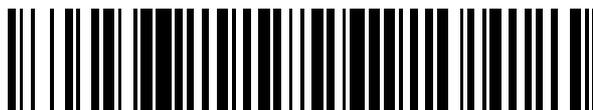


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 168**

51 Int. Cl.:

A61P 25/24 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/4172 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05749738 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1753511**

54 Título: **Tratamiento de trastornos depresivos con activadores de anhidrasa carbónica**

30 Prioridad:

18.05.2004 US 571892 P

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

29.10.2013

73 Titular/es:

**BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES
INSTITUTE (100.0%)
P.O. BOX 9301 MEDICAL CENTER DRIVE
MORGANTOWN, WV 26596-9301, US**

72 Inventor/es:

**SUN, MIAO-KUN y
ALKON, DANIEL L.**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 427 168 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

Tratamiento de trastornos depresivos con activadores de anhidrasa carbónica.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una composición usada para tratar trastornos depresivos en la que los compuestos mejoran el aprendizaje y la memoria. Específicamente, la invención se refiere a campos de activadores de anhidrasa carbónica, como agentes farmacéuticos en el tratamiento de trastornos depresivos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**A. Depresión y Tratamiento Tradicional**

15 La depresión es una de las formas más prevalentes y constantes de enfermedad mental que afecta a individuos de cualquier edad y género. (Gainotti y col. (2001) J. Neural Neurosurg. Psychiatr. 71: 258-261; Wong y col. (2001) Nature Rev. Neurosci. 2: 343-351; Nestler y col. (2002) Neuron 34: 13-25). El riesgo de por vida de depresión mayor es de aproximadamente el 12% en los hombres y aproximadamente el 25% en las mujeres, generalmente (Kessler y col. (1994) Arch. Gen. Psychiatry 51: 8). Además, aproximadamente del 5 al 10% de todos los pacientes en el
20 ámbito de la atención primaria, presentan depresión mayor, mientras que aproximadamente del 3 al 5% de los pacientes son diagnosticados de distimia (Barrett y col. (1988) Arch. Gen. Psychiatry 45: 1100). Sin embargo, en pacientes hospitalizados, entre el 10 y el 14% de todos los pacientes se diagnostican con depresión mayor (Blackburn y col. (1997) Br. J. Psychiatry 171: 328). La depresión mayor es particularmente inhabilitante y perniciosa, en parte, porque es recurrente. La tasa de recaídas en los pacientes con depresión mayor es de aproximadamente
25 el 40% durante un período de dos años después de un primer episodio. La aparición de recaída incrementa a aproximadamente el 75% en un período de cinco años tras el diagnóstico de un segundo episodio de depresión mayor (Solomon y col. (2000) Am. J. Psychiatry 157: 229).

30 Los trastornos depresivos se tratan más comúnmente con tres clases principales de compuestos: 1) inhibidores de la monoaminoxidasa; 2) antidepresivos heterocíclicos; e 3) inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). Los antidepresivos conocidos y prescritos actualmente tienen numerosos efectos secundarios. Los inhibidores de la monoaminoxidasa fueron la primera clase de antidepresivos usados clínicamente. Los inhibidores de la monoaminoxidasa, incluyendo isocarboxazida, fenelzina y tranilcpromina, inhiben el metabolismo de la feniletilamina y el catabolismo de la dopamina, la serotonina y la norepinefrina. Como consecuencia de las
35 numerosas restricciones dietéticas relacionadas con el uso de inhibidores de la monoaminoxidasa, extensos efectos secundarios, incluyendo hipertensión, dolor de cabeza, convulsiones, interrupción del sueño y complicaciones gastrointestinales, los inhibidores de la monoaminoxidasa no se usan actualmente como un antidepresivo de primera línea. Los antidepresivos tricíclicos, incluyendo, imipramina, desipramina, nortriplina, amitriplina, doxepina y protriplina, producen una diversidad de efectos secundarios anticolinérgicos, somnolencia,
40 hipotensión ortostática, arritmias cardiacas y aumento de peso. Aunque generalmente más leves que los inhibidores de la monoaminoxidasa y los antidepresivos tricíclicos, los ISRS también producen numerosos efectos secundarios. Por ejemplo, los ISRS, incluyendo fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, sertralina y citalopram, se relacionan con trastornos gastrointestinales, nerviosismo, agitación y trastornos del sueño.

45 Además de los numerosos efectos secundarios relacionados con la medicación de antidepresivos convencional, estos productos terapéuticos también se caracterizan por una eficacia marginal. Varios estudios sobre la eficacia de la terapia con antidepresivos para la depresión mayor han concluido que el tratamiento de la enfermedad aguda o de la terapia de mantenimiento se relaciona con un índice de respuesta del 50-60% (Schulberg y col. (1998) Arch. Gen. Psychiatry 55: 1121). El índice de respuesta absoluta medio entre los antidepresivos y un placebo es
50 aproximadamente del 20-25% (Williams y col. (2000) Ann. Intern. Med 132: 743). En consecuencia, existe la necesidad actual de nuevas terapias de antidepresivos.

FERRARI; F: "Behavioral pharmacology of imidazole, a potential antidepressant agent", ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THERAPIE, vol. 277, N° 2, 1985, páginas 303-312, desvela
55 el uso de imidazol para tratar la depresión. Dicho documento es la técnica anterior más cercana.

En vista de los frecuentes efectos secundarios graves y la eficacia marginal de las numerosas terapias con antidepresivos, existe una gran necesidad de productos farmacéuticos mejorados que traten de forma eficaz
60 trastornos depresivos sin producir los efectos secundarios relacionados con los tratamientos de la depresión. La presente invención identifica aquellos compuestos que potencian o mejoran el aprendizaje y la memoria como una nueva clase de productos terapéuticos para el tratamiento de trastornos depresivos.

B. Anhidrasa Carbónica

La anhidrasa carbónica, una enzima que contiene cinc que cataliza la interconversión de dióxido de carbono y anión de bicarbonato, está presente por todo el cuerpo, incluyendo el cerebro (Sun y col. (2002) Trends in Pharm. Sci. 23(2): 83-89). La anhidrasa carbónica II, la más activa de las siete isozimas humanas, es una enzima de 23,9 kDa que se encuentra principalmente en los eritrocitos, células gliales y neuronas cerebrales. (Id.). Además de su implicación en la regulación del pH, la reabsorción de bicarbonato y la expiración del dióxido de carbono, la anhidrasa carbónica tiene una función crucial en el procesamiento de señales, la transformación sináptica a largo plazo y el desbloqueo de atención del almacenamiento de la memoria. (Id.).

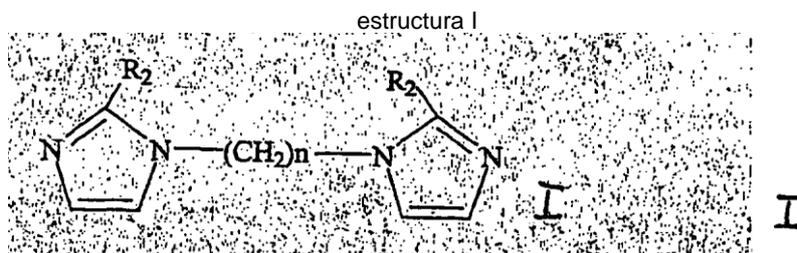
La disfunción de la anhidrasa carbónica se ha asociado con el retraso mental, la enfermedad de Alzheimer y la cognición deteriorada. Por el contrario, se ha demostrado que la activación de la anhidrasa carbónica mejora el aprendizaje y la memoria (Id; solicitudes de patentes de Estados Unidos N° de serie PCT/US02/13784; PCT/US03/07102; 60/287.721; 60/362.081; 10/172.005; y 10/476.459). Sin embargo, antes de la presente divulgación, la mejora mediada por anhidrasa carbónica del aprendizaje y la memoria no se ha reconocido como un mecanismo para el tratamiento de trastornos depresivos. Aunque un estudio bioquímico reciente usando anhidrasa carbónica aislada identificó tres ISRS, fluoxetina, sertralina y citalopram, como activadores de la anhidrasa carbónica, estos experimentos no demostraron que la activación de la anhidrasa carbónica es el mecanismo por el que mejoran los síntomas de los trastornos depresivos (Casini y col. (2003) Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 2765-2768).

