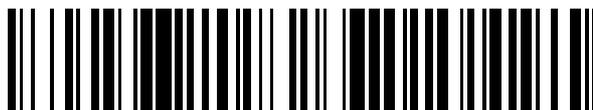


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 769**

51 Int. Cl.:

A61K 31/416 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2012** **E 12706085 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2673048**

54 Título: **Tratamiento del trastorno bipolar**

30 Prioridad:

09.02.2011 GB 201102248

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

15.04.2016

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
Ewert House Ewert Place, Summertown
Oxford, Oxfordshire OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:

**CHURCHILL, GRANT C.;
VASUDEVAN, SRIDHAR R. y
SINGH, NISHA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 769 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del trastorno bipolar

La presente invención se refiere a compuestos para su uso en el tratamiento del trastorno bipolar.

El trastorno bipolar es una de las causas más importantes de incapacidad en personas con edades entre los 15 y los 44 años. Se caracteriza por episodios recurrentes de manía o estado de ánimo exaltado, y estados de ánimo depresivos o irritables. Es diferente a otros trastornos del estado de ánimo, por ejemplo las enfermedades depresivas tales como la depresión o la depresión recurrente, los trastornos maniacos tales como la manía o la hipomanía, o los trastornos persistentes del estado de ánimo tales como la ciclotimia y la distimia, estando clasificado por separado en la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la Salud de la Organización Mundial de la Salud.

Los tratamientos actuales incluyen el ácido valproico, la lamotrigina, la carbamazepina y el litio en forma de sales tales como el carbonato de litio o el citrato de litio. Aunque considerado por lo general como el tratamiento más eficaz, el litio presenta el problema de la toxicidad, siendo su nivel tóxico de tan solo el doble de su concentración terapéutica. Puede causar también efectos secundarios tales como la poliurea, la polidipsia y daño renal, además de interferir con el metabolismo de la glucosa.

Se cree que la capacidad para inhibir la enzima inositol monofosfatasa (IMPasa) es un factor clave en el control del trastorno bipolar. La IMPasa cataliza la hidrólisis del inositol monofosfato (IP₁) a inositol, y se requiere para la regeneración de los fosfolípidos de la membrana que tienen un grupo de cabeza inositol. La hidrólisis del grupo de cabeza del fosfolípido inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) libera inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). El IP₃ se difunde en el citosol y abre los canales de calcio para aumentar el calcio. El DAG permanece en la membrana y activa la proteína quinasa C. La enzima fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del PIP₂, y está bajo control hormonal y de neurotransmisores. Se cree que la inhibición de estas cascadas de señalización en la vía de los fosfoinosítidos (PI) es la razón por la que el litio ayuda en el trastorno bipolar, al controlar determinadas poblaciones de neuronas que son hiperactivas. Esto se ilustra en la Figura 1.

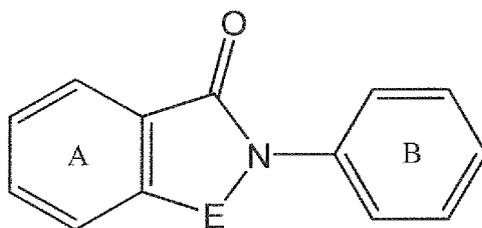
Berridge y col., en *Cell*, 59, 411-419, 1989, sugieren que la inhibición de la IMPasa es la razón más plausible de por qué el litio es eficaz en el tratamiento del trastorno bipolar. En el documento WO 2009/138987, se sugiere que un dodecapéptido que tenía actividad demostrable de inhibición de la IMPasa podría ser potencialmente útil en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo. Asimismo, el documento WO 96/37197 describe el uso de derivados de la tropolona como inhibidores de la IMPasa, y también su uso potencial en el tratamiento de la manía y la depresión. Giocebbe y col. en el documento US 4.981.980 comunican además que la fermentación de un medio nutriente por parte de un hongo hifomiceto del género *Memnoniella* o *Stachybotrys* daba un producto, cuyo componente principal puede inhibir a la inositol monofosfatasa, y es útil en el tratamiento de la depresión maniaca.

Atack y col., en *Medicinal Research Reviews*, 17(2), 1997, págs. 215-224, proponían que los efectos secundarios del litio podrían estar asociados a su no especificidad por la enzima IMPasa, e intentaron desarrollar nuevos inhibidores específicos de la IMPasa basados en análogos del sustrato, el inositol. Sin embargo, los compuestos preparados presentaban o bien una baja inhibición o bien una baja biopermeabilidad.

El ebselén (2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona) es un compuesto conocido que tiene actividad antioxidante (Muller y col.; *Biochemical Pharmacology*, 33(20), 3235-3239, 1984), y también se ha comunicado que es activo en el tratamiento de una serie de indicaciones terapéuticas, por ejemplo, como antidepresivo (Posser y col.; *European Journal of Pharmacology*, 602, 85-91, 2009), para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas, para el tratamiento de tumores malignos, para la estimulación del sistema inmune, para el tratamiento de enfermedades por deficiencia de selenio, para tratamientos antiarterioescleróticos y antiinflamatorios (US 5.021.242), en el tratamiento de los efectos secundarios causados por el uso médico del cisplatino (WO 92/02221), en el tratamiento de la pérdida de audición inducida por ruido (Lynch y col., *Seminars in Hearing*, 30(1), 47-55, 2009), y en el tratamiento de enfermedades mentales que se pueden tratar promoviendo la liberación de cinc de la metalotioneína, tales como la depresión y la esquizofrenia (WO 99/49680). Su uso en el tratamiento del cáncer también se ha comunicado en el documento US 2006/211745. Se ha evaluado en ensayos clínicos en fase III para otros trastornos tales como la apoplejía y la aterosclerosis, y se cree, por tanto, que es seguro para uso en humanos.

Ninguno de estos documentos informa de la capacidad del ebselén, o análogos del mismo, para actuar como inhibidor de la IMPasa y, por tanto, no enseñan o desvelan el uso del ebselén, o análogos del mismo, en el tratamiento de afecciones que se pueden tratar mediante la inhibición de la enzima IMPasa, tales como el trastorno bipolar.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del trastorno bipolar, siendo la Fórmula I:



Fórmula I

en la que:

E es S o Se

5 y cada uno de los anillos fenilo A y B está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, en los que cada sustituyente se selecciona independientemente de:

(1) un halógeno, que se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br;

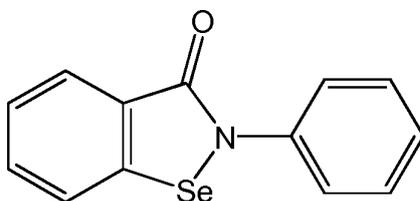
(2) un alquilo C₁-C₄, tal como un alquilo C₁-C₂, o un alquilo C₁, opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br; y

10 (3) un alcoxi C₁-C₄, tal como un alcoxi C₁-C₂, o un alcoxi C₁; opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br.

