades se calculan como la base libre.

25 Método

Se usaron ratas Sprague-Dawley machos, con un peso inicial de 275 a 300 g. Los animales se alojaron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, bajo condiciones controladas para la temperatura (21 \pm 2°C) y humedad interiores (55 \pm 5%), con libre acceso al alimento y agua potable. Para los experimentos de tratamiento de tres días se utilizaron minibombas osmóticas (Alzet, 2ML1). Las bombas se cargaron e implantaron bajo condiciones asépticas, de forma subcutánea bajo anestesia de sevoflurano. Los experimentos se llevaron a cabo con las minibombas implantadas. Al final de los experimentos, se tomaron muestras de sangre para medir las concentraciones plasmáticas del compuesto de ensayo después de 3 días de tratamiento.

Cirugía y experimentos de microdialísis

Los animales se anestesiaron con Hypnorm/Dormicum (2 ml/kg) y se implantaron de forma estereotáxica cánulas de guía intracerebral (CMA/12) en el hipocampo, situando el extremo de la sonda de diálisis en el hipocampo ventral (coordenadas: 5,6 mm anterior al bregma, lateral -5,0 mm, 7,0 mm ventral con respecto a la duramadre), o en la corteza frontal (coordenadas: 3,2 mm anterior al bregma; lateral, 3,0 mm; 4,0 mm ventral con respecto a la duramadre). Se utilizaron tornillos de fijación y cemento acrílico para fijar las cánulas de guía. Se monitorizó la temperatura corporal de los animales por medio de una sonda rectal, manteniéndola a 37°C. Se dejó a las ratas recuperarse de la cirugía durante 2 días, alojadas individualmente en jaulas. El día del experimento, se insertó una sonda de microdialísis (CMA/12, 0,5 mm de diámetro, 3 mm de longitud) a través de la cánula de guía. Las sondas se conectaron a través de un doble canal pivotante a una bomba de microinyección. Se inició la perfusión de la sonda de microdialísis con solución de Ringer filtrada (NaCl 145 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,2 mM) poco después de la inserción de la sonda en el cerebro y continuó durante el experimento con un caudal constante de 1 (1,3) μ l/min. Después de 180 min de estabilización, se iniciaron los experimentos. Los dializados se recogieron cada 20 (30) min.

Después de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se extrajeron sus cerebros, se congelaron y se cortaron en secciones para verificar la colocación de las sondas.

Análisis de los dializados

La concentración de dopamina en los dializados se analizó mediante HPLC con detección electroquímica. Las monoaminas se separaron por cromatografía líquida de fase inversa (ODS 150 x 3 mm, 3 μ M). Dopamina: fase móvil consistente en NaH₂PO₄ 90 mM, citrato sódico 50 mM, 367 mg/l de ácido 1-octanosulfónico sódico, EDTA 50 μ M y 8% de acetonitrilo (pH 4,0), con un caudal de 0,5 ml/min. La detección electroquímica se llevó a cabo con un detector colorimétrico; potencial fijado en 250 mV (célula de guardia a 350 mV) (Coulochem II, ESA).

55

Ejemplo 2F: Incremento de acetilcolina

El experimento se diseñó para evaluar los efectos del compuesto I sobre las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal de ratas que se mueven libremente.

5 Para los experimentos se usaron ratas Wistar machos (280 a 350 g; Harlan, Zeist, Holanda). Las ratas se alojaron en jaulas plásticas individuales (30x30x40 cm) y tuvieron libre acceso al alimento y agua.

10 Las ratas se anestesiaron usando isoflurano (al 2%, 400 ml/min de N₂O, 400 ml/min de O₂). Para la anestesia local se usó lidocaína (al 10% m/v). Cada animal se colocó en un marco estereotáxico (Kopf Instruments, EE.UU.) y se insertaron sondas en forma de "I" fabricadas específicamente (membrana Hospal AN 69, superficie expuesta 4 mm) en la corteza prefrontal medial (mPFC), utilizando el atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1982). Las coordenadas para el extremo de la sonda fueron mPFC [AP = 3,4 mm, L = -0,8 mm, V = 5,0 mm]. A continuación, la sonda se fijó al cráneo con cemento dental y un tornillo. Como anestésico postoperatorio se administró Flunixin (1 mg/kg, s.c.).

15 Los experimentos se llevaron a cabo 24 a 48 horas después de la intervención quirúrgica. El día del experimento, las ratas se conectaron mediante tubos PEEK flexibles a bombas de microperfusión (CMA 102) y las sondas de diálisis se perfundieron con solución tampón de Ringer que contuvo NaCl 147 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM y MgCl₂ 1,2 mM, con un caudal de 1,5 µl/min. Las muestras de microdiálisis se recogieron a intervalos de 30 min en mini-viales que contuvieron 55 µl de ácido fórmico 0,02 M para la determinación de acetilcolina. Las muestras se recolectaron por medio de un recolector de fracciones automatizado (CMA 142) y se conservaron a -80°C hasta el análisis. Después de finalizar los experimentos, las ratas fueron sacrificadas. Se extrajeron los cerebros y se introdujeron en solución de paraformaldehído (4% m/v). Se verificó histológicamente la colocación de cada sonda de acuerdo con Paxinos y Watson (1982) mediante la realización de cortes coronales del cerebro.

20 El compuesto de ensayo se disolvió en 2-OH-propil-beta-ciclodextrina al 10%, y la administración tuvo lugar por inyección subcutánea de volúmenes de 5 ml/kg en dosis diferentes.

25 Las concentraciones de acetilcolina se determinaron por HPLC con detección por espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

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

35 Los análisis de LC/MS se llevaron a cabo usando un sistema API 4000 MS/MS consistente en un detector API 4000 MS/MS y una interfase Turbo Ion Spray (ambos de Applied Biosystems, Holanda). Las adquisiciones se realizaron en modo de ionización positiva, situando el voltaje de pulverización iónica en 5,5 kV, la presión de gas de nebulización a 3,4 bar (en una escala SCIEX 0-90), con una temperatura de sonda de 600°C. El instrumento se hizo funcionar en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM) para la detección de acetilcolina (precursor 146,1 Da, producto 86,8 Da). La energía de colisión fue de 21,0 eV y la presión de gas de colisión (nitrógeno) se mantuvo en 7 (en una escala SCIEX de 0-12). Los datos se calibraron y cuantificaron usando el sistema de datos Analyst® (Applied Biosystem, versión 1.2).

40 Como valor basal se tomaron dos muestras consecutivas de microdiálisis con menos de 50% de variación y se establecieron como 100%. Las variaciones de concentración de acetilcolina se expresaron como porcentaje del valor basal en el mismo individuo.

Los datos se muestran en la Figura 24.

45 Ejemplo 2G: Incremento de acetilcolina

El experimento se diseñó para evaluar los efectos del compuesto I sobre las concentraciones extracelulares de acetilcolina en la corteza prefrontal y el hipocampo ventral de ratas que se mueven libremente.

50 Se usaron ratas Sprague-Dawley machos, con un peso inicial de 275 a 300 g. Los animales se alojaron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, bajo condiciones controladas de temperatura (21±2°C) y humedad interiores (55±5%), con acceso libre al alimento y agua potable.

Cirugía y experimentos de microdiálisis

- Los animales se anestesiaron con Hypnorm/Dormicum (2 ml/kg) y se implantaron de forma estereotáxica cánulas de guía intracerebral (CMA/12) en el hipocampo, situando el extremo de la sonda de diálisis en el hipocampo ventral (coordenadas: 5,6 mm posterior al bregma, lateral -5,0 mm, 7,0 mm ventral con respecto a la duramadre), o en la corteza frontal (coordenadas: 3,2 mm anterior al bregma; lateral, 3,0 mm; 4,0 mm ventral con respecto a la duramadre). Se utilizaron tornillos de fijación y cemento acrílico para fijar las cánulas de guía. Se monitorizó la temperatura corporal de los animales por medio de una sonda rectal, manteniéndola a 37°C. Se dejó a las ratas recuperarse de la cirugía durante 2 días, alojadas individualmente en jaulas. El día del experimento, se insertó una sonda de microdiálisis (CMA/12, 0,5 mm de diámetro, 3 mm de longitud) a través de la cánula de guía.
- Las sondas se conectaron a través de un doble canal pivotante a una bomba de microinyección. Se inició la perfusión de la sonda de microdiálisis con solución de Ringer filtrada (NaCl 145 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1,2 mM, que contuvo neostigmina 0,5 µM) poco después de la inserción de la sonda en el cerebro y continuó durante el experimento con un caudal constante de 1 µl/min. Después de 180 min de estabilización, se iniciaron los experimentos. Los dializados se recogieron cada 20 min. Después de los experimentos, los animales fueron sacrificados, se extrajeron sus cerebros, se congelaron y se realizaron cortes para verificar la colocación de la sonda.

