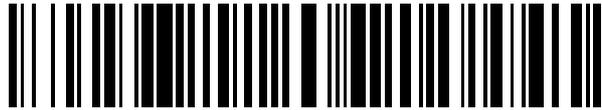


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 622**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2009 E 09709577 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2254598**

54 Título: **Combinación de agonistas nicotínicos alfa 7 y antipsicóticos**

30 Prioridad:

13.02.2008 US 28282

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

21.11.2013

73 Titular/es:

**TARGACEPT, INC. (100.0%)
100 North Main Street, Suite 1510
Winston-Salem, NC 27101, US**

72 Inventor/es:

**BENCHERIF, MEROUANE;
GATTO, GREGORY J.;
HAUSER, TERRY;
JORDAN, KRISTEN G. y
LETCHWORTH, SHARON R.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 430 622 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

Combinación de agonistas nicotínicos alfa 7 y antipsicóticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una combinación de un agonista nicotínico alfa 7 ($\alpha 7$) y un agente antipsicótico. La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden dicha combinación y a procedimientos para tratar trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos psicóticos, mediante la administración de dicha combinación. La invención se refiere adicionalmente a un kit que comprende la combinación y el uso de dicho kit en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos psicóticos.

Antecedentes la invención

10 Se ha demostrado que los receptores nicotínicos neuronales (NNR) característicos del sistema nervioso central (SNC) se producen en varios subtipos, los más comunes de los cuales son los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$. Véase, por ejemplo, Schmitt, *Current Med. Chem.* 7: 749 (2000). Se ha propuesto que los ligandos que interactúan con el subtipo $\alpha 7$ del NNR son útiles en el tratamiento de una diversidad de afecciones y trastornos (véase Mazurov y col., *Curr. Med. Chem.* 13: 1567-1584 (2006) y las referencias en el mismo). Cabe destacar entre esas afecciones y trastornos el deterioro cognitivo, esquizofrenia, inflamación, angiogénesis, dolor neuropático y fibromialgia.

20 Se ha informado que diversos compuestos interactúan con los NNR $\alpha 7$ y se han propuesto como terapias sobre esa base. Véanse, por ejemplo, el documento PCT WO 99/62505, el documento PCT WO 99/03859, el documento PCT WO 97/30998, el documento PCT WO 01/36417, el documento PCT WO 02/15662, el documento PCT WO 02/16355, el documento PCT WO 02/16356, el documento PCT WO 02/16357, el documento PCT WO 02/16358, el documento PCT WO 02/17358, Stevens y col., *Psychopharm.* 136: 320 (1998), Dolle y col., *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 44: 785 (2001) y Macor y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 319 (2001) y las referencias en los mismos, cada uno de los cuales se incorpora por referencia con respecto a dichas enseñanzas de antecedentes. Entre estos compuestos, un tema estructural común es el de la amina bicíclica terciaria sustituida (por ejemplo, quinuclidina). También se ha informado que compuestos similares de quinuclidina sustituida se unen a los receptores muscarínicos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.712.270 de Sabb y los PCT, el documento WO 02/00652 y el documento WO 02/051841, cada uno de los cuales se incorpora por referencia con respecto a dicha enseñanza.

30 Una limitación de algunos compuestos nicotínicos es que se asocian con diversos efectos secundarios no deseados, por ejemplo, estimulando los receptores musculares y ganglionares. Por consiguiente, sería deseable tener compuestos, composiciones y procedimientos para prevenir y/o tratar diversas afecciones o trastornos (por ejemplo, trastornos del SNC), incluyendo el alivio de los síntomas de estos trastornos, donde los compuestos presentan farmacología nicotínica con un efecto beneficioso (por ejemplo, en el funcionamiento del SNC), pero sin efectos secundarios asociados significativos. Además, podría ser muy deseable proporcionar compuestos, composiciones y procedimientos que afecten a la función del SNC sin afectar significativamente a esos subtipos de receptores nicotínicos que tienen el potencial de inducir efectos secundarios no deseados (por ejemplo, actividad apreciable en los sitios del músculo cardiovascular y esquelético). Además, sería muy deseable proporcionar composiciones y procedimientos farmacéuticos que incorporen un compuesto que interactúa con los receptores nicotínicos pero no con los receptores muscarínicos, ya que los últimos están asociados con efectos secundarios, tales como hipersalivación, sudoración, temblores, alteraciones cardiovasculares y gastrointestinales, relacionados con la función del sistema nervioso parasimpático (véase Caulfield, *Pharmacol. Ther.* 58: 319 (1993) y Broadley y Kelly, *Molecules* 6: 142 (2001), que se incorporan en el presente documento por referencia con respecto a dicha enseñanza). Además, sería muy deseable proporcionar composiciones y procedimientos farmacéuticos que incorporaran un compuesto que interactúa con los receptores nicotínicos pero no con los receptores de 5-hidroxitriptamina (5HT3), ya que la reactividad cruzada entre estos dos tipos de receptores ha limitado el índice terapéutico de algunos otros ligandos nicotínicos. La presente invención proporciona composiciones y procedimientos que incorporan dichos compuestos nicotínicos altamente selectivos.

50 La esquizofrenia es un ejemplo de un trastorno psicótico que es particularmente susceptible de tratamiento mediante la modulación del subtipo $\alpha 7$ de NNR. Existe una disminución del número de NNR del hipocampo en el tejido cerebral postmortem de pacientes esquizofrénicos. Además, existe un efecto psicológico mejorado en el hábito de fumar en comparación con los pacientes esquizofrénicos no fumadores. La nicotina mejora los déficits de estimulación sensorial en animales y en esquizofrénicos. El bloqueo del subtipo $\alpha 7$ de NNR induce un déficit de estimulación similar al observado en la esquizofrenia. Véase, por ejemplo, Leonard y col., *Schizophrenia Bulletin* 22 (3): 431 (1996), que se incorpora en el presente documento por referencia con respecto a dicha enseñanza. Los estudios bioquímicos, moleculares y genéticos del procesamiento sensorial, en pacientes con déficit de estimulación del potencial evocado auditivo P50, sugieren que el subtipo $\alpha 7$ de NNR puede funcionar en una vía neuronal inhibitoria. Véase, por ejemplo, Freedman y col., *Biological Psychiatry* 38 (1): 22 (1995), que se incorpora en el presente documento por referencia con respecto a dicha enseñanza.

Los antipsicóticos se han usado desde hace mucho tiempo en el tratamiento de trastornos psicóticos (esquizofrenia, por ejemplo), así como otros trastornos psiquiátricos. Los ejemplos de antipsicóticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, clorpromazina, haloperidol, flupentixol, y perfenazina. Ejemplos de antipsicóticos atípicos incluyen, pero no se limitan a, clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox y asenapina. Los antipsicóticos atípicos ofrecen varios beneficios clínicos sobre los antipsicóticos convencionales. Las ventajas perceptibles a modo de ejemplo sobre las medicaciones antipsicóticas tradicionales incluyen una mejoría superior de los síntomas negativos, tales como el aislamiento social, y un menor riesgo de efectos secundarios parkinsonianos y disquinesia tardía.

Sumario de la invención

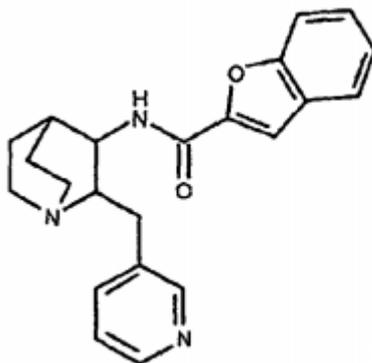
10 La presente invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende [a] (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma en forma de un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) al menos un agente antipsicótico, en la que la combinación proporciona terapia sinérgica para trastornos psiquiátricos.

15 En una realización, el trastorno psiquiátrico es un trastorno psicótico. En una realización adicional, el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia.

En una realización, la combinación farmacéutica de la presente invención proporciona terapia sinérgica para uno o más trastornos de atención, procesamiento de la información, trastornos de la memoria, o déficits en la función ejecutiva.

20 En una realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ y el al menos un agente antipsicótico se proporcionan de forma simultánea, secuencial, o por separado.

El agente nicotínico $\alpha 7$ usado en la invención 1 es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, también denominada en el presente documento Compuesto A.



Compuesto A

25 En una realización adicional, el agente nicotínico $\alpha 7$ es una sal del ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido maleico, o ácido *p*-toluenosulfónico de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o un solvato de la misma.

30 El compuesto (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-5-metiltiofeno-2-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, también denominada en el presente documento Compuesto B y sus usos también se describe por referencia. Las sales del Compuesto B incluyen la sal del ácido clorhídrico, ácido fosfórico, o *p*-toluenosulfónico de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-5-metiltiofeno-2-carboxamida o un solvato de las mismas.

35 En una realización, el agente antipsicótico es un antipsicótico convencional o atípico. En esas realizaciones en las que el antipsicótico es un antipsicótico convencional, el agente se selecciona entre clorpromazina, haloperidol, flupentixol, o perfenazina, o un metabolito, sal, o solvato del mismo. En esas realizaciones en las que el antipsicótico es un antipsicótico atípico, el agente se selecciona entre clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox, o asenapina, o un metabolito, sal o solvato del mismo. En una realización, el al menos un agente antipsicótico es clozapina o quetiapina, o un metabolito, sal, o solvato del mismo.

40 La presente invención incluye un procedimiento para el tratamiento de prevención de un trastorno psiquiátrico que comprende la administración de una combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. En una realización, el trastorno psiquiátrico es un trastorno psicótico. En una realización adicional, el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico

breve, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico resistente al tratamiento, un trastorno psicótico debido a afecciones médicas generales, o un trastorno psicótico que no se especifica de otro modo. En aún una realización adicional, el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia.

5 La presente invención incluye un kit para el tratamiento o la prevención de trastornos psiquiátricos que comprende un envase que contiene una combinación sinérgica de uno o más agonistas nicotínicos $\alpha 7$ y uno o más agentes antipsicóticos.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 ilustra la capacidad de un agonista del receptor nicotínico $\alpha 7$, específicamente el Compuesto B de referencia, de revertir el déficit en la ganancia sensorial en ratones th(tk-)/th(tk-) (n = 15). El Compuesto B no tuvo efecto en el control (n = 8).

La Figura 2a ilustra que no hubo efecto principal significativo del Compuesto A en los ratones de control, indicando que el fármaco no tuvo efecto sobre la PPI en los ratones de control. Como se ilustra en la Figura 2b, sin embargo, el Compuesto A tuvo un efecto en los ratones transgénicos [th(tk-)/th(tk-)], mostrando por lo tanto la capacidad del Compuesto A de mejorar la PPI en ratones transgénicos (n = 8).

15 La Figura 3 ilustra los efectos terapéuticos de los agonistas nicotínicos $\alpha 7$ en la estimulación sensorial. Los ratones transgénicos tuvieron una mayor respuesta al sobresalto que los ratones de control (n = 8).

La Figura 4 ilustra los efectos terapéuticos en la clozapina para corregir la ganancia sensorial en ratones transgénicos.

20 La Figura 5 ilustra una interacción sinérgica entre la clozapina y el Compuesto A en ratones transgénicos (PPI) (n = 8).

La Figura 6 ilustra una interacción sinérgica entre la clozapina y el Compuesto A en ratones transgénicos (respuesta al sobresalto) (n = 8).

Las Figuras 7a y 7b ilustran la capacidad de la quetiapina para corregir la estimulación sensorial en ratones transgénicos, PPI y respuesta al sobresalto respectivamente.

25 La Figura 8 ilustra una interacción sinérgica entre el Compuesto A y la quetiapina en ratones transgénicos (PPI y respuesta al sobresalto).

Las Figuras 9A y 9B son ilustraciones gráficas del efecto del Compuesto A sobre los receptores $\alpha 7$ expresados en oocitos de *Xenopus*. Figura 9A: Dosis-respuesta para las corrientes evocadas del Compuesto A en receptores $\alpha 7$ humanos expresada en oocitos de *Xenopus*. Figura 9B: Respuestas de control evocado por ACh de receptores $\alpha 7$ humanos después de la aplicación del Compuesto A en las concentraciones indicadas. Los datos se normalizaron a la carga neta de respuestas de ACh 300 μ M al control obtenidas 5 min antes de las respuestas experimentales evocadas por agonistas. Cada punto representa la Media \pm SEM de las respuestas normalizadas de al menos 4 oocitos.

35 Las Figuras 10A y 10B son representaciones gráficas de datos que muestran que el Compuesto A no tiene efecto en la actividad locomotora en el Ensayo en Campo abierto y en el Laberinto Elevado En Cruz. Figura 10A: El tiempo de Control de los ratones th(tk-)/th(tk-) (TK-) pasado en la zona periférica o central del campo abierto. Aunque los ratones TK- pasaron significativamente más tiempo en el centro (y en consecuencia significativamente menos tiempo en la periferia) que los Controles, no hubo efecto del Compuesto A (0,3 mg/kg). * = significativamente diferente a partir de los controles (p < 0,05). Figura 10B. El Compuesto A no tuvo efecto en el tiempo pasado en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Los sujetos de ambos genéticos pasaron significativamente más tiempo en los brazos cerrados que en los brazos abiertos. Los ratones TK- pasaron significativamente más tiempo en los brazos abiertos que los controles. No hubo efecto del fármaco. * = significativamente diferente a partir de los controles (p < 0,05).

45 La Figura 11 es una representación gráfica de los datos que muestran que el Compuesto A invierte el deterioro inducido por apomorfina de la inhibición del prepulso. Para examinar la inhibición del prepulso (PP), los ensayos de PP implicaron un prepulso de 75 dB (= 10 dB sobre el fondo) o 85 dB (= 20 dB sobre el fondo) de 20 mseg de duración con un inicio de 100 mseg antes de un pulso de 120 dB de 40 mseg de duración. El intervalo promedio entre ensayos se estableció a 40 seg con un intervalo de 20-60 seg, y la longitud del intervalo entre ensayos se seleccionó aleatoriamente. La respuesta al sobresalto se midió durante 100 ms desde el inicio de la presentación del pulso de 120 dB. Se midió la magnitud del "encogimiento por el dolor" de una rata sobresaltada. En una comparación global entre los factores del tratamiento con fármacos (solo), la administración de solución salina más (-)apomorfina (1,0 mg/kg; por vía subcutánea) redujo significativamente el % de PPI en comparación con los animales tratados con solución salina + vehículo (+ p < 0,001). El Compuesto A (0,3 mg/kg; por vía subcutánea) invirtió significativamente (**p < 0,001) los déficits de PPI inducidos por apomorfina (% de PPI) seguido de 0,3 de Compuesto A + 1,0 de Apo cuando se compara con solución salina más (-)apomorfina (1,0 mg/kg; por vía subcutánea). El haloperidol antipsicótico típico (0,3 mg/kg; por vía intraperitoneal) invirtió significativamente (**p < 0,001) los déficits de PPI inducidos por apomorfina (% de PPI) seguido de 0,3 de HAL + 1,0 de Apo cuando se compara con solución salina más (-)apomorfina (1,0 mg/kg; por vía subcutánea). Los datos se expresan como media \pm SEM. La (-)apomorfina se obtuvo en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La (-)apomorfina se disolvió en solución salina que contenía ácido ascórbico al 0,1 % (p/v) (Sigma) y se refrigeró en la oscuridad para proteger frente a la degradación oxidativa.

60 Las Figuras 12A y 12B son presentaciones gráficas de los datos que muestran los efectos de dosis-respuesta

del Compuesto A en la cognición de un paradigma de Reconocimiento de Objetos Nuevos. Figura 12A (izquierda): el Compuesto A se administró por vía oral. (0,3 - 10 mg/kg) y los efectos sobre la cognición se determinaron en un paradigma de reconocimiento de objetos novedosos (NOR), como se describe en 'Procedimientos'. Los resultados se expresan como el tiempo pasado en la exploración de objetos nuevos y familiares (Media \pm SEM). **p < 0,02 en comparación con los con los controles de vehículo. Figura 12A (derecha): el Compuesto A se administró por vía oral. (0,3 mg/kg) y los tiempos de exploración se determinaron a las 0,5, 2, 6, 18 y 24 h después de la administración. Los datos expresan como Media \pm SEM. p < 0,05 en comparación con los controles de vehículo. Figura 12B: se calculó el índice de reconocimiento del % de A (% de IR = [(tiempo investigando el objeto nuevo)/(tiempo total investigando ambos objetos nuevo + familiar)]) en diversos momentos después de la administración del Compuesto A (0,3 mg/kg por vía oral.). Los resultados representan el Índice de Reconocimiento (IR) como una función del tiempo después de la administración del Compuesto A que se expresan como Media \pm SEM. * p < 0,05 en comparación con los controles de vehículo.

La Figura 13 es una representación gráfica que muestra los efectos del Compuesto B de referencia sobre la glucosa en plasma en ratones db/db obesos.

La Figura 14 es una representación gráfica que muestra los efectos del Compuesto B de referencia sobre el peso corporal en ratones db/db obesos.

Descripción detallada de la invención

Se contempla que las combinaciones que se describen en el presente documento proporcionan efectos sinérgicos en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, particularmente, trastornos psicóticos. Se contempla que las combinaciones descritas proporcionan alivio sintomático de trastornos psiquiátricos, particularmente se contempla que en los trastornos psicóticos, tienen menos efectos secundarios, se contempla que permiten una reducción del uso de estos agentes en comparación con la administración independiente, se contempla que complementan a los sedantes y a los estabilizantes del estado de ánimo tales como litio, se contempla que dirigen profilácticamente la progresión de afecciones psicóticas.

Trastornos psicóticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico resistente al tratamiento y trastornos psicóticos debidos a afecciones médicas generales. Las afecciones y trastornos que se han mencionado anteriormente se definen por ejemplo en la Asociación Americana de Psiquiatría: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición, Revisión del Texto, Washington, DC, Asociación Americana de Psiquiatría, 2000.

Se contempla que las composiciones y los procedimientos que se describen en el presente documento ofrecen ventajas sobre los procedimientos anteriores para tratar trastornos neuropsiquiátricos. La combinación de la presente invención proporciona eficacia potenciada de un antipsicótico cuando se toma en combinación con un agonista nicotínico y por lo tanto permite que se usen cantidades reducidas de estos agentes, así como que permita la mejora de la gestión de síntomas de la enfermedad y efectos secundarios relacionados con la enfermedad. Una ventaja adicional de este efecto sinérgico puede ser un comienzo más rápido del efecto terapéutico que el de los compuestos individuales.

Los agonistas nicotínicos de la presente invención son aquellos compuestos que tienen actividad agonista o agonista parcial del subtipo $\alpha 7$ del receptor NNR (agonista nicotínico $\alpha 7$). Los agonistas nicotínicos particulares útiles en la combinación de la presente invención son los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.953.855 y en la solicitud de Estados Unidos con números de serie N° 11/157.119, N° 11/458.231 y N° 60/971.654.

Agonistas nicotínicos particulares son las formas estereoisoméricas de N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y los metabolitos o profármacos y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Un agonista nicotínico a modo de ejemplo es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, que en el presente documento también se denomina Compuesto A. El Compuesto A y otros compuestos de Fórmula 1 modulan los receptores nicotínicos en el cerebro de un sujeto. Como tal, los compuestos tienen la capacidad de expresar farmacología nicotínica, y en particular, actuar como agonistas nicotínicos. La preparación de estos compuestos se describe en las patentes y en las solicitudes que se han mencionado anteriormente.

Las siguientes definiciones tienen el fin de aclarar, pero no limitar, los términos definidos. Si un término en particular usado en el presente documento no se define específicamente, dicho término no se debería considerar indefinido. Es decir, los términos se usan dentro de sus significados aceptados.

Los compuestos incluidos dentro del alcance de la presente invención pueden formar sales de adición ácida. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales inorgánicas de adición ácida tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, y nitrato; sales orgánicas de adición ácida tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glicolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, y ascorbato; sales con aminoácidos ácidos tales como aspartato y glutamato. Las sales

representativas se proporcionan tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.597.919 de Dull y col., N° 5.616.716 de Dull y col. y N° 5.663.356 de Ruecroft y col.

5 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser de varias estequiometrías diferentes. Por lo tanto, en algunos casos la relación molar de ácido a base es 1:1; en otros casos la relación molar de ácido a base es 1:2; y en aún otros casos, la relación molar de ácido a base es 2:1. También son posibles otras estequiometrías.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser, en algunos casos, hidratos o solvatos de etanol, que también son útiles de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "solvato" incluye solvatos de compuestos y solvatos de sales de compuestos.

10 Los metabolitos y los profármacos de los compuestos que se describen en el presente documento también son útiles de acuerdo con la presente invención. Cualquier referencia a un compuesto debería incluir un reconocimiento de que un metabolito o un profármaco de dicho compuesto están incluidos, también.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente del compuesto para tratar trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos o afecciones psicóticas, a una relación de riesgo a beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "prevención" o "profilaxis" incluyen cualquier grado de reducción de la progresión de o retraso del comienzo de una enfermedad, trastorno, o afección. El término incluye proporcionar efectos protectores frente a una enfermedad, trastorno, o afección en particular así como una mejora de la reparación de la enfermedad, trastorno, o afección. Por lo tanto, como un ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que padece o que está en riesgo de desarrollar o de experimentar una
20 reaparición de un trastorno mediado por un NNR o por un nAChR. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico beneficioso, por ejemplo, en un sujeto con una disfunción del SNC.

El término "trastorno," a menos que se indique lo contrario, tiene el mismo significado que los términos "afección" y "enfermedad" y se usan indistintamente a lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

25 El término "sinergia" se refiere a que el efecto de la combinación es mayor que la suma de los dos agentes individuales.

En el presente documento se desvelan combinaciones que comprenden (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico.

30 En el presente documento también se desvelan combinaciones de un agonista nicotínico $\alpha 7$ y un antipsicótico que son útiles para el tratamiento simultáneo, secuencial, o separado de trastornos psicóticos, particularmente esquizofrenia. Particularmente, las composiciones que comprenden una combinación farmacéutica de un agonista nicotínico $\alpha 7$ y un antipsicótico típico se describen como útiles para el tratamiento simultáneo, secuencial, o separado de dichos trastornos.

35 La invención también se refiere a una combinación en la que el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y el antipsicótico atípico es clozapina o quetiapina, que incluyen las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos agentes.

40 Un segundo aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ como se ha definido anteriormente y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, particularmente un antipsicótico atípico, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende una unidad de dosificación de la mezcla de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, opcionalmente con instrucciones para su uso.

45 También se describe un procedimiento para tratar trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos psicóticos, tales como esquizofrenia, en un sujeto con la necesidad del mismo, que comprende administrar simultáneamente, secuencialmente o separadamente a dicho sujeto (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$; y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, en el que las cantidades de (a) y (b) en conjunto son sinérgicamente eficaces en el tratamiento.

50 También se describe un procedimiento en el que (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, se administran simultáneamente, secuencialmente o separadamente, al sujeto en una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo que consiste en administración oral, transmucosa, transdérmica, nasal, pulmonar, bucal, parenteral, rectal, y

sublingual.

También se describe un procedimiento en el que (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$, y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, se administran simultáneamente, secuencialmente o separadamente, a un sujeto en una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, mediante un procedimiento seleccionado entre el grupo que consiste en administración por vía oral, por vía parenteral, por vía transmucosal, es decir, por vía sublingual o por vía bucal, vía tópica, por vía transdérmica, por vía rectal, o mediante inhalación, es decir, inhalación nasal o pulmonar profunda. La administración parenteral incluye, pero no se limita a intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intratecal o a través de una técnica de alta presión.

- 5
- 10 En los procedimientos que se han mencionado anteriormente el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y el antipsicótico atípico puede ser clozapina o quetiapina, que incluye las sales o los solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos agentes.

- 15 Otro aspecto se refiere a composiciones que incluyen agonistas NNR $\alpha 7$ para tratar hiperglucemia, diabetes, aumento de peso, y/o dislipidemia que tienen su origen en la administración de antipsicóticos. En realizaciones particulares, las composiciones incluyen antipsicóticos típicos y atípicos.

- 20 La asociación entre el uso de antipsicóticos y la hiperglucemia, aumento de peso, dislipidemia y diabetes se ha documentado bien (American Diabetes Association y col. (2004); Henderson, DC y col. (2005 a); Koller y Doraiswamy (2002); Sernyak, MJ (2002)). Se pueden recomendar cambios en el estilo de vida para controlar el azúcar en sangre, peso y diabetes, pero, en la población psiquiátrica, a menudo la falta de cumplimiento es un problema. En ocasiones se intenta el cambio a un antipsicótico diferente, pero las ventajas se deben sopesar con la necesidad de un tratamiento eficaz de la enfermedad psiquiátrica. En ocasiones se prescriben amantadina, metformina, sibutramina y topiramato para compensar los efectos de los antipsicóticos en el azúcar en sangre y en el aumento de peso (Canitano, R (2005); Graham, KA y col. (2005); Henderson, DC y col. (2005 b); Klein, DJ y col. (2006)), pero se han informado efectos secundarios. El uso de un agonista del NNR $\alpha 7$ como una terapia auxiliar para el tratamiento con antipsicóticos puede abordar los problemas de hiperglucemia, aumento de peso, dislipidemia y/o diabetes con un perfil mejorado de efectos secundarios.
- 25

- 30 Existe una evidencia importante de que la administración de antipsicóticos típicos y atípicos puede conducir a hiperglucemia y diabetes (American Diabetes Association y col. (2004); Henderson, DC y col. (2005a); Koller y Doraiswamy (2002); Sernyak, MJ (2002)). Los estudios de los inventores muestran que los agonistas del NNR $\alpha 7$ (por ejemplo, el Compuesto B tal como se describe en el presente documento) son eficaces en modelos de diabetes. Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona una ventaja en la administración de un agonista del NNR $\alpha 7$ en un entorno clínico para contrarrestar la hiperglucemia, diabetes, aumento de peso, dislipidemia, síntomas relacionados con la diabetes, complicaciones de la diabetes o complicaciones del aumento de peso, inducidos por antipsicóticos.