Se proporciona también el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del trastorno bipolar.

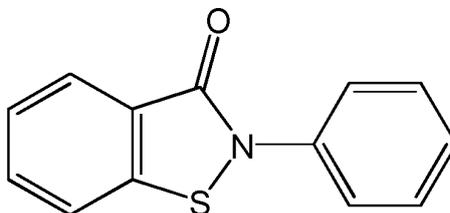
15 Un procedimiento para el tratamiento del trastorno bipolar comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un ejemplo de un compuesto de Fórmula I es la 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona, conocida también como ebselén. Su estructura se muestra en la Fórmula II.



Fórmula II

20 Otro ejemplo de un compuesto de Fórmula I es la 2-fenil-1,2-benzoisotiazol-3(2H)-ona. Su estructura se muestra en la Fórmula III.



Fórmula III

25 Características deseables de los compuestos descritos en el presente documento son la capacidad para inhibir la IMPasa, y se pueden usar, por tanto, para el tratamiento de afecciones que se pueden tratar mediante la inhibición de la IMPasa. El trastorno bipolar es una de tales afecciones. Los compuestos descritos en el presente documento tienen biodisponibilidad y son capaces de ser transferidos a través de la sangre/la barrera encefálica. Además, al contrario que el litio, se consideran menos tóxicos que el mismo y más específicos en cuanto a la inhibición de la IMPasa. El ebselén, por ejemplo, ya ha pasado los ensayos preclínicos para otras indicaciones.

30 Los átomos de hidrógeno de uno o bien de los dos anillos de fenilo A y B en el compuesto de Fórmula I pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. Cada sustituyente se selecciona independientemente de:

(1) un halógeno, que se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br; más preferentemente entre F y Cl;

(2) un alquilo C₁-C₄, tal como un alquilo C₁-C₂, o un alquilo C₁, opcionalmente sustituido con uno o más átomos

de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br; más preferentemente entre F y Cl; y

(3) un alcoxi C₁-C₄, tal como un alcoxi C₁-C₂, o un alcoxi C₁; opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br, más preferentemente entre F y Cl.

5

Cada uno de los anillos de fenilo A y B comprende preferentemente no más de 2 sustituyentes, más preferentemente no más de 1 sustituyente. Incluso más preferentemente, solo uno de los anillos de fenilo A y B está sustituido, y con no más de un sustituyente. Lo más preferente es que ambos anillos de fenilo A y B no estén sustituidos.

10 El compuesto tiene la estructura de Fórmula I, o es una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización preferente, el compuesto no es una sal.

15 Los compuestos de Fórmula I descritos en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden administrar a un paciente por vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal u oral, por ejemplo. Se pueden administrar mediante cualquier medio conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal). La administración puede ser sistémica o local.

20 Los compuestos de Fórmula I descritos en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden formular como un medicamento al que, preferentemente, se le dará forma de dosis individuales terapéuticamente eficaces del compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, ajustadas al modo de administración.

Para administración oral, el medicamento se puede formular en preparaciones sólidas o líquidas, tales como píldoras, comprimidos, trociscos, cápsulas, polvos, gránulos, jarabes, soluciones, suspensiones o emulsiones.

25 Los medicamentos sólidos pueden comprender uno o más de los siguientes junto con la cantidad deseada del compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo: un vehículo farmacéuticamente aceptable, que incluye ingredientes convencionales tales como la lactosa, la sacarosa y el almidón de maíz; aglutinantes tales como la goma arábiga, el almidón de maíz o la gelatina; agentes disgregantes tales como el almidón de patata o el ácido algínico; y lubricantes tales como el ácido esteárico o el estearato magnésico. Opcionalmente, el medicamento puede ser una formulación de liberación sostenida, en la que el ebselén se incorpora en una matriz de un polímero acrílico o quitina, por ejemplo.

30 Ejemplos de medicamentos líquidos para administración oral incluyen soluciones acuosas tales como jarabes, jarabes aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones opcionalmente aromatizadas con aceites comestibles, y elixires. Las suspensiones pueden incluir agentes de suspensión o de dispersión tales como gomas naturales o sintéticas, por ejemplo, la goma de tragacanto, la goma arábiga, el alginato, el dextrano, la carboximetilcelulosa sódica, la metilcelulosa, la polivinilpirrolidona y la gelatina.

35 Para medicamentos para administración parenteral, el compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, se formula normalmente con un vehículo de inyección líquido adecuado que incluye, por ejemplo, el agua, la solución salina, la dextrosa, disolventes miscibles con agua tales como el etanol, el polietilenglicol y el propilenglicol, y vehículos no acuosos tales como aceites animales o vegetales. Opcionalmente, el medicamento puede ser una emulsión. Opcionalmente, el pH está normalmente en el intervalo de 6 a 8, preferentemente de 6,5 a 7,5. Opcionalmente, pueden estar presentes tampones tales como citratos, acetatos o fosfatos. Opcionalmente, pueden estar presentes antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico. Opcionalmente, pueden estar presentes agentes solubilizantes y estabilizantes tales como la ciclodextrina, la lisolectina, el ácido oleico, el ácido esteárico, y la dextrina. Opcionalmente, pueden estar presentes anestésicos locales tales como el clorhidrato de procaína y de lignocaína. Se pueden usar formulaciones tales como las descritas en el documento US 2004/0029934, que comprenden fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y las descritas en el documento US 2004/0053888, que comprenden ciclodextrina.

45 Dosis adecuadas del compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, están en el intervalo de 5 a 5000 mg para un paciente humano al día, por ejemplo de 50 a 2000 mg al día o 500 a 1000 mg al día.

50 El compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, se puede proporcionar en una dosis, o en más de una dosis, normalmente en el intervalo de dos a ocho dosis al día, por ejemplo de dos a cuatro o de dos a tres dosis al día. En una realización, el compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, se puede administrar en forma de una solución o suspensión en agua para administración por vía oral. Un ejemplo de pauta posológica sería la administración de una solución o suspensión que comprende 100 mg del compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, en agua 3 veces al día, o 150 mg en agua 2 veces al día. En otra realización, se pueden proporcionar cápsulas, píldoras o comprimidos que comprenden el compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, para administración oral, por ejemplo la administración de 1, 2, 4 o 8 cápsulas, píldoras o comprimidos que comprenden cada uno 200 mg del compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo, al día. Los compuestos o sales descritos en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos adicionales que son eficaces para su uso en el tratamiento

55

del trastorno bipolar, por ejemplo uno o más de los siguientes: ácido valproico, lamotrigina, carbamazepina, otro compuesto de Fórmula I descrito en el presente documento, sales farmacéuticamente aceptables de uno cualquiera o más de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de litio. La administración puede ser simultánea, secuencial o por separado, y se puede proporcionar en forma de un kit que comprende los dos o más principios activos, bien combinados en un único medicamento, o bien por separado en forma de medicamentos separados.