La actividad de la anhidrasa carbónica se regula por rutas de señalización que incluyen rutas de señalización mediadas por el receptor de rianodina. La liberación intracelular de calcio a través de los receptores de rianodina, por ejemplo, está implicada en la inversión sináptica mediada por GABA (Sun y col. (2002) Trends in Pharmacol. Sci. 23(2): 83-89). La activación de los receptores de rianodina en células piramidales CA1, combinada con la carga de calcio inducida por la despolarización, transforma las respuestas mediadas por GABA, un efecto que se bloquea por los antagonistas del receptor de rianodina o los inhibidores de anhidrasa carbónica (Sun y col. (2000) Proc. Nat'l Acad Sci USA 97: 12300-12305). Sin embargo, el efecto del calcio sobre la anhidrasa carbónica parece ser indirecto. Por ejemplo, los primeros estudios muestran que el calcio potencia la activación de la anhidrasa carbónica purificada o la anhidrasa carbónica de la mucosa gástrica por histamina y otros agentes (Puscas y col. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 1464-1466). Además, la inhibición dependiente de la dosis de la anhidrasa carbónica por verapamilo también implica al calcio en la activación de la anhidrasa carbónica. Además, en las líneas celulares mielomonocíticas humanas, la síntesis de la anhidrasa carbónica II se activa por la proteína cinasa C (Sun y col. (2002) Trends in Pharmacol. Sci. 23(2): 83-89). En consecuencia, el aumento mediado por PKC en la síntesis de anhidrasa carbónica puede aumentar la actividad de la anhidrasa carbónica que tiene un efecto antidepresivo resultante.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un uso de un compuesto para la fabricación de medicamentos que potencian o mejoran el aprendizaje y la memoria, para el tratamiento de trastornos depresivos.

La presente invención proporciona una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de un trastorno depresivo en el que la composición comprende un activador de anhidrasa carbónica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y en el que el activador de anhidrasa carbónica se selecciona entre el grupo que consiste en:



en la que n es 1 ó 2 y R₂ es H alquilo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico o alquilo C₁-C₄; y sales farmacéuticamente aceptables de I.

También se desvelan procedimientos usando derivados y análogos de los activadores de anhidrasa carbónica desvelados en este documento, en los que los derivados y análogos aumentan la potencia del efecto activador de la anhidrasa carbónica, aumentan la especificidad a la anhidrasa carbónica en comparación con otros agentes,

reducen la toxicidad, mejoran la estabilidad en una forma de dosificación oral y/o potencian la capacidad del compuesto para cruzar la barrera hematoencefálica (profármacos). Los derivados son compuestos que se forman añadiendo o eliminando cadenas laterales de los compuestos enumerados. Los análogos son variantes estructurales de los compuestos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares mejoradas con respecto al sitio de unión de la anhidrasa carbónica. Dichos derivados y análogos son aquellos que son capaces de entregar los compuestos activadores de la invención al cerebro de un sujeto.

En una realización de la presente invención, los activadores de anhidrasa carbónica proporcionan una actividad neuronal de la anhidrasa carbónica de al menos aproximadamente el 110, 115, 125, 135, 150, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 220, 230, 240 y el 250% el de la alanina.

En una realización preferida, el activador activa la anhidrasa carbónica intraneuronal. En otra realización, el activador activa la anhidrasa carbónica II entre 1,5 y 2 veces más que la alanina, *in vitro*.

El activador se selecciona entre el grupo que consiste en: un diimidazol enlazado, de estructura I y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

También se desvela un procedimiento que comprende las etapas de a) identificar un sujeto con un trastorno depresivo; y b) administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un activador de anhidrasa carbónica y un vehículo farmacéuticamente aceptable a dicho sujeto, en el que el activador es la estructura I y adicionalmente en el que n es 1 ó 2; y R² es H o metilo. En una realización, el activador activa la anhidrasa carbónica II entre 1,5 y 2 veces más que la alanina, *in vitro*.

Se proporcionan procedimientos para el tratamiento de la depresión en un sujeto que necesita el mismo, que comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un activador de anhidrasa carbónica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en los que el activador se selecciona entre el grupo que consiste en: un diimidazol enlazado, y un diimidazol sustituido enlazado.

También se desvelan procedimientos para seleccionar un agente para la actividad antidepresiva, que comprende las etapas de:

a) administrar un agente en un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto de prueba y administrar el vehículo farmacéuticamente aceptable al sujeto de control;
 b) colocar de forma individual dichos sujetos de prueba y de control en una piscina de agua y medir la distancia y/o duración del nado durante un periodo de prueba; y
 c) comparar la distancia o duración del nado del sujeto de prueba con un sujeto de control, donde el aumento de la distancia o la duración del nado del sujeto de prueba en comparación con el sujeto de control es indicativo de actividad antidepresiva.

Se prefiere que la piscina de agua sea redonda. Preferiblemente, la piscina tiene un diámetro de entre 100 y 200 cm. Más preferiblemente, la piscina tiene un diámetro de 150 cm. Preferiblemente, la piscina no tiene escapatoria.

Pueden repetirse las etapas (a), (b) y (c). Preferiblemente, las etapas se repiten tres veces.

En los procedimientos para seleccionar un agente para la actividad antidepresiva de la presente invención, la distancia y/o la duración del nado se mide preferiblemente por medio de video.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figure 1** representa el efecto de tres antidepresivos, imipramina, iproniazida y mianserina, que se usan como compuestos de referencia, en la movilidad de ratas en la prueba de natación en espacio abierto.

La **Figure 2** representa el efecto del alaproclato, que se usa como compuesto de referencia, en la movilidad y duración del nado activo de ratas en la prueba de natación en espacio abierto.

La **Figure 3** compara el efecto de la imipramina y el activador de anhidrasa carbónica, fenilalanina, que se usan como compuestos de referencia, en la movilidad de ratas en la prueba de natación en espacio abierto.

La **Figure 4** compara el efecto de la imipramina y el activador de PKC, briostatina-1, que se usan como compuestos de referencia, en la movilidad de ratas en la prueba de natación en espacio abierto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**A. Definiciones**

- 5 Como se usa en este documento, la "administración" de una composición incluye cualquier vía de administración, incluyendo oral, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular.
- Como se usa en este documento, el término "aromático" se refiere a una entidad molecular cíclicamente conjugada con una estabilidad significativamente mayor que la de una estructura localizada hipotética. Como se usa en este documento, los compuestos aromáticos incluyen compuestos policíclicos y heterocíclicos.
- 10 Como se usa en este documento, "activador de anhidrasa carbónica" se refiere a un activador que aumenta la velocidad de la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica mediante la unión a la anhidrasa carbónica en o cerca de una molécula de agua unida a cinc.
- 15 Como se usa en este documento, "trastorno depresivo" se refiere a depresión mayor, distimia y depresión atípica o depresión no especificada de otro modo.
- Como se usa en este documento, "una cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para reducir uno o más síntomas relacionados con un trastorno depresivo.
- 20 Como se usa en este documento, "activador de la proteína cinasa C" o "activador de PKC" se refiere a una sustancia que aumenta la velocidad de la reacción catalizada por la proteína cinasa C mediante la unión a la proteína cinasa C.
- 25 Como se usa en este documento, la expresión "un único grupo aromático" se refiere únicamente a un grupo aromático monocíclico o uno policíclico.
- Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero.
- 30 Como se usa en este documento, la expresión "imidazol sustituido" se refiere a un resto imidazol con uno o más grupos de sustituyentes unidos al anillo imidazol.
- Como se usa en este documento, la expresión "fenilo sustituido" se refiere a un resto fenilo con uno o más grupos de sustituyentes unidos al anillo fenilo.
- 35 Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición química con la que el ingrediente activo puede combinarse y que, después de la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto. Como se usa en este documento, la expresión éster o sal "fisiológicamente aceptable" se refiere a una forma de éster o sal del principio activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, que no es perjudicial para el sujeto al que se va a administrar la composición.
- 40 Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" también incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y disgregantes; agentes de unión; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes saporíferos; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables, tal como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables.
- 45 Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa.
- 50 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido o desarrollado en lo sucesivo en este documento en la técnica de la farmacología. En general, dichos procedimientos de preparación incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un vehículo o uno o más ingredientes accesorios diferentes y, después, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una unidad individual o multidosis.
- 55 Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración ética a seres humanos, se entenderá por el experto en la técnica que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todo tipo. Se entiende bien la modificación de composiciones farmacéuticas
- 60

5 adecuadas para su administración a seres humanos con el fin de administrar las composiciones adecuadas para su administración a animales, y el experto farmacólogo veterinario puede diseñar y realizar dicha modificación con experimentación ordinaria, si la hubiera. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, seres humanos y otros primates, y otros mamíferos.

