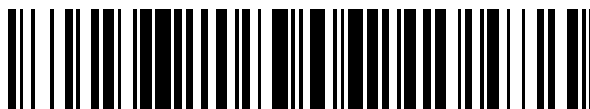


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 853**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011** **E 11827047 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2618826**

54 Título: **Compuestos de fenilpiperidina para el tratamiento de demencia**

30 Prioridad:

20.09.2010 US 384403 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2016

73 Titular/es:

A.CARLSSON RESEARCH AB (100.0%)
Thorild Wulffsgatan 50
413 19 Göteborg, SE

72 Inventor/es:

CARLSSON, LIZZIE MARIA;
KLOBERG, ANGÉLICA;
BURSTEIN, ETHAN S. y
CARLSSON, PER ARVID EMIL

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 579 853 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

Compuestos de fenilpiperidina para el tratamiento de demencia

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de demencia seleccionada del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy.

Antecedentes de la invención

Durante las últimas tres décadas se ha acumulado un considerable conocimiento sobre la farmacología de fenilpiperidinas. En la década de 1980 se preparó [3-(3-hidroxifenil)-N-n-propil]piperidina (= 3PPP) y se describió como un agonista del receptor de dopamina D2/D3. Se encontró que el enantiómero R era un agonista completo y que el enantiómero S era un agonista parcial en estos receptores. Se sometió a prueba este último en pacientes con esquizofrenia así como con Parkinson, y pudo verificarse clínicamente sus propiedades agonistas-antagonistas en receptores de dopamina. Posteriormente, se prepararon moléculas con sustituyentes secuestrantes de electrones que reemplazaban el grupo hidroxilo, y esto condujo a actividades intrínsecas y afinidades inferiores sobre los receptores D2/D3.

El trabajo adicional en este campo se centró en los enantiómeros S, y especialmente el derivado de metilsulfonyl (= OSU6162 o PNU-96391). A pesar de una muy baja actividad intrínseca, que pudo detectarse *in vitro* pero apenas *in vivo*, este compuesto ha conservado un perfil farmacológico reminiscente de un agonista parcial. Por tanto, puede actuar como antagonista y por tanto inhibir el comportamiento en condiciones de alta actividad psicomotora, por ejemplo en ratas expuestas a un entorno novedoso, altamente estimulante, mientras que estimula moderada pero significativamente el comportamiento de animales a los que se les ha dado un tiempo para habituarse a un entorno menos estimulante. Los mecanismos que subyacen a esta acción doble aún no se han aclarado completamente. El componente inhibitor podría deberse bien al antagonismo sobre receptores de dopamina postsinápticos. El mecanismo que subyace al componente estimulador está menos claro, especialmente en vista del hecho de que este efecto no lo comparten agonistas parciales de receptores de dopamina establecidos tales como (-)-3PPP y aripiprazol.

El antagonismo de autorreceptores preferente podría estar implicado pero también se han hecho especulaciones en este contexto sobre supuestos sitios alostéricos en receptores de dopamina o "selectividad funcional". En cualquier caso, los datos de unión *in vitro* e *in vivo* disponibles apoyan alguna clase de mecanismo dopaminérgico, y estos compuestos novedosos se han descrito por tanto como "estabilizadores de receptores de dopamina", que podrían ser útiles en el tratamiento de estados caracterizados por inestabilidad del tono dopaminérgico. Observaciones clínicas tempranas prometedoras en pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esquizofrenia tienden a apoyar esta noción.

En estudios de unión *in vitro* (-)-OSU6162 tiene una afinidad relativamente baja por receptores de dopamina D2/D3 ($K_i = 447$ nM) pero una afinidad incluso inferior para gran número de otros receptores estudiados hasta la fecha en este contexto. En condiciones *in vivo*, incluso dosis relativamente bajas de (-)-OSU6162, tienen la capacidad de unirse a receptores de dopamina, tal como se muestra por el desplazamiento de ligandos selectivos de D2 (por ejemplo racloprida) en el cuerpo estriado. Como ligando dopaminérgico, actúa como antagonista aunque puede demostrarse una baja actividad intrínseca en condiciones *in vitro*. Por tanto, debe suponerse que su modo de acción difiere del de los agonistas parciales de receptores de dopamina, a pesar de su similitud en muchos sentidos con respecto a los perfiles de comportamiento.

Hasta la fecha no se ha hecho mucho trabajo sobre el enantiómero R de OSU6162 o compuestos relacionados. Por ejemplo, en la primera patente que describe estos compuestos, R-(+)-OSU6162, aunque se incluye entre los compuestos reivindicados en la patente, no se había preparado aún. Un año más tarde, en 1995, Sonesson, en su tesis doctoral (Sonesson C (1995) "Arylpiperidine and arylpyrrolidine derivatives with potential antipsychotic efficacy". Thesis, ISBN 91-554-3453-3) describió la preparación de este compuesto y presentó algunos datos sobre sus propiedades farmacológicas. Junto con dos congéneres, asimismo enantiómeros R, se estableció que no inducía ningún cambio en la actividad de comportamiento. El único efecto farmacológico de R-(+)-OSU6162 notificado en la tesis de Sonesson fue un débil aumento en la síntesis de dopamina en el cuerpo estriado del cerebro. Sin embargo, el presente trabajo presentará evidencias bastante contradictorias con respecto a los hallazgos anteriores ya que:

1) R-(+)-OSU6162 muestra fuerte actividad en varios modelos diferentes de comportamiento animal.

2) Ambos enantiómeros de OSU6162 pueden influir en el comportamiento animal, no sólo por medio de un componente dopaminérgico, sino también por medio de un componente serotoninérgico fuerte.

3) Los dos enantiómeros tienen perfiles de comportamiento claramente diferentes que se muestran tanto en ratas como en ratones.

4) Los efectos de comportamiento de ambos enantiómeros de OSU6162 pueden reconciliarse con sus perfiles funcionales de selectividad *in vitro*.

Estos descubrimientos tienen importantes implicaciones para la posible utilidad clínica de ambos compuestos, así como varios de sus congéneres.

El documento WO99/03470 da a conocer 3-fenilpiperidinas sustituidas específicas y análogos de 3-fenilpirrolidina útiles en el tratamiento de trastornos cognitivos.

El documento WO01/46145 da a conocer un compuesto de propilpiperidina sustituida con 4-(3-metilsulfonyl)fenilo para el tratamiento de trastornos en el sistema nervioso central.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de demencia seleccionada del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy, en la que 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma actúa como agonista parcial sobre el receptor de 5-HT. El al menos un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) puede ser del grupo que consiste en los receptores 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆, y 5HT₇, tales como por ejemplo uno o más de los receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1E}, 5HT_{1F}, 5HT_{2A}, 5HT_{2B}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT_{5A}, 5HT₆ y 5HT₇. En una realización, el al menos un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) puede ser un receptor 5HT₂, tal como por ejemplo uno o más del grupo que consiste en los receptores 5HT_{2A}, 5HT_{2B} y 5HT_{2C}, y especialmente los receptores 5HT_{2A} y/o 5HT_{2B}.

El receptor de neurotransmisores monoaminérgicos puede ser uno o más de receptores de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT).

El uno o más de los receptores de neurotransmisores dopaminérgicos puede comprender un receptor de dopamina (receptor de DA). Tal receptor de dopamina puede ser del grupo que consiste en receptores D₁, D₂, D₃, D₄, y D₅. En una realización el receptor de dopamina puede ser un receptor D₂.

La una o más enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos se seleccionan del grupo que consiste en depresión, demencia, disfunciones cognitivas, comportamiento agresivo, trastorno obsesivo-compulsivo con comportamiento impulsivo (OCD) y trastornos de ansiedad.

La enfermedad depresión puede seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en trastornos depresivos recurrentes, depresión clínica, depresión mayor, depresión unipolar y trastornos unipolares.

La enfermedad demencia puede seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy.

Las enfermedades disfunciones cognitivas pueden seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y alcoholismo crónico, envenenamiento por metales pesados, menopausia, fibromialgia, trastornos del estado de ánimo, trastornos de déficit de atención (ADD, ADHD) y trastornos del sueño.

La enfermedad comportamiento impulsivo puede seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en tricotilomanía, trastorno explosivo intermitente, ludopatía, cleptomanía <http://www.forensicpsychiatry.ca/forensic/Criminology/impulse/gambling.htm> y piromanía.

Los trastornos de ansiedad pueden seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en trastorno de pánico, agorafobia, fobia social, fobias, trastorno de ansiedad general, trastorno de estrés postraumático y tensión premenstrual.

Al menos una enfermedad asociada con una necesidad de modulación de al menos un receptor de dopamina puede seleccionarse del grupo que consiste en trastornos neurológicos y psiquiátricos caracterizados por una disfunción del sistema de dopamina.

Tales trastornos neurológicos y psiquiátricos pueden seleccionarse del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Parkinson en estadios tempranos, piernas inquietas, acatisia, distonías, fatiga mental asociada con edad avanzada, accidente cerebrovascular, estados postencefálicos o postraumáticos, trastornos de déficit de

atención (ADHD y ADD), trastornos del espectro autista, pérdidas de conciencia incluyendo narcolepsia, epilepsia de pequeño mal y síncope, trastornos del sueño incluyendo hipersomnia, apnea del sueño, y ataques de sueño inducidos por agonistas de receptores de dopamina, hipofunción de dopamina inducida por fármacos antipsicóticos, síndrome de Tourette y síndrome de fatiga crónica (CFS).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 sobre la actividad motora en ratones pretratados con reserpina.

Figura 2. Efectos de diferentes antagonistas de receptores de monoamina sobre la estimulación locomotora inducida por (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 en ratones pretratados con reserpina.

Figura 3. Efectos de diversas dosis de M100907 sobre la estimulación locomotora inducida por (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 en ratones pretratados con reserpina.

Figura 4. Efectos de inducción locomotora de DOI en ratones pretratados con reserpina.

Figura 5. Efectos de inducción de sacudida de la cabeza de DOI, (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en ratones.

Figura 6. Efectos antagonizantes de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 sobre la respuesta de sacudida de la cabeza inducida por DOI en ratones.

Figura 7. Efectos de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 sobre la actividad motora en ratones.

Figura 8. Efectos de (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 sobre la actividad motora en ratas activas.

Figura 9. Efectos de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 sobre la locomoción en ratas habituadas.

Figura 10. Efecto de haloperidol sobre la estimulación locomotora inducida por a) (-)-OSU6162 y b) (+)-OSU6162 en ratas habituadas.

Figura 11. Efecto de M100907 sobre la estimulación locomotora inducida por a) (-)-OSU6162 y b) (+)-OSU6162 en ratas habituadas.

Figura 12. Ensayos funcionales de R-SAT™ de 5-HT2A.

Figura 13. Ensayos de hidrólisis de fosfatidil inositol (PI) de 5-HT2A.

Figura 14. Ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia de 5-HT2A (BRET2).

Figura 15. Ensayos funcionales de R-SAT™ de D2.

Figura 16. Ensayos de unión de GTPγS de D2.

Figura 17. Ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia de D2 (BRET2).

Figura 18. Antagonismo funcional competitivo de dopamina por (-)-OSU6162.

Descripción detallada de la invención

Antes de que se describa la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales formulaciones, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento sólo es para el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. Debe indicarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, e incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica.

Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento mediante referencia para dar a conocer y describir los métodos y/o materiales específicos en relación con los cuales se mencionan las publicaciones. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Se han definido adicionalmente unas pocas excepciones, tal como se enumeran a continuación, dentro del alcance de la presente invención.

Tal como se usan en el presente documento los términos “agonista” o “agonista de receptor” pretenden significar un compuesto químico que se une a un receptor de una célula y desencadena una respuesta por esa célula. Los agonistas a menudo imitan la acción de una sustancia que se produce de manera natural. Los agonistas completos se unen (tienen afinidad por) y activan un receptor, presentando eficacia completa en ese receptor, mientras que los agonistas parciales también se unen a y activan un receptor dado, pero tienen sólo eficacia parcial en el receptor en relación con un agonista completo. Los agonistas parciales pueden actuar como antagonista competitivo en presencia de un agonista completo, ya que compite con el agonista completo por la ocupación del receptor, produciendo de ese modo una disminución neta en la activación del receptor en comparación con la observada con el agonista completo solo. Un agonista endógeno para un receptor particular es un compuesto producido de manera natural por el huésped que se une a y activa ese receptor.

Tal como se usan en el presente documento los términos “antagonista” o “antagonista de receptor” pretenden significar un ligando de receptor o fármaco que no provoca una respuesta biológica por sí mismo tras la unión a un receptor, sino que bloquea o dificulta respuestas mediadas por agonistas. Los antagonistas tienen afinidad pero no eficacia por sus receptores relacionados, y la unión alterará la interacción e inhibirá la función de un agonista o agonista inverso en los receptores. Los antagonistas median sus efectos mediante la unión al sitio activo o a sitios alostéricos en receptores, o pueden interaccionar en sitios de unión únicos no implicados normalmente en la regulación biológica de la actividad del receptor. La actividad antagonista puede ser reversible o irreversible dependiendo de la longevidad del complejo antagonista-receptor que, a su vez, depende de la naturaleza de la unión antagonista-receptor. Por tanto, los antagonistas de fármacos logran su potencia compitiendo con ligandos o sustratos endógenos en sitios de unión estructuralmente definidos en receptores. Los antagonistas no presentan eficacia para activar los receptores a los que se unen. Sin embargo, una vez unidos, los antagonistas inhiben la función de agonistas, agonistas inversos y agonistas parciales.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “monoaminas” o “neurotransmisores de monoamina” se refieren a neurotransmisores y neuromoduladores que contienen un grupo amino que está conectado a un anillo aromático por una cadena de dos carbonos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Ejemplos de monoaminas son catecolaminas: por ejemplo epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) y dopamina; triptaminas: por ejemplo serotonina y melatonina; y aminorazas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dopamina” (algunas veces abreviado DA) se refiere a un neurotransmisor de catecolamina presente en una amplia variedad de animales, incluyendo tanto vertebrados como invertebrados. En el cerebro, esta fenetilamina sustituida funciona como neurotransmisor, activando los cinco tipos conocidos de receptores de dopamina: D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅ y sus variantes. Además, el término “dopaminérgico” significa relacionado con el neurotransmisor dopamina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “estabilizador de dopamina” pretende significar una sustancia que normaliza la transmisión dopaminérgica en el caso de señalización excesiva o deficiente. Tales fármacos pueden ser útiles para tratar estados que implican tono dopaminérgico tanto aumentado como disminuido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “transportador de dopamina” o “DAT”, se refiere a una proteína que se extiende por la membrana que bombea el neurotransmisor dopamina fuera de la sinapsis de vuelta al citosol. DAT es un cotransportador que desplaza la dopamina a través de la membrana celular acoplado al movimiento al movimiento favorable energéticamente de iones de sodio que se desplazan desde una elevada hasta una baja concentración al interior de la célula. La función de DAT requiere la unión secuencial y el cotransporte de dos iones Na⁺ y un ión Cl⁻ con el sustrato dopamina.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “serotonina” o “5-hidroxitriptamina (5-HT)” se refieren a un neurotransmisor de monoamina. Bioquímicamente derivada del triptófano, la serotonina se encuentra principalmente en el tracto gastrointestinal (GI), las plaquetas y en el sistema nervioso central (SNC) de animales incluyendo seres humanos. Además, el término “serotonérgico” significa relacionado con el neurotransmisor serotonina.

Cuando se usan en el presente documento, los términos “inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina” o “inhibidor de la recaptación específico de serotonina (SSRI)” se refieren a una clase de compuestos normalmente usados como antidepresivos en el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad y algunos trastornos de la personalidad. Se cree que los SSRI aumentan el nivel extracelular del neurotransmisor serotonina inhibiendo su recaptación en la célula presináptica, aumentando el nivel de serotonina en la hendidura sináptica disponible para unirse al receptor postsináptico. Tienen grados variables de selectividad por los otros transportadores de monoamina, teniendo los SSRI puros sólo afinidad débil por el transportador de noradrenalina y dopamina.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “transportador de serotonina” o “SERT”, se refieren a una proteína transportadora de monoamina. Es una proteína integral de la membrana que transporta el neurotransmisor serotonina desde los espacios sinápticos al interior de las neuronas presinápticas. Este transporte de serotonina por la proteína SERT termina la acción de la serotonina y la recicla de una manera dependiente de sodio.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “transportador de norepinefrina” o “NET” se refieren a un transportador de monoamina que transporta los neurotransmisores norepinefrina (noradrenalina) y dopamina desde la sinapsis de vuelta al citosol.

5 El término “receptores adrenérgicos”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a una clase de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G que son dianas de las catecolaminas, especialmente noradrenalina (norepinefrina) y adrenalina (epinefrina). Se incluyen los receptores de noradrenalina y adrenalina.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “sitio ortostérico” pretende significar la región del receptor a la que se une el agonista endógeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sitio alostérico” pretende significar un sitio en un receptor (o una enzima de múltiples subunidades) que no es el sitio de unión del agonista endógeno.

15 Tal como se usa en el presente documento, “actividad intrínseca” o “eficacia” se refieren a la capacidad relativa de un complejo fármaco-receptor para producir una respuesta funcional máxima. Agonistas de alta eficacia pueden producir la respuesta máxima del sistema de receptor al tiempo que ocupan una proporción relativamente baja de los receptores en ese sistema. Los agonistas de eficacia inferior no son tan eficientes en la producción de una respuesta a partir del receptor al que se unió el fármaco, estabilizando la forma activa del receptor al que se unió el fármaco. Por tanto, pueden no ser capaces de producir la misma respuesta máxima, incluso cuando ocupan toda la población de receptores, ya que la eficacia de transformación de la forma inactiva del complejo fármaco-receptor en el complejo fármaco-receptor activo puede no ser lo suficientemente alta para provocar una respuesta máxima.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “mitad de la concentración eficaz máxima” o “CE₅₀” se refiere a la concentración de un fármaco, anticuerpo o agente tóxico que induce una respuesta a mitad de camino entre el nivel inicial y el máximo tras algún tiempo de exposición especificado. Se usa comúnmente como una medida de la potencia del fármaco. La CE₅₀ de una curva de respuesta a la dosis graduada representa por tanto la concentración de un compuesto a la que se observa el 50% de su efecto máximo.

30 Los siguientes fármacos tienen en el contexto de su aplicación los siguientes efectos:

el haloperidol es un antagonista del receptor de DA D₂ selectivo;

M100907 es un antagonista del receptor 5-HT_{2A} selectivo;

35 la racloprida es un antagonista del receptor de DA D₂ selectivo;

la reserpina media en el agotamiento de neurotransmisores de monoamina de células nerviosas monoaminérgicas del sistema nervioso central y periférico. Actúa bloqueando el transportador de monoamina vesicular VMAT que transporta normalmente norepinefrina, serotonina y dopamina libres desde el citoplasma de la terminación nerviosa presináptica al interior de vesículas de almacenamiento para su liberación posterior a la hendidura sináptica;

40 SCH23390 es un antagonista del receptor de DA D₁ selectivo y tiene efectos o bien mínimos o bien insignificantes sobre el receptor D₂;

45 SCH39166 es un antagonista del receptor de DA D₁ selectivo;

DOI (dimetoxianfetamina) es un agonista de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. Sus efectos psicodélicos están mediados por sus propiedades agonistas en el receptor 5-HT_{2A};

50 NDMC (N-desmetilclozapina) actúa como un agonista parcial débil en los receptores D₂/D₃;

el aripiprazol actúa como agonista parcial de D₂. El aripiprazol es también un agonista parcial en el receptor 5-HT_{1A}, y como los otros antipsicóticos atípicos presenta un perfil antagonista en el receptor 5-HT_{2A}. También antagoniza el receptor 5-HT₇ y actúa como agonista parcial en el receptor 5-HT_{2C}, ambos con alta afinidad;

el bifeprunox combina agonismo del receptor D₂ mínimo con agonismo del receptor de 5-HT;

(-)-3-PPP es un agonista parcial de D₂;

60 el pramipexol actúa como agonista parcial/completo en los siguientes receptores: receptor D_{2S}, receptor D_{2L}, receptor D₃, receptor D₄. El pramipexol también presenta afinidad baja/insignificante para los receptores adrenérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y α₂;

65 el roxindol actúa como agonista en los receptores D₂, D₃, D₄ y 5HT_{1A}, pero se ha notificado que también actúa como antagonista del receptor 5-HT_{2A};

la pergolida funciona como agonista en los receptores de dopamina D₂, D₁ y serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C};

5 el talipexol es un agonista completo de D₂;

el quinelorano es un agonista completo de D₂;

10 el ropinirol actúa como agonista de los receptores de dopamina D₂, D₃ y D₄ con la mayor afinidad por D₃. Es débilmente activo en los receptores 5-HT₂ y α_2 y se dice que prácticamente no tiene afinidad por los receptores 5-HT₁, de benzodiazepina, de GABA, muscarínicos, receptores adrenérgicos α_1 y β ;

la desipramina inhibe la recaptación de norepinefrina y en un menor grado de serotonina;

15 la amoxapina es un inhibidor fuerte de la recaptación de norepinefrina y un inhibidor débil de la recaptación de serotonina. También presenta acciones antiadrenérgicas, anticolinérgicas, antidopaminérgicas, antihistamínicas y antiserotonérgicas;

20 la fluoxetina es un antidepresivo de la clase de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI);

el bupropión actúa como inhibidor de la recaptación de norepinefrina y antagonista del receptor de acetilcolina nicotínico;

25 la indatralina es un inhibidor del transportador de monoamina no selectivo que se ha mostrado que bloquea la recaptación de dopamina, norepinefrina y serotonina;

se cree que el mazindol actúa como inhibidor de la recaptación de norepinefrina. Además, inhibe la recaptación de dopamina y serotonina;

30 la tergurida (INN) es un agonista de dopamina;

el quinpirol actúa como agonista selectivo de los receptores D₂ y D₃.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "ratones sin tratamiento previo con fármaco" se refiere a ratones no tratados previamente con un fármaco.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "ratones empobrecidos en monoamina" pretende significar ratones cuyas reservas monoaminérgicas se han empobrecido inyectando reserpina por vía intraperitoneal (i.p.) como pretratamiento antes de un registro de actividad. Tras tal tratamiento, los ratones presentan normalmente movilidad fuertemente reducida y estado de vigilia.

Animales con "baja actividad" son ratas o ratones a los que se les ha dado tiempo para que se habitúen a un entorno menos estimulante.