- 35 También se describe la administración simultánea de un agonista del NNR $\alpha 7$ con un antipsicótico en un paciente que está presentando hiperglucemia, diabetes, aumento de peso, dislipidemia, síntomas relacionados con la diabetes, complicaciones de la diabetes o complicaciones del aumento de peso, o la administración de un agonista del NNR $\alpha 7$ para la prevención de éstos en un paciente que está tomando un antipsicótico.

- 40 El Compuesto B de referencia, un agonista del NNR $\alpha 7$, reduce el azúcar en sangre y el aumento de peso en ratones db/db, un modelo de diabetes (véanse las Figuras 13 y 14).

AGONISTAS NICOTÍNICOS ALFA 7

- 45 Compuestos útiles de acuerdo con la presente invención son ligandos selectivos del NNR $\alpha 7$ e incluyen los compuestos que se ejemplifican en el presente documento. El Compuesto A es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.953.855 y en las solicitudes de Estados Unidos N° 11/157.119, N° 11/458.231, y N° 60/971.654.

Formas preferidas de sales de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida se describen en la solicitud de Estados Unidos N° 60/971.654 e incluyen las sales de ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido maleico y ácido p-toluenosulfónico, así como los solvatos de dicha sales.

AGENTES ANTIPSICÓTICOS

- 50 Compuestos útiles de acuerdo con la presente invención son antipsicóticos, tanto convencionales como atípicos.

Los ejemplos de antipsicóticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, clorpromazina, haloperidol, flupentixol, y perfenazina, así como las sales o solvatos de los mismos.

Ejemplos de antipsicóticos atípicos incluyen, pero no se limitan a, clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox, y asenapina, así como

las sales o solvatos de los mismos.

Antipsicóticos preferentes son clozapina y quetiapina, así como las sales o solvatos de los mismos.

- 5 Sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos antipsicóticos que se describen en el presente documento incluyen sales de adición ácida que se pueden formar, por ejemplo, por mezcla de una solución del compuesto de acuerdo con la invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable. Además, cuando los compuestos llevan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio, y sales formadas con bases orgánicas adecuadas, tales como sales de amonio cuaternario.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una combinación de (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es un agente antipsicótico atípico.

- 15 En otra realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y el antipsicótico es clozapina o quetiapina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En otra realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es un antipsicótico atípico.

En otra realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es clozapina o quetiapina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 Los principios activos de la composición que se describen en el presente documento se pueden coadministrar simultáneamente o se pueden administrar separadamente o secuencialmente en cualquier orden, o en forma de una composición farmacéutica única.

- 30 Las combinaciones que se describen en el presente documento se pueden administrar de una manera convencional para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos psicóticos, tal como mediante administración por vía oral, por vía parenteral, por vía transmucosal tal como por vía sublingual o por vía bucal, por vía tópica, por vía transdérmica, por vía rectal, o mediante inhalación tal como inhalación nasal o pulmonar profunda. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal o a través de una técnica de alta presión.

- 35 Para la administración bucal, la composición puede estar en forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de una forma convencional. Por ejemplo, los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener uno o más vehículos convencionales tales como agentes aglutinantes, tales como jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón o polivinilpirrolidona, cargas, tales como lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico o sorbitol, agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol, o sílice, agentes disgregantes, tales como almidón de patata o glicolato sódico de almidón, o agentes humectantes, tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica.

Dichas preparaciones también se pueden formular en forma de supositorios para administración rectal con uno o más vehículos, es decir, que contienen bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 45 Las composiciones para inhalación se pueden proporcionar normalmente en forma de una solución, suspensión, o emulsión que se puede administrar en forma de un polvo seco o en forma de un aerosol usando un vehículo convencional tal como un agente propulsor, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano.

Las composiciones tópicas y transdérmicas típicas pueden comprender vehículos convencionales acuosos o no acuosos, tales como gotas oculares, cremas, pomadas, lociones, y pastas, o pueden estar en forma de un apósito, parche o membrana medicados.

- 50 Adicionalmente, las composiciones que se describen en el presente documento se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección o infusión continua. Las composiciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de composición, tales como agentes de suspensión, estabilizantes, y/o de dispersión. Como alternativa, el principio

activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril, sin pirógenos) antes de su uso.

Una composición de acuerdo con la presente invención también se puede formular como una preparación de liberación prolongada. Dichas composiciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular) o por inyección intramuscular. En consecuencia, los compuestos de la invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable), resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles (por ejemplo, una sal poco soluble).

Para la administración oral, una composición farmacéutica puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, y similares. Los comprimidos que contienen diversos vehículos farmacéuticamente aceptables, es decir, excipientes tales como citrato sódico, carbonato cálcico y fosfato cálcico se usan junto con diversos agentes disgregantes tales como almidón, por ejemplo almidón de patata o de tapioca, y determinados silicatos complejos, junto con agentes aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, los agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato sódico y talco se pueden usar para formar comprimidos. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se usan como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura; los ejemplos de materiales a este respecto también pueden incluir lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular.

Como alternativa, la composición que se describe en el presente documento se puede incorporar en preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, por ejemplo. Además, las composiciones que contienen estos compuestos se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua o con otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener vehículos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo jarabe de sorbitol, gomas naturales y sintéticas tales como tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinil-pirrolidona o gelatina, glucosa/jarabe de azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, agentes emulgentes, tales como lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábiga, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo y ácido sórbico. Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las composiciones que se describen en el presente documento para la administración por vía oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Cuando se desean suspensiones acuosas y elixires para la administración oral, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden combinar con diversos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulgentes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones de los mismos. Los agentes dispersantes o de suspensión para suspensiones acuosas pueden incluir gomas sintéticas y naturales tales como tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinil-pirrolidona o gelatina.

Las combinaciones que se describen en el presente documento también se pueden administrar en una composición de liberación controlada tal como una composición de liberación lenta, una composición de liberación rápida o inmediata, o una composición de liberación retardada, controlada o modificada. Dichas composiciones de liberación controlada de las combinaciones que se describen en el presente documento se pueden preparar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. El procedimiento de administración será determinado por el médico asistente u otra persona experta en la materia después de una evaluación de la afección y de los requisitos del paciente.

KIT

Los kits de la invención comprenden una unidad de dosificación de la mezcla de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$, y un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, opcionalmente con instrucciones de uso. En una realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es un antipsicótico atípico. En otra realización, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es clozapina o quetiapina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es un antipsicótico atípico. Por ejemplo, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es clozapina o quetiapina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO

Se describen procedimientos para tratar trastornos psiquiátricos, particularmente trastornos psicóticos, en un sujeto en necesidad de los mismos, que comprende administrar simultáneamente, secuencialmente o separadamente, a dicho sujeto (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, en los que las cantidades de (a) y (b) en conjunto son sinérgicamente eficaces en el tratamiento.

Un procedimiento para tratar trastornos psicóticos en un sujeto en necesidad del mismo puede comprender la administración simultáneamente, secuencialmente o separadamente, a dicho sujeto (a) de una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, en el que las cantidades de (a) y (b) en conjunto son sinérgicamente eficaces en el tratamiento.

El trastorno o afección psicótico puede ser esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico resistente al tratamiento, trastornos psicóticos debidos a afecciones médicas generales, o un trastorno psicótico no especificado de otro modo. Como un ejemplo, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente o una sal, solvato o sal solvatada farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico se elige entre un grupo que consiste en clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox y asenapina, o sal, solvato o sal solvatada farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un procedimiento para tratar esquizofrenia en un sujeto en necesidad del mismo puede comprender la administración simultáneamente, secuencialmente o separadamente, a dicho sujeto de (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, en el que las cantidades de (a) y (b) en conjunto son sinérgicamente eficaces en el tratamiento. En este procedimiento, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es como se ha definido anteriormente, o sal, solvato o sal solvatada farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico se puede elegir entre un grupo que consiste en clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox y asenapina, o sal, solvato o sal solvatada farmacéuticamente aceptable del mismo. En un procedimiento preferente, el agonista nicotínico $\alpha 7$ es (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antipsicótico es clozapina o quetiapina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización de la invención se refiere al uso de la combinación que comprende (a) una cantidad de un primer agente terapéutico, que es un agonista nicotínico $\alpha 7$ y (b) una cantidad de un segundo agente terapéutico, que es un antipsicótico, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, simultáneamente, secuencialmente o separadamente, de trastornos psiquiátricos, particularmente de trastornos psicóticos.

Con respecto a la sinergia, como se describe en el presente documento, la presente invención es una combinación de un agonista nicotínico $\alpha 7$ y un agente antipsicótico. Se cree que la presente combinación proporciona sinergia en el tratamiento o profilaxis de la disfunción cognitiva. Como un ejemplo, los síntomas asociados con la esquizofrenia se dividen en tres categorías: positivos, es decir alucinaciones, delirios y trastornos del pensamiento; negativos, es decir anhedonia, pobreza de expresión, y falta de motivación; y cognitivos, es decir atención, memoria, y función ejecutiva. La investigación realizada durante la pasada década apoya la premisa de que, además de los NNR $\alpha 4\beta 2$, el subtipo $\alpha 7$ tiene un gran potencial como una diana terapéutica para déficits cognitivos, así como para los síntomas positivos de la esquizofrenia. El origen de esta línea de investigación se atribuye en gran medida a los informes epidemiológicos que muestran una mayor tasa de tabaquismo entre los esquizofrénicos en comparación con la población general y que sugiere un intento de automedicación con nicotina. En apoyo adicional, numerosos estudios adicionales han comenzado a delinear el potencial, y los mecanismos subyacentes, de los agentes terapéuticos para la esquizofrenia que implican la modulación del receptor $\alpha 7$.

Desde un punto de vista fisiológico, varios estudios han demostrado la presencia de receptores $\alpha 7$ en diversas vías mecánicas conocidas por desempeñar un papel en la etiología y en la sintomatología de la esquizofrenia. Por ejemplo, los estudios postmortem en tejido cerebral de pacientes esquizofrénicos muestran una marcada disminución en el número de NNR $\alpha 7$ en el hipocampo y en la corteza. Estos receptores se sitúan en el hipocampo, núcleos geniculados lateral, y medial, y núcleo reticular del tálamo y se piensa que modulan la liberación de neurotransmisores, que incluyen glutamato, GABA, y dopamina, implicados en la formación de LTP, procesamiento sensorial, y neuroprotección. Los déficits de inhibición sensorial y esquizofrenia familiar se han unido a la región 15q13-q14 en el cromosoma 15. CHRNA7, el gen para el NNR $\alpha 7$, se encuentra en esta región y también se han identificado polimorfismos en la región promotora del gen. Por lo tanto, el potencial por el que los mecanismos de $\alpha 7$ desempeñan un papel en la esquizofrenia está bien apoyado.

La investigación adicional en las consecuencias funcionales de la modulación del NNR $\alpha 7$ con modelos animales *in vivo* ha proporcionado apoyo adicional por su potencial terapéutico en la esquizofrenia. La mayoría de los individuos con esquizofrenia presentan deterioro cognitivo. Los déficits cognitivos en la esquizofrenia incluyen trastornos de

atención, procesamiento lento de la información, trastornos de la memoria de trabajo y déficits en la función ejecutiva. Las reuniones de opinión general recientes (iniciativa MATRICS/TURNS) identificaron déficits cognitivos en la esquizofrenia (CDS) como una característica central de la enfermedad que contribuye significativamente a la falta de funcionalidad de los pacientes. Con la necesidad de una terapia para tratar los déficits cognitivos y la evidencia de un papel del $\alpha 7$ en la esquizofrenia, la iniciativa MATRICS también promocionó el subtipo $\alpha 7$ como una diana terapéutica primaria pertinente para CDS.

Los ensayos preclínicos con múltiples ligandos $\alpha 7$ ha mostrado la promesa de dirigir este receptor. Por ejemplo, GTS-21, un agonista $\alpha 7$ funcionalmente selectivo, muestra eficacia en varios modelos de comportamiento de aprendizaje y de memoria que incluyen la evitación pasiva en ratas lesionadas, evitación activa en ratas de edad, parpadeo condicionado en el conejo de edad, y un retraso en la tarea de emparejamiento en un primate no humano. Los ratones DBA/2, ratas lesionadas en fimbria y fórnix y ratas criadas en aislamiento presentan déficits de procesamiento sensorial similares a los observados en los esquizofrénicos. GTS-21 mejora los déficits de estimulación auditiva en estos modelos animales y otros compuestos selectivos de $\alpha 7$ han mostrado eficacia en modelos de estimulación sensorial. Finalmente, la infusión *in vivo* de MLA, un antagonista selectivo de $\alpha 7$, en el hipocampo ventral o en la amígdala basolateral causa déficits de memoria de trabajo significativos en ratas como se observa en las tareas de laberinto de brazos radiales, indicando la necesidad de receptores $\alpha 7$ en el procesamiento de la memoria.

Aunque el tratamiento de CDS es un objetivo claro para los nuevos agentes terapéuticos antipsicóticos, la ventaja de los ligandos que se dirigen al NNR $\alpha 7$ es que también parecen ser eficaces en términos de mejora de algunos síntomas positivos de la esquizofrenia. Específicamente, el agonista nicotínico no selectivo, nicotina, mejora los defectos en la esquizofrenia tales como déficit de estimulación sensorial y anomalías de movimiento suave de persecución ocular. Se ha mostrado que un agonista selectivo $\alpha 7$ invierte los déficits de la PPI en ratas criadas en aislamiento, un modelo clásico para los antipsicóticos. Otro ejemplo, AR-R17779, otro agonista selectivo $\alpha 7$, mejora los déficits inducidos por escopolamina en el reconocimiento social y mejora el aprendizaje a largo plazo y atenúa los déficits de memoria de trabajo en ratas. Se ha mostrado que el agonista selectivo $\alpha 7$ SSR180711A es eficaz en los paradigmas de reconocimiento de objetos para la memoria episódica a largo plazo y a corto plazo y en los modelos de laberinto de agua de Morris para la memoria de referencia y trabajo, sugiriendo que los compuestos selectivos de $\alpha 7$ también podrían tratar potencialmente los déficits cognitivos de la enfermedad. Recientemente, se inició un ensayo de prueba de concepto en esquizofrenia con el agonista nicotínico $\alpha 7$, DMXB-A (también conocido como GTS-21 al que se hace referencia en el presente documento). Se observaron mejoras significativas en la Batería Repetible para la Evaluación de la puntuación de la escala total del Estado Neuropsicológico y en la inhibición de P50. Los efectos positivos de este compuesto en la clínica apoyan el continuo desarrollo de agonistas $\alpha 7$ selectivos para déficits cognitivos de esquizofrenia y potencialmente para los síntomas positivos de la enfermedad.

Se hace referencia a WONG AHC, VAN TOL HHM: Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2003) 27: 269-306; LEONARD S, ADLER LE, BENHAMMOU K y col.: Smoking and mental illness. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2001) 70: 561-570; FREEDMAN F, HALL M, ADLER LE, LEONARD S: Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia *Biol. Psychiatry* (1995) 38: 22-33; GUAN ZZ, ZHANG X, BLENNW K y col.: Decreased protein level of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *NeuroReport* (1999) 10: 1779-1782; BREESE CR, ADAMS C, LOGEL J y col.: Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 mRNA and [125I]-alpha-bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J. Comp. Neurol.* (1997) 387: 385-398; MANSVELDER, HD, MCGE-HEE DS: Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* (2000) 27: 349-357; EGEA J, ROSA AO, SOBRADO M, GANDIA L, LOPEZ MG, GARCIA AG: Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha 7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience* (2007) 145: 866-872; LEONARD S, FREEDMAN R: Genetics of Chromosome 15q13-q14 in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* (2006) 60: 115-122; WALKER E, KESTLER L, BOLLINI A, HOCHMAN KM: Schizophrenia: Etiology and course. *Annu. Rev. Psychol.* (2004) 55: 401-430; FENTON WS, STOVER EL, INSEL TR: Breaking the log-jam in treatment development for cognition in schizophrenia: NIMH perspective. *Psychopharmacology* (2003) 169: 365-366; MEYER EM, DE FIEBRE DM, HUNTER BE, SIMPKINS CE, FRAUWORTH N, DE FIEBRE NE: Effects of anabaseine-related analogs on rat brain nicotinic receptor binding and on avoidance behaviors. *Drug Dev. Res.* (1994) 31: 127-134; ARENDASH GW, SENGSTOCK GJ, SANBERG PR, KEM WR: Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of nicotinic receptor agonist GTS-21, *Brain Res.* (1995) 674: 252-259; WOODRUFF-PAK DS, LI YT, KAZMI A, KEM WR: Nicotinic cholinergic system involvement in eyeblink classical conditioning in rabbits. *Behav. Neurosci.* (1994) 108: 486-493; BRIGGS CA, ANDERSON DJ, BRIONI JD y col.: Functional characterization of a novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligand GTS-21 in vitro and in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1997) 57: 231-241; SIMOSKY JK, STEVENS KE, KEM WR, FREEDMAN R: Intragastric DMXB- A, an alpha 7 nicotinic agonist, improves deficient sensory inhibition in DBA/ 2 mice. *Biol. Psychiatry* (2001) 50: 493-500; HURST RS, HAJÓS M, RAG-GENBASS M y col.: A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J. Neurosci.* (2005) 25: 4396-4405; HAJÓS M, HURST RS, HOFFMANN WE y col.: The selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *JPET*

- (2005) 312: 1213-1222; BETTANY JH, LEVIN ED: Ventral hippocampal alpha 7 nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2001) 70: 467-474; ADDY NA, NAKIJAMA A, LEVIN ED: Nicotinic mechanisms of memory: effects of acute local D β E and MLA infusions in the basolateral amygdala. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* (2003) 16: 51-57; ADLER LE, OLINCY A, WALDO MC y col.: Schizophrenia, sensory gating and nicotinic receptors. *Schizophr. Bull.* (1998) 24: 189-202; ROSS RG, OLINCY A, HARRIS JG y col.: Anticipatory saccades during smooth pursuit eye movements and familial transmission of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* (1998) 44: 690-697; CILIA J, CLUDERAY JE, ROBBINS MJ y col.: Reversal of isolation-rearing-induced PPI deficits by an α 7 nicotinic receptor agonist. *Psychopharmacology* (2005) 182: 214-219; VAN KAMPEN M, SELBACH K, SCHNEIDER R, SCHIEGEL E, BOESS F, SCHREIBER R: AR-R 17779 improves social recognition in rats by activation of nicotinic α 7 receptors. *Psychopharmacology* (2004) 172: 375-383; LEVIN ED, BETTEGOWDA C, BLOSSER J, GORDON J: AR-R 17779, an α 7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav. Pharmacol.* (1999) 10: 675-680; PICHAT P, BERGIS OE, TERRANOVA JP y col.: SSR180711A, a novel selective α 7 nicotinic receptor partial agonist. III. Effects in models predictive of therapeutic activity on cognitive symptoms of schizophrenia. *Soc. Neurosci. Abstr.* (2004) 34: 583,3; BERGIS OE, PICHAT P, SANTAMARIA R y col.: SSR180711A, a novel selective α 7 nicotinic receptor partial agonist. II. Effects in models predictive of therapeutic activity on cognitive symptoms of Alzheimer's disease. *Soc. Neurosci. Abstr.* (2004) 34: 583,2; y OUNCY A, HARRIS JG, JOHNSON LL y col.: Proof-of-concept trial of an α 7 nicotinic agonist in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* (2006) 63: 630-638.

DOSIFICACIÓN

- 20 La dosis eficaz de un agonista nicotínico α 7 y un antipsicótico en las combinaciones de acuerdo con la presente invención puede variar, dependiendo de factores tales como la afección del paciente, la gravedad de los síntomas del trastorno así como la potencia del compuesto específico seleccionado, el modo de administración, la edad y el peso del paciente, y similares.

- 25 Normalmente, la dosis eficaz de los agonistas nicotínicos requiere generalmente la administración del compuesto en una cantidad inferior a 5 mg/kg de peso del paciente. A menudo, los agonistas nicotínicos se administran en una cantidad inferior a aproximadamente 1 mg/kg de peso del paciente a inferior a aproximadamente 100 μ g/kg de peso del paciente, y ocasionalmente entre aproximadamente 10 μ g/kg a inferior a 100 μ g/kg de peso del paciente. Las dosis eficaces precedentes representan normalmente esa cantidad administrada en forma de una dosis única, o en forma de una o más dosis administradas durante un período de 24 horas.

- 30 Para los pacientes humanos, la dosis eficaz de los agonistas nicotínicos generalmente requiere la administración del agonista nicotínico en una cantidad de al menos aproximadamente 1, a menudo al menos aproximadamente 10, y frecuentemente al menos aproximadamente 25 mg/24 h/paciente. Para pacientes humanos, la dosis eficaz de los agentes nicotínicos requiere la administración del agonista nicotínico que generalmente no supera aproximadamente 500, a menudo no supera aproximadamente 400, y frecuentemente no supera aproximadamente 300 mg/24 h/paciente. Además, la administración de la dosis eficaz es tal que la concentración del agonista nicotínico dentro del plasma del paciente normalmente no supera 500 ng/ml, y frecuentemente no supera 100 ng/ml.

La composición, vía de administración, y dosificación exactas las puede elegir el médico individual en vista de la afección del paciente. La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo, que son suficientes para mantener efectos terapéuticos.

- 40 La dosis eficaz del agente antipsicótico varía con la naturaleza del antipsicótico. De forma deseable, cuando se selecciona la quetiapina como el agente antipsicótico, la dosis diaria de la combinación contiene de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1200 mg. Preferentemente, cada dosis del primer componente contiene de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1000 mg de la quetiapina, e incluso más preferentemente, cada dosis contiene de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 800 mg o de 300 mg a aproximadamente 800 mg o de 400 mg a aproximadamente 800 mg de quetiapina. En otra realización, el primer componente contiene aproximadamente 150-300 o 300-600 mg de la quetiapina. Las dosificaciones pediátricas pueden ser inferiores, tal como, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 40 mg al día. Estas dosificaciones se pueden administrar en una, dos o más dosis orales, por ejemplo: quetiapina: de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 40 mg/kg administrados una vez al día o en dosis divididas.

50 Ejemplos

- Las patologías cerebrales complejas observadas en esquizofrénicos incluyen hipoplasia de neuronas de dopamina (DA) acompañada por hiperactividad de los sistemas subcorticales de DA y función de DA cortical reducida. Una formulación ampliamente aceptada de la hipótesis de dopamina de la esquizofrenia (SZ) tiene los síntomas positivos del trastorno (alucinaciones, delirios y deterioro de la estimulación sensorial) asociados con la hiperactividad de los sistemas de dopaminérgicos subcorticales, mientras que los síntomas negativos (afecto plano, aislamiento social) son causados por la hipoactividad de la dopamina en la corteza prefrontal. El mecanismo mediante el cual la vía de DA subcortical es hiperactiva y la vía de DA cortical es hipoactiva en la esquizofrenia y como estos cambios causan los síntomas del comportamiento no se entiende bien. Además, la patogénesis de la esquizofrenia probablemente tiene su origen en un trastorno del desarrollo neurológico multifactorial que implica otros sistemas neuronales (es

decir, neuronas de serotonina, neuronas corticales y del hipocampo) además del desarrollo anormal y de neurotransmisión en los sistemas de DA. La relación entre DA y otros sistemas afectados y su contribución combinada a los síntomas clínicos complejos no se ha establecido, en parte, debido a la falta de modelos experimentales adecuados que imiten el desarrollo multifactorial y los déficits funcionales asociados tal como se observa en SZ.

Recientemente, se han identificado múltiples vínculos genéticos para este trastorno, que incluyen factores que influyen en el desarrollo neuronal a través de las rutas de señalización de AMP cíclico, MAPK, complejos de coactivador de transcripción y mecanismos epigenéticos.

Los intentos para crear modelos genéticos animales, sin embargo, mediante la introducción de mutaciones individuales en animales de laboratorio hasta la fecha no han replicado el complejo neuronal y los síntomas del comportamiento típicos de SZ.

Recientemente, los cambios en FGF-2 y su receptor, Receptor 1 de FGF (FGFR1), se han descrito en los cerebros de SZ. Dado el papel conocido de FGF en el desarrollo, esto sugiere que la señalización alterada de FGF puede ser la base del desarrollo anormal del cerebro y de la función asociada con SZ. Los estudios de los inventores llevaron al descubrimiento del sitio de Señalización Nuclear Integrante de FGFR1 (INFS) que integra varias vías diferentes en las que se han informado las mutaciones unidas a SZ. INFS las une a la activación del coactivador de la transcripción de ARN Pol II y a la remodelación de la cromatina. Esto implica una interrupción en la señalización integrante de FGFR como el mecanismo patológico común para diversos defectos genéticos unidos a SZ. Se ha diseñado genéticamente un único modelo animal que muestra que dicha interrupción dirigida a las neuronas del desarrollo de DA da como resultado un trastorno que está compuesto tanto de aspectos de desarrollo neurológico como de los síntomas clínicos positivos y negativos de SZ que se pueden tratar con fármacos anti-esquizofrenia. En los ratones th(tk-)/th(tk-) la señalización disminuida de FGFR específicamente en las neuronas de DA da como resultado una hipoplasia de las neuronas de DA que es similar a SZ y que está acompañada de hiperactividad de DA subcortical e hipoactividad de los sistemas de DA corticales.

Además, de forma similar a la enfermedad humana, estos cambios están asociados con la estimulación sensorial alterada [corregida por los fármacos antipsicóticos típicos (TAPD)], que probablemente son la base de los síntomas positivos de SZ, y con interacciones sociales disminuidas, lo que tipifica los síntomas negativos.