10 La cantidad relativa del principio activo, el vehículo farmacéuticamente aceptable, y cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y la afección del sujeto tratado y adicionalmente dependiendo de la ruta por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) del ingrediente activo. Además del principio activo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente uno o más agentes farmacéuticamente activos. Los agentes adicionales contemplados particularmente incluyen antieméticos y eliminadores, tales como eliminadores de cianuro y cianato. Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención pueden prepararse usando la tecnología convencional.

15 La dosis eficaz para la administración de los compuestos es una que mejore la actividad de la anhidrasa carbónica en las células de las rutas de señalización neuronales. Típicamente, las dosificaciones del compuesto de la invención que pueden administrarse a un animal, preferiblemente un ser humano, varían en una cantidad de 1 mg a aproximadamente 100 gramos (comprobar la divulgación de la invención) por kilogramo de peso corporal del animal. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de varios factores, incluyendo, pero sin limitación, el tipo de animal y el tipo de patología que se trata, la edad del animal y la ruta de administración. Preferiblemente, la dosificación del compuesto variará de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g por kilogramo de peso corporal del animal. Más preferiblemente, la dosificación variará de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g por kilogramo de peso corporal del animal. Mucho más preferiblemente, la dosificación está entre 50 y 100 mg por kilogramo de peso corporal del animal y se administra por vía oral tres veces al día.

20 Extrapolando a partir de la dosificación en ratas, que es predictiva de la dosificación en seres humanos, las dosis eficaces de agentes de fenilalanina (50 mM) o imidazol (0,5 M) para tratar seres humanos pueden incluir el equivalente de 0,1, 0,3, 1,3 ó 10 ml/kg de peso corporal tomado tres veces al día.

25 También se desvelan derivados y análogos de estos compuestos que aumentan la potencia del efecto activador de la anhidrasa carbónica, aumentan la especificidad a la anhidrasa carbónica en comparación con otras dianas, reducen la toxicidad, mejoran la estabilidad en una forma de dosificación oral, y/o potencian la capacidad del compuesto para cruzar la barrera hematoencefálica (profármacos). Los derivados son compuestos que se forman añadiendo o eliminando cadenas laterales de los compuestos enumerados. Los análogos son variantes estructurales de los compuestos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares mejoradas con respecto al sitio de unión de la anhidrasa carbónica. Los derivados y análogos son capaces de entregar los compuestos activadores de la invención al cerebro de un sujeto.

30 El compuesto puede administrarse a un animal tan frecuentemente como varias veces al día, o puede administrarse con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para el experto en la técnica y dependerá de varios factores, tales como, pero sin limitación, el tipo y gravedad del déficit de memoria, atención o aprendizaje que se trata, el tipo y edad del animal, etc.

35 B. Trastornos depresivos

40 Los trastornos depresivos incluyen los diagnósticos de depresión mayor, distimia y depresión atípica o depresión no especificada de otro modo ("depresión menor"). Los diferentes subgrupos de trastornos depresivos se clasifican y se definen por el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición (DSM-IV). (American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4ª Ed., Primary Care Version (DSM-N-PC). American Psychiatric Association Press, Washington, DC 1995). De acuerdo con el DSM-IV, un diagnóstico de "depresión mayor" requiere que un paciente presente al menos cinco de los siguientes nueve síntomas durante el periodo de diagnóstico: 1) estado de ánimo depresivo la mayor parte del día (mucho más agudo por la mañana); 2) interés o placer notablemente disminuido en casi todas las actividades (anhedonia); 3) pérdida o ganancia de peso significativa; 4) insomnio o hipersomnio; 5) agitación o retardo psicomotor; 6) fatiga o pérdida de energía; 7) sentimientos de culpa e inferioridad; 8) deterioro de la concentración e indecisión; y 9) pensamientos recurrentes de muerte o suicidio. Para apoyar un diagnóstico de depresión mayor, un estado de ánimo depresivo o la pérdida de interés (anhedonia) debe ser uno de los cinco síntomas observados. Por el contrario, un diagnóstico de "depresión atípica" o "depresión no especificada de otro modo" (también denominada como "depresión menor"), la forma más común de depresión, requiere entre 2 y 4 síntomas depresivos que estén presentes a diario, o durante la mayor parte del día, durante al menos un periodo de dos semanas. La distimia es un trastorno anímico crónico de baja

intensidad caracterizado por anhedonia, baja autoestima y baja energía que persiste durante más de dos años, de forma consecutiva. Se considera que un trastorno afectivo estacional es una forma de depresión mayor caracterizada por la variación estacional.

5 C. Modelos Animales

A pesar del progreso hacia el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y la disponibilidad de varios modelos animales, aún existe la apremiante necesidad de mejores modelos animales para determinar la actividad antidepresiva de los compuestos candidatos (Cryan y col. 2002 Trends Pharmacol 23: 238-45). Actualmente, los modelos animales de depresión más usados comúnmente incluyen las pruebas de natación forzada, la prueba de suspensión de la cola y la bulbectomía olfatoria (Cryan y col. (2002) Trends Pharmacol. 23: 238-45). La prueba de natación forzada mide la inmovilidad de los animales en un cilindro de agua sin escapatoria, 24 h después de una prueba previa de 15 minutos en el mismo cilindro. Es el modelo más usado comúnmente para la predicción preclínica de la actividad antidepresiva, pero requiere criterios y puntuaciones por parte de los investigadores. La prueba no predice de forma fiable la actividad antidepresiva de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (Porsolt (1990) Behavioral Despair: Present Status and Future Perspectives, In: Antidepressants: Thirty Years On, CNS Publishers 85-94; Porsolt y col. (1991) Pharmacological Models of Depression, In: Animal Models in Psychopharmacology, Advances in Pharmacological Sciences. Basel: Birkhauser 137-59; Takamori y col. (2001) Pharmacology 73: 147-53; Cryan y col. (2002) Trends Pharmacol. 23: 238-45) y requiere una puntuación modificada para mejorar la detección (Detke y col. (1995) Psychopharmacology 121: 66-72; Detke y col. (1996) Behav. Brain Res. 73: 43-46; Cryan y col. (2002) Trends Pharmacol. 23: 238-245). La prueba de suspensión de la cola induce un estado de una falta de desesperación caracterizado por una falta de esfuerzo o lucha para escapar, que se invierte de forma aguda por los antidepresivos. Sin embargo, algunos animales escalan sus colas. Por otro lado, la bulbectomía olfatoria, la eliminación bilateral de los bulbos olfatorios, da como resultado un cambio de comportamiento correlacionado con cambios en la depresión. Una respuesta hiperactiva en un aparato de campo abierto de luz intensa novedoso se invierte de forma crónica, pero no de forma aguda, por el tratamiento con antidepresivos (Kelly y col. (1997) Pharmacol. Ther. 74: 299-316). Sin embargo, la prueba se basa en la similitud conductual con respecto a la depresión. Su mecanismo de acción no se comprende muy bien. Para un análisis más detallado de una diversidad de modelos animales, el lector se remite a dos artículos de revisión recientes (Cryan y col. 2000 Trends Pharmacol. 23: 238-245; Nestler y col. (2002) Neuron 34: 13-25).