45 Animales con "alta actividad" son ratas o ratones expuestos a un entorno novedoso, altamente estimulante. El término "sujeto" incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos, animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos, mamíferos domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende incluir sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean masculinos o femeninos. En realizaciones preferidas, el sujeto es un mamífero, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos. En la realización más preferida, el sujeto es un ser humano.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la prevención, remediación, mejora intentadas y la prevención de la recaída de un problema de salud en un sujeto, habitualmente tras un diagnóstico.

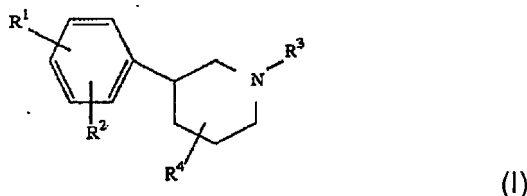
55 La invención se describirá ahora en más detalle. Sin embargo, las realizaciones descritas mencionadas a continuación se facilitan sólo como ejemplos y no deben ser limitantes para la presente invención. Otras soluciones, usos, objetivos y funciones dentro del alcance de la invención tal como se reivindica en las reivindicaciones de la patente descritas más adelante deben ser evidentes para el experto en la técnica.

60 De manera más precisa, la presente invención se refiere a 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de demencia seleccionada del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy, en la que 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma actúa como agonista parcial sobre el receptor de

5-HT.

También se da a conocer en el presente documento el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

5 compuestos de fórmula I



10 en la que:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H (siempre que no más de uno de R^1 y R^2 sea H), CONH_2 , OH, CN, CH_2CN , OSO_2CH_3 , OSO_2CF_3 , SSO_2CF_3 , COR, SO_xCH_3 (en donde x es 0-2), SO_xCF_3 , $\text{O}(\text{CH}_2)_x\text{CF}_3$, $\text{OSO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{CH}=\text{NOR}$, COCOOR , $\text{COCOON}(\text{R})_2$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, NRSO_2CF_3 , fenilo en la posición 2, 3 ó 4, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, N-pirrolinilo, triazolilo, tetrazolilo de piridinilo;

R^3 es hidrógeno, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, cicloalquil $\text{C}_4\text{-C}_9$ -metilo, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o CH_2SCH_3 ,

20 R^4 y R se seleccionan independientemente de hidrógeno, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{CF}_3$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, cicloalquil $\text{C}_4\text{-C}_9$ -metilo, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o $-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^5$ en donde m es 1-8;

25 R^5 es fenilo, fenilo sustituido con sustituyente CN, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, cicloalquil $\text{C}_4\text{-C}_9$ -metilo, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_8$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, 2-tiofenilo, 3-tiofenilo, $-\text{NR}^6\text{CONR}^6\text{R}^7$ o $-\text{CONR}^6\text{R}^7$; y

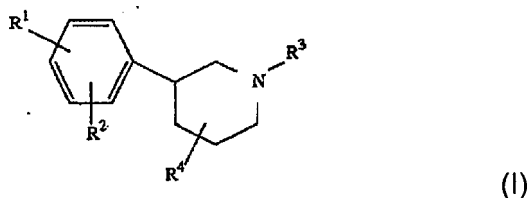
R^6 y R^7 son independientemente H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, cicloalquil $\text{C}_4\text{-C}_9$ -metilo, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_8$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_8$,

30 o una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de los mismos;

para el tratamiento y/o la prevención de una o más enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, caracterizadas porque al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos con una necesidad de modulación es un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT), y porque dicho compuesto de fórmula I actúa como agonista parcial sobre el uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos.

También se da a conocer en el presente documento el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

40 compuestos de fórmula I



45 en la que:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H (siempre que no más de uno de R^1 y R^2 sea H), CONH_2 , OH, CN, CH_2CN , OSO_2CH_3 , OSO_2CF_3 , SSO_2CF_3 , COR, SO_xCH_3 (en donde x es 0-2), SO_xCF_3 , $\text{O}(\text{CH}_2)_x\text{CF}_3$, $\text{OSO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{CH}=\text{NOR}$, COCOOR , $\text{COCOON}(\text{R})_2$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, NRSO_2CF_3 , fenilo en la posición 2, 3 ó 4, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, N-pirrolinilo, triazolilo, tetrazolilo de piridinilo;

50 R^3 es hidrógeno, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$, cicloalquil $\text{C}_4\text{-C}_9$ -metilo, alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_8$, 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o CH_2SCH_3 ,

R^4 y R se seleccionan independientemente de hidrógeno, $CF_3CH_2CF_3$, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o $-(CH_2)_m-R^5$ en donde m es 1-8;

5 R^5 es fenilo, fenilo sustituido con sustituyente CN, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 o alquinilo C_2-C_8 , 2-tiofenilo, 3-tiofenilo, $-NR^6CONR^6R^7$ o $-CONR^6R^7$; y

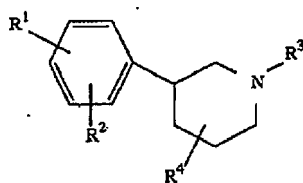
R^6 y R^7 son independientemente H, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 o alquinilo C_2-C_8 ,

10 o una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de los mismos;

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una o más enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, caracterizadas porque al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos con una necesidad de modulación es un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT), y porque dicho compuesto de fórmula I actúa como agonista parcial sobre el uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos.

Además, se da a conocer en el presente documento un método de tratamiento y/o prevención de al menos una enfermedad en un sujeto, estando asociada dicha enfermedad con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, caracterizada porque al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos con una necesidad de modulación es un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT), y porque dicho compuesto de fórmula I actúa como agonista parcial sobre el uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

compuestos de fórmula I



(I)

en la que:

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H (siempre que no más de uno de R^1 y R^2 sea H), $CONH_2$, OH, CN, CH_2CN , OSO_2CH_3 , OSO_2CF_3 , SSO_2CF_3 , COR, SO_xCH_3 (en donde x es 0-2), SO_xCF_3 , $O(CH_2)_xCF_3$, $OSO_2N(R)_2$, $CH=NOR$, $COCOOR$, $COCOON(R)_2$, cicloalquilo C_3-8 , $NRSO_2CF_3$, fenilo en la posición 2, 3 ó 4, tienilo, furilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, N-pirrolinilo, triazolilo, tetrazolilo de piridinilo;

R^3 es hidrógeno, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o CH_2SCH_3 ,

R^4 y R se seleccionan independientemente de hidrógeno, $CF_3CH_2CF_3$, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , 3,3,3-trifluoropropilo, 4,4,4-trifluorobutilo o $-(CH_2)_m-R^5$ en donde m es 1-8;

R^5 es fenilo, fenilo sustituido con sustituyente CN, CF_3 , CH_2CF_3 , alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 o alquinilo C_2-C_8 , 2-tiofenilo, 3-tiofenilo, $-NR^6CONR^6R^7$ o $-CONR^6R^7$; y

R^6 y R^7 son independientemente H, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquil C_4-C_9 -metilo, alquenilo C_2-C_8 o alquinilo C_2-C_8 ,

o una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de los mismos; a un sujeto que lo necesita.

La patente estadounidense 5.462.947, más específicamente en la columna 7, líneas 26-28 y los ejemplos, da a conocer cómo pueden obtenerse los compuestos de fórmula I. Es importante indicar que los compuestos de la presente invención también abarcan cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo compuesto. Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la invención es, por ejemplo, una sal de adición de ácido de un compuesto de la invención que sea suficientemente básico, por ejemplo, una sal de adición de ácido con, por ejemplo, un ácido orgánico o inorgánico, por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, metansulfónico, sulfúrico, fosfórico, trifluoroacético, para-toluenosulfónico, 2-mesitilensulfónico, cítrico, acético, tartárico, fumárico, láctico, succínico, málico, malónico, maleico, 1,2-etanodisulfónico, adipico, aspártico, bencenosulfónico, benzoico,

etanosulfónico o nicotínico. Además, una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la invención es, por ejemplo, una sal de adición de base de un compuesto de la invención que sea suficientemente ácido, por ejemplo, una sal de metal, por ejemplo, sal de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc o aluminio, una sal de amonio, una sal con una base orgánica que proporciona un catión fisiológicamente aceptable, que incluye hidróxidos de amonio cuaternario, por ejemplo metilamina, etilamina, dietilamina, trimetilamina, terc-butilamina, trietilamina, dibencilamina, N,N-dibenciletilamina, ciclohexiletilamina, tris-(2-hidroxietil)amina, hidroxietildietilamina, (1R,2S)-2-hidroxiinden-1-amina, morfolina, N-metilpiperidina, N-etilpiperidina, piperazina, metilpiperazina, adamantilamina, hidróxido de colina, hidróxido de tetrabutilamonio, hidróxido de tris-(hidroximetil)metilamina, L-arginina, N-metil-D-glucamina, lisina o arginina.

Determinados compuestos de la presente invención pueden existir como tautómeros o estereoisómeros (por ejemplo racemato, enantiómero, diastereómero o isómero E o Z). Debe entenderse que la presente invención abarca todos estos tautómeros o estereoisómeros. Además, determinados compuestos de la presente invención pueden existir como solvatos o hidratos. Debe entenderse que la presente invención abarca todos estos solvatos o hidratos.

Dichos compuestos de fórmula I pueden usarse para el tratamiento y/o la prevención de una o más enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, caracterizadas porque al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos con una necesidad de modulación es un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT), y porque dicho compuesto de fórmula I actúa como agonista parcial sobre el uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor de neurotransmisores monoaminérgicos" se refiere a un grupo de receptores unidos a proteína G expresados sobre la superficie de células postsinápticas unidas indirectamente a canales iónicos, por medio de un sistema de segundo mensajero que implica proteínas G y adenilato ciclasa. También se expresan sobre células presinápticas para proporcionar mecanismos de retroalimentación y atenuar la liberación excesiva de neurotransmisor. La unión de un ligando a su receptor de neurotransmisor específico puede dar como resultado la activación de una miríada de rutas de transducción de señales y la modulación de la homeostasis de canales iónicos. Los ejemplos de receptores de neurotransmisores monoaminérgicos incluyen los receptores de dopamina: D1, D2, D3, D4 y D5; los receptores de serotonina (5-HT): 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇; los receptores adrenérgicos, es decir los receptores de noradrenalina: alfa1, alfa 2, beta 1, beta2 y beta3 y los receptores de acetilcolina: M1, M2, M3, M4, NM y NN.

Al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos que necesita modulación es un receptor de 5-hidroxitriptamina. El término "receptor de 5-hidroxitriptamina" (también receptor de 5-HT) o "receptor de serotonina" se refiere a un grupo especial de receptores acoplados a proteína G (GPCR) y canales iónicos activados por ligando (LGIC) que se encuentran en los sistemas nerviosos central y periférico. Median en la neurotransmisión tanto excitatoria como inhibitoria. Los receptores de serotonina se activan por el neurotransmisor serotonina, que actúa como su ligando natural. Los receptores de serotonina modulan la liberación de neurotransmisores, tales como glutamato, GABA, dopamina, epinefrina / norepinefrina y acetilcolina, así como muchas hormonas, incluyendo oxitocina, prolactina, vasopresina, cortisol, corticotropina y sustancia P, entre otros. Los receptores de serotonina influyen en diversos procesos biológicos y neurológicos o enfermedades tales como agresión, ansiedad, apetito, cognición, demencia, depresión, aprendizaje, comportamiento impulsivo, memoria, estado de ánimo, náuseas, sueño y termorregulación. Por tanto, en el presente documento se da a conocer el uso de un compuesto con fórmula I para el tratamiento y/o la prevención de al menos uno de dichos procesos biológicos y neurológicos o enfermedades cuando están asociados con una necesidad de modulación de al menos un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) que influye en dichos procesos biológicos y neurológicos o enfermedades.