Es importante destacar que estos déficits del comportamiento parece que se desarrollan gradualmente en la vida adulta temprana como se observa en SZ humana. Los estudios de los inventores muestran que la hipoplasia neuronal de DA conduce a la remodelación de otros sistemas neuronales que dan como resultado el recableado cerebral de transmisores múltiples similar al propuesto en SZ. Los ratones th(tk-)/th(tk-) desarrollan hiperinervación serotoninérgica tanto de la sustancia negra como de los centros neuronales de DA del área tegmental ventral. Este recableado serotoninérgico contribuye a los déficits en la estimulación sensorial, interacciones sociales y cognición que son corregidos por los fármacos antipsicóticos atípicos (AAPD) que se dirigen a los receptores 5HT-2A. De forma similar a SZ y coherente con el papel establecido de las neuronas de DA en el desarrollo de otros sistemas neuronales, los ratones th(tk-)/th(tk-) muestran hipoplasia y desequilibrio de las neuronas tanto corticales como del hipocampo. Se conoce que todos los sistemas afectados expresan los receptores nicotínicos alfa 7 y los síntomas tanto positivos como negativos en los ratones th(tk-)/th(tk-) se corrigen con agonistas nicotínicos alfa 7, una nueva clase de fármacos antipsicóticos. En contraste, ni los antagonistas de 5HT-2A ni los agonistas nicotínicos afectan al comportamiento de los ratones normales. Por lo tanto, el "cerebro recableado" de los ratones th(tk-)/th(tk-) ofrece un modelo único para el desarrollo y el ensayo de agentes antipsicóticos.

En resumen, el modelo de ratón th(tk-)/th(tk-) no sólo proporciona un apoyo experimental para las hipótesis del desarrollo de DA de SZ, sino que también lo vincula a hipótesis alternativas que se centran en otros sistemas neuronales como importantes en SZ. Los resultados obtenidos proporcionan una nueva visión de la compleja etiología de los neurotransmisores múltiples y la sintomatología de SZ y sugieren nuevas dianas terapéuticas.

La patogénesis de la esquizofrenia SZ probablemente se debe a un trastorno de desequilibrio en el desarrollo neurológico multifactorial así como a una transmisión dopaminérgica anormal. No se ha establecido como se pueden relacionar estos dos déficits. De acuerdo con la hipótesis de DA de SZ, los síntomas positivos de la esquizofrenia (alucinaciones, delirios y estimulación sensorial alterada) están asociados con la hiperactividad del sistema o sistemas dopaminérgicos subcorticales mientras que los síntomas negativos (afecto plano, aislamiento social) están causados por la hipoactividad de DA en la corteza prefrontal. Esto fue corroborado por estudios de PET humano que muestran que, en pacientes con SZ neurolépticos e ingenuos, la capacidad de síntesis de DA presináptica y la liberación de DA estimulada por anfetaminas en el cuerpo estriado están potenciadas, lo que implica una desregulación y una hipersensibilidad de las neuronas dopaminérgicas de nigro-estriatales mientras que las funciones de las neuronas de DA que inervan la corteza prefrontal parecen estar disminuidas.

Los cuerpos celulares de estas neuronas de DA están situados en el tegmento mesencefálico principalmente en la Sustancia Negra compacta (SNc; grupo de células A9) y en el área tegmental ventral más medial (VTA; grupo de células A10). Mientras que, SNc A9 al VTA constituye un continuo cuyas proyecciones se superponen en varias áreas terminales, la SNc inerva predominantemente el cuerpo estriado dorsal formando un sistema nigroestriatal y

las neuronas del VTA proyectan al núcleo accumbens (NAc) (sistema mesolímbico) o a la corteza prefrontal (PFC) (sistema mesocortical). En pacientes humanos con SZ y el síndrome de Asperger relacionado, se encontró una reducción en el diámetro medio sagital del mesencéfalo y se correlacionó a la inversa con la gravedad de los síntomas así como con la exposición a agentes neurolépticos. En pacientes con SZ no sometidos a tratamientos con neurolépticos existe una disminución significativa en el volumen del área de la SN (- 21 %), el volumen medio de células nerviosas disminuyó en la SNc (- 15 %) y el VTA (- 17 %). En contraste, parece que se produce un alargamiento del cuerpo estriado en SZ debido a la medicación con antipsicóticos. Aún se desconoce el modo en el que la hipoplasia de las neuronas de DA podría conducir paradójicamente a la hipertransmisión de DA en los ganglios basales subcorticales y la hipotransmisión simultánea en la corteza frontal.

Aunque la mayoría, si no todas, las medicaciones con agentes neurolépticos tienen características de bloqueo del receptor 2 de DA (D2), los fármacos antipsicóticos tradicionales (TAPD) no son capaces de tratar todos los defectos clínicos de SZ y causan una incidencia inaceptablemente elevada de síndromes extrapiramidales (EPS). Los agentes antipsicóticos atípicos introducidos más recientemente (AAPD) a menudo presentan una mayor eficacia terapéutica en un intervalo más amplio de déficits clínicos de SZ que incluyen los síntomas positivos así como los negativos y presentan una propensión mucho menor para EPS. Esto puede estar relacionado con la acción de los sistemas de neurotransmisores tanto de DA como de serotonina (5HT). Se cree que los fármacos que tratan eficazmente los síntomas de SZ reducen la neurotransmisión de DA en regiones del cerebro en las que es hiperactiva y aumentan la neurotransmisión de DA en regiones del cerebro en las que es hipoactiva. Sin embargo, no se ha definido bien el modo en el que los antagonistas de los receptores 5-HT ejercen sus efectos terapéuticos. Además, los cambios en otros sistemas (neuronas corticales y del hipocampo) también pueden contribuir a los síntomas de SZ y de este modo podrían ser la diana de agentes terapéuticos. Además, se ha desarrollado una nueva categoría de fármacos, agonistas de los receptores nicotínicos, que pueden ser los más eficaces de todos en el tratamiento de SZ.

De forma coherente con la alta frecuencia (1 %) de SZ en la población general, se han sugerido múltiples enlaces genéticos para este trastorno. Son de particular interés las proteínas que pueden influir en el desarrollo neuronal a través de cambios en enzimas de AMP cíclico, vías de señalización de MAPK y complejos coactivadores de la transcripción. Además, se han propuesto mecanismos epigenéticos (modificaciones de ADN y cromatina) para contribuir a los patrones complejos de herencia y etiología de SZ. Recientemente, se han descrito los cambios de FGF 2 y su receptores FGFR1 en los cerebros de pacientes de SZ y bipolares, y se mostró que los tratamientos neurolépticos aumentan la expresión de FGF-2 lo que sugiere que la señalización alterada de FGF sirve de base para el desarrollo anormal del cerebro y para la función asociada con estos trastornos.

La señalización Nuclear Integrante del Receptor 1 de FGF (FGFR1), o INFS, integra varias vías diferentes en las que se han informado mutaciones unidas a SZ, las une a la activación de ARN Pol II del coactivador de transcripción y a la remodelación de cromatina, y es importante en el desarrollo neuronal. Un mecanismo patológico común para los diversos defectos genéticos unidos a SZ es una interrupción en la señalización integrante de FGFR.

Los ratones th(tk-)/th(tk-) se diseñaron por ingeniería genética para expresar un FGFR1 con tirosina quinasa suprimida. La composición genética del modelo animal usado en el presente procedimiento se describe en Klejbor, y col. (J Neurochem 2006, 97, (5), 1243-58, que se incorpora en el presente documento por referencia) y en el presente documento se denominan ratones "th(tk-)/th(tk-)". Los ratones th(tk)/th(tk-) se diseñaron por ingeniería genética para expresar un FGFR1 con tirosina quinasa suprimida.

FGFR1 (TK-) bloquea el FGFR1 nuclear a partir de la activación de CBP, ARN Pol II y acetilación de histonas y evita la activación de genes, diferenciación neuronal y crecimiento por cAMP y otras señales. Además, FGFR1 (TK-) se puede dimerizar con e inactivar los receptores FGF de la membrana plasmática, afectando por lo tanto a la señalización de ERK y Akt también implicados en el SZ25. La expresión del FGFR1 (TK-) negativo dominante se dirigía al desarrollo de neuronas de catecolamina postmitóticas mediante el promotor genético de tirosina hidroxilasa (TH) en ratas de 4,5 kb. El comienzo de esta actividad promotora en E17 en la diferenciación de las neuronas del mesencéfalo y su especificidad al cerebro regional imita de cerca a la de los genes endógenos TH. Usando procedimientos convencionales, se obtuvieron ratones que transmiten el gen FGFR1 (TK-) a su descendencia. La proteína FGFR1 (TK-) fue detectada en el tronco cerebral y en la SN diseccionada. Se detectó poco o ningún FGFR1 (TK-) en el telencéfalo (corteza cerebral y cuerpo estriado) y en otras regiones cerebrales que no expresan o que expresan niveles bajos de TH (no se muestran).

No hubo diferencias significativas en los pesos corporales y de cerebro entre los ratones de control y th(tk)/th(tk-). Además, no se encontraron cambios aparentes en una anatomía macroscópica del cerebro en ratones th(tk-)/th(tk-).

Neuronas de DA:

En los ratones th(tk-)/th(tk-) la señalización disminuida de FGFR dio como resultado la densidad y el tamaño reducido de las neuronas de DA de la SNc que forman la proyección dopaminérgica nigroestriatal así como la hipoplasia del VTA de las neuronas de DA. Esto se demostró usando recuentos estereológicos imparciales de las densidades neuronales TH-IR en la SNc y en los núcleos del VTA. Se encontraron disminuciones estadísticamente significativas en la densidad de las neuronas TH-IR en la SNc (- 34 %) y en el VTA en el día 1 después del

nacimiento de los ratones th(tk-)/th(tk-). Los cambios en la SNc pero no en el VTA se mantuvieron durante toda la vida. Se realizaron medidas estereológicas que revelaron que el tamaño medio de los cuerpos celulares TH-IR en ratones th(tk-)/th(tk-) recién nacidos (PD 0) se redujeron tanto en la SNc (- 37 %) como en el VTA (- 20 %) en comparación con los ratones del control. Las neuronas TH-IR se mantuvieron más pequeñas en los ratones adultos th(tk-)/th(tk-) (PD 360) (- 15 % en la SNc y - 11 % en el VTA).

La densidad reducida del transportador de DA en el cuerpo estriado demostró además la alteración del desarrollo del sistema de DA nigro-estriatal. Paradójicamente, los ratones th(tk-)/th(tk-) tenían niveles aumentados de DA, ácido homovanílico y 3-metoxitiramina en el cuerpo estriado, indicativo de la transmisión excesiva de DA. Estos cambios estructurales y bioquímicos en las neuronas de DA son similares a los informados en pacientes humanos con esquizofrenia.

Neuronas de Serotonina:

Aunque parece que DA es el neurotransmisor principal en SF, la serotonina desempeña un papel significativo en la etiología de esta enfermedad. Se ha planteado la hipótesis de que los sujetos con SF que responden a clozapina pueden presentar actividad serotoninérgica excesiva, aunque la naturaleza de dichos cambios potenciales ha sido desconocida.

Con el fin de examinar si existen alteraciones de los sistemas 5-HT en el modelo transgénico de SZ en th(tk-)/th(tk-), las regiones del cerebro se diseccionaron y se analizaron para 5-HT y su metabolito, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)s por HPLC-ECD en ratones de control adultos y homocigotos th(tk-)/th(tk-). Las regiones analizadas fueron las que compartían los sistemas tanto DA como 5-HT, que incluían tanto los campos terminales (cuerpo estriado, corteza frontal, núcleo accumbens, hipotálamo) como el origen somal (VTA, SNc, núcleo del rafe dorsal) de estos dos sistemas de neurotransmisores. Los niveles de 5HT en el cuerpo estriado, núcleo accumbens, corteza frontal, e hipotálamo no fueron significativamente diferentes entre los ratones de control y los th(tk-)/th(tk-). Sin embargo, en la SN, los niveles de 5-HT en ratones transgénicos mostraron aproximadamente un 70 %, aumento estadísticamente significativo en comparación con los ratones del control. Una tendencia similar se observó en el VTA, y fue acompañada de un aumento estadísticamente significativo en los niveles de 5-HIAA. En contraste con los núcleos del mesencéfalo, en la región del rafe pontino, los niveles tanto de 5HT como de 5-HIAA en los ratones th(tk-)/th(tk-) se redujeron significativamente en comparación con los controles.

Con el fin de examinar los mecanismos celulares subyacentes a los cambios observados en 5HT/5HIAA en el mesencéfalo ventral, se realizó una inmunohistoquímica anti-5-HT. Esto reveló fibras teñidas positivamente y puntos en el mesencéfalo ventral en los ratones tanto de control como th(tk-)/th(tk-). Las estructuras examinadas incluyeron: el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra (SN) y sus subdivisiones: el núcleo interfascicular (IF), el núcleo pigmentoso parabraquial (PBP), el núcleo paranigral PN, el núcleo del rafe lineal rostral (RLi); las partes compacta y reticular de la sustancia negra (SNC y SNR, respectivamente). En general, todos los núcleos del VTA presentaban fibras inmunorreactivas a 5-HT, pero el aspecto y las densidades de estas fibras diferían. En el núcleo IF, se observó un sistema denso de fibras varicosas de pequeño diámetro, y cortas. El análisis estereológico no reveló diferencias significativas en la densidad de las fibras 5-HT-ir en el IF entre los ratones de control y th(tk-)/th(tk-).

En el núcleo PBP, se observó un sistema de fibras 5-HT-ir que seguían un curso irregular. Algunas de estas fibras eran relativamente largas y corrían paralelas entre sí a lo largo del núcleo. Además, en los ratones th(tk-)/th(tk-) pero no en los controles, se encontraron fibras lisas (delgadas), largas sin varicosidades. El análisis cuantitativo mostró que toda la densidad de las fibras 5-HT-ir en el núcleo PBP era 2 veces mayor en los ratones th(tk-)/th(tk-) que en los controles ($p < 0,00001$).

En el PN, estaban presentes numerosos puntos de 5-HT-ir y un denso sistema de fibras 5-HT-ir. En ambos grupos ensayados de animales eran predominantes largas filas con numerosas varicosidades pequeñas, extendiéndose a lo largo del núcleo. Además, en los ratones transgénicos este núcleo mostró grupos de fibras que estaban ausentes en los ratones de control. Éstas eran fibras suaves y finas, largas, sin varicosidades y orientadas verticalmente. El análisis cuantitativo mostró que toda la densidad de las fibras 5HT-ir en el núcleo PN era aproximadamente 1,5 veces mayor en los ratones th(tk-)/th(tk-) que en los controles ($p < 0,005$).

En el Rli se encontraron fibras individuales de 5-HT-ir siguiendo un curso vertical. El Rli contenía números relativamente pequeños de puntos de 5-HT-ir. No había diferencia en el aspecto de estos elementos entre los ratones de control y los th(tk-)/th(tk-). Además, el análisis cualitativo no mostró diferencias significativas en las densidades de las fibras entre los ratones de control y los transgénicos.

En la región pars compacta de la sustancia negra son visibles tanto las fibras como los puntos de 5-HT-ir. No hubo diferencia significativa en las densidades de las fibras 5-HT-ir en la SNc entre los ratones de control y los th(tk-)/th(tk-).

En comparación con la SNc, la SNr presentó una densidad significativamente más elevada de las fibras 5-HT-ir en ambos grupos de ratones. Estas fibras se extienden diversas direcciones. En la SNr, el análisis cuantitativo mostró un aumento significativo de un 68 % en la densidad de las fibras 5-HT-ir en los animales transgénicos.

Por lo tanto, los análisis anatómicos cuantitativos mostraron que los ratones th(tk-)/th(tk-) tenían números significativamente mayores de las fibras 5-HT en los núcleos PN y PBP del VTA que sobresalen principalmente de la corteza prefrontal y del núcleo accumbens, así como dentro de la región de la SNr, cuando se compara con los ratones de control. En los ratones th(tk-)/th(tk-) los axones serotoninérgicos de hiperinervación formaron sistemas densos de fibras inmunorreactivas a 5-HT con numerosas varicosidades, presentando algunas forma diferente a la observada en los ratones de control. La invasión de terminales 5-HT se corroboró mediante el aumento de los niveles de 5-HT en las regiones del mesencéfalo ventral de los ratones th(tk-)/th(tk-).

Ni 5HT ni 5HIAA fueron aumentados en los campos terminales de las neuronas de DA: cuerpo estriado, núcleo accumbens o corteza frontal. Por lo tanto, las neuronas de DA se pueden ver afectadas por un aumento del tono de 5-HT en los núcleos del mesencéfalo, en vez de indirectamente a través del control de serotonina de las proyecciones telencefálicas en el tegmento ventral. Ni la 6-hidroxidopamina indujo lesión en las neuronas de DA en ratas adultas ni la pérdida de neuronas de DA de la SN causada por la transfección de FGFR1 (TK-) en un cerebro adulto (observaciones sin publicar) condujo a la hiperinervación serotoninérgica del cuerpo estriado o del mesencéfalo ventral, respectivamente. Por lo tanto, la hiperinervación serotoninérgica de la SN y del VTA en ratones th(tk-)/th(tk-) puede representar una respuesta al desarrollo de la hipoplasia de las neuronas de DA en estas regiones del cerebro.

Neuronas del hipocampo y corticales prefrontales/frontales

La alteración de la capa cortical y el tamaño reducido de las neuronas corticales y del hipocampo se han informado en pacientes con SZ. De acuerdo con estos informes, en ratones th(tk-)/th(tk-), la doble tinción con anticuerpos NeuN específicos de neuronas y DAPI (ADN) reveló un aumento de la densidad de los somas neuronales en las capas del hipocampo piramidal y granular y la interrupción de las capas corticales en la corteza límbica frontal/prefrontal.

Las características anatómicas y neuroquímicas de los ratones th(tk-)/th(tk-) y su correlación con la patología SZ se pueden resumir como:

1. Los ratones th(tk-)/th(tk-) tienen neuronas de DA poco desarrolladas e hiperfuncionales que se inervan en los ganglios basales. En contraste, la proyección de DA a la corteza frontal puede ser hipofuncional;
2. El subdesarrollo de las neuronas de DA tiene un efecto secundario en el desarrollo de las neuronas de serotonina que provoca una hiperinervación serotoninérgica de las neuronas de DA hipoplásicas;
3. Malformaciones neuronales en la corteza prefrontal (interrupción de la capa, desplazamiento e insuficiencia neuronal) en ratón th(tk-)/th(tk-) que son similares a los cambios corticales observados en SF humano. Estos cambios corticales probablemente son secundarios a los cambios en las neuronas de DA. Esto es coherente con el papel de DA como factor para el control de la neurogénesis. Esto también apoya la hipótesis de que la hipoplasia neuronal de DA afecta al desarrollo de otros sistemas neuronales y crea un sistema de circuitos anormales en el cerebro tal como se propone en SF; y
4. Los cambios en la transmisión de DA se desarrollan en la adolescencia.

Los déficits del comportamiento en ratones son similares a los déficits positivos, negativos y cognitivos en SZ. Los síntomas positivos de SZ se caracterizan por alucinaciones, delirios y déficits asociados a la estimulación sensorial. La inhibición prepulso (PPI) como una medida de la estimulación sensoriomotriz y del procesamiento de la información se refiere a la atenuación de la respuesta al sobresalto mediante un estímulo débil (prepulso) que aparece un breve período de tiempo antes del estímulo de sobresalto (Vollenweider F.X., y col., Biol Psychiat 2006, 60, 597-603).

Los déficits en la inhibición prepulso (PPI) se producen en SZ (31, 32). Tanto TAPD como AAPD mejoran la PPI (Kumari V, Sharma T; Psychopharmacology 2002, 162,97-101, revisión). Estudios recientes sugieren que AAPD puede ser superior a TAPD en la normalización de los déficits de la PPI en SZ en relación a los controles sanos (Kumari y col., 1999 de Vollenweider). En comparación con los controles, los ratones th(tk-)/th(tk-) presentaban una inhibición al prepulso reducida y respuestas al sobresalto potenciadas. Estos cambios se desarrollaron gradualmente entre 1 y 4 meses de vida y se mantuvieron estables al menos hasta los 14 meses de edad.

Además de la estimulación sensorial alterada y las alucinaciones y delirios asociados, la SZ se caracteriza por síntomas negativos (afecto plano, aislamiento social) que son normalmente más resistentes al tratamiento farmacológico. Estos síntomas no se han presentado satisfactoriamente en animales alterados genéticamente. Para determinar si los ratones th(tk-)/th(tk-) presentan síntomas de tipo negativo, se observó su comportamiento de investigación social y no social.

Hubo una diferencia significativa en el comportamiento de investigación entre los sujetos de control y th(tk-)/th(tk-). Los controles de tipo silvestre pasaron significativamente más tiempo ($p < 0,05$) investigando un estímulo animal femenino y masculino que los ratones th(tk-)/th(tk-). Otras medidas de comportamiento de investigación (por ejemplo, investigación anogenital) mostraron el mismo patrón. En contraste, no hubo diferencias entre los ratones de control y los transgénicos en un comportamiento de autoacicalamiento no social. En el ensayo en campo abierto, los ratones TK- recorrieron una distancia significativamente mayor tanto en las zonas periféricas como centrales que los

ratones de tipo silvestre.

La SZ también se caracteriza por deterioros cognitivos que son normalmente resistentes al tratamiento farmacológico. La presencia de posibles síntomas cognitivos en ratones th(tk-)/th(tk-) se analizó por ensayos de laberinto radial y de reconocimiento de objetos.

- 5 En los experimentos de laberinto de brazos radiales, los animales th(tk-)/th(tk-) cometieron más errores y necesitaron más tiempo para encontrar los artículos de alimento en los días de ensayo 1 y 2 (las diferencias son estadísticamente significativas). En el día del ensayo 3, no hubo diferencia genotípica. Esto indica que hay un déficit en th(tk-)/th(tk-) en aprendizaje, memoria, o ambos. El déficit es coherente con un problema con la memoria de trabajo.
- 10 En el ensayo de Reconocimiento de Objetos, los animales th(tk-)/th(tk-) se comportaron de manera diferente a la de los animales WT, los ratones th(tk-)/th(tk-) usaron una cantidad de tiempo similar para investigar el objeto familiar y el nuevo mientras que los ratones WT necesitaron significativamente más tiempo para investigar el objeto nuevo.

Una interpretación es que los ratones th(tk-)/th(tk-) no recuerdan el objeto que es nuevo y el que es familiar.

- 15 En comparación con SZ, el ratón th(tk-)/th(tk-) es un modelo único que imita las características complejas del desarrollo neurológico, estructurales y funcionales (síntomas "positivos", "negativos" y de "deterioro cognitivo" de SZ humana y las une a, pero las elabora en la "Hipótesis de DA de la Esquizofrenia". Este modelo ofrece conocimientos nuevos y únicos sobre las enfermedades humanas y debería facilitar nuevas estrategias terapéuticas.

- 20 La inhibición de prepulso reducida en los ratones th(tk-)/th(tk-) se normalizó por tratamiento con el TAPD (antagonista del receptor DA), flupentixol, a dosis que no efectuaron amplitud de sobresalto. Los datos de la PPI se analizaron usando un ANOVA mixto de 3 factores con el grupo [FGFR1 (TK-), Control] como una variable entre el sujeto y la intensidad del estímulo (pp4, pp8, y pp16) y la dosis del fármaco (solución salina, 0,25, 0,5, y 1,0 mg/kg) como dentro de las variables del sujeto. Este análisis produjo una interacción significativa de dos vías entre la dosis y el grupo (F 3,72 = 3,11, P < 0,05) y una interacción significativa de tres vías entre la dosis, el grupo y la intensidad del estímulo (F 6,72 = 2,85, P < 0,05). Hubo una interacción significativa entre el grupo y la intensidad del estímulo (F 2,14 = 14,93, P < 0,01). El seguimiento de los ensayos t a cada una de las tres intensidades del estímulo reveló reducciones significativas en la PPI en cada una de las tres intensidades del estímulo (pp4 = P < 0,1; pp8 = P < ,05; y pp16 = P < 0,01) en el grupo th(tk-)/th(tk-). Un ANOVA de dos factores con dosis e intensidad del estímulo como factores reveló un efecto significativo de la dosis en los ratones th(tk-)/th(tk-) (F 3,42 = 29,92, P < 0,01) pero no un efecto de la dosis en el grupo de control. Todas las tres dosis de flupentixol aumentaron la PPI en los ratones th(tk-)/th(tk-) a todas las tres intensidades del estímulo (P < 0,01).
- 25
- 30

En la respuesta al sobresalto, hubo un efecto significativo en ambos grupos (F 1,11 = 21,76, P < 01) y dosis (F 3,33 = 3,99, P < 0,05) en los ratones th(tk-)/th(tk-). El seguimiento de los ensayos t indicó que en comparación con la solución salina, la respuesta al sobresalto disminuyó con flupentixol en la dosis de 1,0 mg/kg de flupentixol tanto en los ratones th(tk-)/th(tk-) como en los de control.

- 35 Aunque parece que DA es el principal neurotransmisor en SZ, la serotonina puede desempeñar un papel significativo en la etiología de esta enfermedad. La clozapina y los fármacos antipsicóticos atípicos relacionados (AAPD) tienen alta afinidad para 5HT_{2A} y aumentan los niveles de 5HT en el cerebro. El elevado índice de ocupación de 5HT_{2A} por AAPD está asociado con sus efectos favorables en el tratamiento con antipsicóticos. En contraste no hubo asociación entre la eficacia antipsicótica de AAPD y la ocupación de D₂.
- 40 Schmidt y col. (1993) indicaron que el antagonismo de 5HT_{2A} puede tener un efecto corrector sobre la estimulación sensorial alterada, y que los esquizofrénicos que responden a la clozapina presentan actividad serotoninérgica excesiva. Esta hipótesis concuerda con los datos en los pacientes en los que se encontraron algunos índices Iniciales de tono de serotonina central potencial y parecen relacionados con la eficacia clínica de AAPD (Kasper y col., 1999; Martin y col., 1998; Wandenberg y col., 2001). Las neuronas 5-HT que se originan en el núcleo Dorsal del Rafe (DR) y en el núcleo Principal del Rafe (MnR) inervan la región terminal de DA (por ejemplo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado) así como las estructuras del mesencéfalo que incluyen el VTA y la SN en las que hacen contacto sináptico con DA y con las neuronas no dopaminérgicas.
- 45

- 50 Teniendo en cuenta la invasión de la SN y el VTA por los terminales neuronales serotoninérgicos en los ratones th(tk-)/th(tk-), se analizaron los efectos de AAPD (clozapina y quetiapina) y un M100907 antagonista específico de 5-HT_{2A}.