Análisis de acetilcolina en el dializado

- La concentración de acetilcolina (ACh) en los dializados se analizó mediante HPLC con detección electroquímica, usando una fase móvil consistente en hidrógeno-fosfato disódico 100 mM, ácido octanosulfónico 2,0 mM, cloruro de tetrametil-amonio 0,5 mM y 0,005% de MB (ESA), pH 8,0. Con un reactor enzimático con pre-columna (ESA) que contiene colina oxidasa inmovilizada se eliminó la colina de la muestra inyectada (10 µl) antes de la separación de ACh en la columna analítica (ESA ACH-250); caudal 0,35 ml/min, temperatura: 35°C. Después de la columna analítica la muestra se hizo pasar a través de un reactor con columna posterior en fase sólida (ESA) que contuvo acetilcolinesterasa inmovilizada y colina oxidasa. Este último reactor convirtió la ACh en colina y posteriormente la colina en betaina y H₂O₂. Esta última fue detectada electroquímicamente utilizando un electrodo de platino (célula analítica: ESA, modelo 5040).

Presentación de datos

- En los experimentos con una única inyección, el valor medio de 3 muestras de ACh consecutivas inmediatamente anteriores a la administración del compuesto sirvió como concentración basal para cada experimento y los datos se convirtieron en porcentaje del valor basal (valores medios de la inyección previa basal homologados a 100%). Los datos se presentan en las Figuras 25a y 25b.

- Los datos presentados en la Figura 24 muestran descensos inesperados de los niveles de acetilcolina (véase, por ejemplo, 8 mg/kg) que son difíciles de explicar y que se atribuyen a incertidumbre experimental. En general, ambos conjuntos de datos de los Ejemplos 2F y 2G muestran lo mismo, es decir un aumento dependiente de la dosis de las concentraciones de acetilcolina extracelular en el cerebro. Cabe esperar que este hallazgo preclínico se traduzca en una mejora en el conocimiento en el ámbito clínico que resulte de utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una insuficiencia cognitiva tales como, por ejemplo, los pacientes con Alzheimer, los pacientes que responden parcialmente, deterioro cognitivo, etc.

Ejemplo 3: Efectos del compuesto I en ratas espontáneamente hipertensas – modelo animal de TDAH

- Los síntomas centrales del TDAH son déficit de atención, hiperactividad y aumento de la impulsividad. Se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés) como modelo animal del trastorno del déficit de atención e hiperactividad (TDAH); ratas Wistar Kyoto (la cepa original de SHR) sirvieron de control [*Biol. Psychiatry*, 57, 1239-47, 2005]. Para evaluar estos síntomas, se usó un condicionamiento operante que comprendió el retraso de la recompensa con alimento para medir los parámetros relacionados con la atención y la impulsividad. Los déficits de atención se midieron como un incremento del número de veces que el animal presionó la palanca en el lado equivocado. La impulsividad se midió como las presiones de palanca y las inspecciones de las cámaras de recompensa durante el estado OFF en las sesiones de ensayo sin retraso de la recompensa, y durante el intervalo de retraso en las sesiones de ensayo con recompensa retrasada. La hiperactividad se monitorizó mediante registros circadianos en las jaulas mediante infrarrojos.

- Las ratas SHR y Wistar Kyoto no difirieron de forma marcada en la adquisición de la tarea. Además, los dos grupos de vehículo de ratas SHR y Wistar Kyoto mostraron, en general, la misma motivación para la búsqueda de alimento, que se reflejó en un mismo número de recompensas obtenidas. Las ratas SHR exhibieron un ligero déficit de atención en comparación con las ratas Wistar Kyoto. La impulsividad estuvo marcadamente aumentada en las ratas SHR, comparadas con las ratas Wistar Kyoto, observándose asimismo hiperactividad.

- Grupos de ensayo: un grupo de ratas Wistar Kyoto como controles, un grupo de ratas SHR tratadas con vehículo (control negativo), dos grupos de SHR tratadas de forma intermitente con metilfenidato (2 mg/kg y 5 mg/kg, i.p.,

grupos de referencia), un grupo de SHR tratadas de manera crónica con metilfenidato a través del agua de bebida (dosis alcanzada: ~ 10 mg/kg/día), y dos grupos de SHR tratadas intermitentemente con el compuesto I (5 mg/kg y 10 mg/kg de base libre).

5 Métodos: el ensayo operante se llevó a cabo en sesiones de 20 horas, realizadas en jaulas de condicionamiento operante con dos palancas y cámaras de recompensa adyacentes, situadas a la derecha y a la izquierda del panel de palancas. Los animales tenían acceso al alimento sólo mediante pulsaciones de las palancas, en tanto que el agua estuvo disponible libremente. El entrenamiento y los ensayos consistieron en las fases siguientes:

Fase de adquisición (sin tratamiento)

- 10 (1) Ambas palancas estuvieron continuamente activas (indicadas por una señal luminosa). Cada pulsación de palanca dio lugar a la presentación inmediata de una recompensa en la cámara de recompensa adyacente, señalada por una única luz del habitáculo.
- (2) Similar a (1), con la excepción de que una palanca estuvo activa en un momento determinado, alternando con un ritmo de cinco minutos entre el lado derecho y el izquierdo. La señal luminosa indicó el lado correcto.
- 15 (3) Similar a (2), excepto que la palanca del lado correcto se inactivó cada 20 segundos durante un periodo de 20 segundos. La señal luminosa del lado correcto indicó el estado de la palanca (ON u OFF).

Fase de ensayo (durante el tratamiento)

- (1) Similar a Adquisición (3)
- 20 (2) Similar a (1), excepto que después de pulsar la palanca activa, la recompensa no se presentó de inmediato, sino con un intervalo de retraso de 5 segundos. Durante este tiempo, la señal luminosa correspondiente estuvo en OFF y la palanca se inactivó.
- (3) Similar a (2), pero con un intervalo de retraso de 10 segundos.
- (4) Similar a (3), pero con un intervalo de retraso de 20 segundos.

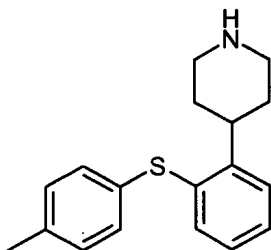
25 El compuesto I a las dos dosis estudiadas (5 y 10 mg/kg, i.p., inyectadas 30 min antes del ensayo) ejerció efectos significativos en las ratas SHR. Estos efectos no afectaron a la adquisición de la tarea ni a la motivación general de búsqueda de alimentos, pero se redujeron los déficits de atención y la impulsividad, junto con la hiperactividad – la actividad motora disminuyó de forma dependiente de la dosis durante la monitorización circadiana de la actividad durante 1 hora, sin efectos prolongados. En la Figura 26 se proporciona un gráfico representativo que muestra los efectos del compuesto I sobre los déficits de atención y la impulsividad en ratas SHR.

30 El metilfenidato no mostró efectos consistentes sobre el condicionamiento operante; no hubo reducciones del déficit de atención ni de la impulsividad. La administración intermitente de metilfenidato agravó marcadamente, de forma dependiente de la dosis, la hiperactividad de las ratas SHR. El efecto duró algunas horas. La administración crónica no alteró la evolución en el tiempo de la actividad.

35 Los resultados de este modelo indican que el compuesto I afecta la impulsividad y la atención por un mecanismo diferente del de metilfenidato. La ausencia de efecto de metilfenidato en este modelo podría deberse al hecho de que metilfenidato ha demostrado ser eficaz en ratas adolescentes, pero no en las adultas [*Psychopharmacology* (Berl), 193(2), 215-23, 2007].

REIVINDICACIONES

1. 4-[2-(4-metilfenilsulfanil)-fenil]-piperidina



- 5 y sus sales de adición de ácido, para usar en el tratamiento del TDAH.
2. El compuesto para ser usado según la reivindicación 1, el cual es la sal de adición de HBr.
3. El compuesto para ser usado según la reivindicación 2, el cual se caracteriza por picos en un DRXP en aproximadamente 6,08, 14,81, 19,26 y 25,38°2θ.
- 10 4. El compuesto para ser usado según la reivindicación 3, el cual se caracteriza por un DRXP como el que se muestra en la Figura 1.
5. El compuesto para ser usado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual se administra a 5-60 mg/día.