Los compuestos de fórmula I actúan como agonistas parciales sobre los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos. Los agonistas parciales también se unen a y activan un receptor dado, pero tienen sólo eficacia parcial en el receptor en relación con un agonista completo. Los agonistas parciales pueden actuar como antagonista competitivo en presencia de un agonista completo, ya que compiten con el agonista completo por la ocupación del receptor, produciendo de ese modo una disminución neta en la activación del receptor en comparación con la observada con el agonista completo solo. El agonista endógeno para el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) es serotonina que se produce de manera natural por el huésped y se une a y activa este receptor.

Al menos uno de los receptores de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos que necesita modulación es del grupo que consiste en los receptores 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆ y 5HT₇, es decir más específicamente uno o más de los receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1E}, 5HT_{1F}, 5HT_{2A}, 5HT_{2B}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT_{5A}, 5HT₆ y 5HT₇. De manera más específica, especialmente los receptores 5-HT₂, es decir los receptores 5HT_{2A}, 5HT_{2B}, 5HT_{2C} se modulan ventajosamente en la presente invención. Debe indicarse que el uso de un compuesto de fórmula I puede incluir la modulación de más un receptor de 5-HT, es decir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más de los receptores de 5-hidroxitriptamina enumerados anteriormente pueden modularse simultáneamente. También se contempla que todos los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos que necesitan modulación para una enfermedad particular sean del tipo de receptor de 5-hidroxitriptamina sólo. Sin embargo, también en tales situaciones puede modularse simultáneamente

más de un receptor de 5-HT tal como se enumeró anteriormente.

Algunas enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de al menos un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) pueden requerir la modulación adicional de un tipo adicional de receptor de neurotransmisores monoaminérgicos, tal como por ejemplo los receptores de dopamina. Cuando se usa en el presente documento el término “receptor de dopamina” se refiere a una clase de receptores acoplados a proteína G metabotrópicos que son relevantes en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados. El neurotransmisor dopamina es el ligando endógeno primario para receptores de dopamina. Los receptores de dopamina están implicados en muchos procesos neurológicos, incluyendo motivación, placer, cognición, memoria, aprendizaje y control motor fino, así como en la modulación de la señalización neuroendocrina. Hay al menos cinco subtipos de receptores de dopamina, D₁, D₂, D₃, D₄ y D₅, todos los cuales se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Los receptores D₁ y D₅ son miembros de la familia similar a D₁ de receptores de dopamina, mientras que los receptores D₂, D₃ y D₄ son miembros de la familia similar a D₂. Los compuestos de fórmula I actúan como agonistas parciales sobre los receptores de dopamina.

Esta al menos una enfermedad asociada con una necesidad de modulación de uno o más receptores de neurotransmisores monoaminérgicos, en la que al menos uno de los receptores de neurotransmisores monoaminérgicos es un receptor de 5-HT, puede seleccionarse del grupo que consiste en depresión, demencia, disfunciones cognitivas, comportamiento agresivo, comportamiento impulsivo, trastornos obsesivos-compulsivos (OCD) y trastornos de ansiedad.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “depresión” pretende incluir cualquier trastorno mental caracterizado por un bajo estado de ánimo global acompañado por baja autoestima, y por pérdida de interés o placer en actividades normalmente placenteras. En la expresión se incluyen trastornos depresivos recurrentes, depresión clínica, depresión mayor, depresión unipolar o trastornos unipolares.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión “demencia” se refiere a una pérdida grave de capacidad cognitiva en una persona sin alteraciones previas, más allá de lo que podría esperarse del envejecimiento normal. Puede ser estática, el resultado de una lesión cerebral global única, o progresiva, dando como resultado un deterioro a largo plazo debido a daño o enfermedad en el organismo. Algunas de las formas más comunes de demencia son: enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy.

Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson tanto la depresión como la demencia son comunes y responden sólo parcialmente al tratamiento con fármacos dopaminérgicos. En la enfermedad de Parkinson, se reconoce bien una pérdida de neuronas serotoninérgicas en el cerebro, además de neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Mientras que se usan de manera amplia y satisfactoria fármacos serotoninérgicos, especialmente inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) en diversas formas de depresión, su eficacia en pacientes con Parkinson deprimidos no se ha demostrado claramente. Esto podría deberse a la pérdida de neuronas serotoninérgicas en los cerebros de pacientes con Parkinson, y por tanto de las dianas para SSRI, es decir, los transportadores de recaptación de dopamina. Se propone por tanto que los agonistas de receptores de 5-HT tales como los de la presente invención demostrarán su utilidad en el tratamiento de depresión de diversas clases, y especialmente en casos en los que se han producido pérdidas sustanciales de neuronas de serotonina, tales como en pacientes con Parkinson. Se admite que los agonistas receptores de 5-HT₂ casi completos, por ejemplo LSD y DOI, son fuertes activadores de diversas funciones mentales pero generalmente no son adecuados como agentes terapéuticos en vista de sus actividades alucinógenas y psicogénicas. Por otro lado, un agonista de serotonina parcial que se ha mostrado que carece de tales efectos secundarios incluso en alta dosificación, por ejemplo (-)-OSU6162, demostrará su utilidad en este contexto. Por tanto, al compensar la pérdida de las funciones tanto de dopamina como serotonina que se producen en la enfermedad de Parkinson, un compuesto de este tipo debe demostrar su utilidad para aliviar no sólo la disfunción motora sino también algunas de las disfunciones mentales al menos igualmente importantes que se producen en este trastorno, incluyendo depresión y demencia.

Desde hace mucho tiempo se sabe que se produce una reducción del nivel de serotonina en los cerebros de pacientes con demencia de tipo Alzheimer. También se han demostrado reducciones de los niveles de acetilcolina (tal como se indica por la colina acetilasa), norepinefrina y dopamina. Se ha encontrado que el tratamiento con fármacos colinérgicos (como inhibidores de acetilcolina esterasa) alivia la demencia en este trastorno, aunque no hay mucho espacio para una mejora adicional. Se ha sugerido que una mezcla de agonistas colinérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos podría conducir a una mayor mejora que cada agonista administrado por separado. Sin embargo, la disponibilidad de agonistas serotoninérgicos adecuados ha sido limitada hasta la fecha. Se propone por tanto que los compuestos de la presente invención demostrarán su utilidad en el tratamiento de demencia y disfunciones cognitivas de diferentes tipos, tales como en enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, o en alcoholismo crónico (en donde se han encontrado cambios similares a los encontrados en la enfermedad de Alzheimer, o bien cuando se administran solos o bien en combinación con otros potenciadores cognitivos).

Con respecto al papel de la deficiencia de serotonina para la fisiopatología de la demencia, se ha encontrado una

correlación negativa estadísticamente significativa entre el nivel de serotonina en la corteza cerebral frontal, medida *post mortem*, y la tasa de deterioro cognitivo en el año que precede a la muerte.

Además, se ha informado un sólido apoyo al papel fisiológico de receptores 5-HT_{2A} en la memoria de trabajo. Se encontró que la estimulación del receptor 5-HT_{2A} facilita el proceso mnemónico que se produce en las células piramidales prefrontales de macaco que participan en la memoria de trabajo espacial. Este efecto facilitador pudo demostrarse tras la aplicación iontoforética de 5-HT o su derivado alfa-metilado sobre las células, y el efecto pudo antagonizarse por el antagonista de 5-HT_{2A} selectivo M100907.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “disfunciones cognitivas” se refiere a un estado de función mental inusualmente mala, asociada con confusión, mala memoria y dificultad para concentrarse. Varios estados y tratamientos médicos o psiquiátricos pueden provocar tales síntomas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y alcoholismo crónico, envenenamiento por metales pesados (en particular envenenamiento por mercurio), menopausia, fibromialgia, trastornos del estado de ánimo, ADHD y trastornos del sueño.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión “comportamiento agresivo” se refiere a un comportamiento entre miembros de la misma especie que pretende provocar humillación, dolor o daño. Además, cuando se usa en el presente documento la expresión “comportamiento impulsivo”, se refiere a la incapacidad de resistir un comportamiento o acto impulsivo que puede ser perjudicial para sí mismo u otros. Un acto o comportamiento impulsivo se considera que es uno que no está premeditado o no se consideró de antemano y uno sobre el que el individuo no tiene o apenas tiene control. El comportamiento impulsivo puede incluir los trastornos tricotilomanía, trastorno explosivo intermitente, ludopatía, cleptomanía <http://www.forensicpsychiatry.ca/forensic/Criminology/impulse/gambling.htm> y/o piromanía. Evidencias considerables apoyan la consideración de que el comportamiento agresivo, así como la impulsividad, se estimulan por la hipofunción de serotonina únicamente, pero especialmente por la aparición simultánea de hiperfunción de dopamina e hipofunción de serotonina. Puede predecirse por tanto que los compuestos de la presente invención son útiles en la prevención y el tratamiento del comportamiento agresivo, dada su capacidad para contrarrestar ambas de estas aberraciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno obsesivo-compulsivo (OCD)” se refiere a un trastorno de ansiedad caracterizado por pensamientos intrusivos que producen inquietud, aprensión, miedo o preocupación, por comportamientos repetitivos dirigidos a reducir la ansiedad asociada, o por una combinación de tales obsesiones y compulsiones. Los síntomas del trastorno incluyen lavarse o limpiar excesivamente; realizar comprobaciones repetidamente; acaparamiento extremo; preocupación con pensamientos sexuales, violentos o religiosos; aversión a números particulares; y rituales nerviosos, tales como abrir y cerrar una puerta un determinado número de veces antes de entrar o salir de una habitación.

Varios informes han descrito efectos beneficiosos de los agonistas del receptor 5-HT_{2A}(C) LSD, mescalina, psilocina, psilocibina y cactus peyote en OCD. También apoya la importancia de los receptores 5-HT_{2A}(C) en el contexto de OCD el creciente número de informes que describen una propensión de la clozapina, un antagonista del receptor 5-HT_{2A}/C, a producir, desenmascarar o exacerbar los síntomas de OCD en sujetos esquizofrénicos. Además, ha habido informes de efectos de desenmascaramiento o empeoramiento de risperidona, un antagonista del receptor 5-HT_{2A}/DA D₂, con respecto a síntomas de OCD en psicosis. Se han notificado posteriormente efectos similares con varios otros antipsicóticos de segunda generación que presentan un mayor bloqueo del receptor 5-HT₂ frente a DA D₂ relativo que los neuroleptícos clásicos. Estos estudios subrayan el supuesto papel de los receptores 5-HT_{2A} en OCD. Dados los datos resumidos anteriormente, los agonistas parciales del receptor HT_{2A}(C) deben demostrar que son beneficiosos en el tratamiento de OCD, siempre que carezcan de propiedades alucinógenas pero que todavía conserven una actividad intrínseca suficiente para aliviar síntomas de OCD. (-)-OSU6162 parece satisfacer estos criterios puesto que se ha encontrado que no es un alucinógeno incluso en alta dosificación a pesar de un grado significativo de actividad intrínseca, tal como se evidencia por los datos *in vitro* e *in vivo* presentados en la presente invención.