- La clozapina a 3 mg/kg no tuvo efecto en la PPI o en la respuesta al sobresalto. En contraste, a la dosis más elevada (6 mg/kg), la clozapina aumentó significativamente la PPI en los ratones tanto de control como transgénicos y disminuyó la respuesta al sobresalto en los ratones transgénicos. No se encontró interacción significativa del fármaco de genotipo x en la dosis de clozapina o a cualquier intensidad de prepulso dentro de cada dosis indicando que el tratamiento con clozapina tenía un efecto similar sobre la PPI en los ratones de control y en los th(tk-)/th(tk-), aunque hubo una disminución significativa de la PPI en los ratones transgénicos en comparación con el grupo de control apropiado a cada intensidad de prepulso a cada dosis. Estos resultados eran coherentes con el hallazgo
- 55

humano de que el AAPD clozapina también aumentaba la PPI en individuos sanos de una manera comparable con la de los pacientes SZ. La PPI para el grupo transgénico de 6 mg/kg de clozapina no difería de la del grupo de vehículo de control (ensayo t: pp4; pp8; pp16 = $p > .05$, SN) demostrando la capacidad de la clozapina para normalizar la PPI en los ratones transgénicos. Se observó una normalización similar con la respuesta al sobresalto.

5 En los ratones th(tk-)/th(tk-), la quetiapina normalizó la PPI reducida a una dosis de 7,0 mg/kg ($p < .001$) mientras que las dosis más bajas no tuvieron efecto. En los ratones de control no hubo efecto principal significativo de la quetiapina a cualquier dosis examinada. Para los ratones transgénicos hubo una disminución significativa en la respuesta al estímulo en comparación con el grupo de solución salina a todas las dosis de Quetiapina ($p < 0,05$). En contraste, no hubo efecto principal de la Quetiapina en la respuesta al sobresalto a ninguna dosis en los ratones de control.

10 Para confirmar que los efectos de AAPD pueden reflejar específicamente la inhibición de los receptores de serotonina, se ensayó un M100907 antagonista específico de 5-HT_{2A}. M100907 no tuvo efecto a ninguna dosis en la PPI o en la respuesta al sobresalto en los ratones de control. El grupo M100907 transgénico de dosis baja (0,01 mg/kg) mostró una PPI significativamente más baja que la del grupo de control de dosis baja, similar a la diferencia observada en los grupos tratados con el vehículo. No hubo diferencia significativa entre los grupos transgénicos y los de control en la dosis media (0,1 mg/kg) o alta (1 mg/kg), y en la dosis alta hubo una interacción significativa del genotipo x al fármaco indicando que M100907 a 1,0 mg/kg mejoraba preferentemente la PPI en los ratones transgénicos. A las dosis media y alta, M100907 dio como resultado aumentos de PPI en los ratones transgénicos en comparación con el grupo de vehículo. Aunque no hubo diferencia significativa entre los grupos de control y transgénico a cualquier dosis de M100907, hubo una disminución significativa de la respuesta al sobresalto en los grupos transgénicos tratados, en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

20 Dos de los síntomas negativos de evidencias de SZ son una falta de interacción social y un afecto aplanado. M100907 aumentó significativamente la cantidad de tiempo usado por los ratones TK- para investigar el estímulo animal pero no tuvo efecto en el tiempo de investigación en los animales de tipo silvestre. En contraste con el aislamiento social, el comportamiento de autoacicalamiento y de movimiento en el campo abierto no se vio afectado por el tratamiento con fármacos.

25 Estos resultados indican que los ratones th(tk-)/th(tk-) presentan un comportamiento que es análogo al de los síntomas negativos de SZ. La investigación social se reduce en los ratones th(tk-)/th(tk-) pero el tratamiento con M100907 invierte este déficit. M100907 no tiene efecto en los ratones de tipo silvestre, lo que sugiere que el sistema serotoninérgico difiere funcionalmente entre los ratones de tipo silvestre y los th(tk-)/th(tk-). En los pacientes con SZ, los déficits en el comportamiento social no se invierten mediante los antipsicóticos típicos y son resistentes al tratamiento mediante muchos de los antipsicóticos atípicos. La observación de que M100907 invierte los déficits sociales en los ratones th(tk-)/th(tk-) sin afectar a la investigación social en los ratones de tipo silvestre sugiere que los fármacos que se dirigen al receptor 5-HT_{2A} pueden mejorar los síntomas negativos de los pacientes con SZ sin afectar el comportamiento social en la población no SZ. El efecto facilitador de M100907 en la investigación social parece relativamente específico ya que el comportamiento no social tal como el autoacicalamiento y la locomoción en el campo abierto no se vieron afectados por el fármaco.

30 Los ratones th(tk-)/th(tk-) proporcionan un apoyo experimental para la hipótesis 5HT de SZ que propone que la buena respuesta a los AAPD (antagonistas de 5HT_{2A}) depende de una actividad serotoninérgica central potenciada y que la eficacia de estos fármacos se correlaciona con el grado del aumento del tono serotoninérgico. Los esquizofrénicos paranoides sin medicar en la fase temprana de la enfermedad en la que responden bien al antagonismo selectivo de 5HT_{2A} tienen un tono de serotonina central potenciada sugerido por una respuesta a la prolactina inducida por la fenfluramina y por niveles más altos de 5HIAA en CSF que los controles (Bartfai y col., 1984; Rimon y col., 1971) (Abel y col., 1996). En los esquizofrénicos el mejor indicador de la respuesta favorable a la clozapina es una baja proporción de CSF de HVA/5HIAA, una sustitución de 5HT más elevada en relación a DA (Pickar y col., 1994; Szymanski y col., 1993). La respuesta favorable a la clozapina se ha predicho de forma coherente por la SZ paranoide (Fenton y Lee 1993), un subtipo de enfermedad asociada con niveles elevados de 5HIAA en el cerebro (Hanson y col., (1994)).

40 Una hipótesis con respecto a cómo las hiperinervaciones serotoninérgicas afectan a las funciones de las neuronas de DA y al comportamiento en ratones th(tk-)/th(tk-) es que la hiperinervación de 5HT estimula las neuronas de DA en la SN e inhibe VA actuando a través de los receptores 5HT_{2A}.

45 Se mostró que la PPI alterada y el sobresalto aumentado en los ratones th(tk-)/th(tk-) reflejan la hiperactividad de las neuronas de DA. Por lo tanto, un mecanismo a través del que la hiperinervación de 5-HT de la SN y del VTA podría alterar la estimulación sensorial podría implicar la sobreactivación de 5-HT de las neuronas de DA que integran las dianas subcorticales. En contraste, los síntomas negativos pueden reflejar la conjunción de DA en la corteza frontal. Se sabe que 5-HT tiene efectos opuestos en las neuronas de DA en la SN (predominantemente activador) y en el VTA (predominantemente inhibidor). De este modo, el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} podría normalizar la función de DA en los sistemas de DA tanto subcorticales como corticales.

La actividad serotoninérgica puede influenciar la actividad de las neuronas de DA tanto en la SN como en el VTA. Tanto en ratas como en seres humanos, los receptores 5-HT_{2A} se han localizado en la SN y en el VTA, proporcionando un mecanismo mediante el cual M100907 podría afectar a las neuronas de DA. Dado que el fármaco solamente tenía un efecto en los ratones th(tk)/th(tk-), el papel del receptor 5-HT_{2A} en el comportamiento normal puede ser sutil. Sin embargo, en una afección en la que se produce hiperinervación serotoninérgica, como en los ratones th(tk-)/th(tk-), el fármaco es eficaz al revertir los cambios de comportamiento asociados con esta hiperinervación. Una situación similar existe probablemente en el cerebro SZ humano en el que se observa tanto la hipoplasia neuronal de DA (que desencadena la hiperinervación serotoninérgica en ratones) como la sobreproducción de serotonina.

10 MATERIAL Y MÉTODOS

Los ratones transgénicos th(tk-)/th(tk-) se describieron en Klejbor y col., 2006, LO que se incorpora en el presente documento por referencia con respecto a dicha enseñanza. Los ratones se generaron mediante la introducción de un gen de fusión que consiste en promotor TH de rata (4,5 kb) condensado con FGFR1 (TK-) colocado en serie con FGFR1 (TK-), el sitio de empalme dador-aceptor SV40 y la corriente abajo secuencialmente de SV40 poli(A) (un total de 6,5 kb). Los linajes se identificaron sistemáticamente por la presencia del transgen por amplificación por PCR de ADN de la cola durante 30 ciclos. Los cebadores de PCR sentido (GCCAAGACAGTGAAGTTCAAATGC) y antisentido (GTAATACGACTACTATAGGGC) eran complementarios con las regiones del transgen (Klejbor y col., 2006). Todos los ratones transgénicos y de control usados para los experimentos que se describen a continuación eran animales F2 macho y hembra de antecedentes genéticos mixtos de BCF1 (C57BL/10J/C3H/HeJ). Los ratones adultos (homocigotos, heterocigotos o de tipo silvestre) se alojaron en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h (luces de 1200 h) con libre acceso a alimento y agua. Todos los procedimientos de comportamiento y anatómicos se realizaron de acuerdo con la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y con la aprobación de la Universidad de Buffalo IACUC. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el estrés en los animales y para reducir el número de ratones usados para los experimentos de comportamiento y anatómicos.

25 La Clozapina (RBI/Sigma St. Louis, MO) y la Quetiapina (AstraZeneca) se disolvieron con 5 µl de ácido acético al 20 %/ml de solución salina al 0,9 %.

M100907 (K. Rice), se disolvió en NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato. Las dosis del fármaco se calcularon en la forma de base libre.

30 Los compuestos A y B (un compuesto de referencia) (Targacept Inc; Winston Salem, NC) y Flupentixol (RBI/ Sigma St. Louis, MO) se disolvieron en NaCl al 0,9 % tamponado con fosfato. Las dosis del fármaco se calcularon en la forma de base libre.

Los fármacos o el vehículo se inyectaron por vía subcutánea 30 minutos por vía intraperitoneal antes del ensayo de comportamiento. Todas las inyecciones se administraron a un volumen de 100-200 µl/30 g de peso corporal.

Procedimientos de estudio del comportamiento

35 A. PPI y Sobresalto:

Aparato: La reactividad al sobresalto se midió usando dos cámaras (SR-LAB, San Diego Instruments, San Diego, CA). Cada cámara consistía en un cilindro de Plexiglas no restrictivo transparente sobre una plataforma dentro de una caja ventilada. Un altavoz de alta frecuencia dentro de la cámara producía tanto un ruido de fondo continuo de 68 dB como el pulso de sobresalto de 120 dB. Las vibraciones del cilindro de Plexiglas causadas por la respuesta al sobresalto de todo el cuerpo del animal se tradujeron en señales analógicas mediante una unidad piezoeléctrica unida a la plataforma.

45 Sesión de inhibición del prepulso (PPI): Todas las sesiones de ensayos de PPI consistían en ensayos de sobresalto (pulso solo), ensayos de prepulso (prepulso + pulso), y ensayos de no estímulo (noestim). La prueba de pulso solo consistía en un pulso de 120 dB durante 40 ms de ruido de banda ancha. La PPI se midió mediante los ensayos de prepulso + pulso que consistían en un prepulso de ruido de 20 mseg, un retraso de 100 mseg, a continuación un pulso de sobresalto de 120 dB de 40 mseg (intervalo de inicio a inicio de 120 mseg). Las intensidades del prepulso acústico fueron 4, 8, y 16 dB por encima del ruido de fondo de 68 dB (es decir, 72, 76, y 84 dB). La prueba de noestim consistía solamente en un ruido de fondo. La sesión del ensayo comenzó y finalizó con cinco presentaciones del ensayo de pulso solo; entre ellos, cada tipo de prueba acústica o de noestim se presentó 10 veces en un orden pseudoaleatorio. Hubo un promedio de 15 seg (intervalo, 12-30 seg) entre ensayos. Para los estudios de fármacos, los ratones se colocaron en cámaras de sobresalto 30 minutos después de cada inyección, y se presentó un nivel de ruido de fondo de 68 dB durante un período de aclimatación de 10 min y continuó durante toda la sesión de ensayo.

55 La cantidad de PPI se calculó como un porcentaje de puntuación para cada tipo de ensayo de prepulso acústico: % de PPI = 100 {[respuesta al estímulo para prepulso + pulso]/[respuesta al estímulo para el pulso solo]} x 100. La magnitud de la respuesta al sobresalto acústico se calculó como la respuesta media de todos los ensayos de pulso solo, excluyendo el primer y el último bloque de cinco ensayos de pulso solo presentados.

Procedimiento: En todas las cohortes, la PPI se ensayo dos veces por semana con al menos dos días de separación de los días de ensayo para todas las dosis de fármacos. Cada semana los ratones recibieron una inyección del vehículo antes de una de las sesiones de ensayo y tratamiento con fármacos para la segunda sesión de ensayo. La PPI y la magnitud del sobresalto en los días del ensayo con vehículo se examinaron para determinar si estas medidas cambiaban con ensayos repetidos. Dado que no se observó ningún efecto de los ensayos repetidos, se usó para el análisis el promedio de las sesiones de ensayo con el vehículo y con el fármaco (a cada dosis). El orden de solución salina/sin inyección e inyecciones de fármacos se cambió cada semana. Los datos para los grupos sin inyectar se recogieron antes de la administración de cualquier tratamiento. El número de animales ensayados para cada fármaco varió y se indica en los Resultados. Para todos los experimentos, los ratones se ensayaron entre 5 y 12 meses de edad y hubo una distribución equitativa del género dentro de cada genotipo.

Estadísticas: Los datos de la PPI se analizaron usando un ANOVA mixto de tres factores con el grupo [FGFR1 (TK-), control] como una variable entre sujetos y la intensidad del estímulo de prepulso (pp) (pp4, pp8 y pp16) y las dosis del fármaco como variables entre sujetos. Para determinar si había una diferencia entre los grupos sin tratamiento con fármacos, los datos sin inyección y con solución salina se analizaron con un ANOVA de dos factores, mixto con el grupo y la intensidad del estímulo como factores. Las dosis de los fármacos analizados fueron vehículo de solución salina, flupentixol (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg), clozapina (3,0 mg/kg y 6,0 mg/kg), quetiapina (1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg y 7,0 mg/kg), M100907 (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg), Compuesto B (0,1 mg/kg y 1,0 mg/kg), Compuesto A (0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg) y dosis combinadas de clozapina (3,0 mg/kg) y Compuesto A (0,1 mg/kg), y quetiapina (3,0 mg/kg) y Compuesto A (0,1 mg/kg). El seguimiento de los ensayos t se realizó a cada una de las tres intensidades del estímulo (pp4, pp8 y pp16) para determinar la diferencia significativa entre grupos. Para determinar si el tratamiento aumentaba diferencialmente la PPI en los ratones th(tk-)/th(tk-), un ANOVA de dos factores con dosis e intensidad del estímulo como factores se realizó en los grupos tanto th(tk-)/th(tk-) como de control separadamente. La respuesta al estímulo se analizó con un ANOVA mixto de dos factores con grupo y dosis como factores y el seguimiento de los ensayos t se realizó de la misma manera que para la PPI. La significación estadística para todos los ensayos fue $p < 0,05$.

B. El comportamiento social, autoacicalamiento no social, y la actividad en campo abierto se midieron en ratones macho de tipo silvestre ($n = 7$) y FGFR1 (TK-) ($n = 7$) entre las edades de 7 y 10 meses que se habían alojado individualmente durante al menos cuatro semanas antes del ensayo. En los días del ensayo, cada sujeto recibió tres ensayos: un ensayo de comportamiento social con una hembra, un ensayo de comportamiento social con un macho, y un ensayo en campo abierto. Hubo un intervalo de 30 minutos entre cada ensayo. El comportamiento social se ensayó usando una variante del paradigma residente-intruso, en el que se introdujo un estímulo animal en la jaula de alojamiento del sujeto durante tres minutos. Antes del ensayo, las jaulas de alojamiento de los sujetos no se cambiaron durante al menos cuatro días para permitirles establecer la jaula como su territorio. Los animales de estímulo femenino C57Bl/6Js se alojaron individualmente, rotando aleatoriamente (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Cada sujeto se ensayó con un animal de estímulo diferente y cada animal de estímulo se usó solamente una vez por cada día de ensayo. Los animales de estímulo masculino C57Bl/6Js se alojaron individualmente (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Cada sujeto se ensayó con un animal de estímulo diferente y cada animal de estímulo se usó solamente una vez por cada día de ensayo. Un estímulo femenino se puso en la jaula de sujetos de tipo silvestre ($n = 8$) y tk-/- ($n = 8$).

Después de tres minutos, el estímulo femenino se retiró. Treinta minutos más tarde un estímulo masculino se puso dentro de la jaula de alojamiento del sujeto. Después de tres minutos, el animal de estímulo se retiró. Todo el ensayo se produjo en la fase oscura (la fase activa) del ciclo de luz bajo iluminación de luz de color rojo. La interacción se grabó en video desde el lateral usando la función NIGHTSHOT en una videocámara de Sony (DRV-120, Sony Corporation). El comportamiento del sujeto se cuantificó desde la cinta de video usando el Observador Móvil (Noldus Information Technologies, Sterling, VA). Se midió el número de episodios observados y la cantidad de tiempo dedicado en los siguientes comportamientos: contacto social general (contacto con el animal de estímulo, olfateo (contacto tanto anogenital como no anogenital), y comportamiento no social (autoacicalamiento). La persona que anotaba el comportamiento no tenía acceso al genotipo y al tratamiento de los sujetos. Para ensayar la actividad en campo abierto, los sujetos se retiraron de su jaula de alojamiento y se colocaron solos en un área de ensayo en campo abierto de Plexiglas (45 cm x 45 cm x 25 cm) para una sesión de ensayos de diez minutos, tras lo cual se devolvieron a su jaula de alojamiento. El ensayo se grabó en video desde arriba usando una cámara de video Handycam TRV-350 de SONY usando la función nightshot. El movimiento se analizó en detalle usando el sistema de Clever Sys. Inc.

Para el ensayo con fármacos, los ratones de tipo silvestre ($n = 7$) y tk-/- ($n = 7$) se inyectaron por vía intraperitoneal con 1 mg/kg de M1009007 o de vehículo. 30 minutos más tarde, un estímulo femenino se puso en la jaula de alojamiento del sujeto. Después de tres minutos, el estímulo femenino se retiró. Treinta minutos más tarde un estímulo masculino se puso en la jaula de alojamiento del sujeto. Después de tres minutos, el animal de estímulo se retiró. Después de 30 minutos, el sujeto se ensayó en el ensayo en campo abierto.

C. Laberinto de Brazos Radiales: Los déficits en la memoria de trabajo están presentes en los pacientes humanos con SZ y con trastornos psicológicos que están asociados con otros déficits de comportamiento social. En resumen, los ratones se colocan en el centro de un laberinto radial de ocho brazos y se permite que exploren el laberinto libremente. Los sujetos se ensayan no más de una vez al día. Hay dos fases de entrenamiento. Fase 1 - Durante la

primera fase de entrenamiento, un artículo de alimento apetecible (tal como una pieza de un Cheerio) se coloca en el extremo de cada uno de los ocho brazos. El ensayo continúa hasta que el animal ha encontrado todos los artículos de alimento o hasta que han pasado veinte minutos. El ensayo necesita que los sujetos tengan motivación para encontrar el alimento. Por lo tanto, se limita el alimento a los sujetos durante aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 8 pm hasta la hora del ensayo, aproximadamente a las 8 am. En el momento entre el final del ensayo y las 8 pm, los sujetos tienen acceso a voluntad al alimento. Siempre en sus jaulas de alojamiento, los sujetos siempre tienen acceso a voluntad a agua. Todos los sujetos se pesan diariamente. Cualquier sujeto que pierde más de un 15 % de su peso corporal inicial se retira del estudio y se le proporciona comida a voluntad. Una vez que el animal ha aprendido a recuperar la comida de todos los brazos, comenzará la segunda fase del entrenamiento.

Fase 2 - En esta fase, la comida se coloca en cuatro de los ocho brazos. Después de varias sesiones de entrenamiento en estas condiciones, la fase de ensayo comienza. Durante el ensayo, la comida se coloca en cuatro de los ocho brazos. El sujeto se coloca en el centro del laberinto y se permite que explore el laberinto libremente. El ensayo termina cuando el sujeto ha consumido todas las piezas de alimento o cuando han pasado 20 minutos. Se cree que el número de entradas en los brazos vacíos reflejan la memoria espacial. Se cree que el número de entradas en los brazos ya investigados durante el ensayo actual refleja la memoria de trabajo.

D. Reconocimiento de Objetos: Se usaron cuatro objetos diferentes: dedales de cobre, tuercas hexagonales de acero de 2 cm, matraces de vidrio de 25 ml y tarros de cerebro de plástico. Para cada objeto, había tres copias idénticas (es decir, tarro de cerebro 1, tarro de cerebro 2, y tarro de cerebro 3).

Ensayo: Los sujetos se ensayaron entre las 10 am y las 3 pm en la oscuridad bajo iluminación con luz de color rojo. La cámara de ensayo es una caja grande de Plexiglas (40 x 40 x 40) con un suelo opaco. Todos los ensayos se registraron usando una cámara Handycam de Sony (DRV120, Sony Corporation, Oradell, NJ) usando la función Nightshot. La cámara y los objetos se lavaron cuidadosamente con etanol al 95 % y se permitió secar durante cinco minutos antes del ensayo. El ensayo se dividió en dos fases, la fase de aclimatación y la fase de reconocimiento de objetos.

Fase 1 - La fase de aclimatación se produjo en los días uno a tres del ensayo. El sujeto se puso en el centro del campo abierto y se permitió que explorara libremente durante 10 minutos. Esto se produjo una vez al día durante tres días.

Fase 2 - La fase de reconocimiento de objetos se produjo a los días cuatro a cinco del ensayo. En esta fase, se colocaron dos copias idénticas del objeto en esquinas adyacentes del campo abierto (es decir, tarro de cerebro 1 y tarro de cerebro 2). La colocación coherente de los sujetos se aseguró midiendo con una pieza de cartón de 5 x 5 cm. El cuadrado se colocó en la esquina y el centro del objeto se colocó a continuación debajo de la esquina más cercana al centro de la cámara. El sujeto se puso en el centro de la cámara y se permitió que explorara libremente durante tres minutos. Después de tres minutos, el sujeto se devolvió a su jaula de alojamiento durante 30 minutos. Durante este retraso, la cámara de ensayo y los objetos se limpiaron de nuevo con alcohol al 95 %. Después del retraso, los originales objetos fueron devueltos a la misma ubicación en la que estaba inicialmente. A continuación, un nuevo objeto reemplazó la otra copia del objeto original. Por ejemplo, si el tarro de cerebro 1 y el tarro de cerebro 2 se habían usado inicialmente, uno de éstos se devolvía (es decir, el tarro de cerebro 1) y el otro se reemplazaba con un nuevo objeto (es decir, la rosca de acero 1). Después de haber colocado estos objetos, el sujeto se colocaba de nuevo en el centro de la cámara y se permitía que explorara libremente. Después de tres minutos, el sujeto se devolvía a su jaula de alojamiento durante el día. Para cada fase, el objeto usado o el objeto devuelto se determinaron aleatoriamente. Este mismo procedimiento se usó en el quinto día del ensayo pero usando los otros objetos. Por lo tanto, si el tarro de cerebro y la rosca de acero se usaron en el cuarto día, el dedal de cobre y el matraz de vidrio se usan en el quinto día.

4. Inmunocitoquímica y estereología

La inmunocitoquímica y la estereología de las neuronas que expresan TH y de las fibras de DA son de (Klejbtor y col. 2006) y se describen a continuación.

A. Neuronas de TH - Los ratones se perfundieron con PBS y paraformaldehído al 4 % y se prepararon secciones de cerebro criostatizado de 40 micrómetros y se inmunotifieron con anticuerpo TH policlonal de conejo (1:1000) (Sigma Chem. Co) y anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy3 (1:600) como se ha descrito anteriormente (Fang y col. 2005). El análisis estereológico cuantitativo se realizó usando el sistema GASTGrid (Olympus, Dinamarca). El sistema consiste en un ordenador con una superficie de contacto gráfica y un microscopio BX-51 (Olympus, Japón). El objetivo principal de este procedimiento de recuento fue comparar los perfiles neuronales de los ratones transgénicos y de control y no determinar los números absolutos de neuronas de THIR en el mesencéfalo. Se analizaron cinco ratones en cada grupo. En todos los casos, los perfiles neuronales inmunorreactivos se analizaron dentro de los campos ensayados usando protocolos idénticos que consisten en: (1) perfilar los núcleos (SNc y VTA) con ampliación baja; (2) muestreo aleatorio con ampliación de 20 x de las áreas de SNc o VTA usando la misma secuencia antero-posterior (5 secciones de cada cerebro de - 4,52 a - 5,6 con relación al Bregma); (3) determinar la densidad neuronal de THIR dentro de los campos ensayados de las áreas de superficie conocida (al menos un 60 % de la superficie nuclear para la SNc y un 100 % para el VTA). Los datos en bruto a partir de los campos ensayados

individuales se registraron y se sopesaron y la densidad media de las neuronas de THIR se calculó para cada núcleo. La densidad de las células de THIR en los ratones de control y transgénicos se comparó usando ANOVA (ensayo de Kruskal-Wallis).

5 Para estimar las superficies medias de células TH-IR, las rejillas de muestreo que se colocaron sistemáticamente mediante el ordenador sobre los perfiles seccionales de la SNc y del VTA para el recuento celular se usaron para obtener estimaciones imparciales del promedio de la superficie celular de TH-IR por medio de un software Laser Pix version 4.1 de Olympus (Biorad, Gran Bretaña). Se aplicó ANOVA de una vía con ensayos de Newman-Keuls y Mann-Whitney a posteriori para la significación estadística entre grupos. Todas las densidades celulares y las medidas de tamaños se realizaron a ciegas con respecto al genotipo.