Para mejorar el entendimiento de los mecanismos causales de la depresión, se necesitan modelos animales que reflejen la situación de los pacientes (Cryan y col. 2000 Trends Pharmacol. 23: 238-245). Una diferencia entre la depresión humana y el modelo de natación forzada convencional (también denominado el modelo de desesperación conductual) es que la depresión humana se manifiesta en una gran parte de los casos como una falta de motivación (desesperanza) y no tiene una contraparte directa con respecto a la característica principal del modelo de natación forzada, una falta de "espacio físico" que funciona como el inductor de la depresión.

Un modelo animal mejorado de depresión con capacidad predictiva aumentada se desvela por la presente. Para elucidar si el modelo de natación en espacio abierto tiene "capacidad predictiva", las ratas se trataron con los tres antidepresivos principales. Estos experimentos demostraron una restauración dependiente del tiempo de los parámetros conductuales en comparación con los animales sin tratar. Se usaron imipramina, un antidepresivo tricíclico (inhibidor de los transportadores de la recaptación de serotonina y de norepinefrina), iproniazida, un inhibidor de monoaminoxidasa, y mianserina, un antidepresivo atípico, como compuestos de referencia en el estudio, para comprobar su eficacia en clínicas y representativos de cada clase. Es una práctica común evaluar la adecuabilidad de modelos animales de depresión examinando la eficacia de los tres antidepresivos prototípicos. A diferencia de la prueba de natación forzada, el espacio restringido no será un factor determinante en la prueba de natación en espacio abierto y la movilidad se mide directamente sin una implicación del criterio y puntuación humanos. Los resultados muestran que la prueba tiene una alta predecibilidad de los fármacos antidepresivos, incluyendo un ISRS, y una sensibilidad mejorada al tratamiento con antidepresivos. La distancia recorrida mide el estado de nado activo de los animales durante el periodo del ensayo. Además, es sensible a los ISRS sin requerir una modificación de la puntuación. Puede tener valor como una selección de modelos depresivos en la revelación de un mecanismo o mecanismos patofisiológicos de la depresión y la búsqueda de nuevas clases de antidepresivos.

Los modelos animales son indispensables en la búsqueda de nuevos antidepresivos y para aclarar la patofisiología que subyace a la depresión. Por otro lado, la disponibilidad de los antidepresivos clínicamente activos también ha hecho posible desarrollar y validar una amplia gama de pruebas conductuales para estudiar fenotipos similares a la depresión en modelos animales. En este modelo de espacio abierto, las ratas se quedaron rápidas y reproduciblemente inmóviles, mostrando un aumento de la inactividad "flotante" durante el transcurso de los ensayos. La validez de la prueba de natación en espacio abierto para la depresión se confirmó por los resultados obtenidos por los animales de prueba tratados con antidepresivos conocidos. Las tres clases principales de antidepresivos se representaron en este estudio: imipramina, un antidepresivo tricíclico (inhibición de los transportadores de recaptación de serotonina o norepinefrina); iproniazida, un inhibidor de la monoaminoxidasa, y

mianserina, un antidepresivo atípico, y alaproclato, un ISRS. La dosis empleada en este estudio fue similar/idéntica a la usada en ratas en estudios con antidepresivos sin inducir cambios en una actividad locomotora no especificada (Bai y col. (2001) *Pharmacol. Biochem. Behav* 70: 187-192; Krocicka y col. (2001) *Brain Res. Bull.* 55: 297-300; Takamori y col. (2001) *Pharmacology* 63: 147-153; Kitamura y col. (2002) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 63-69).

5 Los resultados de la prueba de natación en espacio abierto pueden compararse con los datos que se han informado previamente (Porsolt y col. (1977) *Nature* 266: 730-730-732; Porsolt y col. (1978) *Eur J. Pharmacol.* 47: 379-391), en los que se emplearon tres dosis i.p. similares (15 mg/kg) de estos antidepresivos tradicionales para ratas de la misma edad en la prueba de natación forzada. Los porcentajes de las reducciones en la distancia recorrida el tercer día (usando la reducción de los grupos de control como el 100%) en este estudio para los grupos de imipramina, iproniazida y mianserina fue $49,8 \pm 7,6\%$ ($n = 8$), $44,0 \pm 7,7\%$ ($n = 8$), y $33,3 \pm 6,3\%$ ($n = 8$), respectivamente, en comparación con el % de inmovilidad, como control de $61,5 \pm 6,5\%$ ($n = 5$; 15 mg/kg x 3 por día; $P < 0,01$; Porsolt y col. (1977) *Nature* 266: 730-730-732; $87,6 \pm 7,3\%$ ($n = 5$, 15 mg/kg x 3 por día; $P < 0,01$; Porsolt y col. (1978) *Eur J. Pharmacol.* 47: 379-391), y $66,5 \pm 7,0\%$ ($n = 5$, 15 mg/kg x 3 por día; $P < 0,01$; Porsolt y col. (1977) *Nature* 266: 730-730-732) en la prueba de natación forzada, respectivamente. Por lo tanto, las ratas ensayadas durante la prueba de natación en espacio abierto fueron más sensibles a los tratamientos con antidepresivos con diferencias estadísticamente significativas de la iproniazida ($F_{1,12} = 11,65$; $P < 0,01$) en comparación con los datos que se han informado previamente.

20 La prueba de nado en espacio abierto satisface tres de los cuatro requisitos mínimos (McKinney y col. (1969) *Arch Gen Psychiatr* Vol. 21, 240-8; Cryan y col. (2002) *Trends Pharmacol* 23: 238-45) para un modelo animal de depresión. Estos requisitos para un modelo animal adecuado incluyen (1) razonablemente análogos para el trastorno humano en su manifestación o sintomatología; (2) la existencia de un cambio conductual que pueda controlarse de forma objetiva; (3) la reversibilidad del cambio conductual por los mismos tratamientos que son eficaces en un ser humano; y (4) que puedan reproducirse por los investigadores. La fiabilidad en laboratorios aún no se ha probado. La prueba de natación forzada, que se ha usado durante muchos años, se visualiza generalmente como una prueba con alta predecibilidad de la eficacia del antidepresivo en la depresión humana (Porsolt y col. (1977) *Nature* 266: 730-730-732). Su valor en la búsqueda de nuevos tipos de fármacos eficaces no está claro.

30 El modelo de natación en espacio abierto tiene varias ventajas. En primer lugar, una ventaja obvia de la prueba sobre la prueba de natación forzada es que, a diferencia del criterio y puntuación del muestreo temporal en la prueba de natación forzada (Krocicka y col. (2001) *Brain Res Bull* 55: 297-300; Reneric y col. (2002) *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12: 159-71), el criterio y puntuación humanos no están implicados en esta prueba de manera que el control es más objetivo. En segundo lugar, la supervisión del objetivo ofrece la posibilidad de mejorar la reproducibilidad en diferentes laboratorios. En tercer lugar, la prueba de natación forzada no refleja la extensión o grado de un comportamiento, tal como movilidad de nado vigorosa, moderada o leve. Por el contrario, estas características se miden directamente en la prueba de natación en espacio abierto. Además, no se observó una conducta de escalada en el modelo de espacio abierto, probablemente debido al gran espacio disponible. Esto elimina otro criterio artificial como si la escalada tuviera contar más que o igual al nado activo en la prueba de natación forzada. En cuarto lugar, esta prueba no limita el movimiento de los animales debido a la restricción de espacio e imita el trastorno humano más estrechamente. Es la falta de motivación (oportunidades o esperanza) en lugar del "espacio físico" restringido lo que define en gran parte (aunque no exclusivamente) la enfermedad humana.