Con respecto a otros trastornos de ansiedad, por ejemplo trastorno de pánico, trastornos de estrés postraumático, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada y tensión premenstrual, es probable que respondan al tratamiento con los compuestos de la presente invención, dada su receptividad a SSRI y otros fármacos que pueden apoyar funciones serotoninérgicas insuficientes.

Las siguientes enfermedades asociadas con una necesidad de modulación de al menos un receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) pueden requerir la modulación de un tipo adicional de receptor de neurotransmisores monoaminérgicos, tal como los receptores de dopamina. Los trastornos neurológicos y psiquiátricos pueden caracterizarse por una disfunción del sistema de dopamina así como el sistema de serotonina. Los trastornos neurológicos y psiquiátricos pueden seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson en estadios tempranos; piernas inquietas; acatisia; distonías; fatiga mental asociada con edad avanzada, accidente cerebrovascular, estados postencefálicos o postraumáticos; trastornos de déficit de atención (ADD y ADHD); trastornos del espectro autista; pérdidas de conciencia incluyendo narcolepsia, epilepsia de pequeño mal y

síncope; trastornos del sueño incluyendo hipersomnia, apnea del sueño y ataques de sueño inducidos por agonistas de receptores de dopamina, hipofunción de dopamina inducida por fármacos antipsicóticos, síndrome de Tourette y síndrome de fatiga crónica (CFS).

5 El compuesto utilizado en la presente invención puede ser 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma. También se dan a conocer en el presente documento (3S)-3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina, (3R)-3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

10 También se dan a conocer en el presente documento 3-(3-cianofenil)-1-propilpiperidina, (3S)-3-(3-cianofenil)-1-propilpiperidina, (3R)-3-(3-cianofenil)-1-propilpiperidina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

La estimulación psicomotora dependiente de serotonina significativamente más fuerte por la forma (+) en comparación con la forma (-) de OSU6162 en ratones empobrecidos en monoamina (véase por ejemplo la figura 1, más adelante), sugiere que las formas (+), es decir (3R)-3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina y/o (3R)-3-(3-cianofenil)-1-propilpiperidina o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas tendrán un efecto terapéutico más fuerte que la forma (-) sobre la demencia y la depresión, especialmente en estados neurodegenerativos caracterizados por pérdida de serotonina, tales como enfermedad de Parkinson y demencia.

20 El compuesto de fórmula I puede formularse para administración apropiada a un sujeto.

Oral/bucal/sublingual

Para administración oral, bucal o sublingual, los compuestos de la presente invención pueden combinarse con diversos excipientes. Las preparaciones farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen a menudo agentes de unión (por ejemplo jarabes y azúcares, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona, laurilsulfato de sodio, almidón de maíz pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, almidones, almidones modificados, goma arábiga, goma tragacanto, goma guar, pectina, aglutinantes de cera, celulosa microcristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, copovidona y alginato de sodio), disgregantes (tales como almidón y preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca, ácido algínico y determinados silicatos complejos, polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina, goma arábiga, glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa), agentes lubricantes (tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, talco, sílice, ceras de polietilenglicol, ácido esteárico, ácido palmítico, estearato de calcio, cera de carnauba, aceites vegetales hidrogenados, aceites minerales, polietilenglicoles y estearilfumarato de sodio) y cargas (incluyendo polietilenglicoles de alto peso molecular, lactosa, azúcar, fosfato de calcio, sorbitol, glicina, estearato de magnesio, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, harina de arroz, caliza, gelatina, celulosa microcristalina, sulfato de calcio, xilitol y lactitol). Tales preparaciones pueden incluir también agentes conservantes y antioxidantes.

Las composiciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, por ejemplo, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales composiciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión (por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, grasas comestibles hidrogenadas, gelatina, hidroxialquilcelulosas, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábiga), vehículos acuosos o no acuosos (incluyendo aceites comestibles, por ejemplo aceite de almendras, aceite de coco fraccionado), ésteres oleosos (por ejemplo ésteres de glicerina, propilenglicol, polietilenglicol o alcohol etílico), glicerina, agua o solución salina normal; conservantes (por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico) y agentes aromatizantes, conservantes, edulcorantes o colorantes convencionales. También pueden incluirse diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y combinaciones de los mismos. Un experto en la técnica conoce bien otras cargas, aglutinantes, disgregantes, lubricantes y excipientes adicionales adecuados.

Vaginal/rectal

Los compuestos según la presente invención también pueden formularse en una forma adecuada para uso rectal o vaginal. Para administración rectal o vaginal, la formulación puede prepararse en forma de un supositorio. Pueden prepararse formulaciones de supositorio mezclando el principio activo con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura corporal y por tanto se fundirá en el cuerpo liberando el fármaco. Tales supositorios contienen la sustancia activa mezclada con una base de grasa neutra (por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicoles), o en forma de una cápsula de gelatina que contiene la sustancia activa en una mezcla con un aceite vegetal, aceite de parafina u otro vehículo adecuado. Para administración rectal, pueden formularse enemas, en los que las unidades de dosificación toman la forma de un microenema prefabricado; o formulación de microenema seca que ha de reconstituirse en un disolvente adecuado antes de su administración.

65 *Nasal/inhalación*

Para administración intranasal o administración mediante inhalación, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de una disolución, polvo seco o suspensión. La administración puede tener lugar por medio de un recipiente de pulverización de bomba que el paciente aprieta o bombea o a través de presentación de pulverización de aerosol a partir de un recipiente presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Los compuestos de la invención también pueden administrarse por medio de un inhalador de polvo seco, o bien como un polvo finamente dividido en combinación con una sustancia portadora (por ejemplo, un sacárido) o bien como microesferas. El inhalador, la pulverización de bomba o la pulverización de aerosol pueden ser de dosis individual o múltiple. La dosificación puede controlarse a través de una válvula que administra una cantidad medida de compuesto activo.

Parches tópicos/cutáneos

Es posible administrar los compuestos de la presente invención por vía tópica. Esto puede realizarse por medio de cremas, jaleas, geles, pastas, parches, disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas, pomadas y similares. Tales formulaciones las conocen bien los expertos en la técnica.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía transdérmica por medio de una formulación de parche cutáneo. En un ejemplo, un compuesto de la invención se dispersa en un adhesivo que se adhiere a la piel, permitiendo de ese modo que el compuesto se difunda desde el adhesivo a través de la piel para su administración al paciente. Para lograr una velocidad estacionaria de absorción percutánea, pueden usarse adhesivos sensibles a la presión tales como caucho natural o silicona.

Parenteral (i.v. e i.m.)

Los compuestos de la presente invención pueden formularse en una forma inyectable en una disolución, suspensión o emulsión acuosa o no acuosa en un líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, 1,3-butanodiol o un aceite aceptable por vía parenteral o una mezcla de líquidos.

El líquido puede contener agentes bacteriostáticos, antioxidantes u otros conservantes, tampones, solutos, agentes espesantes, agentes humectantes, agentes de suspensión u otros aditivos farmacéuticamente aceptables. Es común que el líquido sea isotónico con la sangre (por ejemplo a través de la adición de sales o glucosa), y habitualmente tiene un pH >8. El líquido se dispensa en dosis unitarias en forma de ampollas, dispositivos de inyección desechables o viales. Alternativamente, la formulación está en forma de un concentrado o una preparación seca que puede reconstituirse antes de su uso para preparar una formulación inyectable.

Formulación de liberación controlada/retardada/prolongada

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en una formulación de liberación controlada. Los compuestos se liberan a la velocidad requerida para mantener una actividad farmacológica constante durante un periodo de tiempo deseable. Tales formas de dosificación proporcionan un suministro de un fármaco al organismo durante un periodo de tiempo predeterminado y por tanto mantienen los niveles de fármaco en el intervalo terapéutico durante periodos de tiempo más prolongados que las formulaciones no controladas convencionales. Los compuestos también pueden formularse en formulaciones de liberación controlada en las que la liberación del compuesto activo está dirigida. Por ejemplo, la liberación del compuesto puede limitarse a una región específica del sistema digestivo a través de la sensibilidad al pH de la formulación. Tales formulaciones las conocen bien los expertos en la técnica.

Liposomas

Los compuestos activos pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Pueden formarse liposomas a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, la invención se describirá en más detalle. Sin embargo, las realizaciones descritas mencionadas a continuación se facilitan sólo como ejemplos y no deben ser limitativas para la presente invención. Otras soluciones, usos, objetivos y funciones dentro del alcance de la invención tal como se reivindica en las reivindicaciones de la patente descritas más adelante deben ser evidentes para el experto en la técnica.

Experimentos *in vivo*

Materiales y métodos

Animales

Se usaron ratones NMRI macho (Charles-River, Alemania) que pesaban 20-35 g en el momento de las pruebas en los diferentes experimentos. Se alojaron los ratones en grupos de ocho en jaulas Macrolon tipo III ventiladas, enriquecidas con lana de madera durante al menos una semana antes de que se llevaran a cabo los experimentos. Se mantuvieron los ratones bajo un ciclo de 12-h de luz/oscuridad encendiéndose las luces a las 6:00 a.m.; se llevaron a cabo los experimentos durante la fase de luz.

Se realizaron experimentos de actividad motora en ratas tanto activas como habituadas en ratas Sprague-Dawley macho (Charles River, Alemania) que pesaban 280-320 g. Antes de las pruebas, se alojaron las ratas en grupos de cuatro o cinco en jaulas Macrolon tipo IV ventiladas durante aproximadamente una semana. Se mantuvieron los animales habituados bajo un ciclo de 12-h de luz/oscuridad encendiéndose las luces a las 6:00 a.m.; se llevaron a cabo los experimentos durante la fase de luz. Se mantuvieron los animales activos bajo un ciclo de luz diurna invertido (ciclo de 12-h de luz/oscuridad apagándose las luces a las 6:00 a.m.); se llevaron a cabo los experimentos durante la fase de oscuridad.

Todos los animales se mantuvieron en una temperatura de 20°C y tuvieron libre acceso a agua y gránulos de alimento. Los experimentos los aprobó el Comité Ético de Göteborg para Experimentación Animal.

Fármacos

Clorhidrato de (-)-OSU6162 (PM=317,9), bajo el sinónimo PNU-96391A, fue un regalo de Pfizer, clorhidrato de (+)-OSU6162 (PM=317,9), bajo el sinónimo R-PNU-96391, se sintetizó por Syntagon, Suecia. Se adquirieron haloperidol (PM=375,9), sal de tartrato de racloprida (sal de (+)-tartrato de S(-)-racloprida, PM=497,3), reserpina (cristalina; PM=608,7) y SCH23390 (clorhidrato de R(+)-SCH-23390, PM=324,2) de Sigma-Aldrich Suecia. Se adquirió bromhidrato de SCH39166 (PM=394,7) de Tocris Bioscience. M100907 ((+)-(R)-1-[1-[2-(4-fluorofenil)etil]piperidin-4-il]-1-(2,3-dimetoxifenil)metanol; MDL100,907; PM= 373,5) fue un regalo de Aventis. Se adquirió DOI [clorhidrato de (±)-1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)-2-aminopropano] de Sigma/RBI.