El ebselén y la 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona son compuestos particularmente preferentes.

Las propiedades biopermeables del ebselén, que le permiten su transferencia a través de la sangre/la barrera encefálica, se demuestran mediante los ejemplos que siguen a continuación. El ebselén es conocido también por ser suficientemente no tóxico en humanos a dosificaciones farmacéuticamente eficaces y, por tanto, es un firme candidato para futuros ensayos clínicos en el tratamiento de los trastornos que se pueden tratar mediante la inhibición de la IMPasa, siendo el trastorno bipolar un ejemplo. La concentración DL₅₀ del ebselén es superior a 1000 mg/kg en ratas. Su toxicidad relativamente baja comparada con la del litio se cree que se debe a su mayor especificidad hacia la inhibición de la IMPasa. El ebselén tiene una CI₅₀ (la concentración a la que se consigue un 50 % de inhibición) para la IMPasa de aproximadamente 2 µM. El valor correspondiente para la 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona es de 35 µM.

El ebselén y la 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona se pueden proporcionar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cada uno de ellos se puede formular tal y como se ha destacado anteriormente, y en las dosificaciones descritas previamente.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes, y con referencia a las Figuras en las que:

La figura 1 es una representación simplificada de la vía de los fosfoinosítidos (PI).

La Figura 2 es una gráfica que muestra los efectos de inhibición de la IMPasa *in vitro* del ebselén (círculos blancos), el litio (triángulos negros) y del compuesto L690330 (cuadrados negros) tal y como se describe en Atack y col. en *Medicinal Research Reviews*, 17(2), 1997, 215-224).

La Figura 3 es una gráfica que muestra los efectos de las diferentes concentraciones de ebselén sobre la inhibición de la IMPasa *in vitro*.

La Figura 4 es una gráfica que muestra los efectos de la 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona sobre la inhibición de la IMPasa *in vitro*.

La Figura 5 es una gráfica de los resultados *ex vivo* que muestra la reducción de la actividad IMPasa en cerebros de ratón homogeneizados después de inyectar a los ratones 5 mg/kg bien de ebselén o bien de control.

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra las mediciones *ex vivo* de los niveles de inositol en cerebros de ratón 1 hora después de la inyección intraperitoneal bien de ebselén o bien de control.

La Figura 7 es una gráfica de la movilidad de los ratones frente al tiempo tras la administración de amfetamina y/o ebselén.

La Figura 8 es un diagrama de barras que muestra la actividad promedio de ratones tratados con ebselén o con control tras la administración bien de amfetamina o bien de control.

La Figura 9 es un diagrama de barras que destaca los efectos inhibidores del ebselén sobre la conducta de postura erguida en ratones.

La Figura 10 es un diagrama de barras que muestra los cambios en la conducta de postura erguida de los ratones tratados con ebselén o con control tras la inyección de inositol.

En los diagramas de barras de las Figuras 6, 8 y 10, "****", "****" y "ns" significan la prueba t estadística de las medias, en las que "." denota $p < 0,05$, "****" denota $p < 0,001$ y "ns" denota "no significativo".

El ADNc de inositol monofosfatasa humano se encargó a Geneservice, Source Bioscience, Cambridge, GB. El ADNc se insertó en el plásmido pRSET5a, que se transformó después en células competentes JM109. Se dejó que estas células se multiplicaran y después se extrajo el plásmido de las células. El plásmido se transformó entonces en la bacteria de expresión *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS. La expresión de la proteína se optimizó y el mejor rendimiento de inositol monofosfatasa se encontró que era en las siguientes condiciones: crecimiento de las bacterias de expresión en caldo de lactosa que contenía betaína 2,5 mM y sorbital 660 mM hasta una DO de 0,9, seguido de la inducción con isopropil alfa-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM, que después se dejó durante la noche a 30 °C en una incubadora. Al día siguiente se lisaron las células y la fracción soluble, que contenía la enzima, se recogió. La purificación se llevó a cabo en 3 etapas. La fracción soluble se calentó a 68 °C durante 1 hora y después se centrifugó. Se recogió el sobrenadante y se hizo pasar a través de una columna de Q-sepharose (Pharmacia). Se recogieron diferentes fracciones y se evaluaron para determinar su actividad. Las fracciones activas se pasaron a continuación a través de una columna Tricorn MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare, GB) para una purificación adicional.

Cada reacción enzimática que usó la inositol monofosfatasa humana contenía 0,00013 mg de enzima (0,0673 mg/ml). El sustrato inositol monofosfatasa (Alexis Chemicals) se diluyó con el tampón apropiado hasta preparar una concentración de solución madre 50 mM. La solución madre se diluyó después con tampón para dar las siguientes concentraciones de sustrato: 0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 25 mM y 30 mM. A partir de esto se añadieron 2 µl de sustrato a cada pocillo de reacción dando una dilución de

sustrato con un factor de dilución de 10 hasta 0 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 2,5 mM y 3 mM. El tampón de reacción contenía EGTA 1mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 3mM, 0,5 ng/ml de BSA, Tri 50 mM, HCl, pH 7,4 y Triton X100 al 0,01 %.

5 Se usó un ensayo de verde de malaquita para la determinación cuantitativa del fosfato inorgánico libre presente en la reacción de la IMPasa. Esto implicaba disolver un 4,2 % p/v de molibdato de amonio en ácido clorhídrico 4 M. El verde de malaquita se preparó hasta una concentración de un 0,045 % p/v. A partir de estas soluciones madre se preparó una mezcla 3:1 de verde de malaquita; molibdato de amonio, y se agitó con formación de vórtice durante treinta minutos. El verde de malaquita forma un complejo de molibdato de amonio:verde de malaquita:fosfato inorgánico en presencia de fosfato inorgánico libre. Para cada placa de reacción, se prepararon pocillos por duplicado de un intervalo de concentraciones conocidas de fosfato dentro del intervalo de concentraciones de 0-300 µM, conteniendo cada pocillo 20 µl de solución. Los patrones de fosfato se prepararon a partir de diluciones en serie de fosfato diácido de potasio 1 M usando H₂O bidestilada. A cada pocillo se añadieron 180 µl de mezcla verde de malaquita:molibdato de amonio. El color producido por la reacción entre el fosfato inorgánico y la mezcla verde de malaquita:molibdato de amonio era proporcional a la cantidad de fosfato presente. Se dejó desarrollar el color durante 15 min y después se leyó la placa en un lector de placas TECAN Sunrise a una longitud de onda de 595 nm.