DRXP sal de HBr

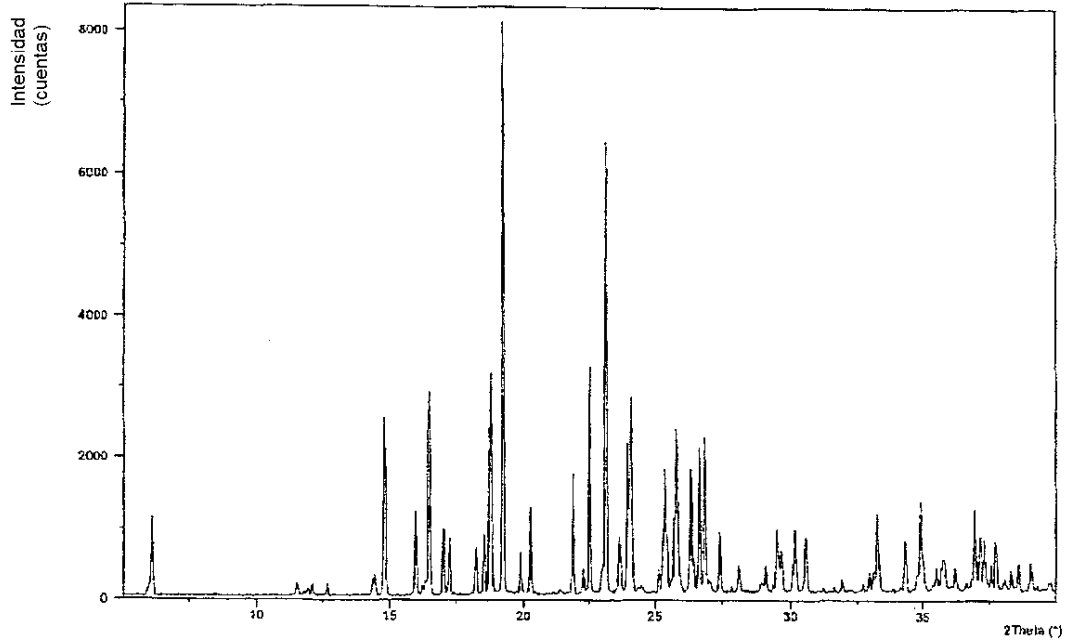


Fig. 1

Sal de HBr, solvato

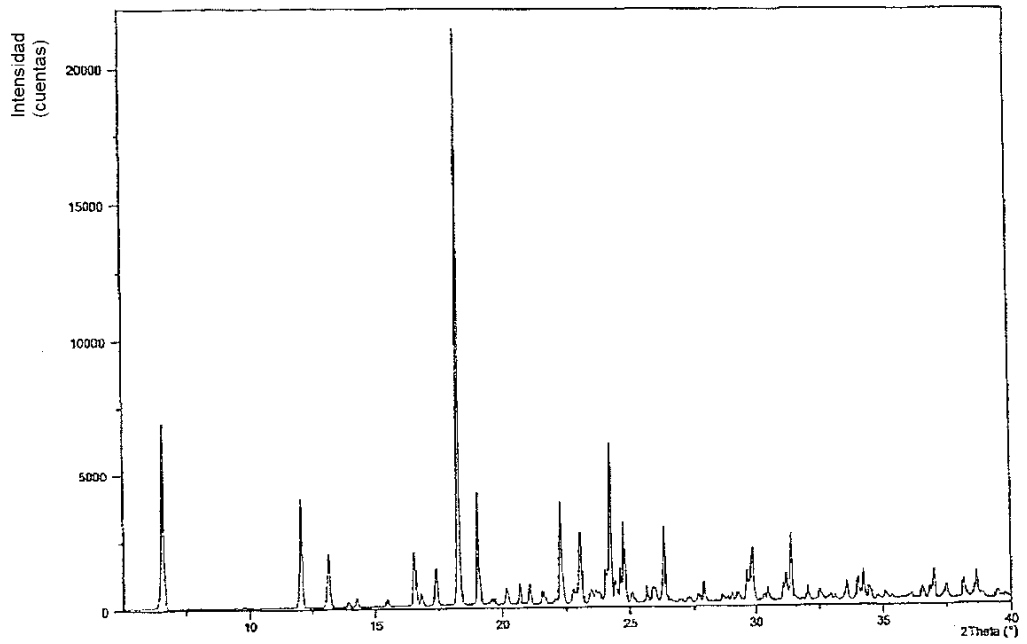


Fig. 3

Sal del ácido palmítico 1:1

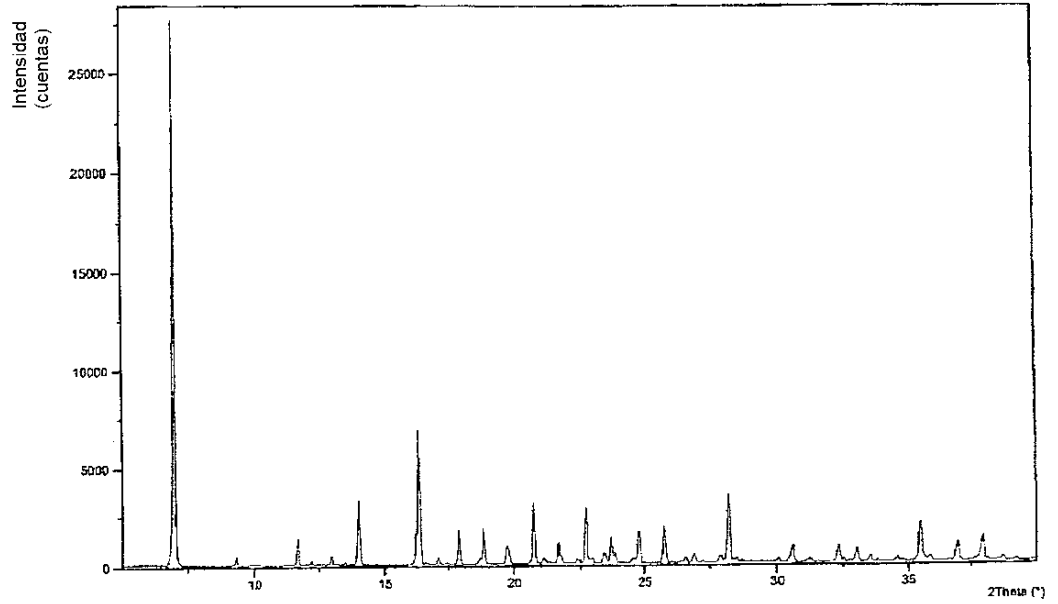


Fig. 3

Sal del ácido DL-láctico 1:1

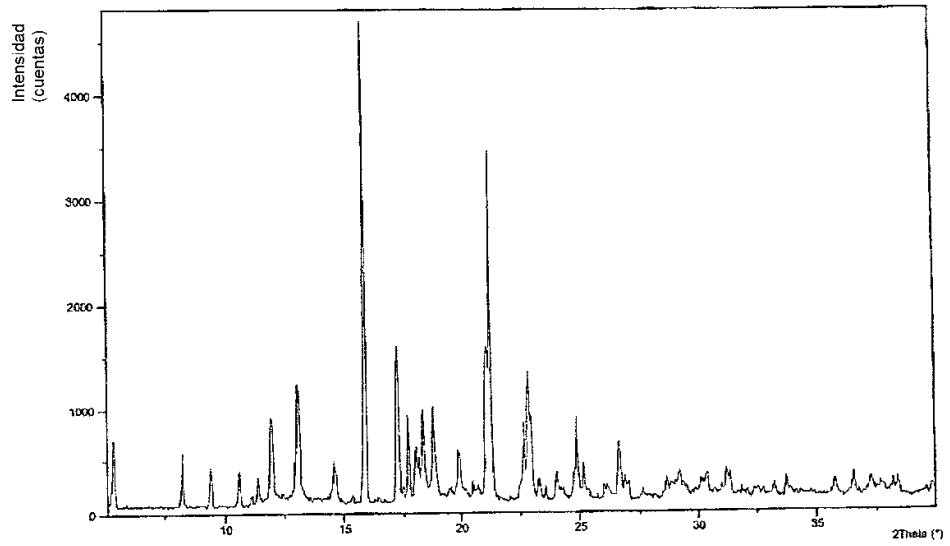


Fig. 4

Sal del ácido adípico 1:1 (mezcla de formas α y β)