Se disolvieron (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en solución salina fisiológica (0,9%) y se administraron por vía intraperitoneal (ip) en ratones y por vía subcutánea (sc) en ratas. Se disolvieron haloperidol, SCH39166 y M100907 en una cantidad mínima de ácido acético y se diluyeron con glucosa al 5,5%. Se ajustó la disolución a pH 5-7 con bicarbonato de sodio. Se administró el haloperidol ip en ratones y sc en ratas. Se administró SCH39166 sc en ratones y ratas. Se administró M100907 ip en ratones y ratas. Se disolvió la reserpina en una cantidad mínima de ácido acético y se diluyó con glucosa al 5,5%, y se inyectó ip. Se disolvieron racloprida y SCH23390 en solución salina fisiológica y se inyectaron sc. Se disolvió DOI en solución salina fisiológica y se inyectó ip en ratones. Se administró la reserpina en un volumen de 20 ml/kg en ratones. Se inyectaron todas las otras sustancias en un volumen de 10 ml/kg en ratones y 5 ml/kg en ratas. Se midió el pH en todas las disoluciones y se ajustó a pH 5-7 con bicarbonato de sodio si era necesario (con la excepción de reserpina). Los grupos control recibieron tratamiento con vehículo apropiado.

Experimentos de seguimiento de video en ratones

Equipo

Se usaron ocho instalaciones de plexiglás de color negro (l, an., al.: 46x33x35 cm), iluminadas indirectamente para evitar reflejos y sombras. Para obtener la iluminación indirecta, se colocaron los accesorios de iluminación por debajo del borde superior de la instalación de plexiglás. Esto produjo una iluminación en los suelos de las instalaciones de aproximadamente 5-7 lux. Se cubrieron los suelos de las instalaciones con gravilla de color gris previamente expuesta a otros ratones. Se filmaron las instalaciones desde arriba con dos cámaras de video monocromáticas, una cámara por conjunto de cuatro instalaciones, conectadas a un PC y grabadas con Noldus MPEG Recorder 2.0.

Tras la finalización del experimento, se analizaron las grabaciones con el programa de seguimiento de video EthoVision 3.1 Color Pro de Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos. El programa seguía automáticamente los movimientos de los animales y se calculó la distancia recorrida por el animal de dos modos (véase más adelante). Se realizó el seguimiento a una frecuencia de muestreo de 12,5 muestras por segundo.

Pruebas de comportamiento de ratones empobrecidos en monoamina

Se les inyectó a los animales ip reserpina (10 mg/kg, 20 ml/kg) 20 h antes de la grabación en video. Tras el tratamiento con reserpina, se permitió que los animales se asentaran en jaulas Macrolon tipo III que contenían una pequeña cantidad de serrín, alimento y agua. Entonces se colocaron las jaulas sobre una estera de calentamiento y se iluminaron con una luz roja tenue para mantener calientes a los animales. A los animales control se les inyectó glucosa al 5,5% (20 ml/kg, ip) 20 h antes de la grabación en video y se alojaron en jaulas Macrolon tipo III separadas en las mismas condiciones, excepto por el calentamiento.

El día del experimento se pesaron los animales, se marcaron y en los experimentos de antagonista se les inyectó a los animales antagonista antes del agonista y la grabación de la actividad. Se inyectaron haloperidol y racloprida 1 h antes de la filmación. Se inyectó M100907 30 minutos (en un experimento con (-)-OSU6162) o 1 h antes de la grabación en video. Se inyectaron (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 justo antes de la grabación y se colocaron los animales en las instalaciones, un animal en cada instalación, y se grabaron en video durante 60 minutos.

Pruebas de comportamiento de ratones sin tratamiento previo con fármaco

El día del experimento se pesaron los animales, se marcaron y se les inyectó ip (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 15 minutos antes de la grabación en video. Los animales se colocaron en las instalaciones, un animal en cada instalación, y se grabaron en video durante 60 minutos.

Procedimiento de los experimentos de sacudida de la cabeza

Los animales usados en los experimentos de sacudida de la cabeza se colocaron individualmente en jaulas Macrolon tipo II y se permitió que se habituaran a estas jaulas de prueba durante 30 minutos antes de que comenzara la grabación en video del comportamiento. Se administraron DOI (1 mg/kg) o varias dosis de (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 10 minutos antes del inicio de la grabación en video. Se grabaron en video los animales durante 10 minutos; se puntuó el comportamiento durante los primeros 5 minutos. Una persona ciega al tratamiento contó el número de sacudidas de la cabeza a partir de las cintas de video.

Análisis de datos y estadísticos

Se calculó la distancia recorrida de dos modos dando como resultado las variables DM o DM1,5. DM es la distancia total recorrida por el animal, calculada a partir de los movimientos horizontales del animal. DM1,5 es la distancia calculada usando un filtro de distancia de 1,5 cm, lo que significa que el animal tiene que desplazarse una distancia de $\geq 1,5$ cm antes de que se produzca el registro de la distancia. Se expresan los datos como medias y error estándar de la media (EEM). En varios casos se han agrupado datos de dos o más experimentos. "C" en las figuras indica el grupo control. Se realizaron comparaciones de grupos con la prueba de la U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Experimentos de actividad motora en ratas activas y habituadas

Pruebas de comportamiento de ratas habituadas

Se diseñaron estos experimentos para que se parecieran a los de Sonesson *et al* (Sonesson C, Lin CH, Hansson L, Waters N, Svensson K, Carlsson A, Smith PM, Wikström H (1994) "Substituted (S)-phenylpiperidines and rigid congeners as preferential dopamine autoreceptor antagonists: synthesis and structure-activity relationships". J Med Chem 37(17):2735-2753). Se alojaron las ratas en un ciclo de luz diurna normal y se llevaron a cabo los experimentos durante el día. Se introdujeron los animales en cajas de actividad iluminadas con el sonido atenuado (l/an./al.: 40x40x20 cm) y se permitió que se habituaran al nuevo entorno durante 65 minutos. Durante los siguientes 5 minutos, se inyectaron los fármacos de prueba, tras lo cual se devolvieron las ratas a las cajas durante otros 60 minutos. Cinco por cinco filas de haces de células fotoeléctricas al nivel del suelo permitieron que un sistema basado en ordenador registrara la actividad horizontal. La actividad motora se presenta como el número acumulado de roturas de haz no repetidas, es decir varias roturas consecutivas de un haz se cuentan como una rotura de haz. Se estableció que el software registrara el comportamiento desde la primera introducción de las ratas en la instalación hasta que se retiraron finalmente de la caja, es decir durante 110 ó 130 minutos.

Pruebas de comportamiento de ratas activas

Este método se ha descrito anteriormente por Rung *et al*. (Rung JP, Rung E, Helgeson L, Johansson AM, Svensson K, Carlsson A, Carlsson ML (2008) "Effects of (-)-OSU6162 and ACR16 on motor activity in rats, indicating a unique mechanism of dopaminergic stabilization" J Neural Transm 115(6):899-908). Se alojaron las ratas en un ciclo de luz diurna inverso y se realizó toda la manipulación de los animales con luz tenue. Se administraron los fármacos de prueba s.c. 30 minutos antes del registro del comportamiento. Se introdujeron ratas individuales en instalaciones rectangulares (l/an./al.: 150x100x40 cm) iluminadas indirectamente mediante una lámpara infrarroja (IR) (Neocom, Corea del Sur). Se registraron los movimientos de las ratas en archivos de video digitales (MPEG2) usando una cámara de video sensible a IR (Panasonic WV-CPR480, lente: Panasonic LA-408C3) conectada a un PC equipado con un codificador de MPEG (MVR1000SX, Canopus Co.). Entonces se analizaron los archivos de video con el software de seguimiento de video EthoVision 3.1 Color Pro (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Bajos) usando una frecuencia de muestra de 12,5 muestras por segundo.

Análisis de datos y estadísticos

Los datos se expresan como medias y error estándar de la media (EEM). En varios casos se han agrupado datos de dos o más experimentos. Se evaluaron resultados atípicos sospechosos uno cada vez con la prueba de Grubbs para

resultados atípicos (Grubbs FE (1969) "*Procedures for detecting outlying observations in samples*". Technometrics 11(1):1-21). Se realizaron comparaciones de grupos con la prueba de la U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

5 Resultados

Ratones empobrecidos en monoamina

La primera serie de experimentos descritos a continuación se realizó en ratones empobrecidos en monoamina. Se logró el empobrecimiento de las reservas monoaminérgicas mediante pretratamiento con 10 mg/kg de reserpina inyectada por vía intraperitoneal (i.p.) 20 h antes del registro de la actividad.

Efectos estimuladores de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en ratones empobrecidos en monoamina

Puede observarse en la figura 1 que (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 estimulaban cada uno la actividad motora en ratones pretratados con reserpina. Se registró la actividad durante 60 minutos en un entorno de seguimiento de video. Los datos representados gráficamente (distancia recorrida; DM 1,5.) se basan en los primeros 30 minutos del periodo de grabación de 60 minutos. Se muestran las medias y EEM. C= animales control. R= animales tratados sólo con reserpina. A todos los animales, excepto a los animales control, se les inyectó reserpina (10 mg/kg, ip) 20 h antes del registro de la actividad. A los animales control se les inyectó disolución de glucosa (5,5%, ip) 20 h antes del registro de la actividad y NaCl (0,9%, ip) justo antes del registro de la actividad. Se inyectó (-)-OSU6162 (25-250 mmol/kg ip) o (+)-OSU6162 (25-500 mmol/kg ip) junto antes del registro de la actividad. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney; *: frente a grupo R, +: frente a (-)-OSU6162, 250 mmol/kg. **/++ $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

(-)-OSU6162 provocó un aumento estadísticamente significativo en la actividad motora a 125 y 250 mmol/kg. (+)-OSU6162 provocó un aumento estadísticamente significativo en la actividad motora a 125, 250 y 500 mmol/kg, con una respuesta máxima a 250 mmol/kg. A 250 mmol/kg los dos enantiómeros diferían significativamente ($p < 0,01$) entre sí, provocando (+)-OSU6162 un efecto mucho más grande sobre la actividad motora (figura 1), y también un efecto más duradero (no mostrado), que el enantiómero (-).

Antagonización de los efectos de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en ratones empobrecidos en monoamina

Se llevó a cabo una serie de experimentos con el objetivo de identificar los receptores y los mecanismos implicados en los efectos estimuladores de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 sobre la actividad motora en ratones pretratados con reserpina. Se sometió a prueba una batería de antagonistas de receptores monoaminérgicos con respecto a su capacidad para contrarrestar los efectos estimuladores de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 (véanse las figuras 2-4). En todos los experimentos se registró la actividad durante 60 minutos en un entorno de seguimiento de video. Los datos representados gráficamente (DM 1,5) se basan en los primeros 30 minutos del periodo de grabación de 60 minutos. Se muestran las medias y EEM. A todos los animales se les inyectó reserpina (10 mg/kg, ip) 20 h antes del registro de la actividad.