20 Para las reacciones cuyos resultados se muestran en la Figura 2, se disolvió litio (Sigma) en H₂O bidestilada y se diluyó apropiadamente hasta la concentración de 10 mM con la adición de 2 µl de litio a cada pocillo para dar una concentración final por pocillo de 1 mM. Se prepararon también soluciones madre de litio a partir de esto. Se adquirió el L690330 en Sigma Chemicals, y se preparó hasta una concentración de solución madre de 1 mM usando H₂O. A partir de esta solución madre se prepararon las siguientes concentraciones usando diluciones en serie con agua: de 300 µM a 30 nM. Estas concentraciones se usaron para obtener una curva de concentración-inhibición para la enzima. El ebselén se adquirió en BioFocus en forma de una solución madre 10 mM en DMSO.

25 Los experimentos usados para obtener los datos para la Figura 2 se llevaron a cabo todos en presencia de una cantidad constante de inositol monofosfato. Los datos para el ebselén se representan mediante círculos, para el L690330 mediante cuadrados, y para el litio mediante triángulos.

El ebselén tenía una CI₅₀ de aproximadamente 2 µM. El L690330, del que se comunicó que tenía una CI₅₀ de aproximadamente 300 nM para la IMPasa bovina, se demostró en el presente estudio que tenía un valor mayor de CI₅₀ (1,5 µM) para la IMPasa humana.

30 La Figura 3 muestra el efecto del aumento de la concentración del ebselén sobre la inhibición de la IMPasa, disminuyendo la velocidad de la reacción catalizada por la IMPasa cuando se aumenta la concentración de ebselén. El experimento se basó en la medición del grado de escisión enzimática del inositol monofosfato por parte de la enzima IMPasa humana en presencia de diversas concentraciones de ebselén. Los resultados demuestran que un aumento de la concentración del sustrato inositol monofosfato no domina la inhibición mediada por el ebselén, indicando un modo de inhibición no competitiva.

35 La Figura 4 muestra que la inhibición *in vitro* de la IMPasa se puede conseguir también usando la 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona. Estos experimentos se llevaron a cabo de un modo análogo al de los experimentos anteriores para el ebselén, con la excepción de que la concentración de 2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona usada era de 30 µM.

40 Atack y col. comunicaron que el L690330 no tenía biodisponibilidad. Para determinar la biodisponibilidad del ebselén, se usó un ensayo *ex vivo* en ratón. En este ensayo, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 mg/kg de ebselén solubilizado en beta-ciclodextrina, de acuerdo con el procedimiento siguiente: Se prepararon una solución madre de ebselén 0,5 M en DMSO y una solución madre de 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina (HPBCD) al 40 %. Se preparó una solución 3,5 mM de ebselén (a partir de la solución madre 0,5 M) en HPBCD al 40 % y, por último, a fin de obtener una concentración de 350 µM de ebselén, se llevó a cabo una dilución 1/10. Se preparó una solución de control que contenía la misma dilución de DMSO y HPBCD. El volumen de fármaco/vehículo inyectado i.p. al ratón fue de 1 ml (para los animales que recibieron una dosis de ebselén esta es de aproximadamente 5 mg/kg asumiendo que cada ratón pesa aproximadamente 20 g). Se usaron ratones CD1 machos que pesaban aproximadamente 20 g. Los animales recibieron una dosis durante una hora bien de fármaco o bien de vehículo antes de ser sacrificados mediante dislocación cervical. Se diseccionaron rápidamente los cerebros y se congelaron en nitrógeno líquido. En un momento posterior, los cerebros se descongelaron y se homogeneizaron en 500 µl de tampón intracelular que contenía sacarosa 0,25 M, trietilamina 20 mM, 20 µg/ml del inhibidor tripticasa de soja y comprimidos de inhibidor de proteasa.

55 Se determinó la concentración de proteína de cada homogeneizado de cerebro y se preparó y almacenó una solución madre de 2,5 mg de proteína a partir del homogeneizado. Para el ensayo de la actividad inositol monofosfatasa, se tomaron 10 µl de este homogeneizado de cerebro en tubos Eppendorf y se incubaron con 2 µl de diversas concentraciones de inositol monofosfato. Se llevó el volumen hasta 50 µl con tampón Tris para dar una concentración final de proteína de 0,5 mg. Los tubos Eppendorf se colocaron en un baño de agua a 37 °C durante 1 hora con agitación a intervalos de 20 min. Al cabo de 1 h, se añadió un volumen igual de metanol enfriado con hielo a fin de precipitar las proteínas y después se centrifugaron los tubos Eppendorf. Se dispusieron 20 µl del

sobrenadante en una placa de 96 pocillos y se añadieron 180 µl de una mezcla 3:1 de 0,045 % de verde de malaquita:4,2 % de molibdato de amonio en HCl 4 M. Se midió la intensidad del color verde formado a 595 nm.

5 Se descubrió que la cantidad de fosfato detectada era significativamente menor para los ratones inyectados con ebselén en comparación con los del control, tal y como se muestra en la Figura 5 (ebselén, línea inferior, triángulos; control, línea superior, círculos). Esto sugiere que los ratones tratados con fármaco tenían una menor actividad inositol monofosfatasa que los ratones del control. Estos datos demuestran también que el ebselén tiene biodisponibilidad, siendo permeable a través de la sangre/la barrera encefálica, y activo en los animales intactos, e inhibe la IMPasa endógena.

10 Se puede llegar a conclusiones similares a partir de los resultados mostrados en la Figura 6, en la que se midieron *ex vivo* los niveles de inositol en cerebros de ratón usando espectroscopía RMN ¹H. Los resultados se obtuvieron a partir de cerebros extirpados de los ratones 1 hora después de la inyección intraperitoneal bien con ebselén o bien con control. Los niveles de inositol en el cerebro eran significativamente inferiores en los ratones tratados con ebselén ($p < 0,001$), lo que sugería un aumento de la inhibición de la IMPasa.

15 Se estudió también la evaluación del seguimiento y actividad de los ratones. Se administró a los ratones una inyección i.p. de solución salina (control) o ebselén (1, 5 o 10 mg/kg) y se colocaron en una base de 35 x 35 cm de Perspex en la que se registró su ubicación mediante un sistema de video-seguimiento Ethovision (Noldus, Wageningen, Holanda). Al cabo de 60 minutos, se inyectó a los ratones d-anfetamina (4 mg/kg) o control. El sistema Ethovision siguió el centro del cuerpo del ratón y registró su posición de acuerdo con la localización este punto. El análisis de los datos se efectuó mediante el software Ethovision, y se calcularon y representaron las distancias de movimiento dentro de un intervalo de cada 5 minutos. La distancia total de movimiento se computó para el intervalo de tiempos de 60 a 120 minutos tras el inicio de la adquisición de los datos. La hiperactividad inducida por anfetamina se usó como un modelo de manía en animales, y es sensible a fármacos que estabilizan el estado de ánimo, tal como el litio.