45 D. Anhidrasa Carbónica

La anhidrasa carbónica, una enzima que contiene cinc que cataliza la interconversión de dióxido de carbono y anión de bicarbonato, está presente por todo el cuerpo, incluyendo el cerebro (Sun y col. (2002) *Trends in Pharm. Sci.* 23(2): 83-89). La anhidrasa carbónica II, la más activa de las siete isozimas humanas, es una enzima de 23,9 kDa que se encuentra principalmente en los eritrocitos, células gliales y neuronas cerebrales. (Id.). Además de su implicación en la regulación del pH, la reabsorción de bicarbonato y la espiración del dióxido de carbono, la anhidrasa carbónica tiene una función crucial en el procesamiento de señales, la transformación sináptica a largo plazo y el desbloqueo de atención del almacenamiento de la memoria. (Id.). La disfunción de la anhidrasa carbónica se ha asociado con el retraso mental, la enfermedad de Alzheimer y la cognición deteriorada, y se ha demostrado que la activación de la anhidrasa carbónica mejora la memoria y el aprendizaje (Id; solicitudes de patente de Estados Unidos N° PCT/US02/13784; PCT/US02/14378; PCT/US03/07102; 60/287.271; 60/289.137; 60/362.081; 10/172.005; 10/476.459; y 10/477.121).

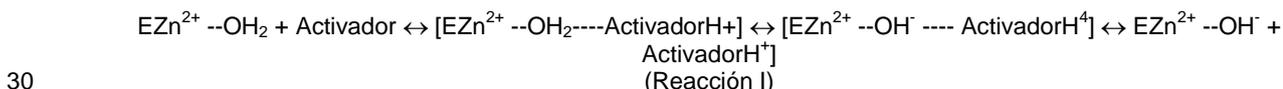
60 La anhidrasa carbónica cataliza una reacción reversible entre la hidratación del CO_2 y la deshidratación de HCO_3^- . Estudios recientes indican que la activación de esta enzima proporciona un mecanismo rápido y eficiente para elevar concentraciones de HCO_3^- en estructuras neuronales relacionados con la memoria. Un aumento del flujo de HCO_3^- a través de los canales de los receptores GABA_A sinápticos altera las respuestas neuronales postsinápticas a GABA y, por lo tanto, las respuestas neuronales a diversas entradas de señales. De esta manera, la anhidrasa carbónica funciona como un desbloqueo atencional eficaz que controla la transferencia de señales a través de la red neuronal.

Las alteraciones en la actividad de la anhidrasa carbónica en las neuronas hipocámpales CA1 proporcionan un mecanismo para invertir entre estados operacionales en las sinapsis de liberación de GABA, desbloqueando así la transferencia de señales a través de la red hipocámpal.

5 La actividad de la anhidrasa carbónica se activa, al menos parcialmente, por la liberación intracelular de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (Ry). Por ejemplo, el RyR está implicado en la inversión sináptica mediada por GABA. El efecto del Ca^{2+} sobre la anhidrasa carbónica parece ser directo. En las líneas celulares mielomonocíticas humanas, la síntesis de la anhidrasa carbónica II se activa por la proteína cinasa C, un efecto que se bloquea por 0,1 μm de estaurosporina. Las hormonas también regulan la actividad de la anhidrasa carbónica a través de cAMP. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la anhidrasa carbónica inducida por la adrenalina y dibutilil-cAMP en los eritrocitos se potencia por la teofilina, y la fosforilación mediante una proteína cinasa dependiente de cAMP activa la anhidrasa carbónica.

15 Existen al menos siete isozimas de la anhidrasa carbónica en los seres humanos (Lindskog (1997) Pharmacol. Ther. 74 (1): P1-20). Se conoce la estructura del sitio de unión a la ACII para acetazolamida y algunos otros inhibidores. Este conocimiento permite un diseño racional de derivados y análogos de los compuestos contemplados en este documento.

20 En base a estudios estructurales, bioquímicos y químicos medicinales, el perfil farmacológico de la anhidrasa carbónica se ha refinado y se han desarrollado activadores específicos. Los activadores de la anhidrasa carbónica proporcionaron una herramienta importante para el tratamiento de deficiencias de anhidrasa carbónica genéticas y trastornos de la memoria. Muchas aminas y aminoácidos (por ejemplo, dopamina, serotonina, noradrenalina, adrenalina, histamina, histidina, imidazoles, fenilalanina o derivados de los mismos (véase el documento WO 00/56760) son activadores de la anhidrasa carbónica. Específicamente, los activadores de la anhidrasa carbónica aumentan la velocidad de interconversión del dióxido de carbono y el ión bicarbonato (Reacción I) actuando directamente como aceptores de protones.



Los activadores de la anhidrasa carbónica y la activación por cada uno de la actividad de la anhidrasa carbónica II humana (con respecto a la activación de la enzima por alanina) se representa en la Tabla 1.

35 **TABLA 1. Activadores de anhidrasa carbónica (Compuestos de referencia)**

Efactor	Ar	R1	R2	R3	% de actividad/Actividad de la ACII de Control
1	H	H	COOH	H	100
2	Fenilo	H	COOH	H	186,7
3	Fenilo	H	H	H	109,5
4	4-Hidroxifenilo	H	COOH	H	189,1
5	4-Fluorofenilo	H	COOH	H	167,7
6	4-Aminofenilo	H	COOH	H	159,4
7	3-Amino-4-hidroxifenilo	H	COOH	H	176,3
8	3,4-Dihidroxifenilo	H	COOH	H	134,3
9	3,4-Dihidroxifenilo	H	H	H	137,5
10	3,4-Dihidroxifenilo	OH	H	H	115,5
11	3,4-Dihidroxifenilo	OH	H	CH ₃	135,0
12	3,4-Dihidroxifenilo	OH	CH ₃	H	129,0
13	Fenilo	OH	CH ₃	CH ₃	134,5
14	Imidazol	(Ar únicamente, sin resto de cadena C-C)			230,0
15	Imidazol-4-ilo	H	H	H	150,0
16	Imidazol-4-ilo	H	COOH	H	170,0
17	5-Metilimidazol-4-ilo	H	H	H	130,5

El cribado de alto rendimiento de bibliotecas combinatorias de productos naturales y caldos de fermentación ha dado como resultado el descubrimiento de varios fármacos nuevos. En la actualidad, la generación y cribado de la diversidad química se utiliza ampliamente como una técnica principal para el descubrimiento de compuestos

candidatos, y esto sin duda es un gran avance fundamental en el área del descubrimiento de fármacos. Adicionalmente, incluso después del descubrimiento de un compuesto "candidato", las técnicas combinatorias proporcionan una herramienta valiosa para la optimización de la actividad biológica deseada. Como se apreciará, la reacción objeto se presta fácilmente a la creación de librerías combinatorias de compuestos para el cribado de una actividad farmacéutica, u otra actividad biológica o relacionada médicamente, o de calidades relacionadas con el material. Una biblioteca combinatoria para los fines de la presente invención es una mezcla de compuestos relacionados químicamente, que pueden cribarse juntos para obtener una propiedad deseada; dichas bibliotecas pueden estar en solución o unidas covalentemente a un soporte sólido. La preparación de muchos compuestos relacionados en una única reacción reduce y simplifica en gran medida el número de procesos de cribado que han de realizarse. El cribado para obtener la propiedad biológica apropiada puede realizarse mediante procedimientos convencionales.

Están disponibles en la técnica una diversidad de técnicas para generar las bibliotecas combinatorias que se describen a continuación, pero se entenderá que la presente invención no se limita por los anteriores ejemplos y descripciones (véase, por ejemplo, Blondelle y col. (1995) Trends Anal. Chem. 14: 83; las patentes de Estados Unidos 5.359.115; 5.362.899; el documento U.S. 5.288.514: publicación PCT WO 94108051; Chen y col. (1994) JACCS 16: 266 1; Kerr y col. (1993) JACCS I 15: 252; publicaciones PCT WO92/10092, WO93/09668; WO91/07087; y WO93/20242). Por consiguiente, puede sintetizarse y cribarse una diversidad de bibliotecas en el orden de aproximadamente 16 a 1.000.000 o más diversómeros para conseguir una actividad o propiedad particular.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de su alcance de ningún modo.