10 B. Inmunotinción DAT y análisis cuantitativo. Secciones de cerebro criostatizado de 40 micrómetros se inmunotñeron con anticuerpo anti-DAT de rata (Chemicon, Temeculla, CA) y anticuerpo anti-rata conjugado con Alexa 488. Las imágenes por microscopia fluorescente (12 bit) se adquirieron con una cámara CCD enfriada con Microcámara XILLIX en un microscopio fluorescente FXA de Nikon. Todas las imágenes adquiridas estaban en el intervalo lineal de la cámara. Las imágenes de las secciones a partir del control y de los ratones transgénicos se adquirieron bajo condiciones de iluminación idénticas y ganancia de cámara, compensación, y exposición idénticos. Las imágenes de fondo (fuera de las secciones tisulares) se tomaron para cada sección y se restaron a partir de las imágenes de secciones de cerebro de DAT-IR (cuerpo estriado y núcleo accumbens). Para cada cerebro y estructura cerebral, se analizaron 3-4 secciones representativas. Las imágenes se volvieron a procesar y a poner en el umbral idénticamente usando un software para Imágenes ONCOR. Se registró el área total de cada imagen así como el número de píxeles en el umbral y su intensidad integrada.

C. Inmunocitoquímica y estereología de fibras que expresan 5-HT:

25 Todos los animales adultos (6 ratones de control y 6 transgénicos) se anestesiaron profundamente con dosis letales de Nembutal (80 mg/kg de peso corporal), a continuación se perfundieron por vía transcardial con solución salina al 0,9 % (NaCl) con heparina, seguido de solución de paraformaldehído al 4 % en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,4). Los cerebros se fijaron posteriormente en paraformaldehído fijador al 4 % durante 3-4 horas. A continuación, se colocaron en sacarosa al 15 % (durante una noche a 4 °C) seguido de sacarosa al 30 % hasta absorción. Se cortaron secciones coronales de 40 µm de espesor de los cerebros en un criostato JUNG 1800 (Leica, Alemania). A continuación las secciones se tiñeron con el uso del procedimiento inmunohistoquímico. Las secciones flotantes libres se bloquearon con suero normal de cabra al 10 % (NGS) que contenía Triton X-100 al 0,3 % durante 1 hora y después se incubaron con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-5-HT (Sigma; 1:1000) durante 48 horas a 4 °C. Después de aclarados múltiples en PBS, las secciones se incubaron durante 2-3 horas, a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios apropiados de cabra anti-conejo conjugados con Cy3 (Jackson ImmunoResearch; diluido a 1:600). El conjunto elegido de secciones de cerebro de ambos experimentos así como los grupos de control fueron sometidos a control negativo con omisión del anticuerpo primario. Para la subdivisión de las estructuras del mesencéfalo se usaron los criterios de Paxinos y Watson (lit.). Las estructuras examinadas incluyeron: el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra (SN) y sus subdivisiones: el núcleo interfascicular (IF), el núcleo pigmentoso parabraquial (PBP), el núcleo paranigral PN, el núcleo de rafe lineal rostral (RLi); las partes compactas y reticular de la sustancia negra (SNC y SNR, respectivamente).

40 Las diapositivas de tinción inmunohistoquímica se examinaron con un microscopio de fluorescencia BX-51 (Olympus, Japón) y con el sistema confocal Radiance 2100 (Bio-Rad, UK), equipado con láser de Kriptón/Argón y se montaron en el microscopio Eclipse 600 (Nikon, Japón). Las imágenes de microscopia de identificación sistemática con láser confocal (CLSM) se obtuvieron usando lentes del objetivo de x 40 y x 60 de inmersión en aceite de N.A. = 1,3 y 1,4, respectivamente. Se usó el iris óptimo para cada ampliación. Para la reconstrucción de la imagen se usó el programa de análisis Laser Sharp 2000 v.4.0. (Bio-Rad; Reino Unido). En cada caso, solamente se tomaron en cuenta las secciones completamente teñidas con fluorescencia.

50 El análisis estereológico cuantitativo de las fibras 5-HT se realizó usando el sistema de Cuadrícula C.A.S.T. (Olympus, Dinamarca) tal como se describe en Gundersen H.J. y West M.J. 1988 (9103, 9085). Se aplicó ANOVA de una vía con ensayos a posteriori de Newman-Keuls y Mann-Whitney para la significación estadística entre los grupos. Todas las medidas de densidad de las fibras se realizaron a ciegas con respecto al genotipo. Se estudiaron treinta secciones por cada núcleo del VTA y de la SN tanto en los ratones del grupo de control como los transgénicos de 12 meses de edad.

Estas secciones se distribuyeron sobre el intervalo de aproximadamente - 4,8 a - 5,6 mm de Bregma. Análisis de 5-HT, 5-HIAA, DA, DOPAC, HVA, 3-MT (sistema de HPLC con detección electroquímica - ESA).

55 Los ratones se sacrificaron usando CO₂, se decapitaron rápidamente y los cerebros se congelaron en hielo seco y se almacenaron a - 80 °C. Las regiones anatómicas del cerebro se aislaron usando agujas de perforación tal como se ha descrito anteriormente (Bialowas y col. 1979). Por cada mg de tejido recogido, se añadieron de 4 a 20 l de ácido perclórico 50 mM que contenía metabisulfito 100 µM y DHBA 500 nM como un patrón interno. Los análisis se realizaron tal como se describe en (Corso y col. 2005). En resumen, los tejidos se sonicaron y el homogeneizado se centrifugó a 11.000 rpm (7500 g) durante 20 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se colocó en una

unidad de filtro centrífugo MC de 0,22 m ultra libre y se centrifugó a la misma velocidad hasta que el sobrenadante había pasado a través del filtro. Las muestras se inyectaron a través de una columna de 15 cm de fase inversa Suppleco Discovery C18 con una protección de columna de 2 cm. La detección se hizo con BAS LC-4C o con ESA Coulochem II con un software de análisis informático ESA. Las concentraciones del tejido de 5-HT analizado y su metabolito 5-HIAA así como DA y sus metabolitos DOPAC y HVA se determinaron por análisis de HPLC de sus respectivos patrones.

Análisis estadístico: ANOVA seguido de LSD.

EFFECTOS TERAPÉUTICOS DE AGONISTAS NICOTÍNICOS ALFA 7 EN RATONES TH(TK-)/TH (TK-)

Usando el modelo de ratones th(tk-)/th(tk-) que se ha descrito anteriormente en el presente documento, el desarrollo de hipoplasia en las neuronas de DA (también encontradas en SZ) afecta al desarrollo de otros sistemas neuronales creando por lo tanto un sistema de circuitos de cerebro anormal con estimulación sensorial, comportamiento social y cognición defectuosos como se propone para SZ. La hiperinervación serotoninérgica de las neuronas de DA con hipoplasia y la hiperfunción de 5-HT apoya esta hipótesis. Además, en los ratones th(tk-)/th(tk-), se encontraron cambios estructurales en la corteza cerebral y en el hipocampo que imita los cambios indicados en SZ. La dirección hacia estas diversas áreas del cerebro con nuevos tratamientos se podrían ensayar como una nueva terapia para SZ.

Las neuronas 5HT y las neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo expresan los receptores nicotínicos alfa 7. Alguien podría ensayar si la estimulación de estos receptores puede normalizar las funciones del sistema de circuitos del cerebro anormal y de este modo ser útil como un tratamiento de SZ. Se están desarrollando nuevas categorías de fármacos anti-SZ que se dirigen hacia los receptores nicotínicos alfa 7.

La Figura 1 ilustra los efectos de un agonista del receptor nicotínico $\alpha 7$ (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-5-metiltiofeno-2-carboxamida (Compuesto B de referencia) para invertir los déficits en la estimulación sensorial (respuesta a la PPI y al sobresalto acústico) en ratones th(tk-)/th(tk-). Es importante destacar que el Compuesto B no tuvo efecto sobre el control (ratones normales; n = 8).

Las Figuras 2a y 2b ilustran los efectos de un agonista nicotínico $\alpha 7$ (Compuesto A) para invertir los déficits en la PPI en ratones th(tk-)/th(tk-). El Compuesto A no tuvo efecto sobre el control (ratones de tipo silvestre) indicando que el Compuesto A corrige específicamente la función del sistema de circuitos del cerebro anormal de los ratones th(tk-)/th(tk-).

La Figura 3 ilustra que el Compuesto A normaliza la respuesta al sobresalto en los ratones th(tk-)/th(tk-).

ACCIONES SINÉRGICAS DE AAPD Y AGONISTAS NICOTÍNICOS ALFA 7

Ejemplo 1

Se prepara una composición farmacéutica combinando (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida con clozapina en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición contiene cantidades respectivas de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y clozapina para cumplir una base diaria una cantidad terapéuticamente eficaz de cada ingrediente. La composición se administra a un paciente para el tratamiento de esquizofrenia en una base diaria, de dos veces al día, de tres veces al día, o de cuatro veces al día.

La Clozapina (3,0 mg/kg) y el Compuesto A (0,1 mg/kg) cuando se administraron individualmente, tuvieron poco efecto sobre la PPI o el sobresalto. Véanse las Figuras 4, 2a, y 2b. En contraste, para los ratones transgénicos hubo un efecto principal significativo de la Clozapina (3,0 mg/kg) y del Compuesto A (0,1 mg/kg) combinados ($p = 0,006$).

No se observaron efectos sinérgicos en los ratones WT de control. Véanse las Figuras 5 y 6.

Ejemplo 2

Se prepara una composición farmacéutica combinando (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida con quetiapina en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición contiene cantidades respectivas de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida y quetiapina para cumplir una base diaria de una cantidad terapéuticamente eficaz de cada ingrediente. La composición se administra un paciente para el tratamiento de esquizofrenia en una base diaria, de dos veces al día, de tres veces al día, o de cuatro veces al día.

En los ratones th(tk-)/th(tk-) transgénicos no hubo efecto principal significativo de la Quetiapina a 3,0 mg/kg (Figuras 7a y 7b) o del Compuesto A a 0,1 mg/kg (Figuras 2a y 2b) independientemente. Cuando se usan en combinación, sin embargo, hubo un efecto de tratamiento sinérgico ($p = 0,047$) (Figura 8). El agonista nicotínico $\alpha 7$ y el agente antipsicótico trabajan sinérgicamente para mejorar la inhibición del prepulso en los ratones th(tk-)/th(tk-) transgénicos. Para los ratones de control no hubo efecto de las dosis combinadas.

Un número creciente de evidencias apoya la hipótesis de que el desarrollo de hipoplasia y la función de las neuronas dopaminérgicas son fundamentales para la génesis de las psicosis esquizofrénicas y que los cambios en las

neuronas serotoninérgicas y glutamatérgicas son importantes en la patología (Dean B 2000, Aus. NZ J. Psychiat 34, 560-569; se incorpora en el presente documento por referencia con respecto a dicha enseñanza). Los ratones th(tk-)/th(tk-) transgénicos apoyan esta hipótesis mostrando que el desarrollo de hipoplasia de las neuronas de DA en SZ puede llevar a su hiperfunción así como afectar al desarrollo de otros sistemas neuronales. En consecuencia, se crea un sistema de circuitos anormales en el cerebro que es responsable de la estimulación sensorial, comportamiento social y funciones cognitivas defectuosos. El funcionamiento de este sistema de circuitos se puede corregir por TAPD, AAPD, y una nueva clase de agentes nicotínicos $\alpha 7$.

El ratón th(tk-)/th(tk-) es un modelo de desarrollo que imita las anomalías estructurales múltiples neuronales, bioquímicas y de comportamiento (síntomas positivos y negativos) encontradas en SZ. TAPD, AAPD y una nueva clase de antipsicóticos (agonistas nicotínicos $\alpha 7$) corrigen la estimulación sensorial alterada en ratones transgénicos th(tk-)/th(tk-); no existe un efecto demostrado en los controles. Un AAPD, clozapina, afecta a la PPI en los ratones de control, de forma similar a la observada en sujetos humanos normales. La Clozapina y el Compuesto A actuaron sinérgicamente para corregir la PPI y la respuesta al sobresalto solamente en los ratones th(tk-)/th(tk-) transgénicos; sin sinergia en los controles. La Quetiapina y el Compuesto A actuaron sinérgicamente para corregir la PPI solamente en los ratones th(tk)/th(tk-) transgénicos; sin sinergia en los controles. Los síntomas negativos (es decir, interacciones sociales alteradas) se corrigen mediante la combinación de uno o más AAPD y uno o más agonistas nicotínicos $\alpha 7$.

Los compuestos de ensayo se usaron en forma libre, sal, o solvatada.

Las respuestas farmacológicas específicas observadas pueden variar de acuerdo con y dependiendo del compuesto activo seleccionado en particular o de si están presentes vehículos farmacéuticos, así como el tipo de formulación y modo de administración usado, y dichas variaciones o diferencias esperadas en los resultados se contemplan de acuerdo con la práctica de la presente invención.

Ejemplo 3

Ensayos de unión

La unión a [3 H]-metillicaconitina ([3 H]-MLA) se determinó en las membranas del hipocampo tal como se ha descrito anteriormente (Davies y col., 1999). La unión de [3 H]-nicotina a los NNR $\alpha 4\beta 2$ en preparaciones de membrana cortical de rata o células SH-EP1 se ensayó usando procedimientos convencionales adaptados a partir de procedimientos publicados (Lippiello y Fernandes, 1986). La CI_{50} (concentración del compuesto que produce una inhibición de un 50 % de unión) se determinó mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un software GraphPad Prism (GraphPAD, San Diego, CA). La K_i se calculó usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng y Prusoff, 1973).

Ejemplo 4

Laberinto en Cruz Elevado en Ratones Transgénicos th(tk-)/th(tk-)

Los sujetos se colocaron en el centro de un laberinto en cruz elevado (San Diego Instruments, San Diego, CA). El ensayo se grabó en video desde arriba usando una cámara de video Handycam TRV-350 de SONY usando la función Nightshot. El comportamiento del sujeto se cuantificó a partir de la cinta de video usando el Observador Móvil (Noldus Information Technologies, Sterling, VA) mediante un observador desconocedor del tratamiento o el genotipo de los sujetos.

Ejemplo 5

Reconocimiento de Objetos Nuevos en Ratas

La respuesta a la dosis y la duración de los efectos potenciadores de la cognición del Compuesto A después de la administración subaguda de 3 días se evaluaron usando dos variaciones de una tarea de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) en la rata. El modelo de reconocimiento de objetos se basa en una tendencia espontánea del roedor a explorar los aspectos de su entorno y esta actividad exploradora puede ser un índice de la función de memoria (Ennaceur y Delacour, 1988). El ensayo NOR mide la capacidad para reconocer un objeto presentado en dos ocasiones, alguna vez por separado. El área de ensayo consistió en un Plexiglas™ transparente de 44,5 x 44,5 cm con paredes de 30 cm de altura. El área se encerró en una cámara opaca, con atenuación del sonido y las puertas (abriéndose hacia el lado delantero) permanecieron abiertas. Las dosis del Compuesto A o del vehículo se administraron por sonda oral una vez al día durante tres días, con un intervalo entre administraciones de 24 h. En los primeros dos días de este paradigma de dosificación subaguda, las administraciones fueron seguidas 30 minutos más tarde por un ensayo de exploración (habitación) (6 minutos) en el Día 1 (sin objetos) y un ensayo de adquisición de reconocimiento de objetos (3 minutos) en el Día 2 (2 de los mismos objetos). Al tercer día, el ensayo OR final, o ensayo de recuerdo (3 minutos; un objeto familiar, un objeto nuevo) se inició a los 30 min, 2 h, 6 h, 18 h o 24 h después de la administración del compuesto. Para el ensayo de recuerdo, se colocó una cámara de video a aproximadamente 91 cm desde el lado sin proteger del área para la grabación en video de los comportamientos de los animales. Estos comportamientos se puntuaron a mano posteriormente mediante un observador ciego que

evaluaba al tiempo usado en explorar un objeto nuevo (objeto B) frente a un objeto familiar (objeto A) durante esta prueba de exposición al recuerdo. El tiempo absoluto de exploración para cada objeto se registró, y se calculó un % del índice de reconocimiento como sigue a continuación:

$$\% \text{ de IR} = [(\text{tiempo investigando el objeto nuevo}) / (\text{tiempo total investigando ambos objetos nuevo + familiar})]$$

- 5 Las pruebas de t de Student se realizaron para cada grupo de tratamiento para determinar las diferencias significativas entre el tiempo de exploración para el objeto familiar con respecto al nuevo y se realizaron ANOVA de 1 VÍA (o ANOVA de Kruskal-Wallis comparables para los datos no distribuidos paramétricamente) para evaluar las diferencias significativas entre los grupos para el % de IR. Cuando se encontraron efectos globales significativos, se realizaron análisis a posteriori. $P < 0,05$ se consideró significativo.

10 Ejemplo 6

Selectividad del Compuesto A para el NNR $\alpha 7$

- 15 El Compuesto A es un inhibidor potente de la unión de [³H]-MLA al receptor $\alpha 7$ a partir de cerebro de rata, con una K_i de 1 nM en membranas de hipocampo de rata (Tabla 1). Una afinidad de unión similar de 1 nM se obtuvo en una línea celular HEK293 que coexpresaba cADN $\alpha 7$ y ric3 humanos. El Compuesto A tiene una menor afinidad por el subtipo del receptor $\alpha 4\beta 2$. En estudios de competencia de unión con [³H]-(S)-nicotina, el Compuesto A presentó una K_i de 2800 nM a los receptores humanos $\alpha 4\beta 2$ expresados en membranas celulares SH-EP1 y una K_i de 2100 nM en los receptores $\alpha 4\beta 2$ de rata expresados en las membranas corticales de rata.

- 20 El Compuesto A también se ensayó en una amplia batería de selectividad del receptor (Novascreen) y se encontraron interacciones mínimas con otras clases de receptores no nicotínicos, tal como se define mediante la inhibición de la unión de ligando selectivo de receptor $> 50\%$ a $10\ \mu\text{M}$. Basándose en este criterio, el Compuesto A mostró interacciones positivas con un ensayo de receptor opioide no selectivo (inhibición de un 58%) y con el sitio 2 de sigma (inhibición de un 79%). Las evaluaciones de dosis-respuesta de estas interacciones mostraron que los valores de K_i para el sitio opioide y para el sitio 2 de sigma fueron ambos $13\ \mu\text{M}$, proporcionando una separación superior a 1000 veces a partir de la afinidad de unión a $\alpha 7$. Debido a la secuencia de cierre y a la homología
- 25 estructural entre los receptores $\alpha 7$ y 5HT3, y las interacciones indicadas anteriormente de algunos ligandos nicotínicos con ambos receptores, se examinó la afinidad del Compuesto A para los receptores 5HT3. La unión del Compuesto A ($10\ \mu\text{M}$) a los receptores 5HT3 presentó una inhibición de un 59% de la unión del radioligando al receptor de ratón y una inhibición de un 25% al receptor humano. La investigación de la activación funcional en el receptor humano 5HT3 sugirió una activación de mínima a ninguna; se obtuvo una respuesta máxima de un 15% a
- 30 Compuesto A $100\ \mu\text{M}$.

Ejemplo 7

Activación Funcional de los NNR por el Compuesto A

- 35 Usando técnicas electrofisiológicas de pinzamiento zonal, se examinó la actividad funcional del Compuesto A en los receptores nicotínicos neuronales expresados temporalmente en oocitos de *Xenopus*. En los receptores $\alpha 7$ humanos, el Compuesto A presentó una CE_{50} de 33 nM y una Emax de un 100% con respecto a ACh (Figura 9A y Tabla 1). Hubo disminuciones en las respuestas al control posteriores a ACh seguido de la aplicación del Compuesto A a concentraciones mayores que $100\ \text{nM}$ ($\text{CI}_{50} = 200\ \text{nM}$, Figura 9B). En contraste con los agonistas totales de $\alpha 7$ que se han descrito anteriormente (Astles y col., 2002), la separación entre los valores de CE_{50} y CI_{50} para el
- 40 Compuesto A indica que las concentraciones que producen la respuesta funcional máxima media de $\alpha 7$ llevan a una inhibición mínima, en lugar de a una inhibición total, residual. No hubo activación detectable cuando el Compuesto A se aplicó a oocitos que expresaban el subtipo $\alpha 4\beta 2$ humano y no hubo disminuciones significativas en las respuestas posteriores al control a ACh, indicando que el Compuesto A no es ni agonista ni antagonista a $\alpha 4\beta 2$ (no se muestran los resultados). El Compuesto A produjo muy poca activación funcional de los receptores periféricos de acetilcolina nicotínicos expresados en líneas celulares de rata y humanas apropiadas (Tabla 1). A 10 y $100\ \mu\text{M}$, el
- 45 Compuesto A no produjo, o produjo una activación muy baja de los receptores de músculo humano (5% y 12% de Emax de la nicotina, respectivamente), ganglio de rata (11% y 20% de Emax de la nicotina, respectivamente) o ganglio humano (6% y 11% de Emax de la nicotina, respectivamente). La falta de interacción con el músculo y con los receptores de tipo gangliónico sugiere bajo potencial para los efectos secundarios nicotínicos con el Compuesto A.

50 Ejemplo 8

Compuesto A - Actividad Motora en el Ensayo en Campo abierto

- 55 El tratamiento con el Compuesto A no tuvo efecto en la actividad motora en el ensayo en campo abierto en los ratones de control o $\text{th}(\text{tk-})/\text{th}(\text{tk-})$ (Figura 10A, ningún efecto principal de tratamiento, $p > 0,05$). Como se ha indicado anteriormente, $\text{th}(\text{tk-})/\text{th}(\text{tk-})$ necesitan más tiempo en la zona central del campo abierto y recorrieron una distancia mayor que los ratones de control (Figura 10A, efecto principal significativo del genotipo, $p < 0,05$). Además, no hubo

efectos del Compuesto A en el comportamiento en el laberinto en cruz elevado (Figura 10B, ningún efecto principal del tratamiento, $p > 0,05$). Los ratones *th(tk-)/th(tk-)* pasaron significativamente más tiempo en el brazo abierto, y en consecuencia menos tiempo los brazos cerrados, que el que pasaron los controles (Figura 10B, efecto principal significativo del genotipo, $p < 0,05$).

5 **Ejemplo 9**

Eficacia del Compuesto A en Modelos de Síntomas Positivos de Esquizofrenia

(Ratas)

Atenuación de la inhibición de Prepulso en Ratas Sprague-Dawley

10 La inhibición de prepulso (PPI) proporciona una medida operacional de la estimulación sensoriomotriz, un sistema en el cerebro que es deficiente en la esquizofrenia. Se ha mostrado que la apomorfina psicoestimulante altera la PPI, y este efecto se puede invertir mediante la administración de fármacos antipsicóticos. El Compuesto A (0,3 mg/kg por vía subcutánea) invirtió significativamente los déficits de PPI inducidos mediante la administración de apomorfina (Figura 11). Esto datos proporcionan evidencia adicional de que el Compuesto A puede ser eficaz en la mejora de los déficits de estimulación asociados con la esquizofrenia.

15 **Ejemplo 10**

Efectos del Compuesto A en la Cognición (Ratas)

En la evaluación de dosis-efecto de la cognición en el ensayo de reconocimiento de objetos nuevos del Compuesto A, a dosis de 0,3, 1 y 10 mg/kg (por vía oral; 30 minutos después de la 3ª administración una vez al día), aumentó significativamente el tiempo necesario para investigar el objeto nuevo (Fig. 12A, izquierda). En una duración de la evaluación del efecto del Compuesto A (0,3 mg/kg por vía oral) en el paradigma de reconocimiento de objetos nuevos, el tiempo medio necesario para explorar el objeto A frente al objeto B por el grupo tratado con vehículo a 30 min, 6 h, o 24 h después de la prueba de administración subaguda final no fue significativamente diferente ($p = 0,17$, $p = 0,35$, y $p = 0,12$, respectivamente). Por comparación, a los 30 min, 2 h, 6 h, y 18 h después de la administración subaguda final (una vez al día x 3 días) del Compuesto A (0,3 mg/kg por vía intraperitoneal), los sujetos necesitaron significativamente más tiempo para investigar el objeto nuevo que el objeto familiar (Figura 12A, derecha). Además, a las 2 h (75 %) y a las 6 h (71 %), el índice de reconocimiento (IR) aumentó significativamente en los animales tratados con 0,3 mg/kg del Compuesto A en comparación con el IR (54 %) del grupo tratado con vehículo a 30 min después de la administración final (Figura 12B). Los resultados demuestran que el Compuesto A facilita la memoria de trabajo en ratas jóvenes hasta 18 horas después de una tercera administración diaria subaguda.

30 Tabla 1: Unión al Compuesto A y Parámetros de Función en los Subtipos de Receptor Nicotínico

Subtipo de NNR/Parámetro	Fuente	Parámetro	Valor de Parámetro (Media ± S.E.)
Unión a $\alpha 7$	Rata (Hipocampo)	K _i (nM)	1,00 ± 0,50
	Ser Humano (Células HEK)		1,00 ± 0,04
Función $\alpha 7$	Oocitos (fijación de voltaje)	CE ₅₀ (nM)	33 ± 10
		E _{máx} (% de ACh)	100 ± 7
Unión a $\alpha 4\beta 2$	Corteza de Rata	K _i (nM)	2100 ± 400
	Ser Humano (Células SH-EP1)		2800 ± 1300
Función Muscular (flujo de Ca ⁺⁺)	Ser Humano (Células TE-671)	% de nicotina a 10 uM	5 ± 2
		% de nicotina a 100 uM	12 ± 7
Función Ganglionar (flujo de Ca ⁺⁺)	Rata (células Shooter PC-12)	% de nicotina a 10 uM	11 ± 6
		% de nicotina a 100 uM	20 ± 8
	Ser Humano (Células SH-SY5Y)	% de nicotina a 10 uM	6 ± 2
		% de nicotina a 100 uM	11 ± 1

Ejemplo 11

Administración de agonistas NNR $\alpha 7$ para dirigir el alto nivel de azúcar en sangre, diabetes, aumento de peso y/o dislipidemia que puede tener su origen en la administración de antipsicóticos (típicos o atípicos).