25 La Figura 7 muestra los patrones de actividad antes y después de la inyección bien de la anfetamina o bien del control para ratones tratados con ebselén y con control. La Figura 8 muestra los movimientos promedio observados en el periodo de 60 a 120 minutos, es decir, el periodo tras la inyección de la d-anfetamina o del control. Estas Figuras demuestran que los ratones tratados con ebselén tienen un menor nivel de hiperactividad inducida por anfetamina ($p < 0,001$).

30 Se efectuaron también experimentos de postura erguida tal como sigue. Se dejó que los ratones se movieran libremente en una jaula equipada con líneas de rayos infrarrojos situadas a dos alturas. Los ratones solo podían romper los rayos superiores irguiéndose sobre las patas traseras. Los datos de la Figura 9 muestran que el número de roturas de los rayos durante la prueba de campo abierto se redujo significativamente en los ratones tratados con ebselén ($p = 0,023$).

35 Si el ebselén imita la acción del litio, cabría esperar que tuviera efectos similares a los del litio sobre la conducta de los roedores. El ebselén inducía una disminución de la postura erguida (Figura 9) y una disminución de la hiperlocomoción inducida por anfetamina (Figuras 7 y 8). Tanto la postura erguida como la hiperlocomoción inducida por anfetamina son pruebas de conducta que son más selectivas al litio que a otros antidepresivos y diagnostican una actividad similar a la del litio. Por tanto, el ebselén no solo inhibe la enzima IMPasa *in vitro* y *ex vivo*, sino que también imita el efecto del litio sobre la conducta global de los ratones. Combinados, estos resultados son consistentes con la acción del litio a través de la IMPasa, y con que el ebselén es un imitador eficaz del litio.

40 Esto se ve confirmado por los resultados mostrados en la Figura 10. En estos experimentos de postura erguida, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de control o de ebselén (5 mg/kg), y al cabo de 60 minutos se les administró una inyección intracerebroventricular de control o de 5,5 µmol de inositol. Los efectos del ebselén sobre la supresión de la conducta de posición erguida eran significativamente reducidos, consistentes con la acción del ebselén como inhibidor de la IMPasa.

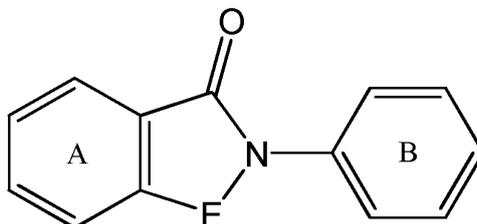
Basándose en los bajos valores p asociados a los resultados de las Figuras 6, 8, 9 y 10, hay una probabilidad muy baja de que las diferencias observadas ocurran puramente por casualidad.

50 El ebselén y la 2-fenil-1,2-benzoisotiazol-3(2H)-ona se han identificado como inhibidores de la IMPasa de molécula pequeña usando una detección *in vitro* frente a IMPasa humana expresada. Además, el ebselén ha demostrado tener biodisponibilidad en un ensayo *ex vivo* usando cerebros de ratones inyectados con ebselén.

55 Dado que el ebselén es un compuesto conocido que se ha demostrado que es seguro en el hombre en estudios de apoplejía (Ogawa y col.; *Cerebrovasc. Dis.*, 9 112-118, 1999; Saito y col.; *Neurosurgery*, 42, 269-277; Yamaguchi y col., *Stroke*, 29, 12-17, 1998), aterosclerosis (*Clinical Trials.gov* Identificador NCT00762671), pancreatitis (Lu y col., *J. Organ Dysfunction*, 4, 43-50, 2008) y la prevención de la pérdida de audición (Lynch y col., *Seminars in Hearing*, 30(1), 47-55, 2009), el ebselén debe poder entrar en ensayos clínicos para el trastorno bipolar.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del trastorno bipolar, siendo la Fórmula I:



5

Fórmula I;

en la que:

E es S o Se

y cada uno de los anillos fenilo A y B está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, en los que cada sustituyente se selecciona independientemente de:

- 10 (1) un halógeno, que se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br;
 (2) un alquilo C₁-C₄, tal como un alquilo C₁-C₂, o un alquilo C₁, opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br; y
 (3) un alcoxi C₁-C₄, tal como un alcoxi C₁-C₂, o un alcoxi C₁; opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno, cada uno de los cuales se selecciona preferentemente entre F, Cl y Br.

15 2. Uso de un compuesto de Fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del trastorno bipolar.

3. El compuesto para su uso o el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad del compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrada al paciente o que está presente en el medicamento está en el intervalo de 10 a 2000 mg al día, por ejemplo de 10 a 300 mg al día.

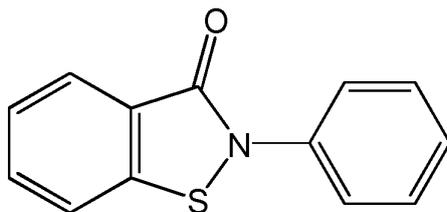
20 4. El compuesto para su uso o el uso de la reivindicación 3, en el que el compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se proporciona en una dosis al día o en más de una dosis al día, por ejemplo dos o tres dosis al día.

25 5. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se usa en combinación con uno o más de otros compuestos que son eficaces para el tratamiento del trastorno bipolar.

6. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el uno o más de otros compuestos se seleccionan entre ácido valproico, lamotrigina, carbamazepina, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables del litio.

30 7. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el compuesto de Fórmula I y el uno o más de otros compuestos eficaces para el tratamiento del trastorno bipolar son para administración simultánea, secuencial o por separado.

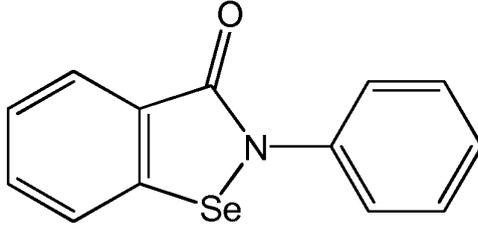
8. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto se selecciona de



(2-fenil-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona)

35

y



(2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2H)-ona o ebselén).

9. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto es el ebselén.