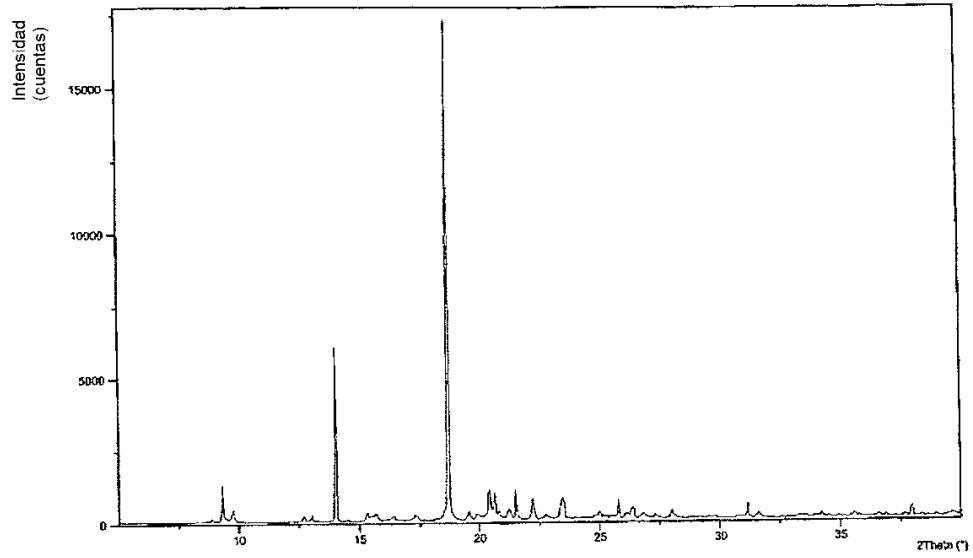


Fig. 5

Sal del ácido adípico 2:1

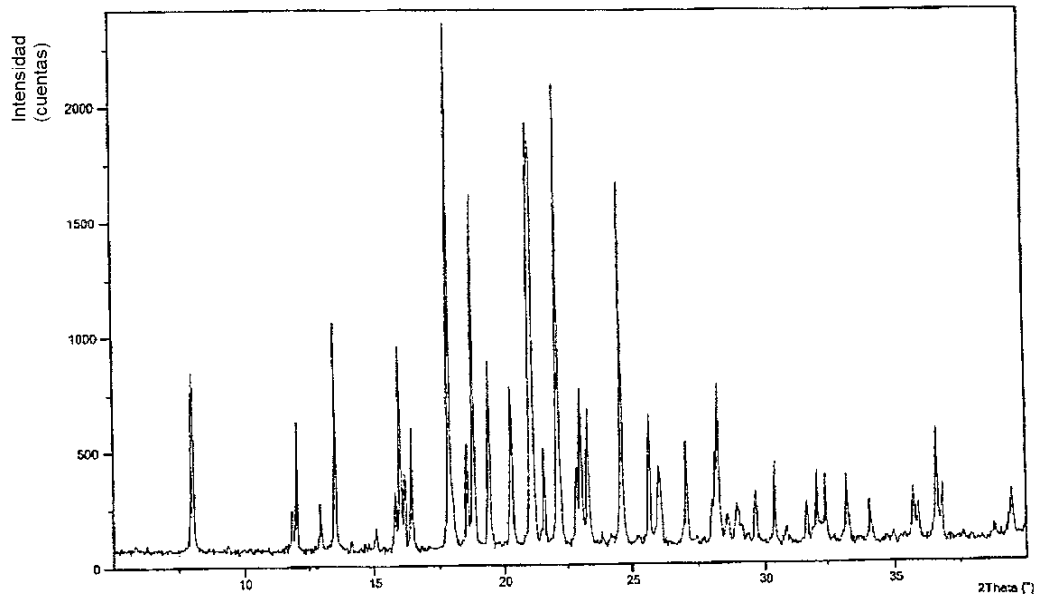


Fig. 6

Sal del ácido fumárico 1:1

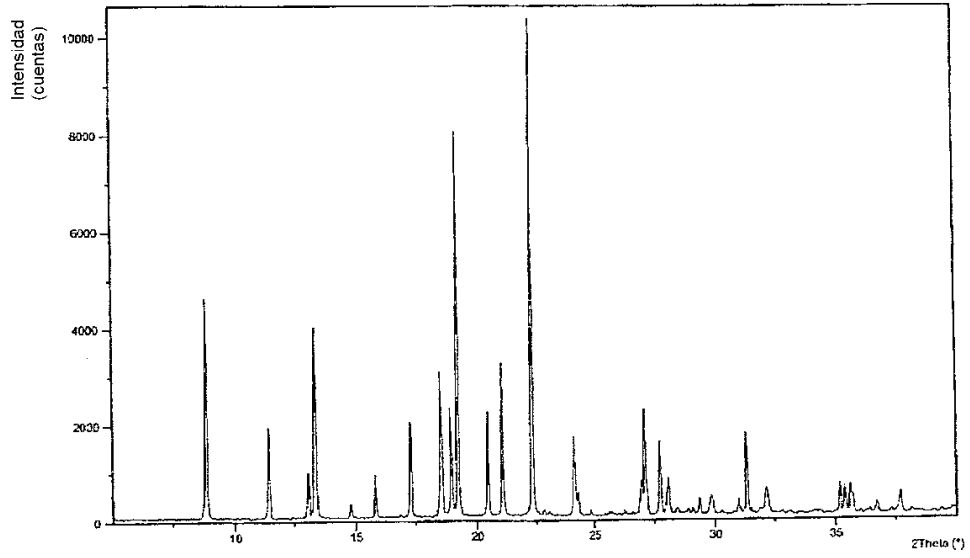


Fig. 7

Sal del ácido glutámico 1:1

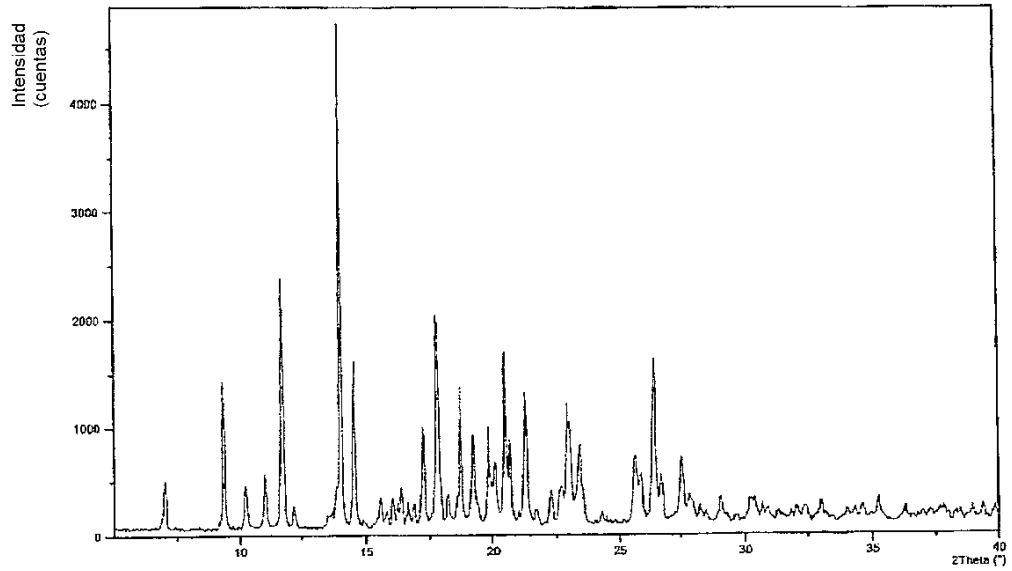


Fig. 8

Sal del ácido malónico 1:1, forma α

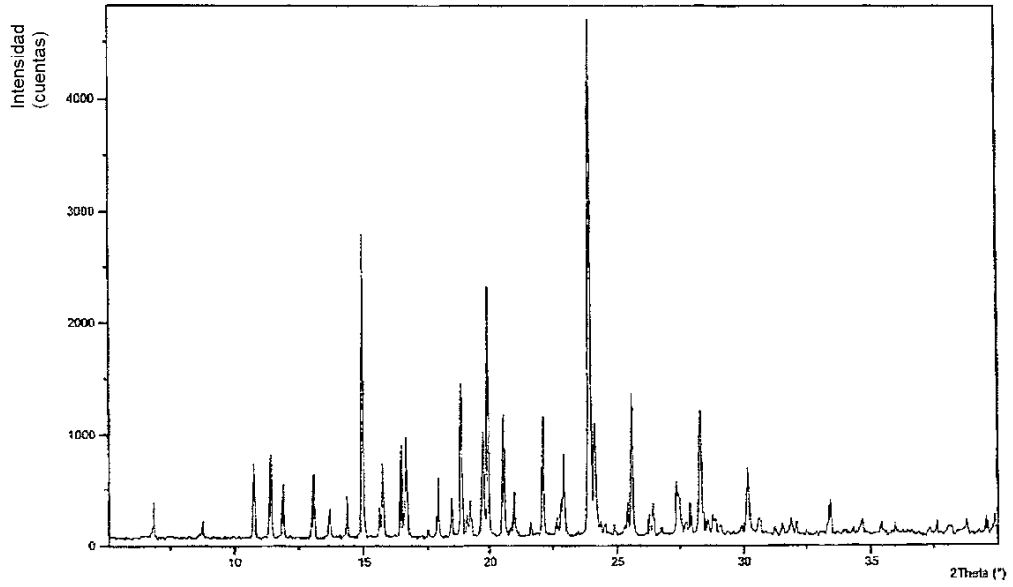


Fig. 9