35 *Agonista $\alpha 7$ en Obesidad. Modelos Animales:* Las cepas parentales de ratones usados en estos estudios fueron los ratones *db/db* deficientes en el receptor de leptina en un fondo de C57BL6 obtenido en Jackson Laboratories y ratones sin PTP1B en un fondo mixto de C57BL6/Balb C de Dr. Michel Tremblay en el Instituto del Cáncer en la Universidad McGill en Montreal, Canadá. Dado que los ratones *db/db* obesos no son fértiles, los ratones se generaron como heterocigotos dobles, heterocigotos tanto para el receptor de leptina mutante como para el PTP1B

suprimido. Los heterocigotos dobles se cruzaron, produciendo ratones obesos a 1:4 y ratones sin PTP-1B a 1:4. En esta configuración de cruce, una relación a 1:16 fueron ratones KO doble. En la cuarta generación, los ratones heterocigotos para ambos genes se cruzaron con ratones heterocigotos sin PTP-1B para el alelo mutante *db*. En esta configuración de cruce los ratones a 1:4 eran obesos y a 1:8 eran ratones KO doble. Por razones de parsimonia, fueron preferentes los heterocigotos con respecto a los tipos silvestres sobre los controles. Los compañeros de camada heterocigotos dobles se usaron como controles de tendencia y los compañeros de camada heterocigotos para *db* se usaron como controles de tendencia de KO PTP1B.

Identificación del genotipo de ratón. A las 3 semanas de edad, el ADN se obtuvo mediante recortes de la cola. El ADN genómico a partir del recorte de la cola se usó para identificar sistemáticamente la presencia del receptor de leptina mutante y el cassette de supresión de PTP-1B usando la Reacción en Cadena de Polimerasa. Los genotipos específicos se determinaron por resolución de los productos de PCR con electroforesis en gel de agarosa. La supresión de PTP-1B se verificó mediante análisis de Western usando un anticuerpo anti-PTP-1B de Upstate Biotechnology.

Identificación del fenotipo metabólico. Los efectos del compuesto ensayado (por ejemplo, el Compuesto A a 1 mg/kg/día a través de sonda oral) en las tasas de crecimiento y la ingesta de alimentos de los ratones se generaron midiendo el peso corporal y la ingesta de alimentos dos veces a la semana para las edades de 3 a 10 semanas. En las cohortes seleccionadas, el MLA antagonista de $\alpha 7$ también se administró a través de la sonda, al mismo tiempo, a 3 mg/kg al día. El inhibidor de quinasa JAK2 (AG-490) se administró por vía intraperitoneal (IP) a 1 mg/kg al día. La glucosa en ayunas se midió una vez a la semana después de la retirada de alimentos, con un glucómetro Precision XL usando extracción sanguínea de la vena de la cola. Los niveles de HbA1c también se midieron a partir de estas muestras con el kit A1C de Metrika, Inc. Para evaluar la tolerancia a la glucosa, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2 % y la arteria carótida izquierda y la vena yugular se canularon después de un ayuno durante una noche. Un bolo de 10 mg de glucosa se inyectó por vía intravenosa (iv) a través de la vena yugular y la glucosa en sangre se midió cada 5 minutos durante 40 minutos en una gota de sangre a partir de la línea de la carótida. Para las medidas de los analitos de plasma en sangre, un grupo separado de ratones en ayunas se anestesiaron con isoflurano en una cámara de inducción rápida y se decapitaron rápidamente. La sangre se recogió en heparina se centrifugó rápidamente a 4°C para retirar las células y para obtener plasma, y las muestras se congelaron para análisis posteriores. Las concentraciones de TNF- α de plasma se determinaron usando kits de ensayo para ELISA de eBioscience y los niveles de triglicéridos en plasma se determinaron usando el ensayo TG H de Tipo L (Wako Diagnostics), en un ensayo *in vitro* para la determinación cuantitativa de triglicéridos en el suero o en el plasma. Todos los datos se expresan como media y SEM. Las diferencias entre todos los grupos se compararon mediante ANOVA de Una Vía.

Estadísticas: Todos los datos se expresan como media y SEM. Las diferencias entre todos los cuatro genotipos se compararon mediante ANOVA de Una Vía.

Los resultados de la administración del Compuesto B de referencia se muestran en las Figuras 13 (glucosa en sangre) y 14 (aumento de peso). El Compuesto B (1 mg/kg) disminuye significativamente los niveles de glucosa en sangre (Figura 13) y el aumento de peso corporal (Figura 14) en los ratones *db/db* con dieta grasa en comparación con los ratones tratados con el vehículo. Los efectos se hacen evidentes después de 6 semanas de tratamiento y se hacen máximos entre 8 y 10 semanas después del tratamiento.

Aunque las realizaciones específicas de la presente invención se ilustran en el presente documento se describen en detalle, la invención no está limitada a las mismas. Las descripciones que se han detallado anteriormente se proporcionan como ejemplos de la presente invención no se deberían interpretar como constituyentes de ninguna limitación de la invención.

Se puede hacer referencia a lo siguiente:

- Abi-Dargham, A., y col., SPECT imaging of dopamine transporters in human brain with iodine-123-fluoroalkyl analogs of beta-CIT. *J Nucl Med*, 37 (7): 1129-33 (1996);
- Abi-Dargham, A., y col., Striatal amphetamine-induced dopamine release in patients with schizotypal personality disorder studied with single photon emission computed tomography and [123I] iodobenzamide. *Biol Psychiatry*, 55, (10), 1001-6 (2004);
- Acker, B.A., y col., Discovery of N-[(3R,5R)-1-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide as an agonist of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo activity. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 3611-3615 (2008).
- Adler L., y col., Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull* 24: 189-202(1998).
- American Diabetes Association, y col., Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity and diabetes. *Diabetes Care* 27: 596-601 (2004).
- Amaiz-Cot JJ, y col., Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *Eur J Neurosci*. 27: 1097-1110 (2008).
- Asties PC, y col., Recent progress in the development of subtype selective nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1: 337-348 (2002).
- Avila MT, y col., Effects of Nicotine on Leading Saccades during Smooth Pursuit Eye Movements in Smokers

- and Nonsmokers with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 28: 2184-2191 (2003).
- Banerjee, S. A., y col., 5' flanking sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene target accurate tissue-specific, developmental, and transsynaptic expression in transgenic mice. *J Neurosci* 12, (11): 4460-7 (2003).
- 5 Barnes TRE, y col., Pharmacological strategies for relapse prevention in schizophrenia. *Psychiatry* 6: 351-356 (2007).
- Beckstead, R. M., y col., Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175, (2): 191-217 (1979).
- Behrendt, RP, Dysregulation of thalamic sensory 'transmission' in schizophrenia: neurochemical vulnerability to hallucinations. *J Psychopharmacol* 20: 356-72 (2006).
- 10 Belluardo N, y col., Neurotrophic effects of central nicotinic receptor activation. *J Neural Transm Suppl* 60: 227-245 (2000).
- Bialowas, J., y col., The relationship between catecholamine levels in the hypothalamus and amygdala under influence of glucose overloading in hungry and sated rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 31, (4): 325-35 (1979).
- Bitner RS, y col. Broad-spectrum efficacy across cognitive domains by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism correlates with activation of ERK1/2 and CREB phosphorylation pathways. *J Neurosci* 27: 10578-10587 (2007).
- 15 Blumenthal EM, y col., Detection of Functional Nicotinic Receptors Blocked by 0-Bungarotoxin on PC12 Cells and Dependence of Their Expression on Post-Translational Events. *J Neurosci* 17: 6094-6104 (1997).
- Boess FG, y col., The novel alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2-carboxamide improves working and recognition memory in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 716-725 (2007).
- Bogerts, B., y col., A morphometric study of the dopamine- containing cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schizophrenics. *Biol Psychiatry* 18, (9): 951-69 (1983).
- 25 Braff DL, y col., Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. *Arch Gen Psych* 47: 181-188 (1990).
- Broderick, P.A., y col., I. Serotonin (5- HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. Basis for 5-HT--DA interaction in cocaine dysfunctional behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 21, (3): 227-60 (1997).
- Bunney, E. B., y col., Electrophysiological effects of cocaethylene, cocaine, and ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* 297, (2): 696-703 (2001).
- 30 Cabib, S., y col., Behavioral and mesocorticolimbic dopamine responses to non aggressive social interactions depend on previous social experiences and on the opponent's sex. *Behav Brain Res* 112, (1-2), 13-22 (2000).
- Canitano, R., Clinical experience with Topiramate to counteract neuroleptic induced weight gain in 10 individuals with autistic spectrum disorders. *Brain Dev* 27: 228-232 (2005).
- Carisson, A., Does dopamine play a role in schizophrenia? *Psychol Med* 7, (4): 58397 (1977).
- 35 Cheng Y, y col., Relationship between inhibition constant (Ki) and concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I50) of an enzymatic-reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108 (1973).
- Corbett R, y col., Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacol* 120: 67-74 (1995).
- Corso, T. D., y col., Transfection of tyrosine kinase deleted FGF receptor-1 into rat brain substantia nigra reduces the number of tyrosine hydroxylase expressing neurons and decreases concentration levels of striatal dopamine. *Brain Res Mol Brain Res* 139, (2): 361-6 (2005).
- 40 Dalack GW, y col., Nicotine dependence in schizophrenia: clinical phenomena and laboratory findings. *Am J Psych* 155: 1490-1501 (1998) .
- Dani JA, y col., Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 699-729 (2007).
- 45 Davies AR, y col., Characterisation of the binding of [3H] methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacol* 38: 679-690 (1999).
- Davis, K. L., y col., Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148, (11): 1474-86 (1991).
- 50 De Luca V, y col., Evidence of Association between Smoking and α 7 Nicotinic Receptor Subunit Gene in Schizophrenia Patients. *Neuropsychopharmacol* 29: 1522-1526 (2004).
- Dickinson JA, y col., Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74: 348-359 (2008).
- 55 Doherty, M. D., y col., Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 864, (2): 176-85 (2000).
- Durany N, y col., Human post-mortem striatal alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor density in schizophrenia and Parkinson's syndrome. *Neurosci Lett* 287: 109-112 (2000).
- Ennaceur A, y col., A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data. *Behav Brain Res* 100: 85-92 (1988).
- 60 Fang, X., y col., Control of CREB-binding protein signaling by nuclear fibroblast growth factor receptor-1: a novel mechanism of gene regulation. *J Biol Chem* 280, (31): 28451-62 (2005).
- Farde, L.; y col., Quantitative analysis of D2 dopamine receptor binding in the living human brain by PET. *Science* 231: 258-261 (1986).
- 65 Freedman R, y col., The alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 20: 299-306 (2000).

- Freedman R, y col., Initial phase 2 trial of a nicotinic agonist in schizophrenia. *Am J Psych* 165: 1040-1047 (2008).
- Gaughran, F., y col., Hippocampal FGF- 2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res Bull* 70, (3): 221-7 (2006).
- 5 Geyer MA, y col., Measurement of startle response, prepulse inhibition and habituation. *Current Protocols Neurosci* 8: 7.1-7.15 (1998).
- Graham, KA, y col., Double-blind, placebo- controlled investigation of amantadine for weight loss in subjects who gained weight with olanzapine. *Am J Psychiatry* 162: 1744-1746 (2005).
- 10 Hajós M, y col., The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 1213-1222 (2005).
- Harris JG, y col., Effects of nicotine on cognitive deficits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 29: 1378-1385 (2004).
- 15 Harrison, P. J., The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4): 593-624 (1999)
- Hashimoto K, y col., $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Agonists as Potential Therapeutic Drugs for Schizophrenia. *Curr MedChem - Central Nervous System Agents* 5: 171-184 (2005).
- Hashimoto, R., y col., Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. *Hum Mol Genet* 15, (20): 3024-33 (2006).
- 20 Henderson, DC, y col., Glucose metabolism in patients with schizophrenia treated with atypical antipsychotic agents. *Arch Gen Psychiatry* 62: 19-28 (2005a).
- Henderson, DC, y col., A double-blind, placebo-controlled trial of sibutramine for olanzapine-associated weight gain. *Am J Psychiatry* 162: 954-962 (2005b).
- 25 Hietala, J. y col., Depressive symptoms and presynaptic dopamine function in neuroleptic-naive schizophrenia. *Schizophr Res* 35, (1): 41-50 (1999).
- Hietala, J., y col., Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. *Lancet* 346, (8983):1130-1 (1995).
- Holden C, Deconstructing Schizophrenia: Large-scale family studies and new drug probes focus on cognitive deficits that may lie at the heart of the disease. *Science* 299: 333-335 (2003).
- 30 Horbinski, C., y col., Bone morphogenetic protein-7 stimulates Initial dendritic growth in sympathetic neurons through an intracellular fibroblast growth factor signaling pathway. *J Neurochem* 80, (1): 54-63 (2002).
- Hu, Z., y col., Differentiation of the midbrain dopaminergic pathways during mouse development. *J Comp Neurol* 476, (3): 301-11 (2004).
- 35 Hurst RS, y col., A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci* 25: 4396-4405 (2005).
- Ikemoto, K., y col., Human midbrain dopamine neurons express serotonin 2A receptor: an immunohistochemical demonstration. *Brain Res* 853, (2): 377-80 (2000).
- Kasper, S., y col., Dopamine- and serotonin-receptors in schizophrenia: results of imaging- studies and implications for pharmacotherapy in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 4: 83-9 (1999).
- 40 Kitagawa H, y col., Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male volunteers. *Neuropsychopharmacol* 28: 542-551 (2003).
- Klein, DJ, y col., A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of metformin treatment of weight gain associated with initiation of atypical antipsychotic therapy in children and adolescents. *Am J Psychiatry* 163: 2072-2079 (2006).
- 45 Klejbor, I., y col., Fibroblast growth factor receptor signaling affects development and function of dopamine neurons - inhibition results in a schizophrenia-like syndrome in transgenic mice. *J Neurochem* 97, (5): 1243-58 (2006).
- Koller y col., Olanzapine-associated diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 22: 841-852 (2002).
- 50 Kwon JS, y col., Gamma frequency-range abnormalities to auditory stimulation in schizophrenia. *Arch Gen Psych* 56: 1001-1005 (1999).
- Laruelle, M., y col., Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, (17): 9235-40 (1996).
- Lauder, J. M., Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16, (6): 233-40 (1993).
- 55 Lena C, y col., Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J Neurosci* 17: 576-585 (1997).
- Leonard S, y col., Genetics of chromosome 15q13-q14 in schizophrenia. *Biol. Psych* 60: 115 -122 (2006).
- Leonard S, y col., Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psych* 59: 1085-1096 (2002).
- 60 Levin ED, y col., AR-R17779, and alpha7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav Pharmacol* 10: 675-680 (1999).
- Levin ED, y col., Nicotine-haloperidol interactions and cognitive performance in schizophrenics. *Neuropsychopharmacol* 15: 429-436 (1996).
- 65 Lippiello PM, y col., The binding of L-[3H]nicotine to a single class of high affinity sites in rat brain membranes. *Mol Pharmacol* 29: 448-454 (1986).
- Liu Q, y col., Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer

- disease model. *FASEB J* 21: 61-73 (2007).
- Ludewig K, y col., Impaired sensorimotor gating in schizophrenia with deficit and with nondeficit syndrome. *Swiss Med Wkly* 132: 159-165 (2002).
- 5 Mansvelder HD, y col., Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27: 349-357 (2000).
- Martin L, y col., Alpha-7 nicotinic receptor agonists: potential new candidates for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacol* 174: 54-64 (2004).
- Meltzer, H. Y., y col., Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D- 1, D- 2 and serotonin2 pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251, (1): 238-46 (1989).
- 10 Meyer-Lindenberg, A., y col., Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* 5, (3): 267-71 (2002).
- Millar, J. K., y col., DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 310, (5751): 1187-91 (2005).
- Moffett J, y col., Increased tyrosine phosphorylation and novel cis- acting element mediate activation of the fibroblast growth factor-2 (FGF-2) gene by nicotinic acetylcholine receptor. New mechanism for trans-synaptic regulation of cellular development and plasticity. *Brain Res Mol Brain Res* 55: 293-305 (1998).
- 15 Mudo G, y col., Nicotinic receptor agonists as neuroprotective / neurotrophic drugs. *Prog Mol Mechanisms* 114: 135-147 (2007b).
- Mudo G, y col., Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neurosci* 145: 470-483 (2007a).
- 20 Murphy PC, y col., Brain- stem modulation of the response properties of cells in the cat's perigeniculate nucleus. *Vis Neurosci* 11: 781-791 (1994).
- Newhouse PA, y col., Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Curr Opin Pharmacol* 4: 36-46 (2004).
- 25 Nilsson L.K., y col., Subchronic treatment with kynurenine and probenecid: effects on prepulse inhibition and firing of midbrain dopamine neurons. *J. Neural Trans.* 113, 557-571, 2006.
- Ohtani, N., y col., Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 23, (7): 2840-50 (2003).
- O'Neill HC, y col., DMXB, an alpha7 nicotinic agonist, normalizes auditory gating in isolation-reared rats. *Psychopharmacol* 169: 332-339 (2003).
- 30 Ovalle, S., y col., Fibroblast growth factor-2 is selectively modulated in the rat brain by E-5842, a preferential sigma-1 receptor ligand and putative atypical antipsychotic. *Eur J Neurosci* 13, (5): 909-15 (2001).
- Papke RL, y col., Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis. *Br J Pharmacol* 137: 49-61 (2002).
- 35 Petronis, A., The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol Psychiatry* 55, (10): 965-70 (2004); *S A* 93, (17): 9235-40 (1996).
- Pichat P, y col., SSR180711, a novel selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist: (II) efficacy in experimental models predictive of activity against cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol* 32: 17-34 (2007).
- 40 Quarta D, y col., Drug discrimination and neurochemical studies in alpha7 null mutant mice: tests for the role of nicotinic alpha7 receptors in dopamine release. *Psychopharmacol* Aug 30 [Epub ahead of print] (2008).
- Quik M, y col., Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 425: 58-69 (2000).
- 45 Schimmel, J. J., y col., 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors. *Brain Res Mol Brain Res* 74, (12): 1-14 (1999).
- Schreiber R, y col., Effects of alpha 4/beta 2- and alpha 7- nicotine acetylcholine receptor agonists on prepulse inhibition of the acoustic startle response in rats and mice. *Psychopharmacol* 159: 248-257 (2002).
- 50 Sernyak, MJ, Association of diabetes mellitus with use of atypical neuroleptics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159: 561-566 (2002).
- Sharma, R. P., Schizophrenia, epigenetics and ligand-activated nuclear receptors: a framework for chromatin therapeutics. *Schizophr Res* 72, (2-3): 79-90 (2005).
- Sharp FR, y col, Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci* 24: 330-334 (2001).
- 55 Simosky JK, y col., Clozapine improves deficient inhibitory auditory processing in DBA/2 mice, via a nicotinic cholinergic mechanism. *Psychopharmacol* 165: 386-396 (2003).
- Singhal SK, y col., Antipsychotic clozapine inhibits the function of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacol* 52: 387-394 (2007).
- Snyder, S. H., The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* 133, (2): 197-202 (1976).
- 60 Stachowiak MK, y col., Integrative Nuclear Signaling in Cell Development-A Role for FGF Receptor-1. *DNA Cell Biol* 26: 811-826 (2007).
- Stachowiak, E. K., y col., cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor- 1 (FGFR1). *J Neurochem* 84, (6): 1296-312 (2003).
- 65 Stachowiak, M. K., y col., Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain

- lesions in neonatal rats. *Brain Res* 291, (1): 164-7 (1984).
- Stachowiak, M. K., y col., Integrative Nuclear Signaling in Cell Development- A Role for FGF Receptor-1. *DNA Cell Biol* 26, (12): 811-26 (2007).
- 5 Stahl SM, Antipsychotic agents. In: *Essential Pharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Cambridge University Press, New York, pp 401-458 (2002).
- Swerdlow, N. R., y col., Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24, (2): 285-301 (1998).
- Swerdlow, N. R., y col., Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51, (2): 139-54 (1994).
- 10 Tietje KR, y col., Preclinical characterization of A-582941: a novel alpha7 neuronal nicotinic receptor agonist with broad spectrum cognition- enhancing properties. *CNS Neurosci Ther* 14: 65-82 (2008).
- Timmermann DB, y col., An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 294-307 (2007).
- 15 Van Kampen M, y col., AR-R 17779 improves social recognition in rats by activation of nicotinic alpha7 receptors. *Psychopharmacol* 172: 375-383 (2004).
- Waldo MC, y col., Auditory sensory gating, hippocampal volume, and catecholamine metabolism in schizophrenics and their siblings. *Schizophrenia Res* 12: 93-106 (1994).
- Wong AH, y col., Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 269-306 (2003).
- 20 Wong, A. H., y col., Identification of candidate genes for psychosis in rat models, and possible association between schizophrenia and the 14-3-3eta gene. *Mol Psychiatry* 8, (2): 156-66 (2003).
- Yang, Y. K., y col., Associated alterations of striatal dopamine D2/D3 receptor and transporter binding in drug-naive patients with schizophrenia: a dual- isotope SPECT study. *Am J Psychiatry* 161, (8): 1496-8 (2004).

REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno psiquiátrico para proporcionar terapia sinérgica para un trastorno psiquiátrico y que comprende:
- 5 (a) (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables de la misma en forma de un agonista nicotínico $\alpha 7$; y
 (b) al menos un agente antipsicótico.
2. Una combinación farmacéutica para uso de la reivindicación 1, que comprende una sal del ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido maleico o ácido p-toluenosulfónico de la (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o un solvato de la misma.
- 10 3. Una combinación farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el al menos un agente antipsicótico es un antipsicótico convencional o atípico.
4. Una combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el al menos un antipsicótico es un antipsicótico convencional, seleccionado entre clorpromazina, haloperidol, flupentixol o perfenazina, o un metabolito, una sal o un solvato de los mismos.
- 15 5. Una combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el al menos un antipsicótico es un antipsicótico atípico, seleccionado entre clozapina, risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, amisulprida, sulprida, zotepina, sertindol, paliperidona, bifeprunox o asenapina, o un metabolito, una sal, o un solvato de los mismos.
- 20 6. Una combinación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el al menos un antipsicótico es clozapina o quetiapina, o un metabolito, una sal o un solvato de los mismos.
7. Una combinación farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la combinación es para la administración simultánea, secuencial o separada del agonista nicotínico $\alpha 7$ y el al menos un agente antipsicótico.
- 25 8. Uso de una combinación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno psiquiátrico.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medicamento proporciona la administración simultánea, secuencial o separada del agonista nicotínico $\alpha 7$ y el al menos un agente antipsicótico.
10. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el uso de la reivindicación 8 o 9, en donde el trastorno psiquiátrico es un trastorno psicótico.
- 30 11. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 o el uso de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno psicoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico resistente al tratamiento, un trastorno psicótico debido a una afección médica general o un trastorno psicótico que no se especifica de otro modo.
- 35 12. La combinación para uso o uso, de la reivindicación 11, en donde el trastorno psiquiátrico es esquizofrenia.
13. Un kit de uso para el tratamiento o la prevención de un trastorno psiquiátrico que comprende un envase que contiene una combinación sinérgica de (2S,3R)-N-(2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)benzofuran-2-carboxamida o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de la misma en forma de un agonista nicotínico $\alpha 7$ y al menos un agente antipsicótico.