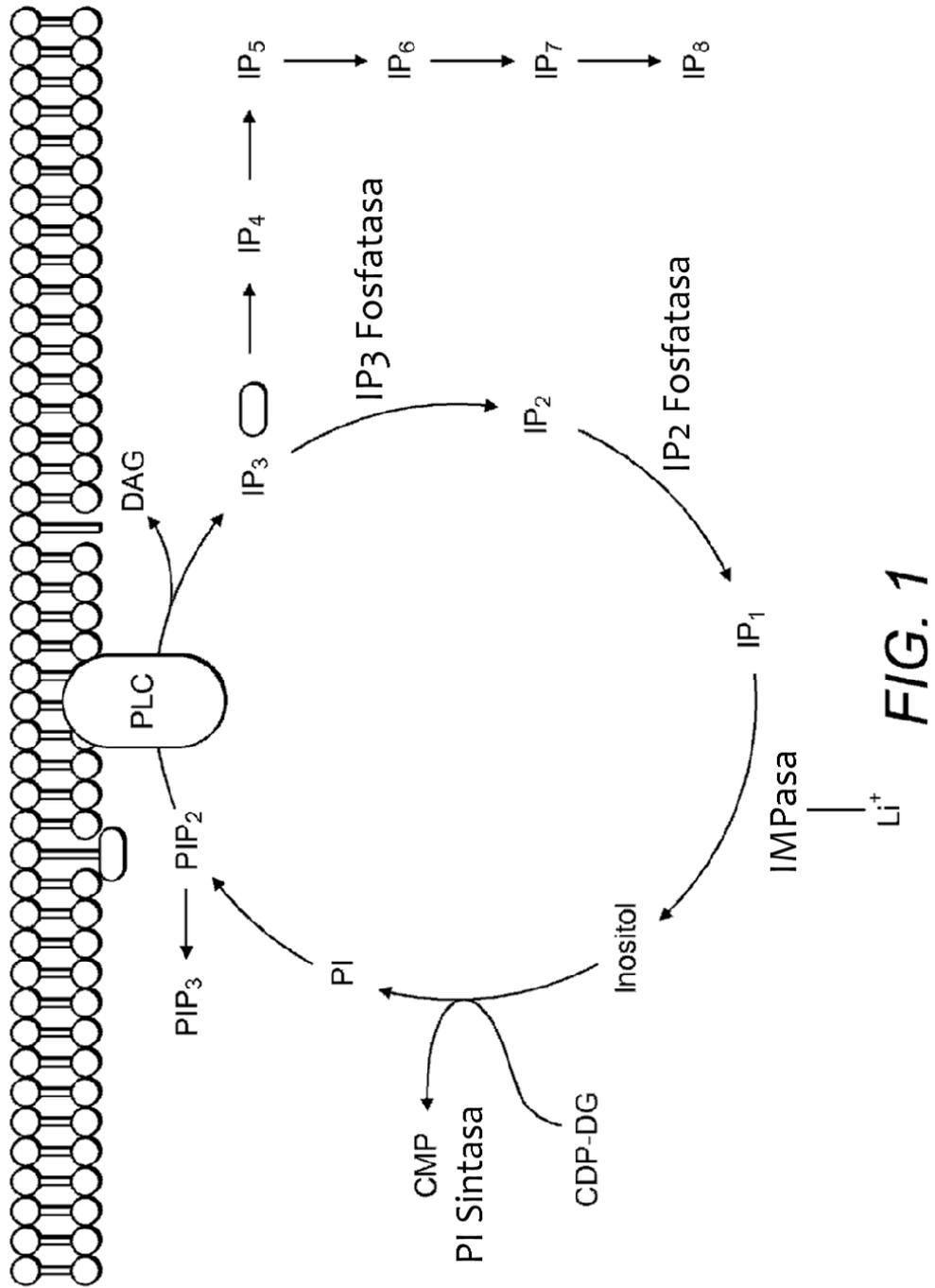


FIG. 1

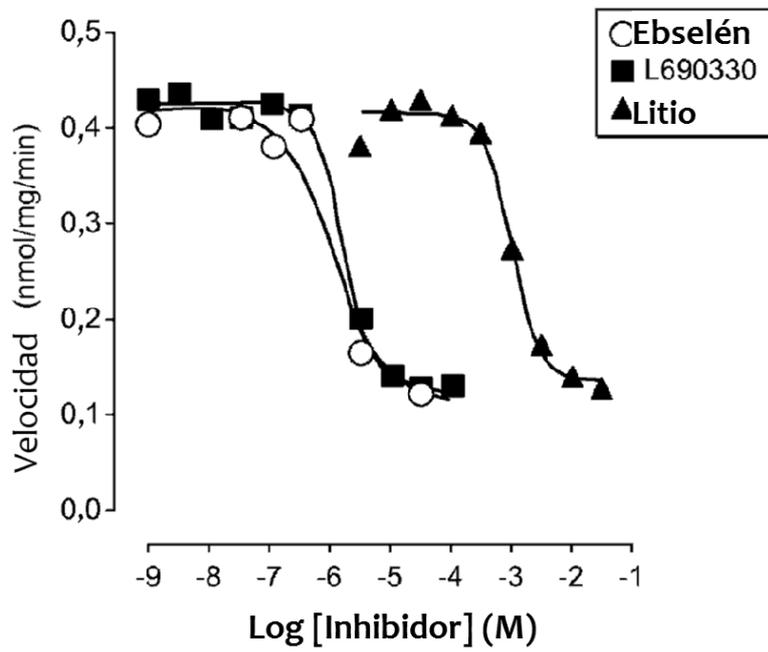


FIG. 2

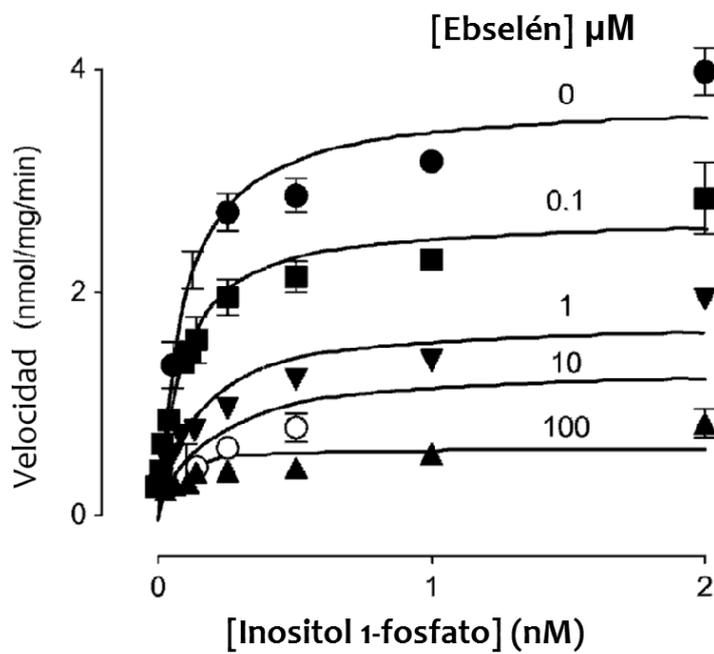


FIG. 3