EJEMPLO 1: Prueba de Natación en Espacio Abierto para la Depresión

Se alojaron ratas Wistar adultas (180-200 g) en una habitación de temperatura controlada (20-24 °C) durante al menos una semana antes del experimento, se les dejó acceso libre a comida y agua, y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se asignaron de forma aleatoria a diferentes grupos (ocho cada uno) y se trasladaron a la habitación de pruebas en sus jaulas al menos 1 h antes de los ensayos. Las ratas se colocaron individualmente en una piscina redonda con un diámetro de 152 cm y una altura de 60 cm y se llenó con 40 cm de H₂O (22 ± 1 °C). La habitación y la piscina son parte de la configuración de inicio usada para tarea espacial del laberinto de agua (Sun y col. (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther. 300: 408-416). Las pruebas para diferentes tratamientos de fármacos y grupos de control estaban en un orden contrarrestado. No había escape disponible en estos ensayos. Las ratas eran libres de nadar (o no nadar) durante 15 min y después se sacaron y se devolvieron a sus jaulas después del secado. Los observadores estaban ocultos a la vista de las ratas durante los ensayos, Pero podían observar el comportamiento de los animales en una pantalla de vídeo durante los ensayos. Se repitió el mismo procedimiento (15 min de sesión por día) 24 h más tarde y se continuó durante 3 días más. Los fármacos se disolvieron en una solución salina para los grupos de prueba y se usó solución salina sola en los grupos de control. El compuesto de referencia imipramina (10 mg/kg x 3 día, i.p.), compuesto de referencia iproniazida (10 mg/kg x 3 por día, i.p.), compuesto de referencia manserina (10 mg/kg x 3 por día, i.p.), compuesto de referencia alaproclato (10 mg/kg x 3 por día) o solución salina se administraron entre las sesiones de ensayo de nado 23, 2 y 1 h antes de la segunda, tercera y cuarta sesión de ensayo, respectivamente. El fundamento para las tres dosis antes de los ensayos de prueba es los efectos predictivos más consistentes que los de una sola dosis (Porsolt y col. (1977) Nature 266: 730-730-732; Porsolt y col. (1978) Eur J. Pharmacol. 47: 379-391; Poncelet y col., (1986) Psychopharmacology 90: 139-141). La trayectoria de nado/deriva se registró con un sistema de seguimiento de vídeo que también se usó para la tarea espacial del laberinto de agua en otros estudios (Sun y col., 2002; Sun y Alkon, 2002a). El sistema rastrea la posición del animal registrando las coordenadas de x/y secuenciales de los acontecimientos desencadenantes (señal de vídeo sobre el nivel de seguimiento) y calculando la distancia en la piscina (periodo de muestra: 0,055 s) y añade la distancia a intervalos establecidos previamente (15 min) durante cada ensayo. Sin embargo, el sistema de seguimiento ni distingue ni determina la duración de ningún periodo de movilidad o inmovilidad. Para evaluar si la distancia recorrida, como se registra por el sistema de seguimiento, refleja la duración del nado activo, el investigador, o investigadores, también registra la duración del nado activo en línea a través de la pantalla de vídeo para realizar una comparación directa de los dos parámetros.

EJEMPLO de referencia 2. La prueba de natación en espacio abierto induce inmovilidad en ratas.

Las ratas inyectadas con solución salina (ocho por grupo) mostraron una reducción gradual y significativa (figura 1) en la movilidad (distancia recorrida) ($F_{3,31} = 49,717$; $P < 0,001$). La distancia recorrida incluye toda la distancia recorrida durante la totalidad de 15 min, como la causada por el nado activo/búsqueda, así como lentas derivas, que se causaron por el movimiento aparentemente de no búsqueda de las puertas, en el movimiento total. El nado activo se define como cuando una rata está haciendo movimientos de nado activo como aquellos al moverse alrededor de

la piscina. A diferencia de los patrones conductuales informados en la prueba de natación forzada (por ejemplo, Reneric y col., 2002), no se observó escalada en la pared, probablemente debido al gran espacio disponible para las ratas. Según progresaron los ensayos, las ratas de control mostraron progresivamente menos y más breves periodos intermitentes de nado activo. Se alcanzó una reducción máxima de su movilidad en el 3^{er} ensayo en estas ratas de control (figura 1). Típicamente, una rata de control no hizo ningún movimiento distinto de los suficientes para mantener su cabeza por encima de la superficie del agua (inmovilidad; no mostrado), una conducta característica que se toma como un indicador de depresión en la prueba de natación forzada.

EJEMPLO 3. Inmovilidad inducida sensible a tratamientos con antidepresivos tradicionales.

El tratamiento con antidepresivos disminuyó significativamente la reducción de la distancia recorrida en los ensayos (figura 1), en comparación con la del grupo de control. Un análisis estadístico reveló efectos significativas de los grupos ($F_{3,16} = 25,071$; $P < 0,001$) indicando que la movilidad en las ratas que se inyectaron con los antidepresivos era significativamente mayor que la de las ratas que se inyectaron únicamente con vehículo. Estas ratas mostraron más periodos de nado activo/búsqueda y más duraderos, medidos como la distancia nadada, aunque los periodos de nado activo no se cuantificaron individualmente en el estudio. Además, un análisis *post hoc* reveló una diferencia significativa del 2^o ensayo con respecto al 4^o ensayo ($P < 0,05$), confirmando una movilidad superior de los grupos de ratas que recibieron el tratamiento con antidepresivos. Para los tres grupos de fármacos usados como ejemplos de referencia, los análisis estadísticos no revelaron una diferencia significativa entre los grupos ($F_{2,12} = 4,199$; $P < 0,05$), aunque la iproniazida parecía más eficaz a la dosis dada que la mianserina y la imipramina en la reducción de la movilidad. **(Figura 1)**. Una comparación entre los presentes resultados y los datos que se han informado previamente obtenidos usando la prueba de natación forzada revela que la presente prueba muestra un efecto antidepresivo mejorado en general.

EJEMPLO de referencia 4. Inmovilidad inducida sensible al tratamiento con antidepresivos ISRS.

Alaproclato, un ISRS, fue eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto **(Figura 2A)**, en comparación con la de un grupo de control. Los análisis estadísticos produjeron una diferencia significativa entre los grupos ($F_{1,8} = 32,60$; $P < 0,001$), indicando que la movilidad de las ratas que se inyectaron con alaproclato fue significativamente superior que la de las ratas que se inyectaron sólo con vehículo.

Si la diferencia observada en la distancia recorrida reflejaba una duración diferente del nado activo que se evaluó registrando los periodos durante los cuales las ratas realizaron claramente un nado activo, es decir, haciendo esos movimientos obvios para nadar en la piscina. Se ilustró una comparación de los resultados de los diferentes grupos en la **Figura 2B**. La duración del nado activo del grupo de alaproclato fue significativamente mayor (diferencia del grupo: $F_{1,8} = 31,51$; $P < 0,001$) que la del grupo de control. El cambio del % en la distancia recorrida (usando un cambio correspondiente del grupo de control como el 100%) no difería significativamente ($P > 0,05$, prueba t no apareado) del cambio de % en la duración del nado activo (usando un cambio correspondiente del grupo de control como el 100%). Por lo tanto, los resultados muestran que el parámetro, "distancia recorrida", de hecho refleja la duración de la movilidad durante la prueba.

EJEMPLO de referencia 5: Inmovilidad inducida sensible a fenilalanina.