Sal del ácido malónico 1:1, forma β

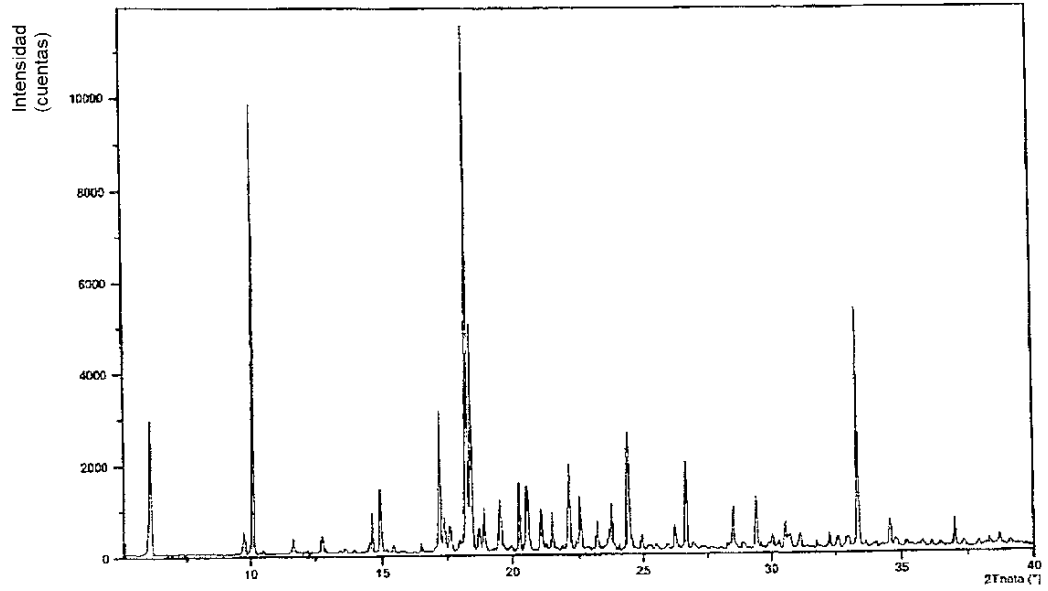


Fig. 10

Sal del ácido oxálico 1:1

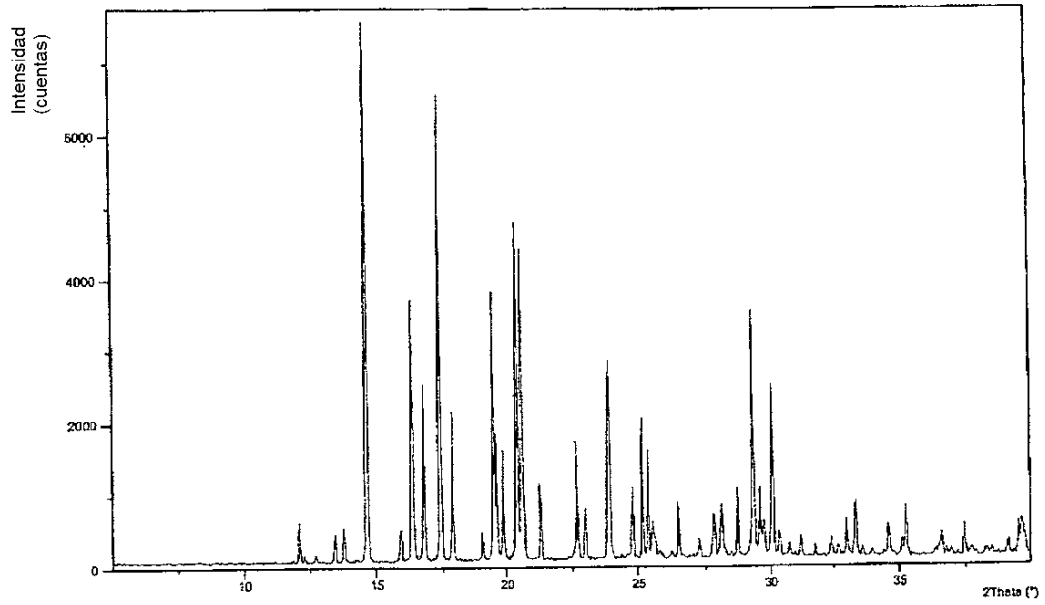


Fig. 11

Sal del ácido sebacoínico 2:1

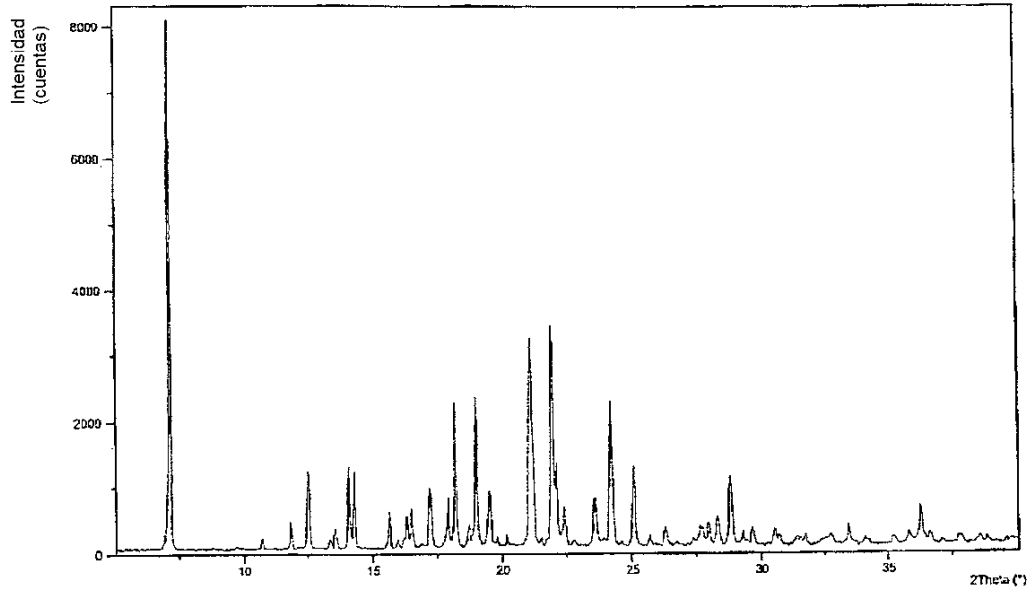


Fig. 12

Sal del ácido succínico 2:1

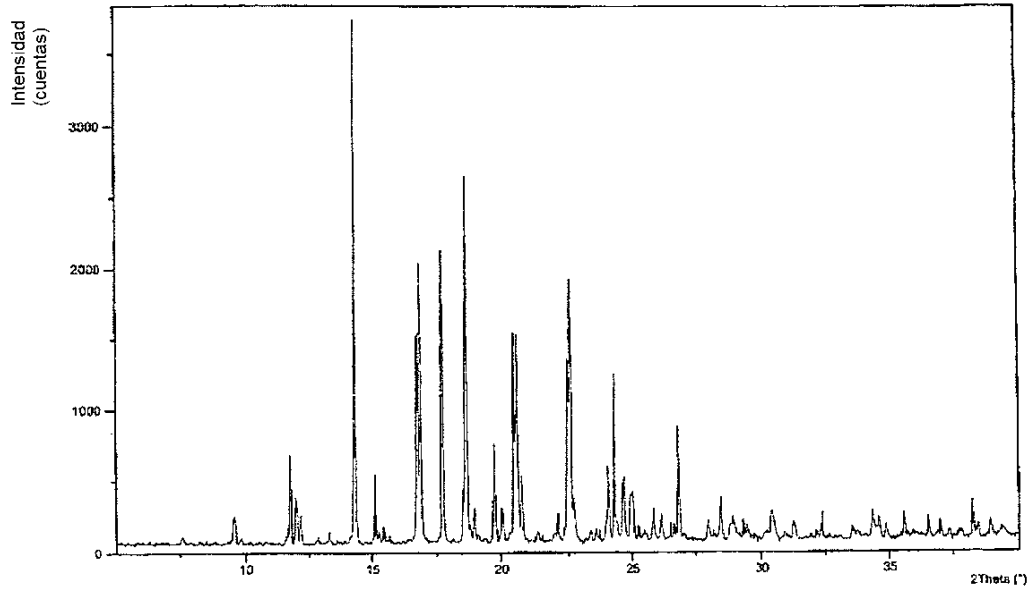


Fig. 13

Sal del ácido L-málico 1:1, forma α