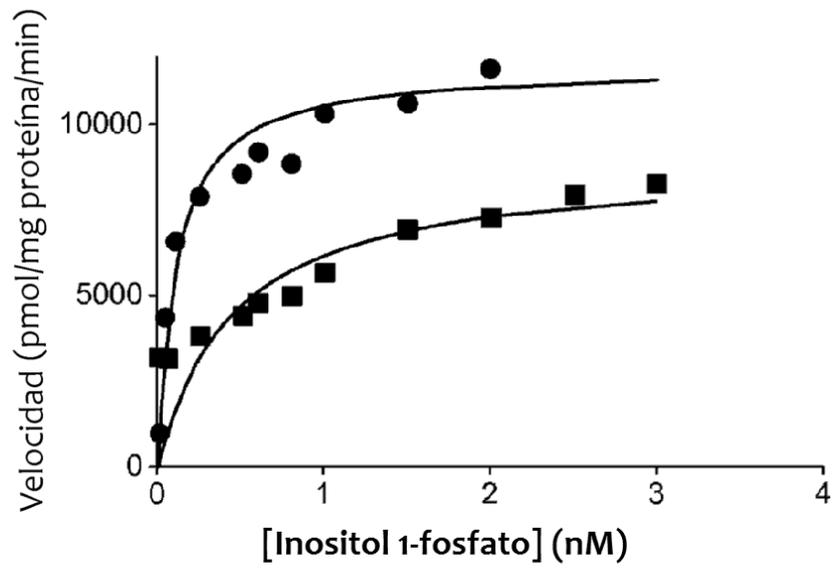


FIG. 4

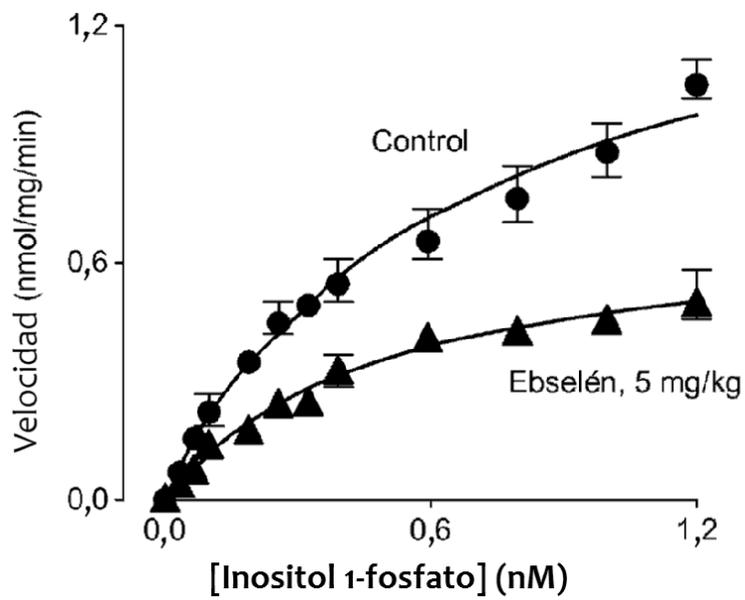


FIG. 5

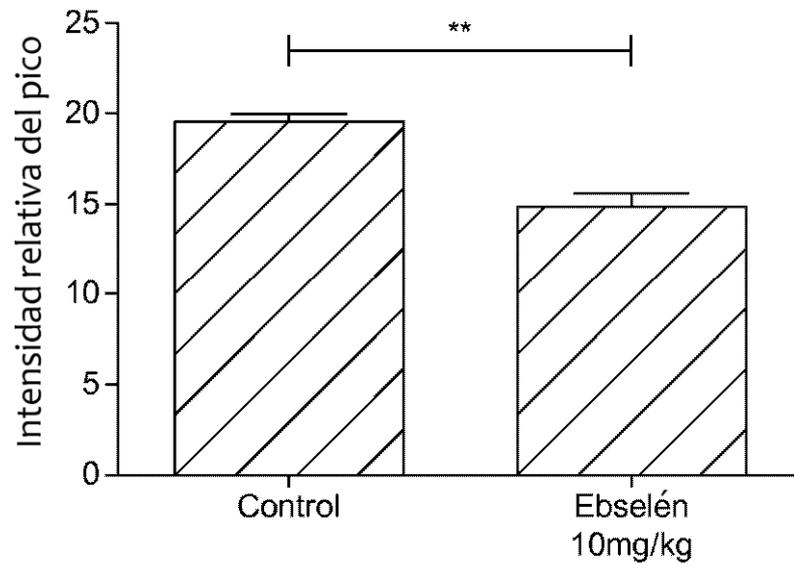


FIG. 6

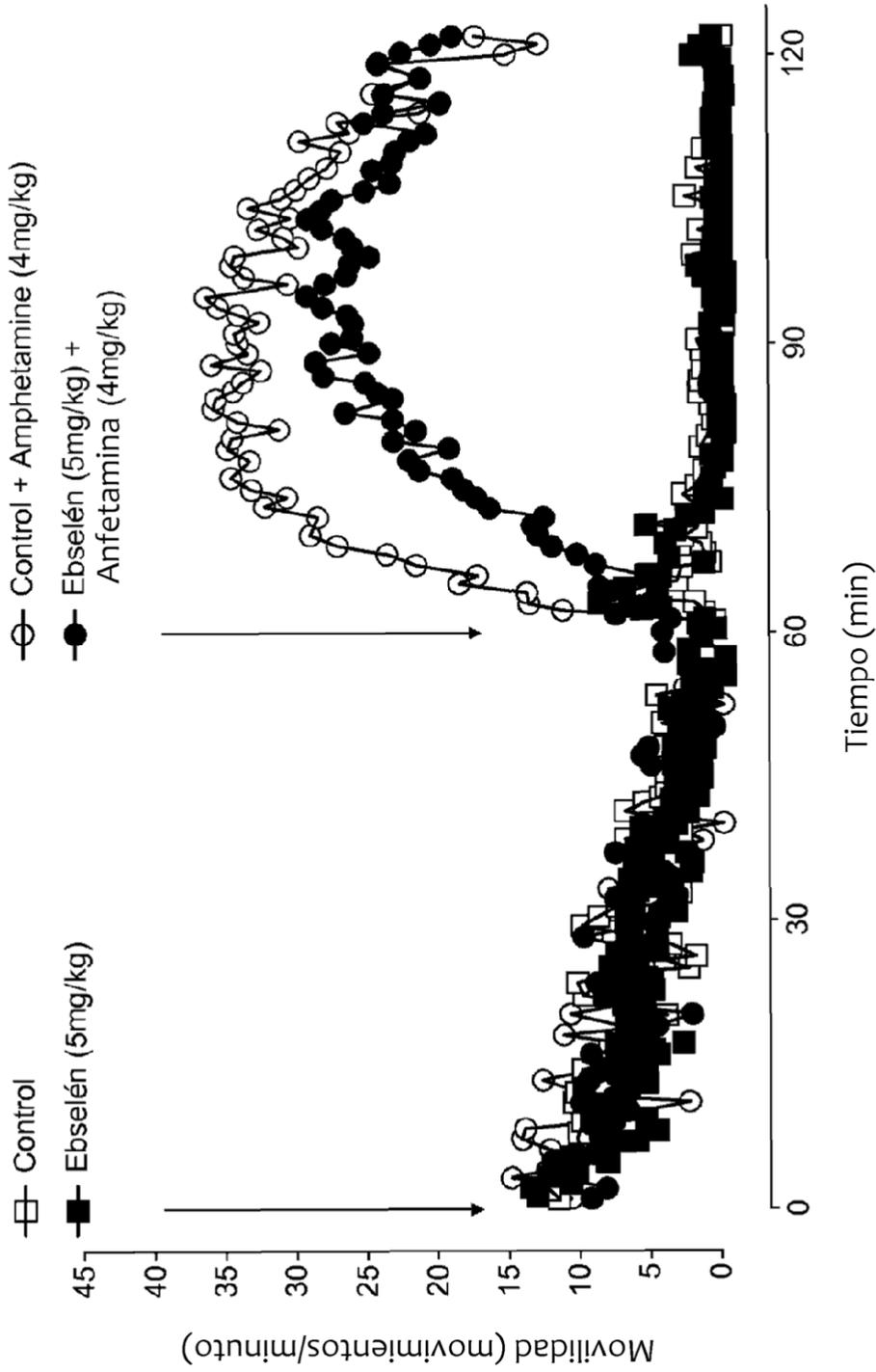