Se indujo un comportamiento depresivo en ratas colocando a los animales en un aparato de natación en espacio abierto, como se describe en este documento, durante 15 minutos por ensayo y por día. Los animales se sometieron a tres ensayos en el transcurso de tres días. Los animales se dividieron en tres grupos: ratas de control (8); ratas de fenilalanina (10); y ratas de imipramina (10). Las ratas de control recibieron una sola dosis i.v. de solución salina en la vena de la cola, 3,5 horas antes del segundo ensayo. Las ratas en el grupo de briostatina-1 recibieron una sola dosis i.v. de fenilalanina en la vena de la cola, 3,5 horas antes del segundo ensayo. Las ratas en el grupo de imipramina recibieron 3 dosis i.p. (10 mg/kg) 23, 2 y 1 hora antes del primer, segundo y tercer ensayos, respectivamente.

La fenilalanina, un activador de anhidrasa carbónica, fue eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto, en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina. **(Figura 3)**. El análisis estadístico demuestra una diferencia significativa entre los grupos de fenilalanina, imipramina y de control, indicando de este modo que la movilidad de las ratas inyectadas con fenilalanina es significativamente mayor que en las ratas que recibieron imipramina o solución salina.

EJEMPLO de referencia 6: Inmovilidad inducida sensible a briostatina-1.

Se indujo un comportamiento depresivo en ratas colocando a los animales en un aparato de natación en espacio abierto, como se describe en este documento, durante 15 minutos por ensayo y por día. Los animales se sometieron a tres ensayos en el transcurso de tres días. Los animales se dividieron en tres grupos: ratas de control (8); ratas de

5 briostatina-1 (10); y ratas de imipramina (10). Las ratas de control recibieron una sola dosis i.v. de solución salina en la vena de la cola, 3,5 horas antes del segundo ensayo. Las ratas en el grupo de briostatina-1 recibieron una sola dosis i.v. de briostatina-1 (80 µg/kg) en la vena de la cola, 3,5 horas antes del segundo ensayo. Las ratas en el grupo de imipramina recibieron 3 dosis i.p. (10 mg/kg) 23, 2 y 1 hora antes del primer, segundo y tercer ensayos, respectivamente.

10 La briostatina-1, un activador de PKC, fue eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto, en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina. (**Figura 4**). El análisis estadístico demuestra una diferencia significativa entre la fenilalanina, la imipramina y los grupos de control, indicando así que la movilidad de las ratas inyectadas con briostatina-1 es significativamente superior que la de las ratas que reciben imipramina o solución salina ($F_{2,27} = 6,168$; $P = 0,007$). No se observó una diferencia significativa entre los grupos de briostatina-1 y de imipramina ($F_{2,27} = 10,128$; $P = 0,724$).

15 **EJEMPLO de referencia 7: Inmovilidad inducida sensible a imidazol.**

El imidazol, un activador de anhidrasa carbónica, es eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

20 **EJEMPLO 8: Inmovilidad inducida sensible a diimidazol enlazado.**

El diimidazol enlazado (estructura I, en la que R₂ es H y n = 1 ó 2), un activador de anhidrasa carbónica, es eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

25 **EJEMPLO de referencia 9: Inmovilidad inducida sensible a tirosina.**

La tirosina, un activador de anhidrasa carbónica, es eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

30 **EJEMPLO de referencia 10: Inmovilidad inducida sensible a 4-fluoro-fenilalanina.**

35 La 4-fluoro-fenilalanina, un activador de anhidrasa carbónica, es eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

40 **EJEMPLO 11: Inmovilidad inducida sensible a activadores de anhidrasa carbónica que proporcionan una actividad de anhidrasa carbónica de entre el 150 y el 250% que la observada con alanina.**

Los compuestos que activan anhidrasa carbónica II entre el 150 y el 250% con respecto a la activación observada para la alanina, son eficaces en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

45 **EJEMPLO de referencia 12: Inmovilidad inducida sensible a neristatinas.**

Las neristatinas, activadores de PKC, son eficaces en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

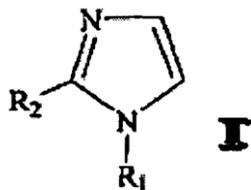
50 **EJEMPLO de referencia 13: Inmovilidad inducida sensible a FGF-18.**

El FGF-18, un activador de PKC, es eficaz en la reducción de la inmovilidad en la prueba de natación en espacio abierto en comparación con un grupo de control y un grupo tratado con el antidepresivo imipramina.

REIVINDICACIONES

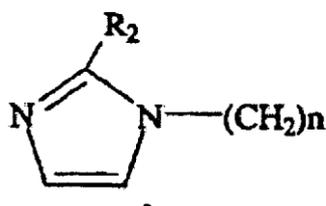
1. Una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de un trastorno depresivo, que comprende un activador de anhidrasa carbónica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el activador se selecciona entre el grupo que consiste en:

(2) estructura I:



(I)

en la que R₁ es



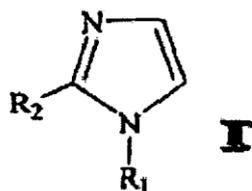
en la que n es 1 ó 2 y R₂ es H, un grupo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico o alquilo C₁-C₄, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que R₂ es H o metilo.

3. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que el activador activa la anhidrasa carbónica intraneuronal.

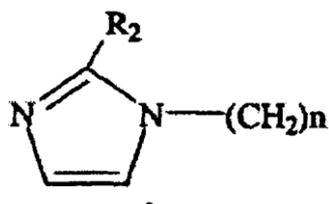
4. El uso de una composición para la fabricación de un medicamento para un trastorno depresivo, que comprende un activador de anhidrasa carbónica y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el activador se selecciona entre el grupo que consiste en:

(2) estructura I:



(I)

en la que R₁ es



en la que n es 1 ó 2 y R₂ es H, un grupo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico o alquilo C₁-C₄, y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