Figura 2 a,b. Se administraron haloperidol (1 mg/kg, ip), racloprida (20 mg/kg, sc) y M100907 (1 mg/kg, ip) una hora antes de (-)-OSU6162 (250 mmol/kg, ip) y el registro de la actividad. Se inyectó SCH23390 (0,3 mg/kg, sc) dos veces, una hora antes e inmediatamente antes del registro de la actividad. También se inyectó (-)-OSU6162 justo antes del registro de la actividad. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney frente a a) el grupo de reserpina y b) el grupo de (-)-OSU6162; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Se observa que el antagonista del receptor de dopamina D2 haloperidol (1 mg/kg) no pudo antagonizar los efectos estimulantes de (-)-OSU6162 (250 mmol/kg) sobre la actividad motora en ratones pretratados con reserpina (figura 2a). Esto también fue cierto para el bloqueante de dopamina D1 SCH23390 (0,3 mg/kg) y el bloqueante de dopamina D2 racloprida (20 mg/kg; figura 2b). El antagonista del receptor 5-HT_{2A} selectivo M100907 (1 mg/kg), por otro lado, antagonizó eficazmente la estimulación del comportamiento inducida por (-)-OSU6162 (figura 2b).

Figura 2c. Se inyectaron racloprida (20 mg/kg, sc), haloperidol (1 mg/kg, ip) y M100907 (1 mg/kg, ip) 1 h antes del registro de la actividad. Se inyectó SCH23390 (0,3 mg/kg, sc) dos veces, una vez 1 h y una vez justo antes del registro de la actividad. Se inyectó (+)-OSU6162 (250 mmol/kg, ip) inmediatamente antes de que comenzara el registro de la actividad. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: ** $p < 0,01$ frente al grupo de (+)-OSU6162.

Los resultados de los experimentos con antagonista con (+)-OSU6162 son similares a los observados para (-)-OSU6162. Ninguno de los antagonistas dopaminérgicos, es decir SCH23390 (0,3 mg/kg), racloprida (20 mg/kg) o haloperidol (1 mg/kg), pudieron antagonizar los efectos estimulantes de la actividad motora de (+)-OSU6162 (250 mmol/kg) en ratones pretratados con reserpina mientras que M100907 (1 mg/kg) antagonizó eficazmente esta respuesta (figura 2c).

Se suponía que otro antagonista de D1, SCH39166, era más selectivo para receptores D1 que SCH23390. Se

administró SCH39166 (0,1, 0,3 ó 0,9 mg/kg, sc) 20 minutos antes de (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 (ambos a 250 mmol/kg, ip) y el registro de la actividad. Se muestran los resultados en la figura 2d y e (en d) n=6 y en e) n=5). Puede observarse que SCH39166 (0,1, 0,3, 0,9 mg/kg) no influyó significativamente en la activación motora provocada por (-) o (+)-OSU6162 (250 mmol/kg). Esto es según los resultados de los experimentos con SCH23390 anteriores (figuras 2b y c).

Las figuras 3a-c muestran curvas de respuesta a la dosis de los efectos de M100907 sobre la estimulación locomotora inducida por los enantiómeros de OSU6162. A todos los animales, excepto para el grupo control en c, se les inyectó reserpina (10 mg/kg, ip) 20 h antes del registro de la actividad. Se inyectaron (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 inmediatamente antes del inicio del registro de la actividad. En a) se inyectó M100907 (0,01, 0,1 ó 1 mg/kg) ip 30 minutos antes de (-)-OSU6162 (250 mmol/kg, ip). En b) se inyectó M100907 (0,01, 0,1 ó 1 mg/kg) ip 30 minutos antes de (-)-OSU6162 (125 mmol/kg). En c) se inyectó M100907 (0,1 ó 1 mg/kg) ip 30 minutos antes de (+)-OSU6162 (125 mmol/kg). N= 2 para el grupo control; n=5 para los grupos de reserpina y M100907 1+OSU; n=6 para los grupos de OSU y M100907 0,1+OSU. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: * p<0,05, ** p<0,01 frente al grupo de (-)/(+)-OSU6162.

La figura 3a muestra los efectos de tres dosis (0,01, 0,1 y 1 mg/kg) de M100907 sobre el aumento de actividad motora provocado por 250 mmol/kg de (-)-OSU6162. Sólo la dosis de 1 mg/kg disminuyó significativamente la actividad motora. Las figuras 3b y c muestran que 0,1 y 1 mg/kg de M100907 revirtieron eficazmente la estimulación locomotora inducida por 125 mmol/kg de (-)-y (+)-OSU6162.

Se sometieron a prueba los efectos de DOI sobre la locomoción en ratones pretratados con reserpina (véanse las figuras 4a-b: En a) se inyectó DOI (1; 2,5; 5; 10 mg/kg) ip justo antes del registro de la actividad. N=4 en el grupo DOI10 y 5 en los demás grupos. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: * p<0,05, ** p<0,01 frente al grupo que sólo recibió reserpina. La figura 4a muestra que también el agonista de 5-HT₂ DOI (1; 2,5; 5; 10 mg/kg) podía inducir estimulación locomotora en ratones pretratados con reserpina, aunque el grado de estimulación era inferior que en el caso de los enantiómeros de OSU6162, particularmente el enantiómero (+).

En b) se muestran los efectos antagonizantes de M100907 sobre la estimulación locomotora inducida por DOI en ratones pretratados con reserpina. Se inyectó M100907 (0,01, 0,1 ó 1 mg/kg) ip 30 minutos antes de DOI (2,5 mg/kg), que se inyectó inmediatamente antes de que se iniciara el registro de la actividad. N=4 en el grupo 0,01+DOI y 5 en los demás grupos. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: * p<0,05, ** p<0,01 frente al grupo de DOI. La figura 4b muestra que M100907 era altamente eficaz en el antagonismo de los efectos estimulantes locomotores de 2,5 mg/kg de DOI (todas las dosis (0,01, 0,1 y 1 mg/kg) de M100907 tuvieron efectos significativos.

Ratones sin tratamiento previo con fármaco

La segunda serie de experimentos se realizó en ratones sin tratamiento previo con fármaco.

El fin del primer experimento era investigar si (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 podían producir sacudidas de la cabeza en ratones, un comportamiento normalmente producido por agonistas de 5-HT₂. Se compararon (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 con DOI en este sentido (véase la figura 5).

En la figura 5, se muestra el número de sacudidas de la cabeza producidas durante 5 minutos. Se habituaron los ratones a las jaulas de prueba durante 30 minutos antes de que comenzara la grabación en video del comportamiento. Se administraron DOI (1 mg/kg ip), (-)-OSU6162 (a) o (+)-OSU6162 (b) (9,375; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 mmol/kg ip) 10 min antes de que se iniciara el registro del comportamiento. Se muestran las medias y EEM, n = 6-12. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 frente al grupo control (C).

Puede concluirse que DOI (1 mg/kg ip) induce sacudidas de la cabeza en el ratón. Varias de las dosis sometidas a prueba de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 (9,375; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 mmol/kg) también produjeron sacudidas de la cabeza, pero en un menor grado que DOI.

El fin del segundo experimento era investigar si los enantiómeros de OSU6162 podían contrarrestar las sacudidas de la cabeza inducidas por DOI. La figura 6a muestra el número de sacudidas de la cabeza producidas durante 5 minutos. Se habituaron los ratones a las jaulas de prueba durante 30 minutos antes de que comenzara la grabación en video del comportamiento. Se administraron todos los compuestos 10 min antes de que se iniciara el registro del comportamiento. Se administró DOI en dosis de 1 mg/kg (ip) todo el tiempo. En a) se muestra la interacción entre (-)-OSU6162 (75 ó 150 mmol/kg ip) y DOI. En b) se muestra la interacción entre (+)-OSU6162 (75 ó 150 mmol/kg ip) y DOI. En c) se muestra la interacción entre (-)- o (+)-OSU6162 (75 mmol/kg ip) y DOI. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney: *p < 0,05, **p < 0,01, frente a DOI. ++ p < 0,01 frente al grupo que recibió (+)-OSU6162 + DOI.

Se observa que 75 y 150 mmol/kg de (-)-OSU6162 antagonizaron significativamente las sacudidas de la cabeza inducidas por DOI. La figura 6b muestra que ni 75 ni 150 mmol/kg de (+)-OSU6162 antagonizaron significativamente las sacudidas de la cabeza inducidas por DOI, aunque había una tendencia de que la dosis superior lo hiciera. La figura 6c, finalmente, muestra que 75 mmol/kg de ambos enantiómeros de OSU6162 contrarrestó las sacudidas de la cabeza inducidas por DOI, siendo el enantiómero (-) considerablemente más eficaz que el enantiómero (+).

El fin del tercer experimento era comparar dosis altas de (-) y (+)-OSU6162 con respecto a su efecto sobre la actividad motora en ratones sin tratamiento previo con fármaco (véase la figura 7). Los datos (DM) se representan gráficamente como medias y EEM. C= animales control. N=4 en el grupo C y 5 en los demás grupos. Se inyectaron (-)-OSU6162, (+)-OSU6162 (150 ó 300 mmol/kg) o NaCl (0,9%, animales control) ip 15 minutos antes del registro de la actividad. Se registró la actividad durante 60 minutos en un entorno de seguimiento de video. Los datos representados gráficamente se basan en los primeros 30 minutos del periodo de grabación de 60 minutos. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ frente al grupo C; + $p < 0,05$ frente a (+)-OSU6162 150 mmol/kg. Tal como resulta evidente a partir de la figura 7 ambos enantiómeros disminuyeron la actividad motora, siendo la forma (-) más potente que la forma (+).

Ratas

La tercera serie de experimentos se realizó en ratas sin tratamiento previo con fármaco (figura 8). Se les inyectó a las ratas sc solución salina (C, 0,9%) o cualquier fármaco de prueba 30 minutos antes de la grabación en video. (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 (30, 60, 120 mmol/kg) se indican - y + respectivamente en el gráfico. Se registró el comportamiento bajo luz infrarroja en instalaciones rectangulares (150x100x40 cm) mediante seguimiento de video. La actividad motora se muestra como velocidad. Se muestran las medias y EEM. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. ** $p < 0,01$ frente al grupo C; ++ $p < 0,01$ frente a (-)-OSU6162. La figura 8 muestra que, de manera similar a ratones sin tratamiento previo con fármaco, (-) y (+)-OSU6162 disminuyeron la actividad motora en ratas activas. De nuevo, la forma (-) era más potente que la forma (+) y la forma (-) era también más eficaz que la forma (+) en la inhibición de la actividad motora.

A la inversa, en ratas habituadas con un bajo nivel de actividad, tanto (-) como (+)-OSU6162 estimularon la actividad motora (figura 9). Se midió la locomoción como roturas de haz no repetidas acumuladas. Se permitió que las ratas se habituaran durante 65 minutos y luego se les inyectó (-)-OSU6162, (+)-OSU6162 (sc) o NaCl (control = C, 0,9%, sc). A esto le siguieron 60 minutos de grabación. Se calcularon los datos a partir de un periodo de 30 minutos, 5-35 minutos tras la inyección, y se representan gráficamente como medias y EEM. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney frente al grupo control, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Se administraron los enantiómeros de OSU6162 en las dosis de 6,25, 12,5, 50, 100, 200 y 400 mmol/kg. Para (-)-OSU6162, se observó una estimulación locomotora significativa para todas las dosis excepto la más baja; para (+)-OSU6162, se observó una estimulación locomotora significativa para todas las dosis excepto las dos más bajas. Cuando se agruparon los animales (controles y ratas tratadas con 50 mmol/kg de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162, respectivamente) de los experimentos mostrados en las figuras 9 y 11, la prueba de la U de Mann-Whitney mostró que (-)-OSU6162 provocaba un mayor grado de estimulación locomotora que (+)-OSU6162. Las medias $\pm$ EEM y el número de animales (n) por grupo agrupados fueron para los controles de 23 ± 6 (n=25), para (-)-OSU6162 de 129 ± 11 (n=22) y para (+)-OSU6162 de 95 ± 12 (n=20). (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 frente a los controles: $p < 0,001$; (-)-OSU6162 frente a (+)-OSU6162: $p < 0,05$. Se calcularon los datos a partir de un periodo de 30 minutos, 5-35 minutos tras la inyección.