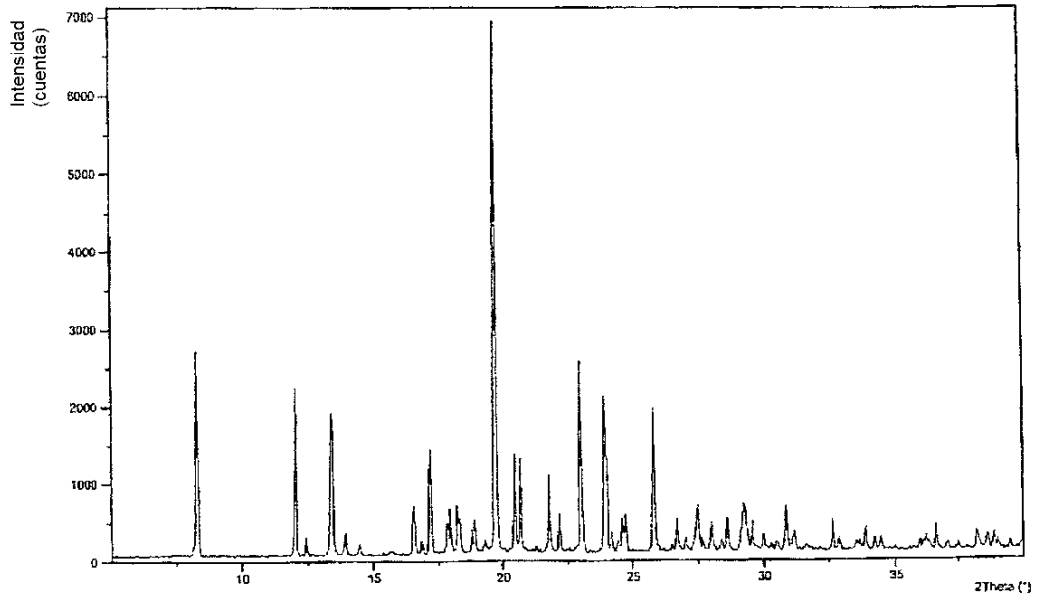


Fig. 14

Sal del ácido L-málico 1:1, forma β

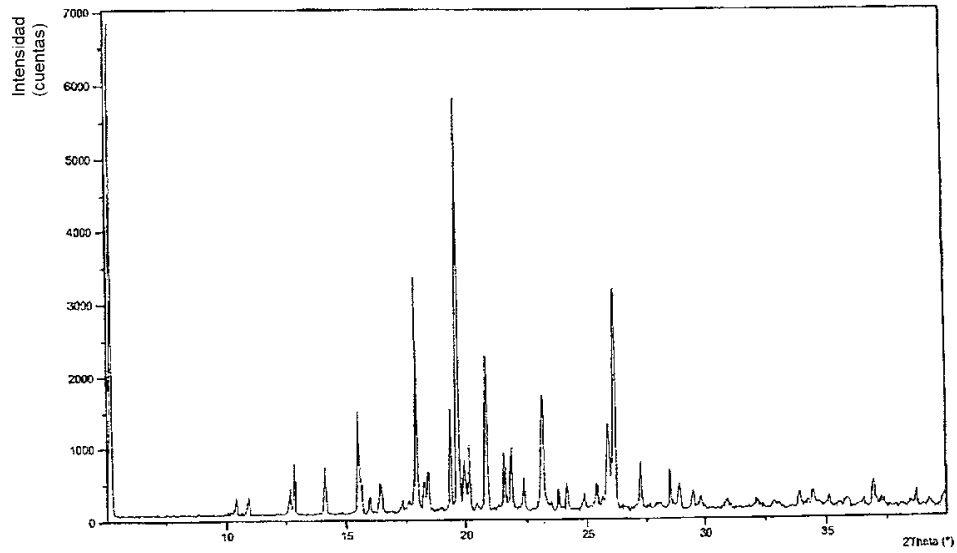


Fig. 15

Sal del ácido D-tartárico 1:1

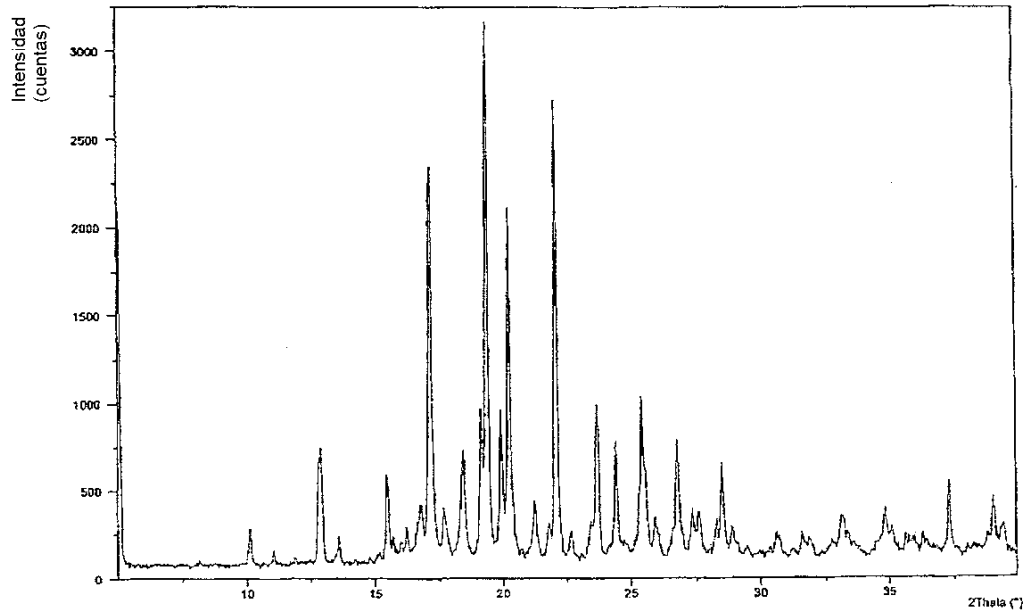


Fig. 16

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

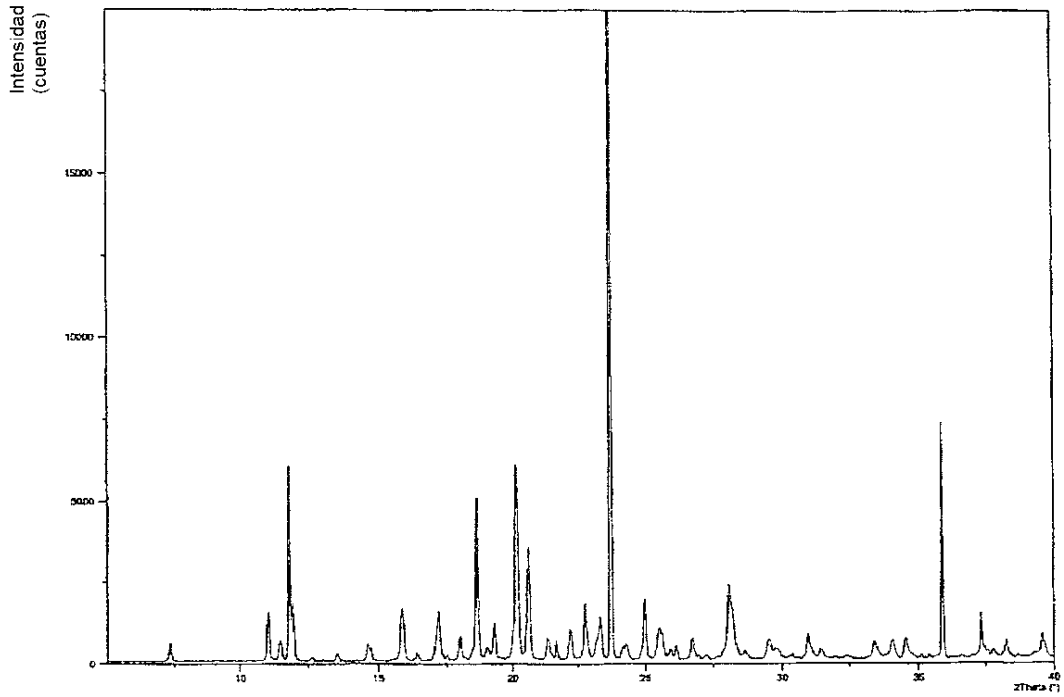


Fig. 17

Hidrato de la sal del ácido L-aspártico 1:1 + ácido L-aspártico