40

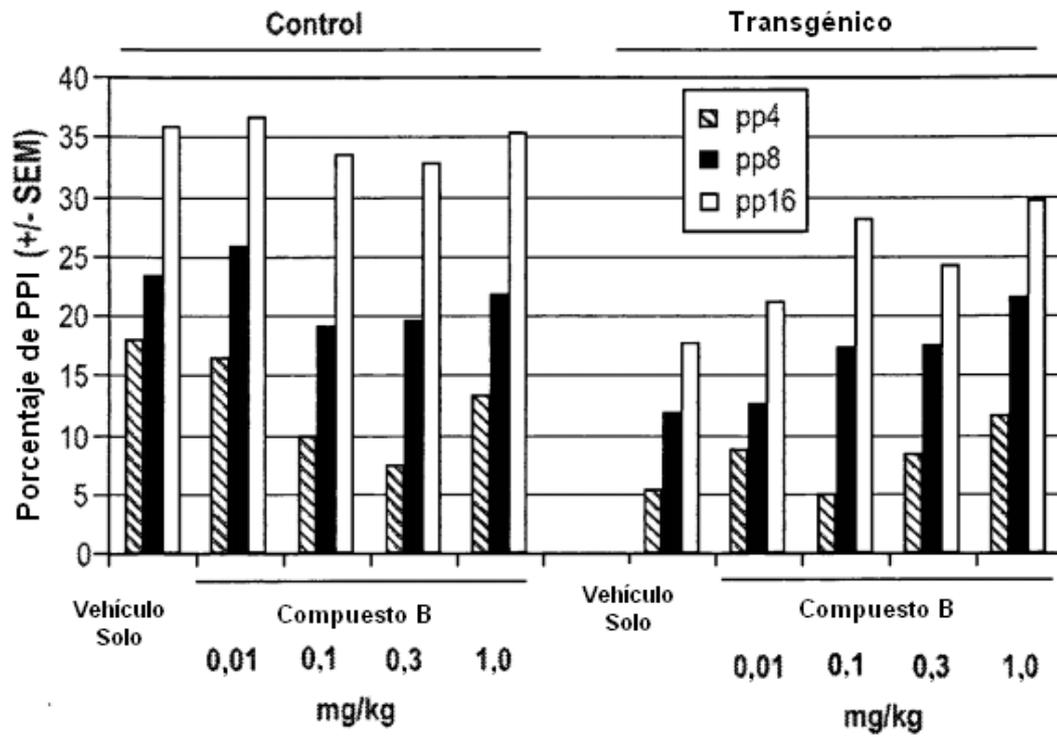


Fig. 1

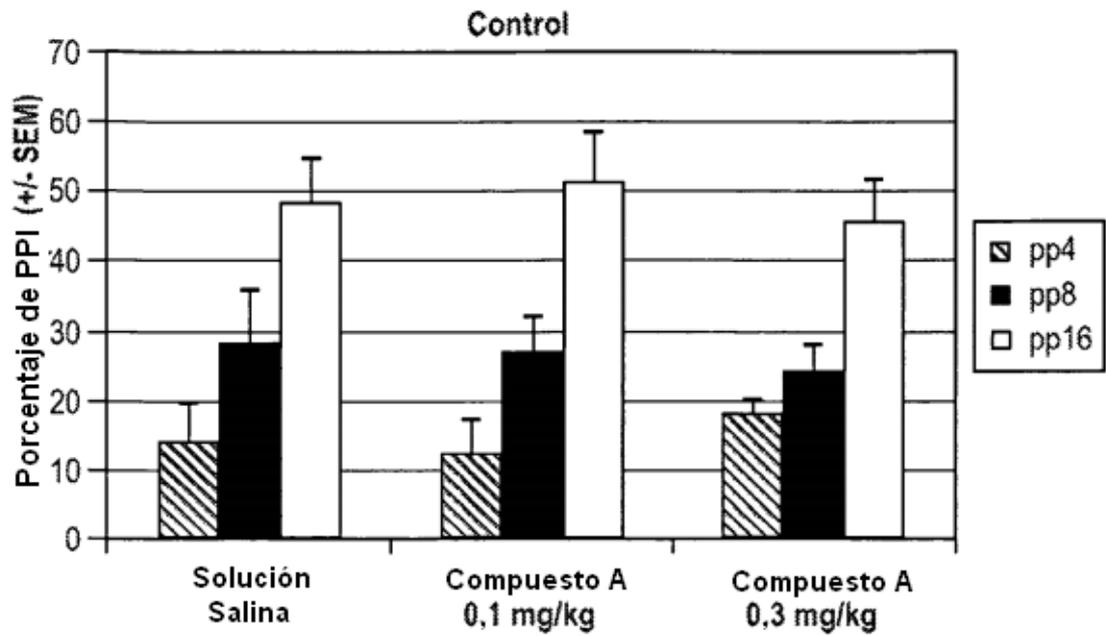


Fig. 2a

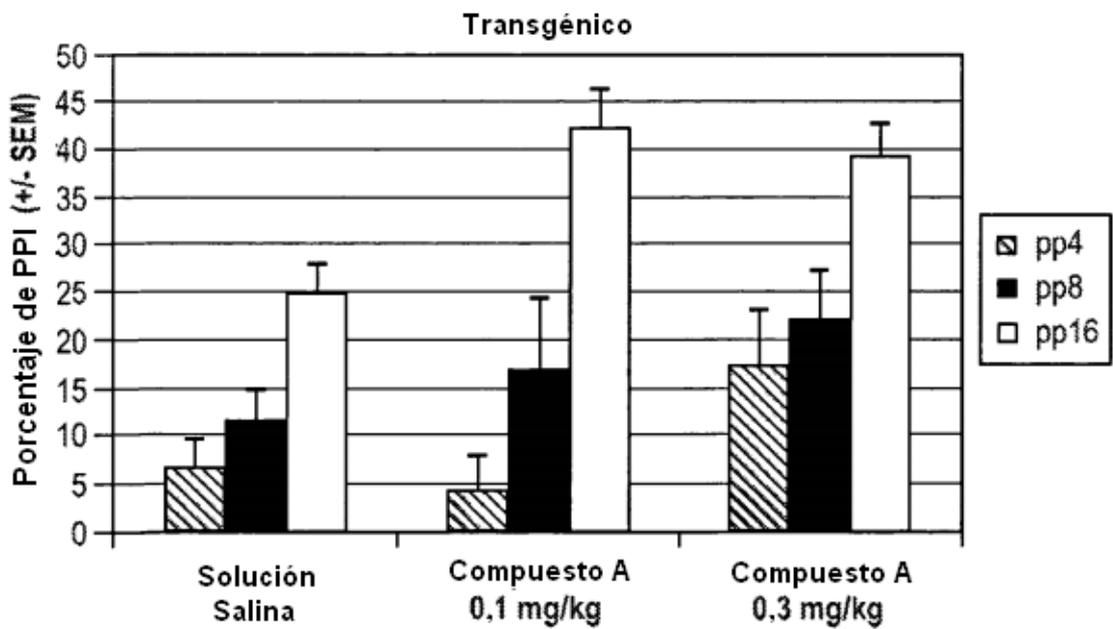


Fig. 2b

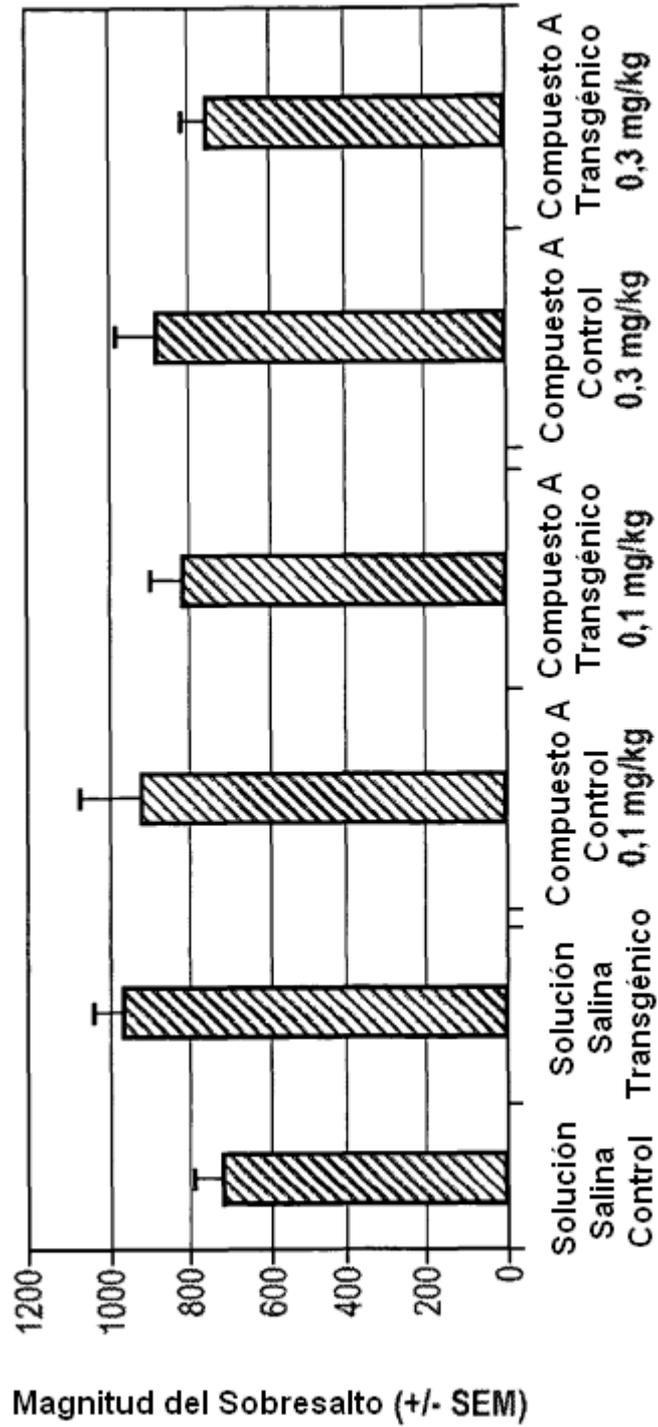


Fig. 3

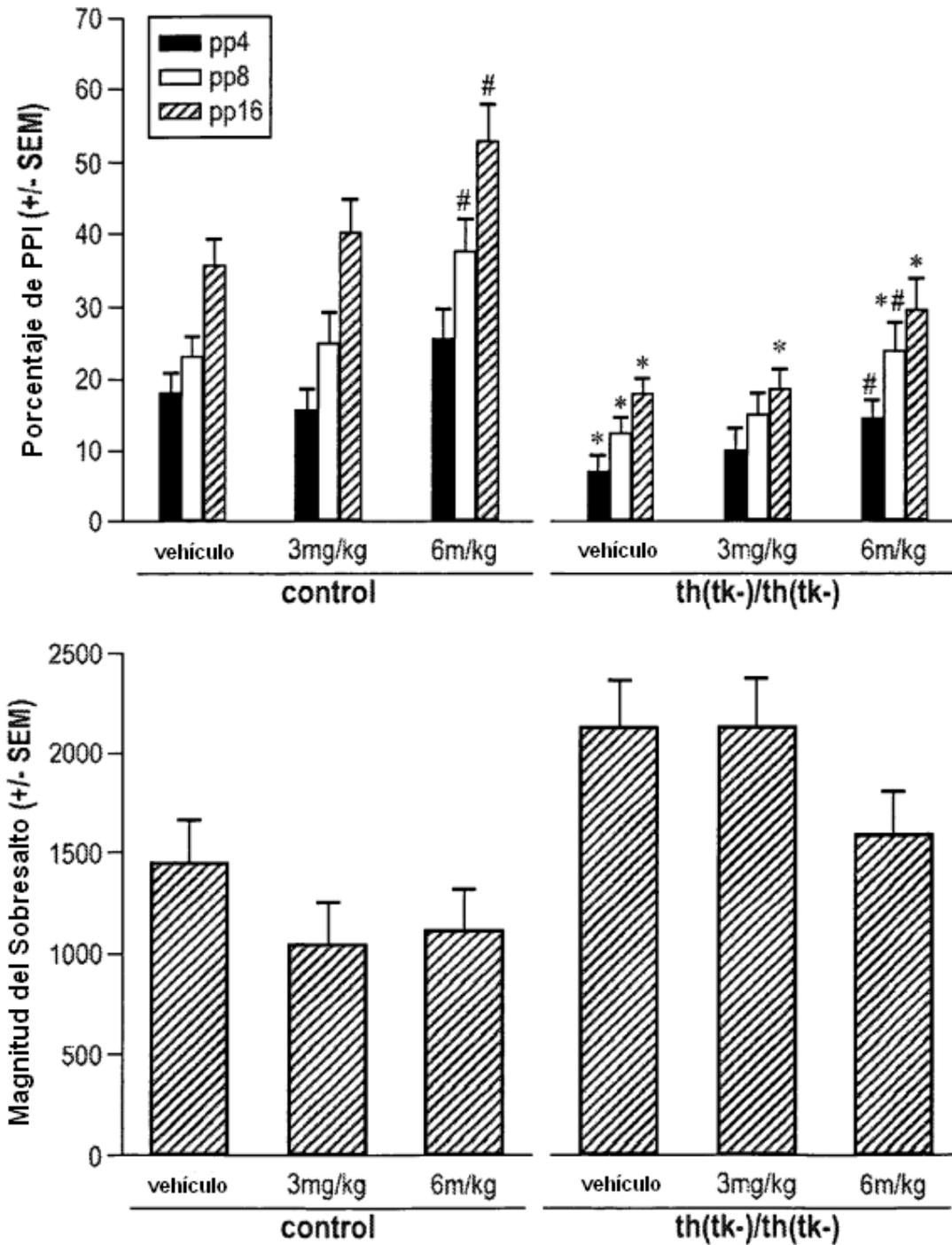


Fig. 4

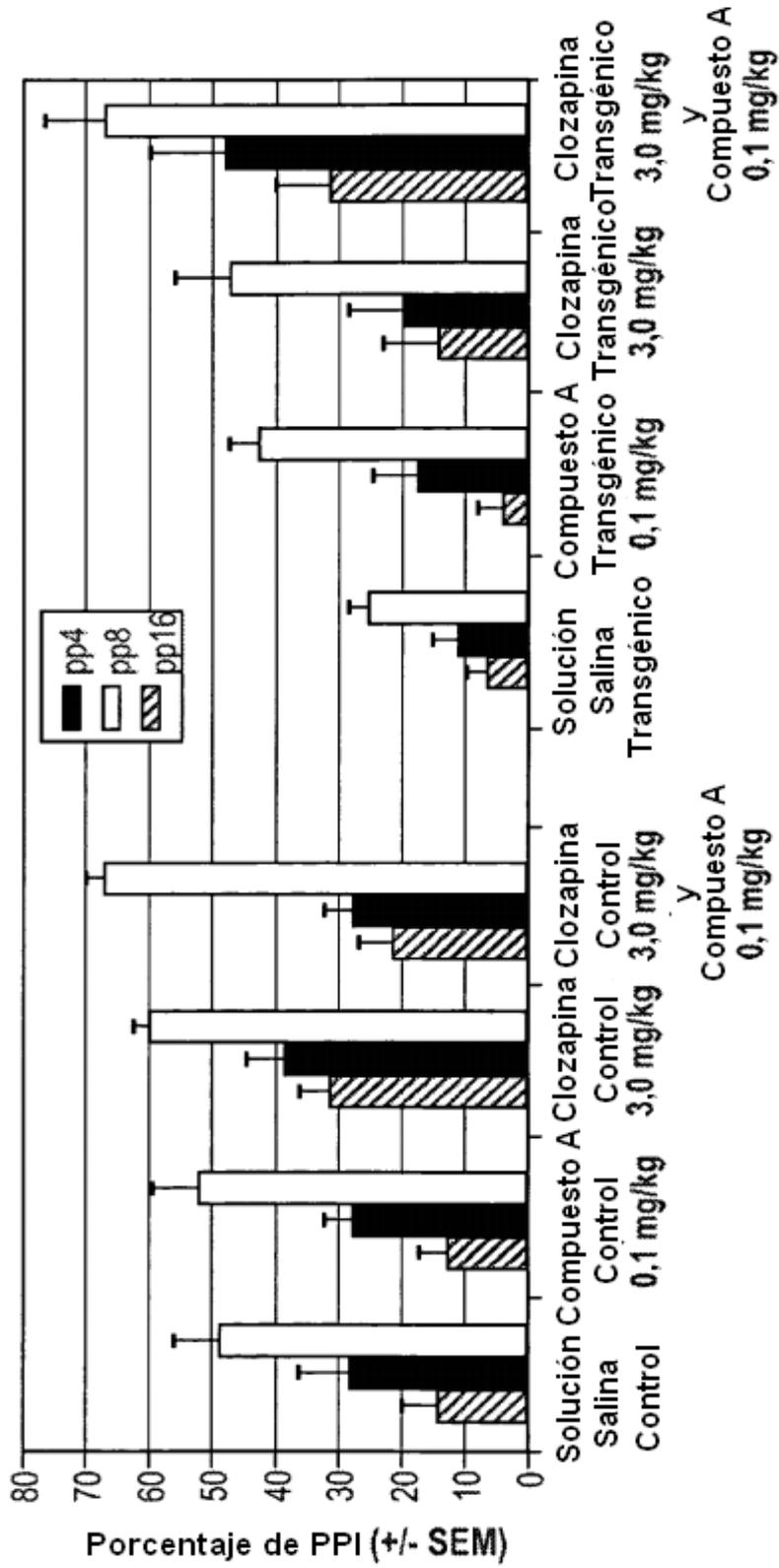


Fig. 5

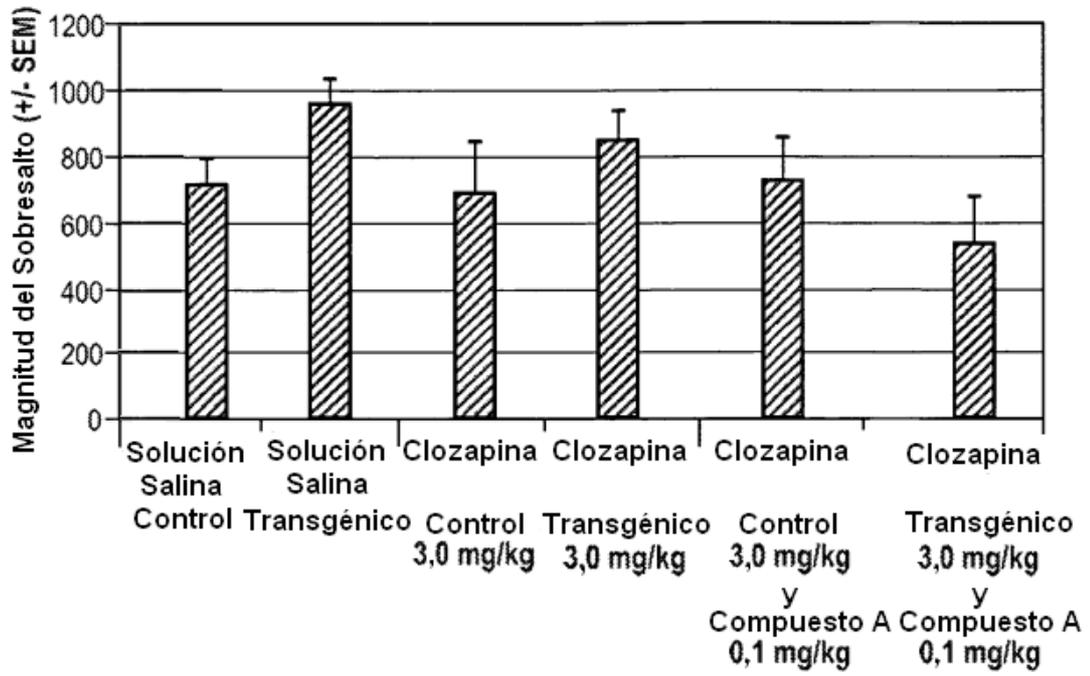


Fig. 6

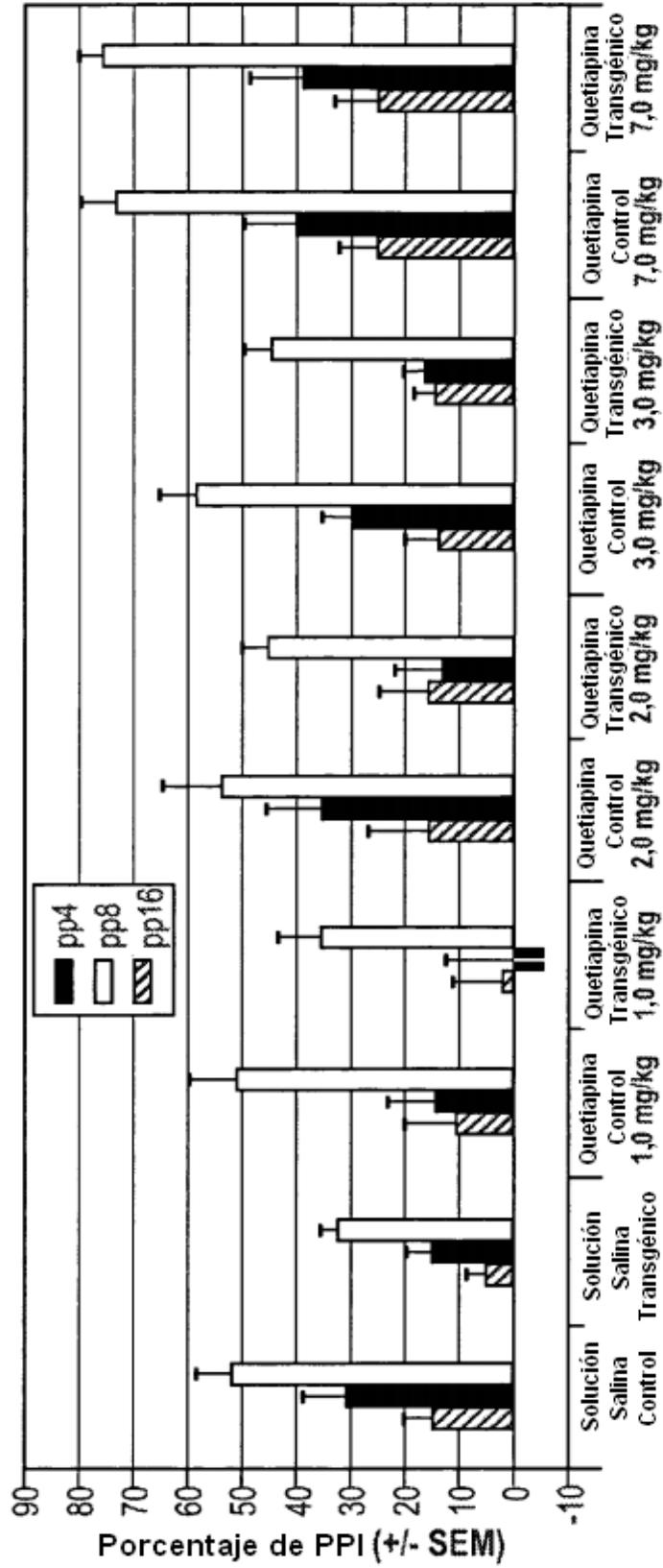


Fig. 7a

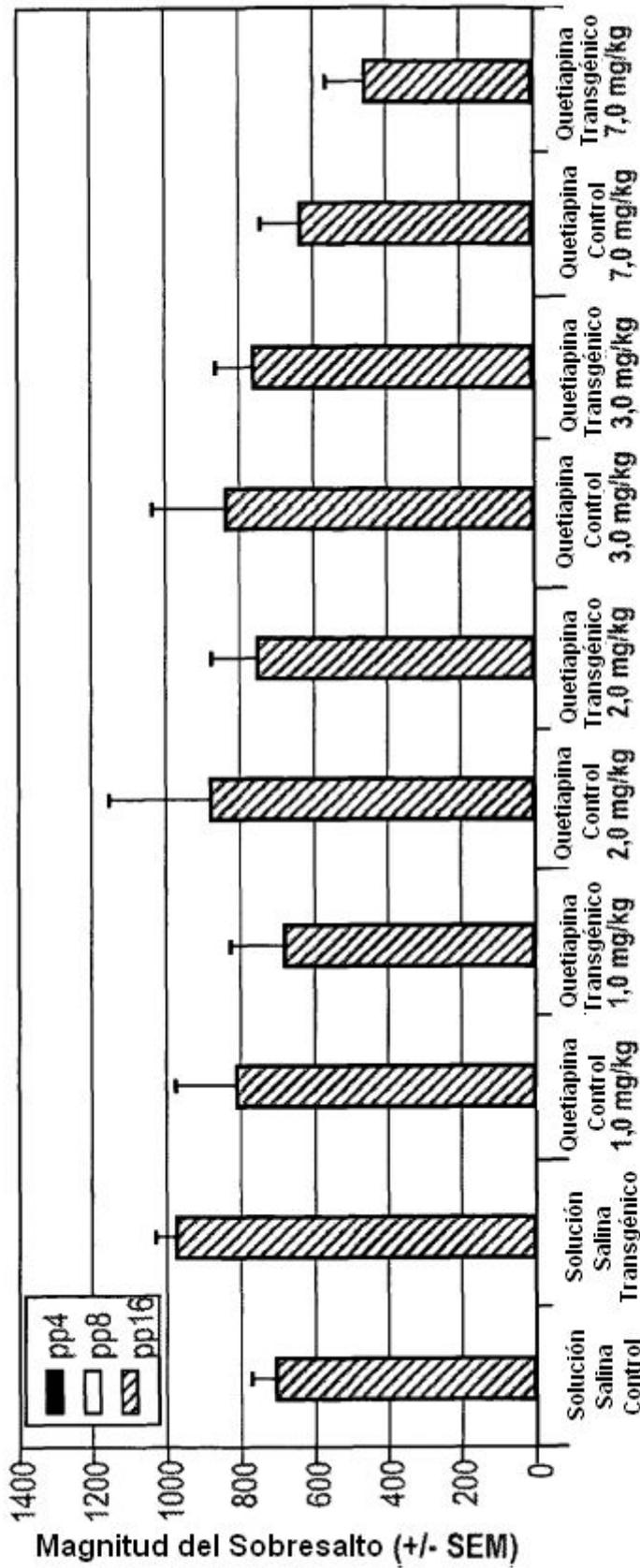


Fig. 7b

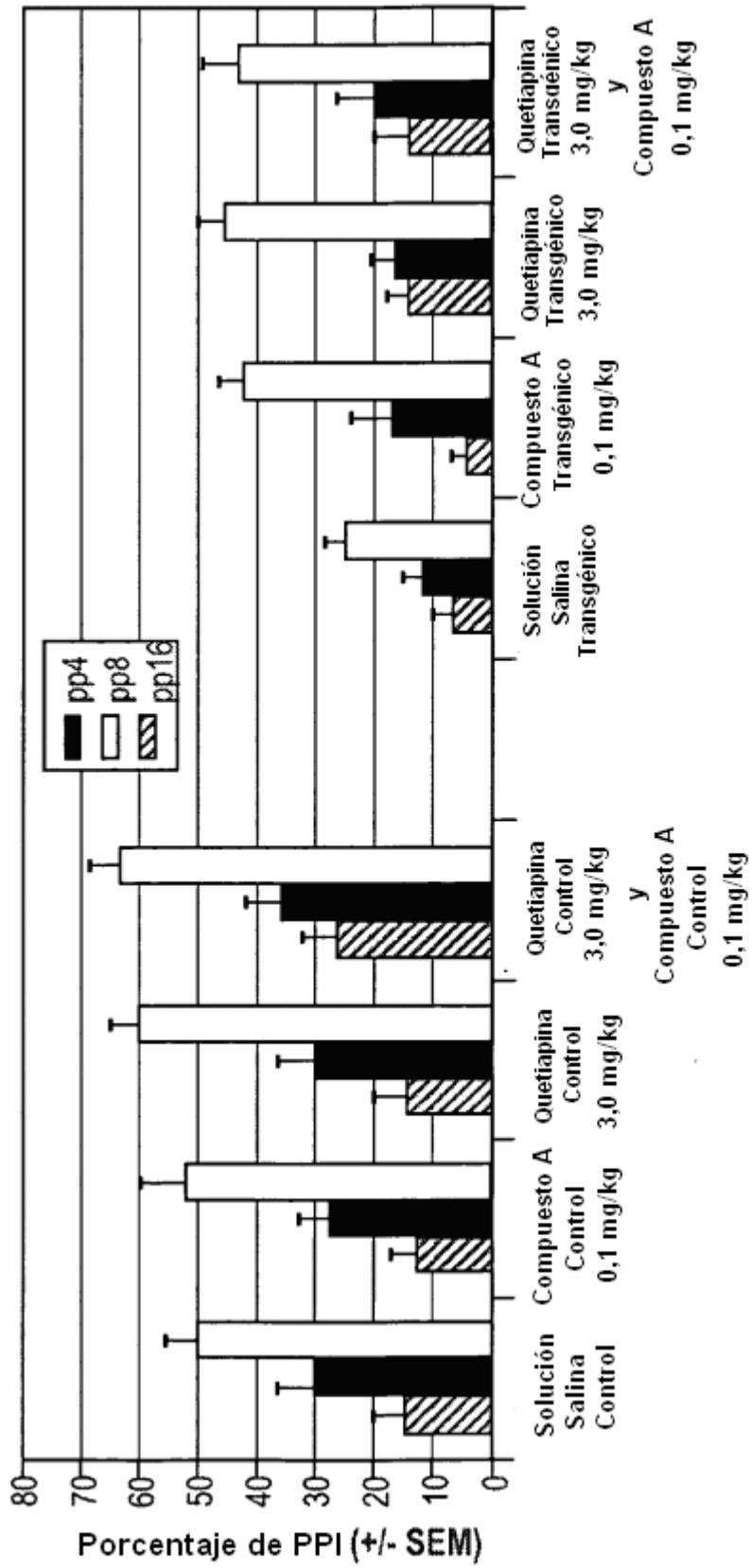


Fig. 8a