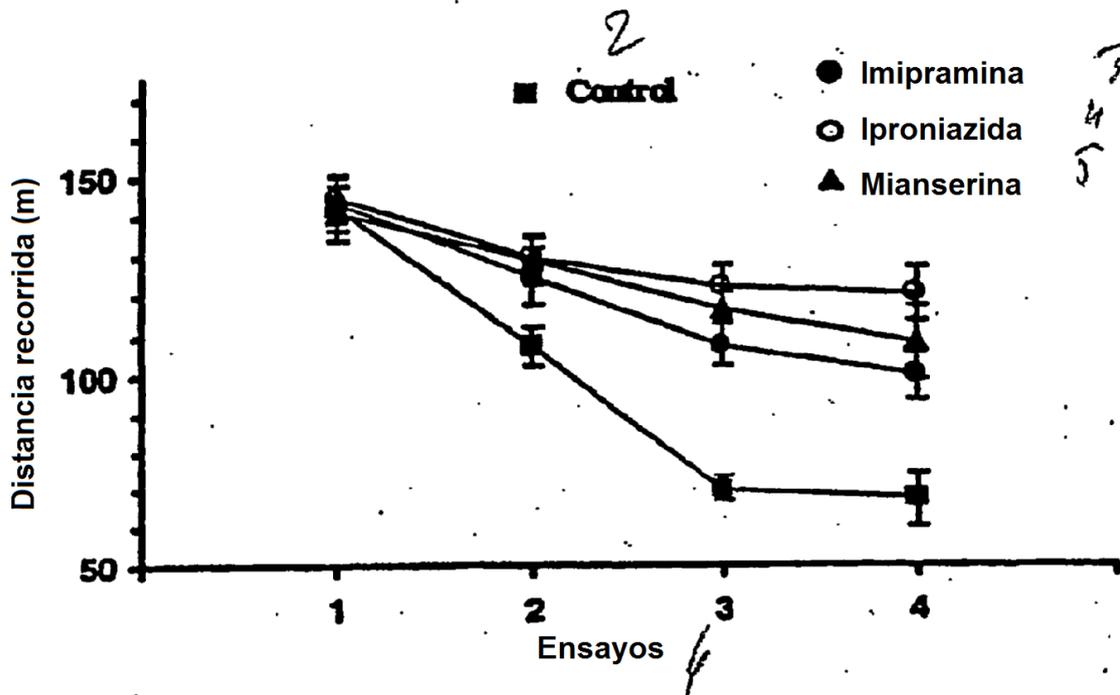
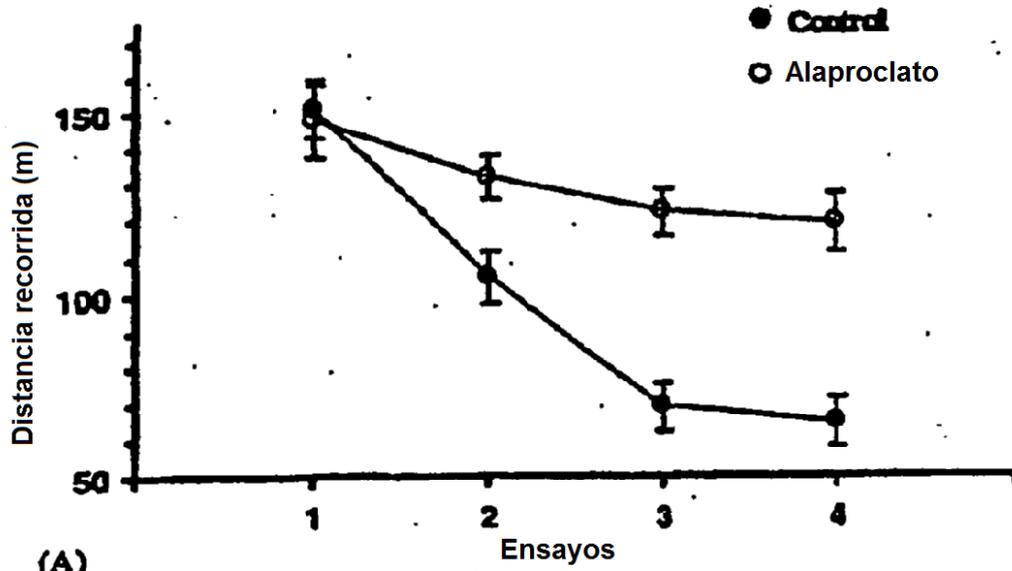
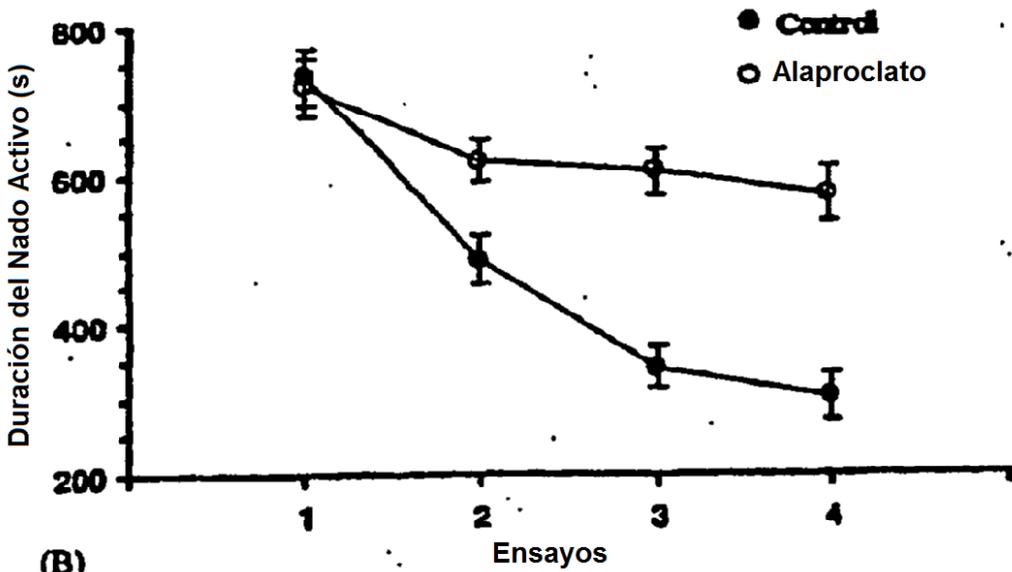


FIG 1



(A)



(B)

FIG. 2A Y 2B

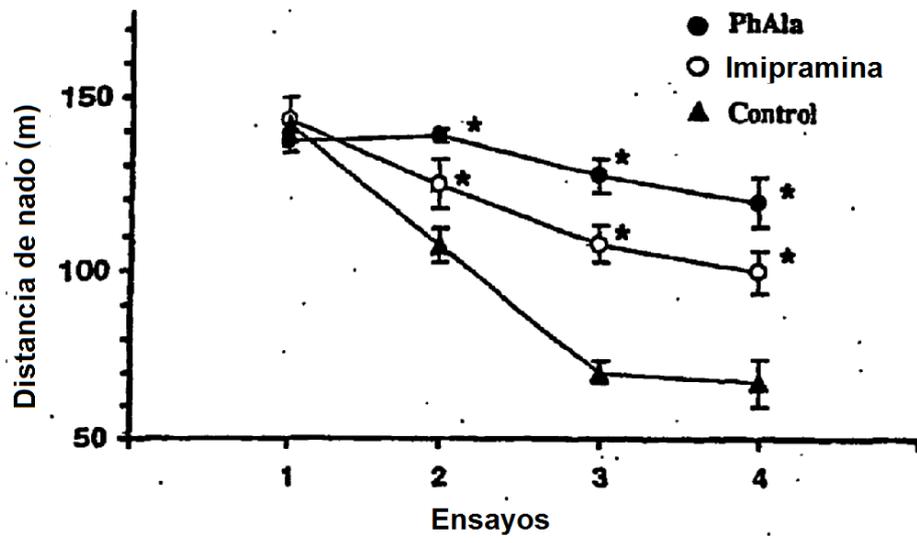


FIG 3

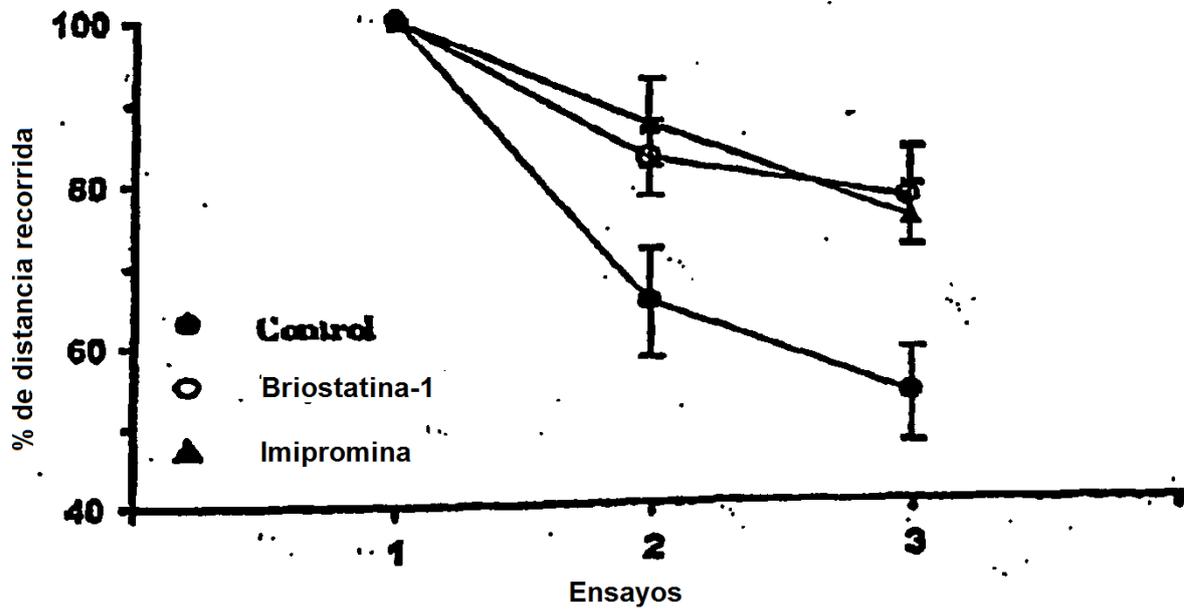


FIG 4