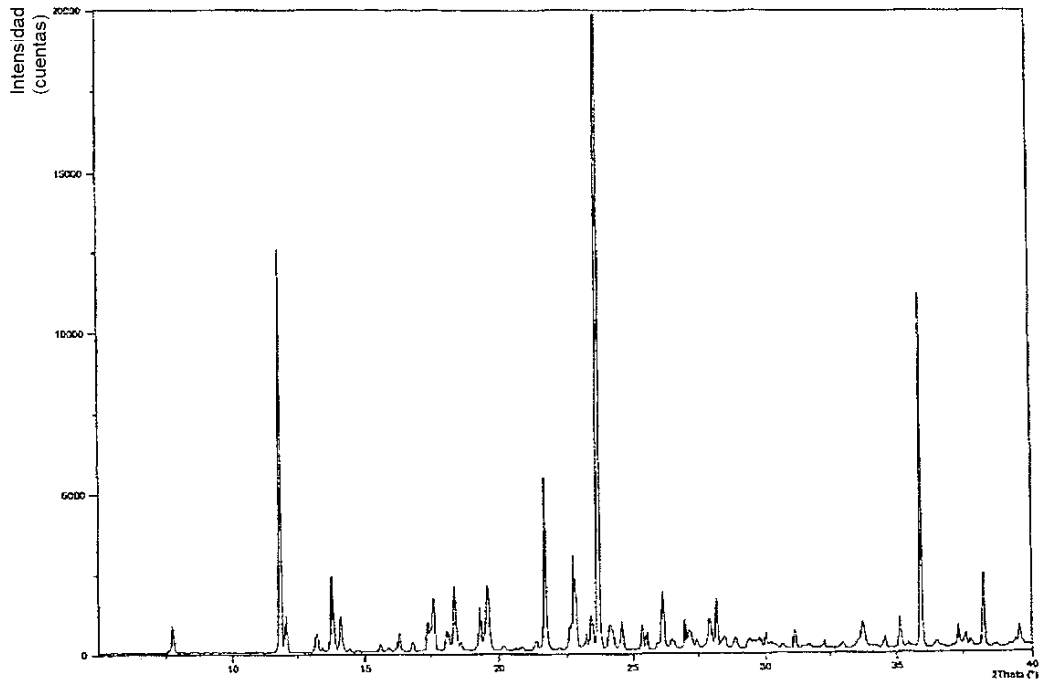


Fig. 18

Sal del ácido glutámico 1:1 + ácido glutámico monohidrato

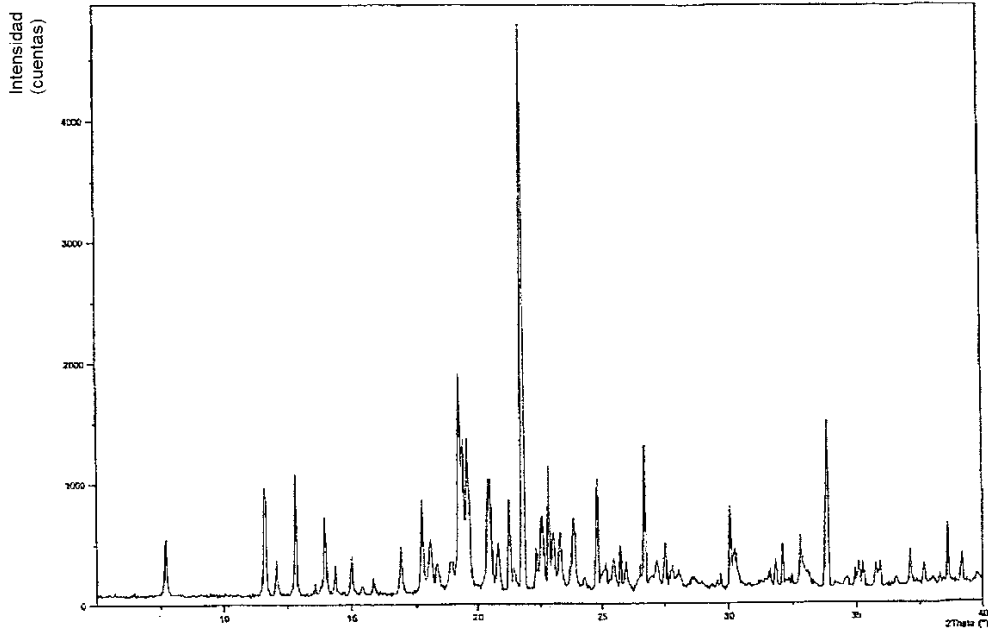


Fig. 19

Sal del ácido cítrico 2:1

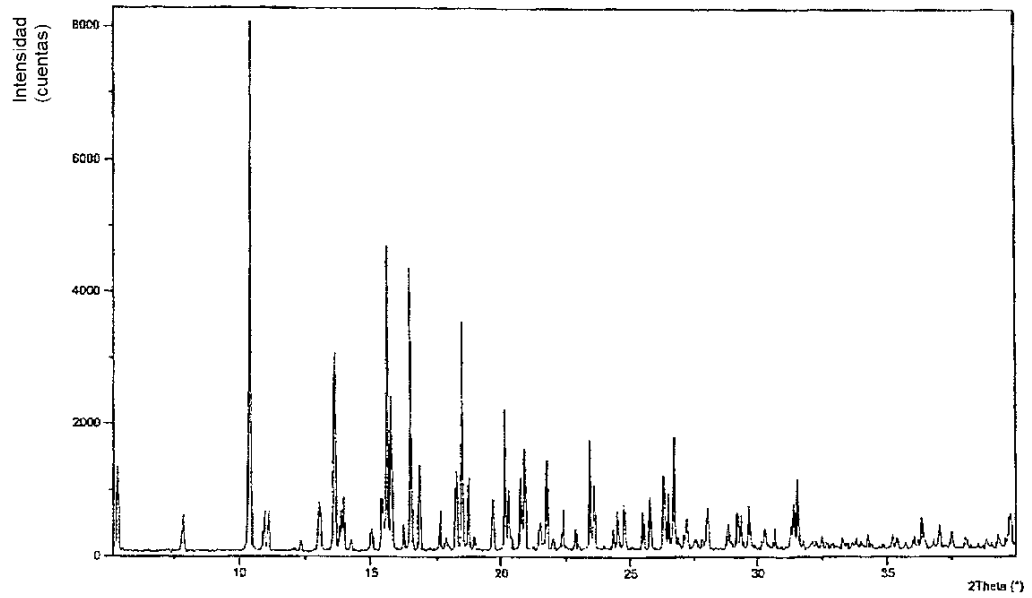


Fig. 20

Sal hidrocioruro

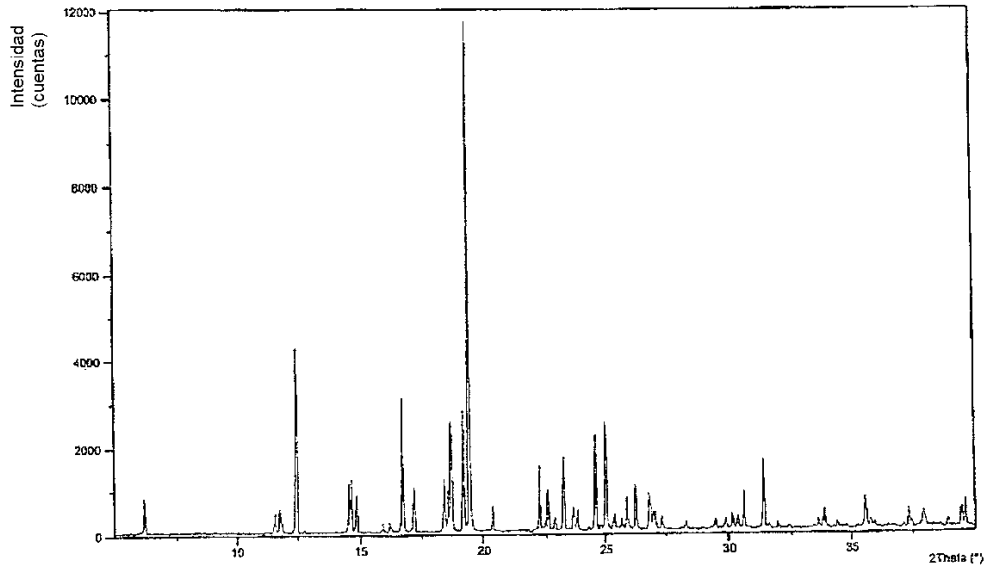


Fig. 21

Sal del ácido fosfórico 1:1