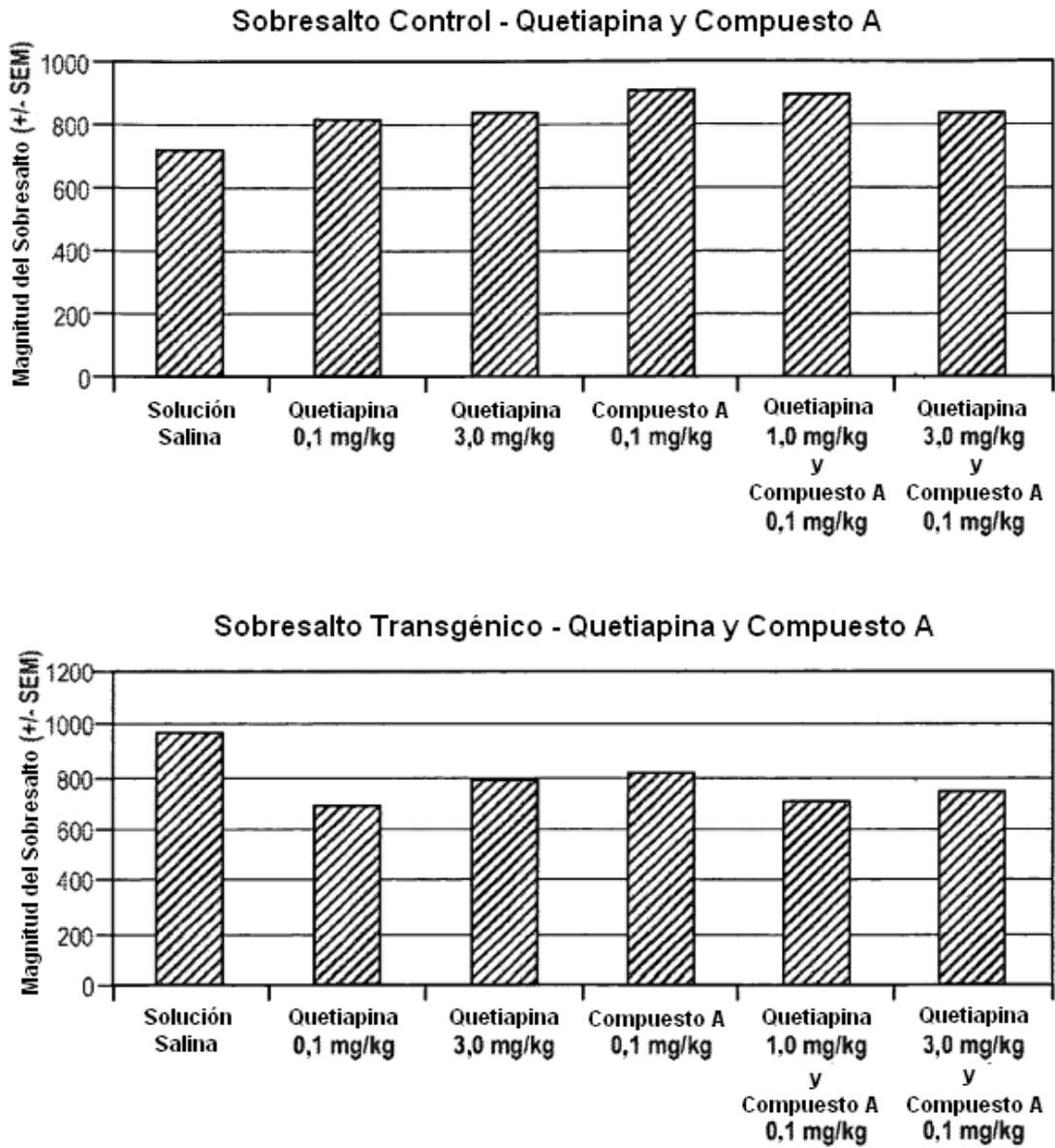


Fig. 8b

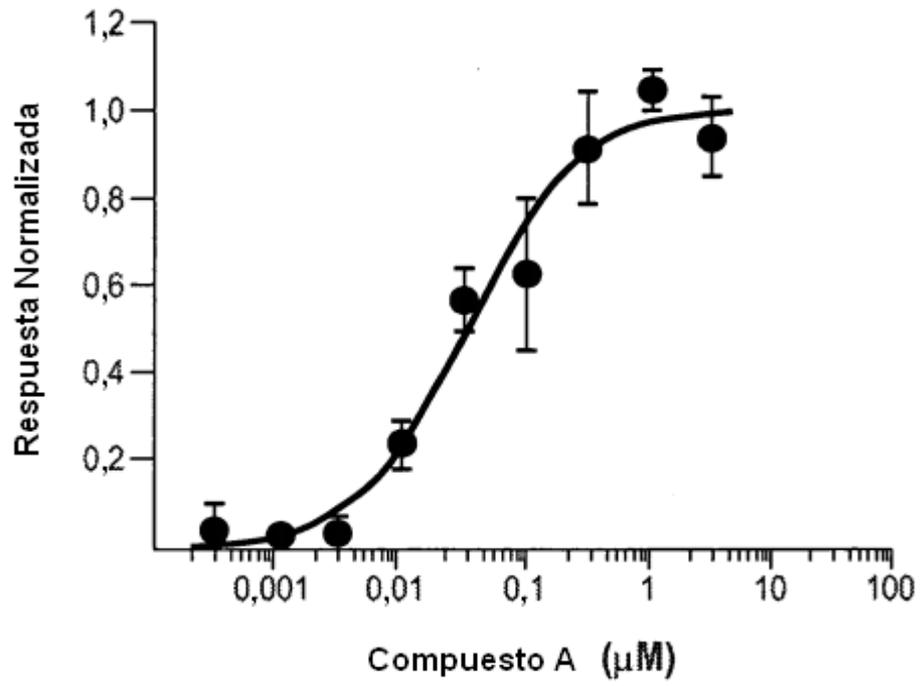


Fig. 9A

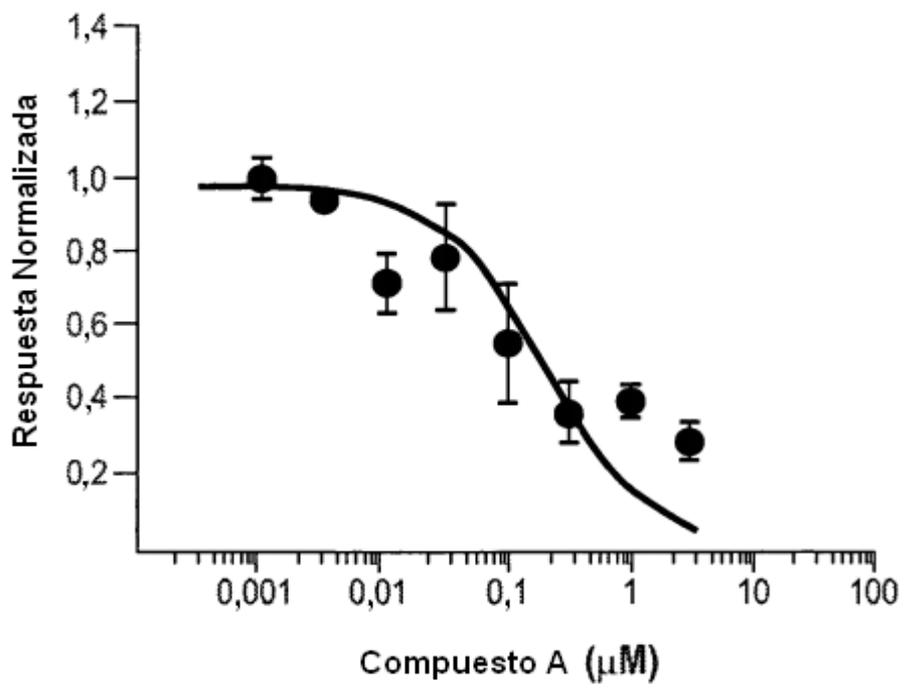


Fig. 9B

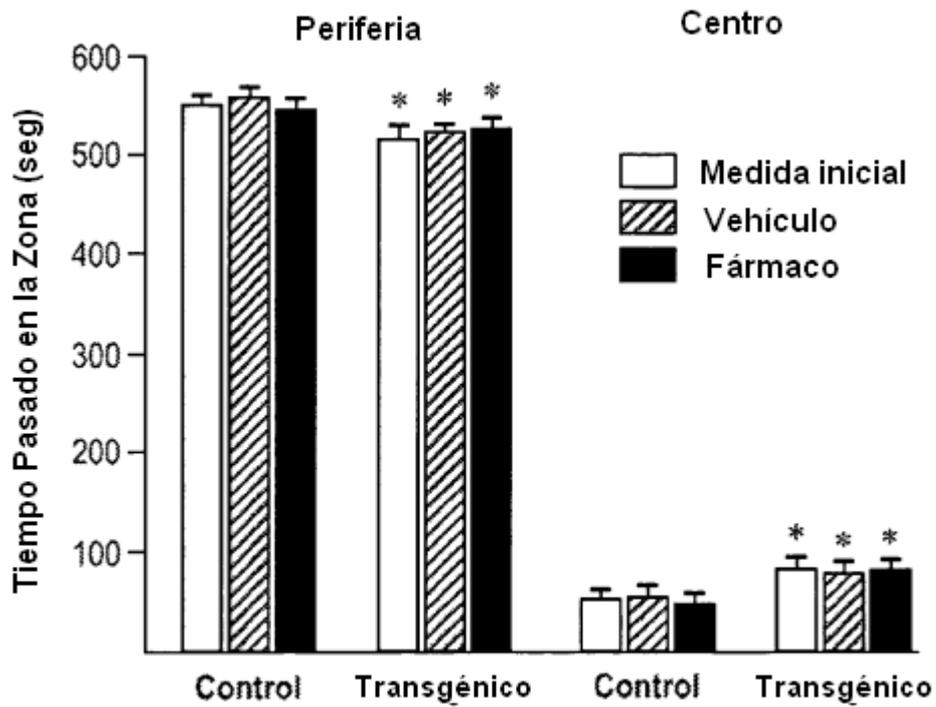


Fig. 10a

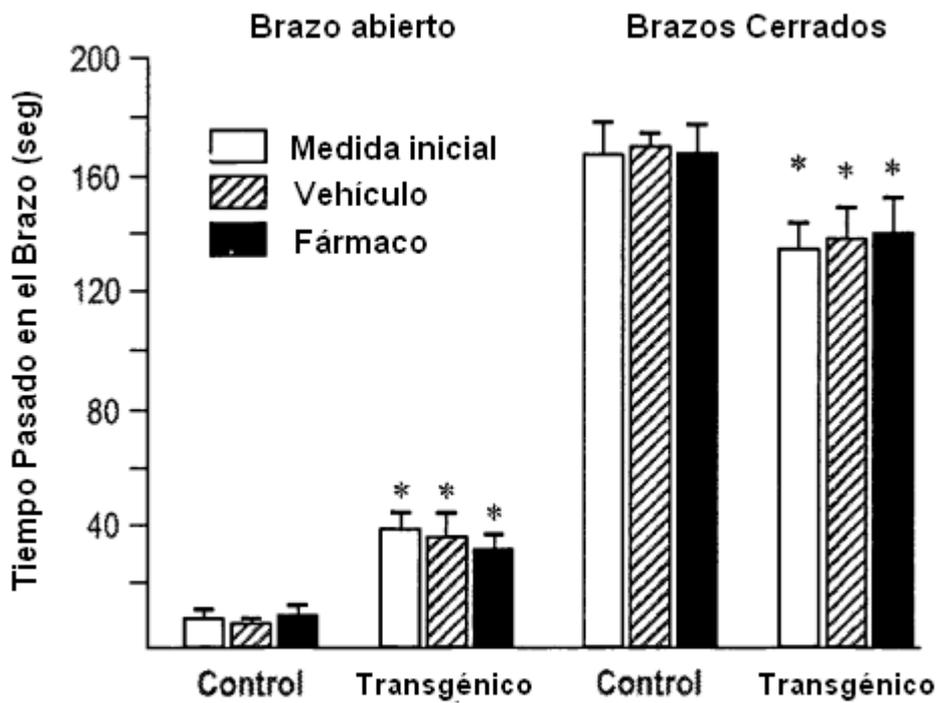


Fig. 10b

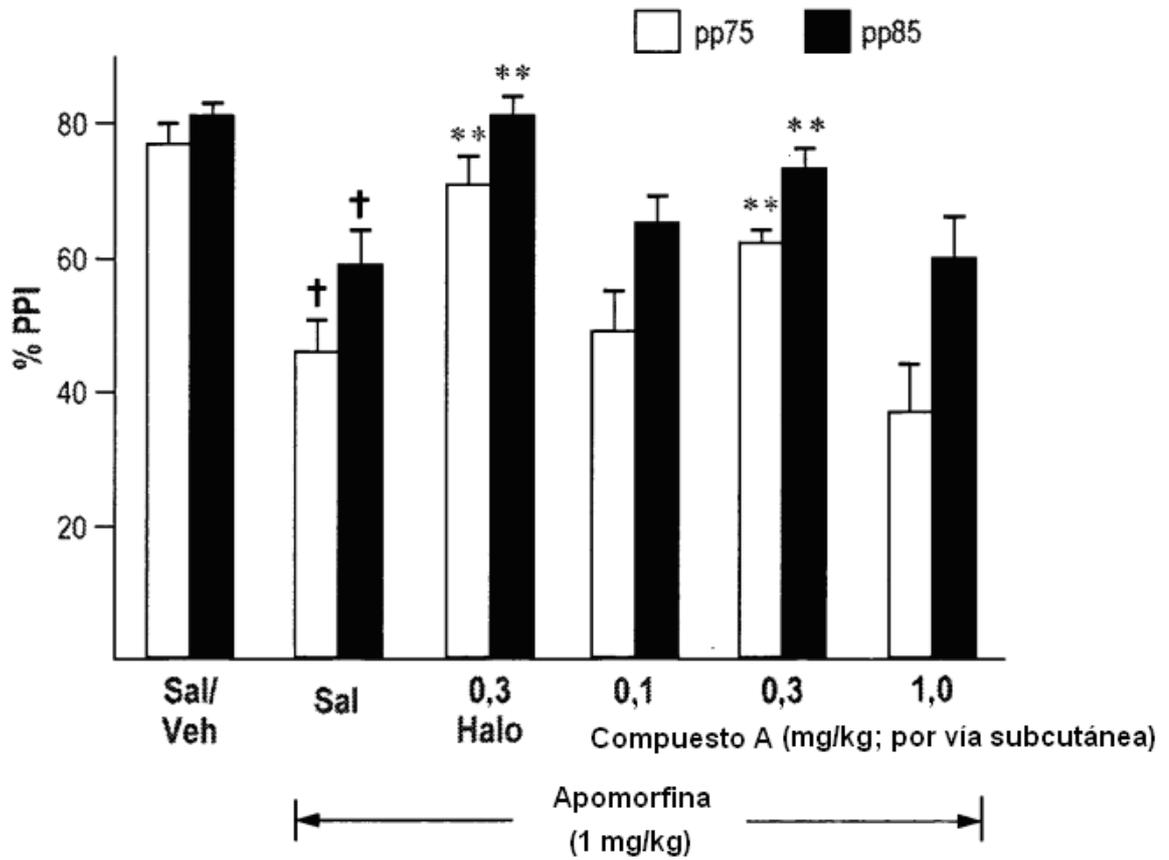


Fig. 11

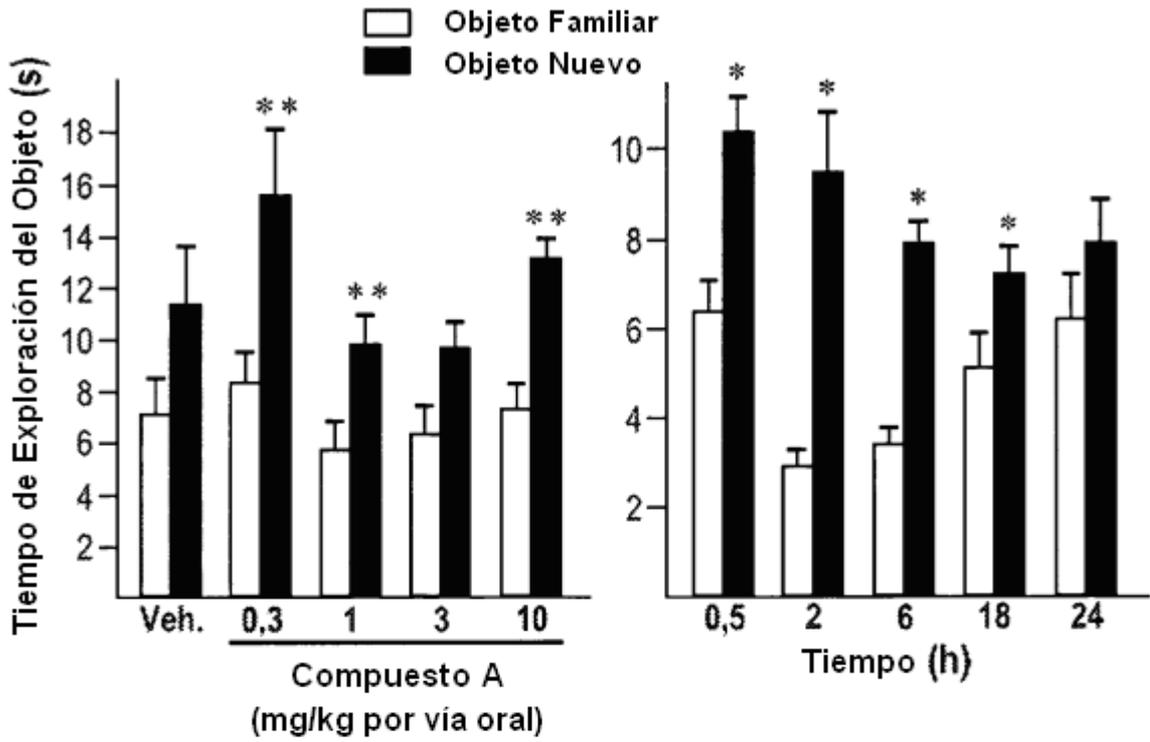


Fig. 12a

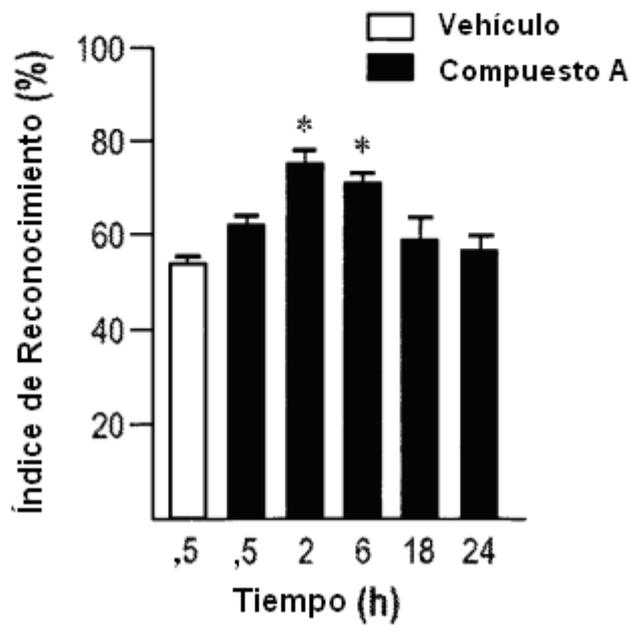


Fig. 12b

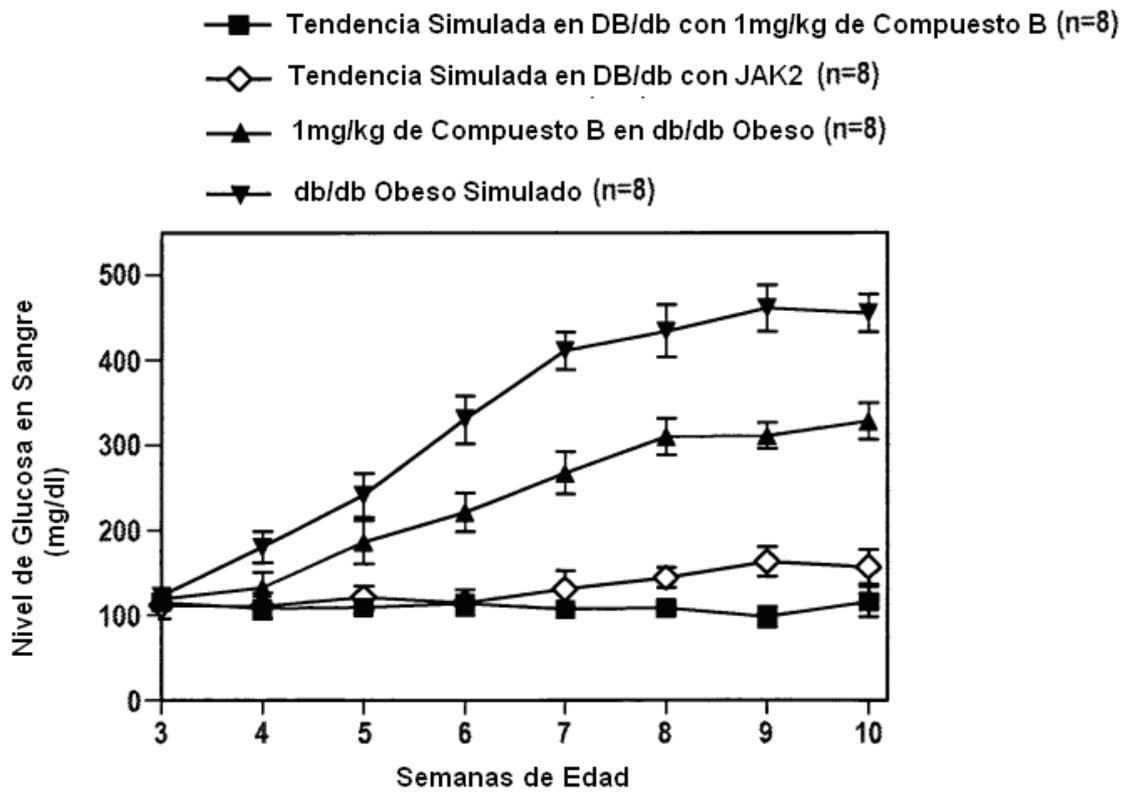


Fig. 13

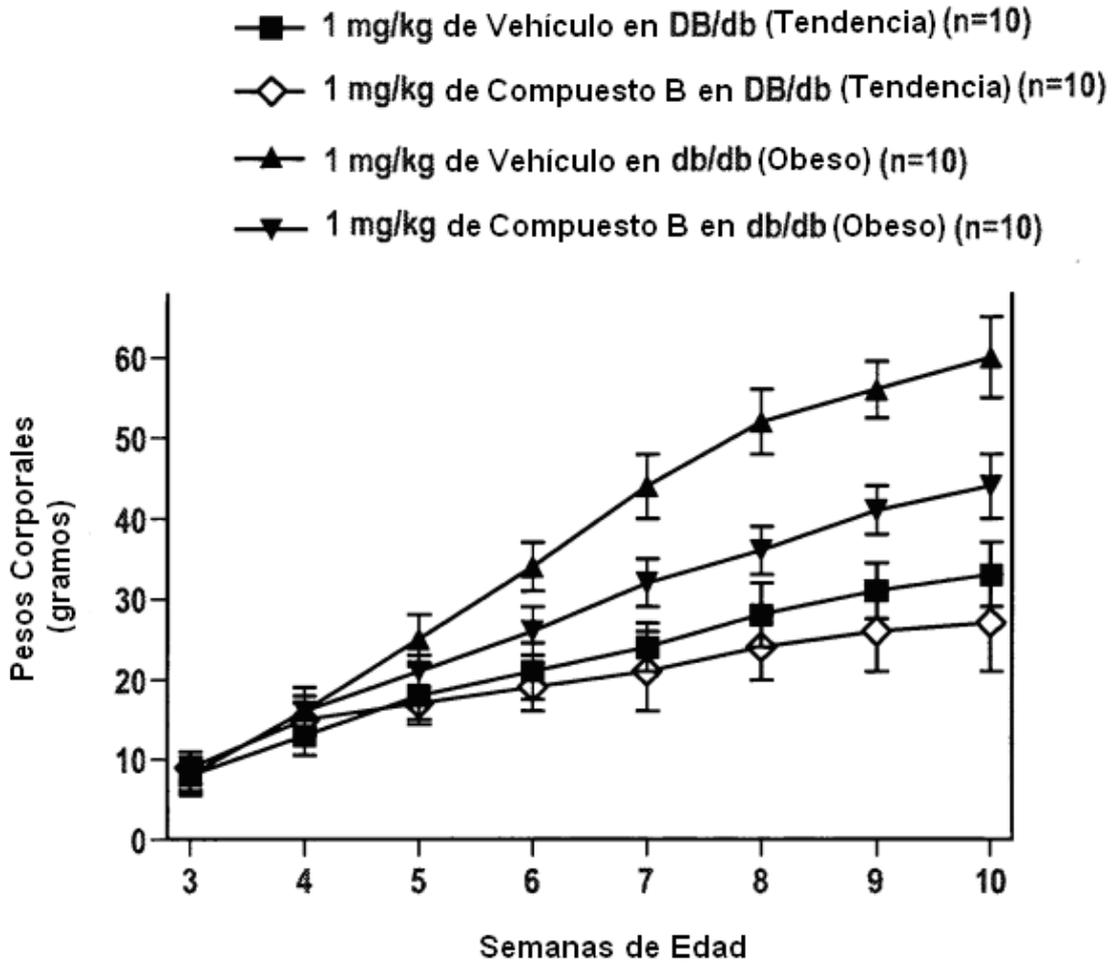


Fig. 14