FIG. 7

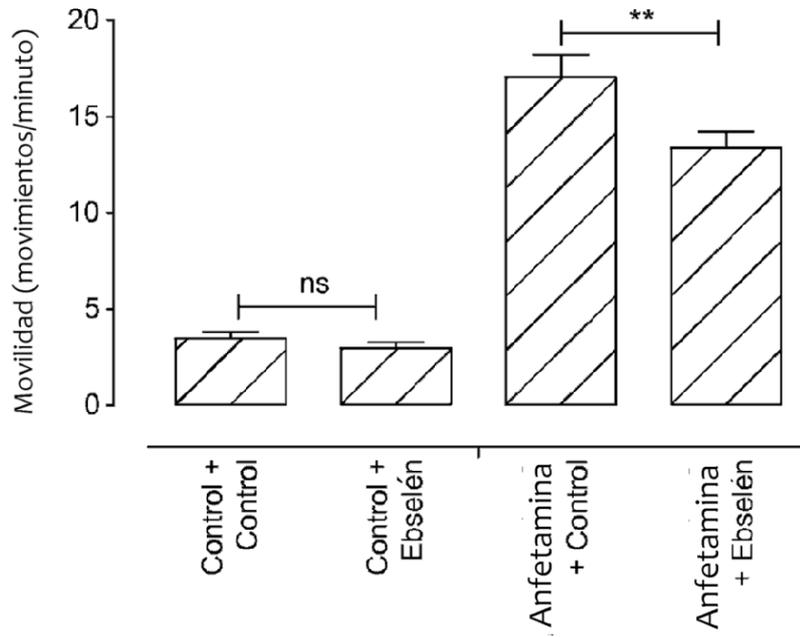


FIG. 8

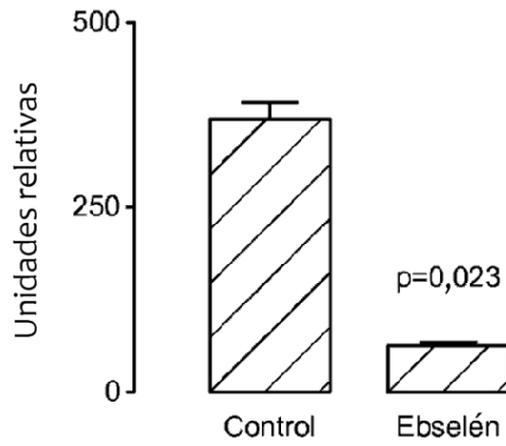


FIG. 9

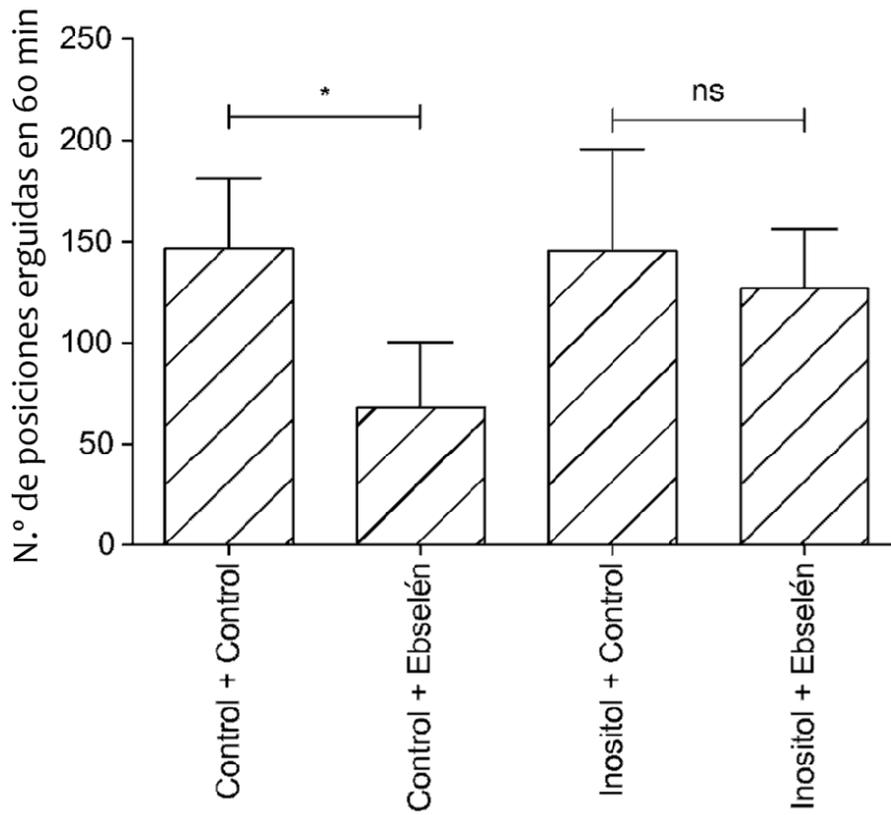


FIG. 10