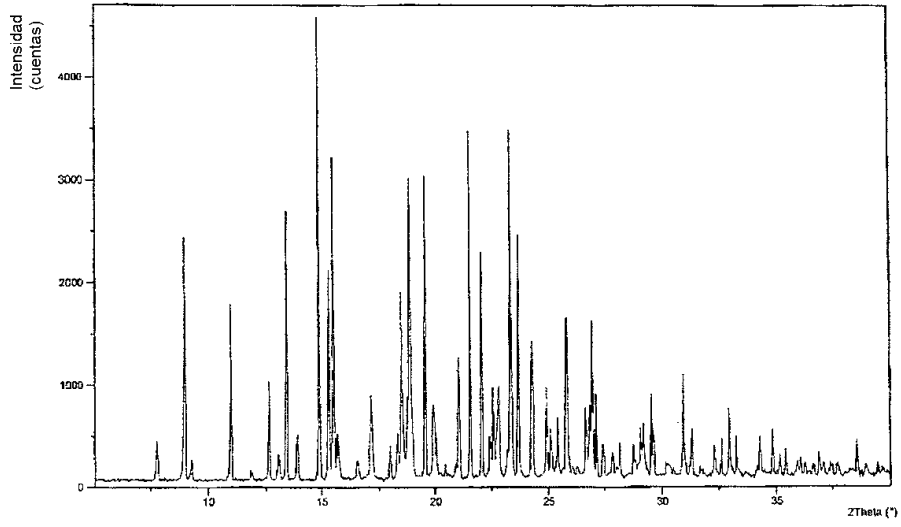


Fig. 22

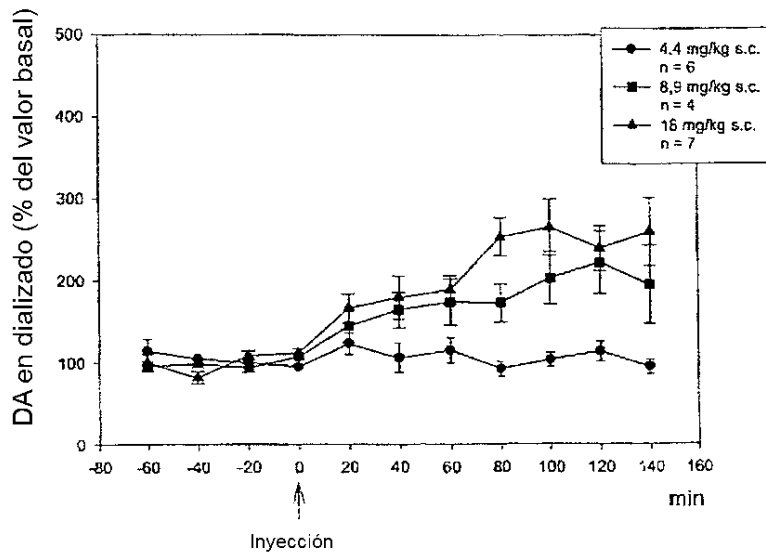


Fig. 23

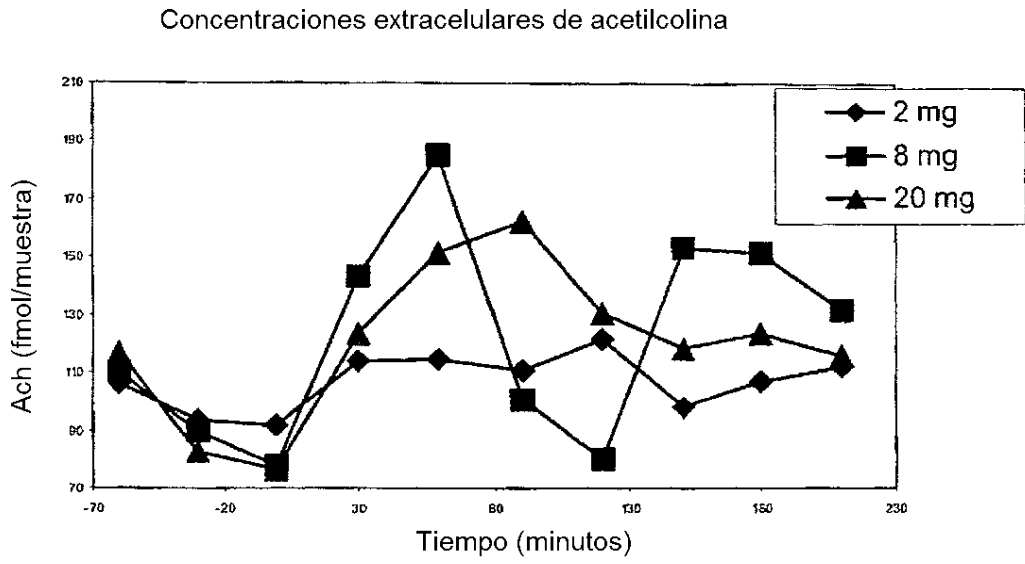


Fig. 24

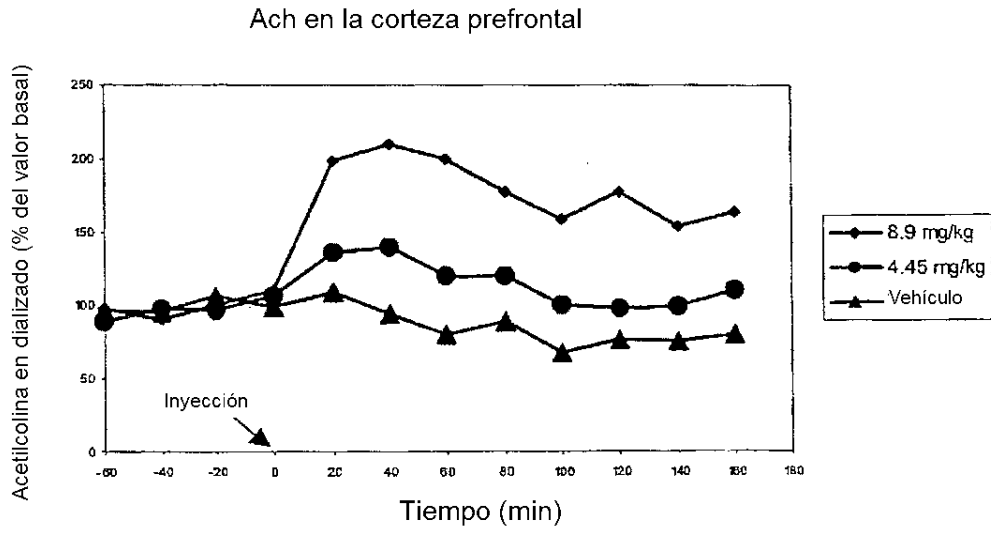


Fig. 25a

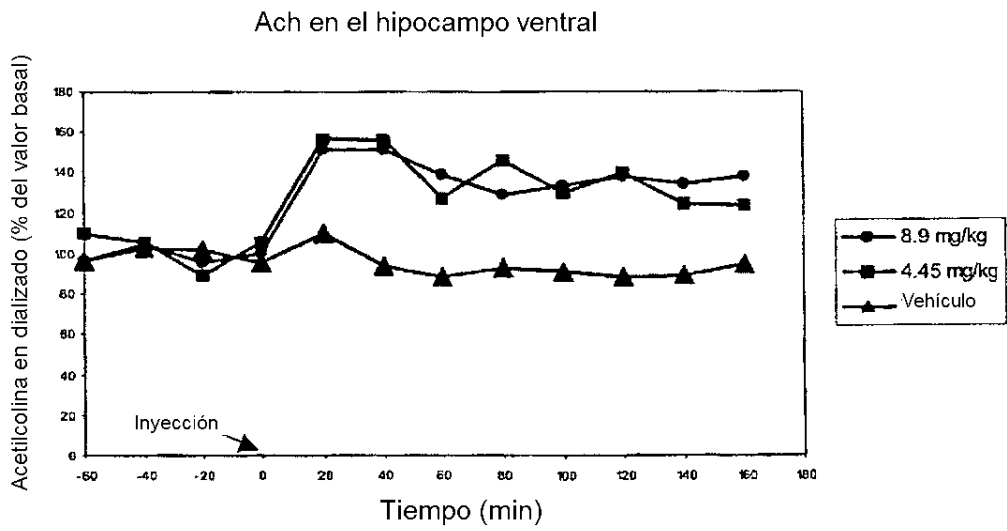


Fig. 25b

Pulsaciones de la palanca del lado INCORRECTO (9ª a 12ª horas del ensayo)

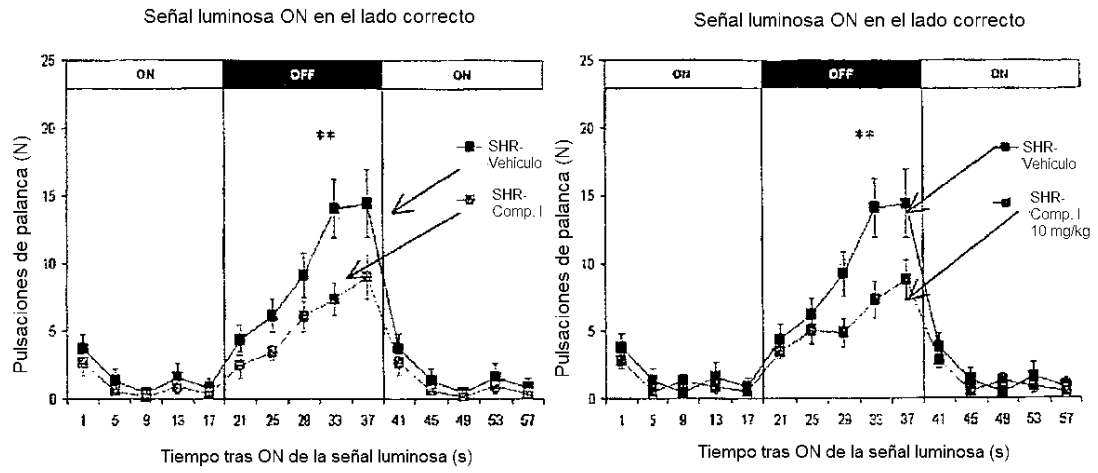


Fig. 26