También se estudió el efecto del haloperidol sobre la estimulación locomotora en ratas habituadas (véase la figura 10). Se midió la locomoción como roturas de haz no repetidas acumuladas. Se les administró a las ratas haloperidol (0,05, 0,2, 0,5 mg/kg, sc) y entonces se permitió que se habituaran durante 65 minutos. Tras la habituación se les inyectó a las ratas (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 (ambos 50 mmol/kg, sc) y luego se grabaron durante 60 minutos. Se calculan los datos a partir de un periodo de 30 minutos, tomados 5-35 minutos tras la inyección, y se representan gráficamente como medias y EEM. N = 4-5. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney frente a a) grupo de (-)-OSU6162 y b) grupo de (+)-OSU6162, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. La figura 10 muestra que el haloperidol (0,05, 0,2 y 0,5 mg/kg) antagonizó eficazmente la estimulación locomotora inducida por (-) y (+)-OSU6162 (ambos 50 mmol/kg, sc) en ratas habituadas.

También se estudió el efecto de M100907 sobre la estimulación locomotora inducida por a) (-)-OSU6162 y b) (+)-OSU6162 en ratas habituadas (véase la figura 11). Se midió la locomoción como roturas de haz no repetidas acumuladas. Se les administró a las ratas M100907 (ip) y entonces se permitió que se habituaran durante 65 minutos. Tras la habituación se les inyectó a las ratas (-)-OSU6162 o (+)-OSU6162 (ambos 50 mmol/kg, sc) y luego se grabaron durante 60 minutos. Los datos se calculan a partir de un periodo de 30 minutos, tomados 5-35 minutos (figuras insertadas: 15-35 minutos) tras la inyección, y se representan gráficamente como medias y EEM. Se realizaron comparaciones estadísticas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney frente a a) grupo de (-)-OSU6162 y b) grupo de (+)-OSU6162, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. La figura 11 muestra que el intervalo de 5-35 minutos 0,5 y 1 mg/kg de M100907 contrarrestaron significativamente la estimulación locomotora inducida por (+)- pero no por (-)-OSU6162 (ambos 50 mmol/kg, sc) en ratas habituadas. En el intervalo de 15-35 minutos, hubo sin embargo una reversión significativa de la estimulación locomotora inducida por (-)-OSU6162, también, tras la administración de

1 mg/kg de M100907.

Experimentos *in vitro*

5 *Materiales y métodos*

Se adquirieron células NIH-3T3 (CRL 1658) y células 293T de riñón embrionario humano (HEK-293T, CRL 11268) de la Colección Americana de Cultivos Tipo. El O-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido y nonidet P-40 eran de Sigma. Los medios de cultivo tisular usados eran medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL), las
10 placas de cultivo tisular de 96 pocillos eran de Falcon. La solución salina equilibrada de Hanks sin cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio, la tripsina-EDTA eran todos de Gibco-BRL.

Fármacos

15 Se solubilizaron todos los compuestos para estudios *in vitro* como disoluciones madre 10 mM en o bien agua o bien DMSO. Se prepararon diluciones de trabajo a partir de disoluciones 50 mM en DMEM con el 25% de Ultraculture, el 1% de PSG. 3-PPP es [3-(3-hidroxifenil)-N-n-propil]piperidina. 5-CT es 5-carboxamidotriptamina. 5-HT es 5-hidroxitriptamina. Se obtuvieron todos los compuestos de Sigma/RBI (Natick, MA) excepto los siguientes: N-desmetilclozapina (8-cloro-11-(1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina) también denominada NDMC y
20 aripiprazol (7-{4-[4-(2,3-dicloro-fenil)-piperazin-1-il]-butoxi}-3,4-dihidro-1H-quinolin-2-ona) se sintetizaron en ACADIA. Se obtuvo Pramipexol ((6S)-N⁶-propil-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2,6-diamina) como comprimidos de prescripción.

Cultivo celular

25 Se incubaron células NIH-3T3 a 37°C en una atmósfera humidificada (el 5% de CO₂) en DMEM complementado con glucosa 4500-mg/l, L-glutamina 4 mM, penicilina G 50 U/ml, estreptomycin 50 U/ml (PSG, HyClone de Fisher Scientific Logan, UT) y suero de ternera al 10%. Se incubaron células HEK-293T a 37°C en una atmósfera humidificada (el 5% de CO₂) en medio de cultivo tisular de Eagle modificado por Dulbecco con los mismos
30 complementos usados para células NIH 3T3 excepto porque se usó suero de ternera fetal al 10% en lugar de suero de ternera.

Constructos

35 Los receptores D1, D2 (forma corta), D3, D4 (variante 4.2), D5, 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C(vgv), 5-HT6, 5-HT7, alfa1A, alfa1B, alfa2A, alfa2B, alfa2C, M1, M2, M3, M4, M5 y H1 humanos se han descrito previamente, Burstein ES, Ma J, Wong S, Gao Y, Pham E, Knapp AE, Nash NR, Olsson R, Davis RE, Hacksell U, Weiner DM, Brann MR. (2005) "*Intrinsic efficacy of antipsychotics at human D2, D3, and D4 dopamine receptors: identification of the clozapine metabolite N-desmethylozapine as a D2/D3 partial agonist*". J Pharmacol
40 Exp Ther. 315:1278-1287; Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U y Brann MR. (2002) "*Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor*". Mol Pharmacol 61:1297-1302; Weiner DM, Burstein ES, Nash N, Croston GE, Currier EA, Vanover KE, Harvey SC, Donohue E, Hansen HC, Andersson CM, Spalding TA, Gibson DF, Krebs-Thomson K, Powell SB, Geyer MA, Hacksell U, Brann MR. (2001) "*5-hydroxytryptamine2A receptor inverse agonists as antipsychotics*". J Pharmacol Exp Ther. 299:268-
45 276). El transportador de dopamina humano (DAT), el transportador de serotonina (SERT) y el transportador de norepinefrina (NET) se clonaron mediante PCR. Se subclonaron todos los clones en el vector pSI (Promega Corp., Madison, WI) y se verificó su secuencia antes de su uso.

Selección de receptores y ensayo de tecnología de amplificación (R-SAT™)

50 Se realizaron ensayos de R-SAT™ tal como se describe (Burstein *et al*, 2005 (como anteriormente); Burstein ES, Piu F, Ma JN, Weissman JT, Currier EA, Nash NR, Weiner DM, Spalding TA, Schiffer HH, Del Tredici AL, Brann MR. (2006) "*Integrative functional assays, chemical genomics and high throughput screening: harnessing signal transduction pathways to a common HTS readout*". Curr Pharm Des. 12:1717-1729; Ma JN, Owens M, Gustafsson M, Jensen J, Tabatabaei A, Schmelzer K, Olsson R, Burstein ES. (2011) "*Characterization of Highly Efficacious Allosteric Agonists of the Human Calcium-Sensing Receptor*". J Pharmacol Exp Ther.) con las siguientes modificaciones. Los datos para los receptores 5-HT2A, D2, D3 y D4 se generaron tal como sigue: Se sembraron en placa las células un día antes de la transfección usando 7x10³ células en 0,1 ml de medio por pocillo de una placa de 96 pocillos. Se transfectaron las células de manera transitoria con de 1 a 10 ng/pocillo de ADN de receptor, y 30
60 ng/pocillo de pSI-beta-galactosidasa (Promega, Madison, WI) por pocillo de una placa de 96 pocillos usando Polyfect (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de D2, D3 y D4, se transfectaron adicionalmente 20 ng/pocillo de ras/rap1 B(AA), 2 ng/pocillo de adenilil ciclasa 2; y 5 ng/pocillo de cada una de las proteínas G G α , G β 1 y G γ 2 tal como se describe (Burstein *et al*, 2005 (como anteriormente)). Un día después de la transfección se cambió el medio y se combinaron las células con ligandos en DMEM complementado con el 25% de complemento sintético Ultraculture (Cambrex, Walkersville, MD) en lugar de suero de ternera hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Tras cinco días en cultivo se midió la actividad beta-galactosidasa y se cuantificaron las respuestas
65

en un lector de placas (Bio-Tek EL 310 o Molecular Devices). Se analizaron todos los datos usando los programas informáticos de software Excel Fit y GraphPad Prism (San Diego). Se generaron los datos para los receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2B, 5-HT2C(vgv), 5-HT6, 5-HT7, alfa1A, alfa1B, alfa2A, alfa2B, alfa2C, M1, M2, M3, M4, M5 y H1 usando un método similar. En resumen, se transfectaron células NIH/3T3 hechas crecer en volúmenes mayores (frascos de fábricas de células de 632 cm², Nalgene Nunc International, Rochester, NY) hasta el 70% de confluencia con ADN que codifica para beta-galactosidasa, los receptores humanos individuales descritos en el texto y ADN "auxiliares" que codifican para proteínas accesorias tales como proteínas G quiméricas para permitir respuestas a receptores acoplados a Gi y acoplados a Gs (Spalding *et al*, 2002 (como anteriormente); Weissman JT, Ma JN, Essex A, Gao Y y Burstein ES. (2004) "*G-protein-coupled receptor-mediated activation of rap GTPases: characterization of a novel Galphai regulated pathway*". Oncogene 23: 241-249.; Burstein *et al*, 2006 (como anteriormente)) usando Polyfect (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se congelaron las células transfectadas a -80°C en DMEM que contenía el 10% de suero de ternera y el 10% de dimetilsulfóxido usando recipientes 5100 Cryo Freezing (Nalgene Labware, Rochester, NY), y posteriormente se transfirieron a -135°C para almacenamiento a largo plazo. El día del ensayo, se descongelaron las células y se añadieron en DMEM que contenía el 30% de Ultraculture (Lonza, Basilea, Suiza) y el 0,4% de suero de ternera (Hyclone, Logan, UT) directamente a ligandos a concentraciones variables en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Tras cinco días en cultivo, se procesaron las placas tal como se describió anteriormente.

Ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET-2)

Se realizaron ensayos de BRET-2 tal como se describió (Ma JN, Schiffer HH, Knapp AE, Wang J, Wong KK, Currier EA, Owens M, Nash NR, Gardell LR, Brann MR, Olsson R, Burstein ES. (2007) "*Identification of the atypical L-type Ca²⁺ channel blocker diltiazem and its metabolites as ghrelin receptor agonists*". Mol Pharmacol. 72:380-386) excepto porque se usó una forma mutante de beta-arrestina 2 truncada en L373 para ensayos de D2, usando células HEK-293T transfectadas con el kit de transfección Eugene HD (Roche, Palo Alto, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se midieron las señales de BRET-2 usando el lector de múltiples capas Mithras 940LB (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania) y se calcularon como la razón entre la emisión de luciferasa de *Renilla* y la emisión de GFP2 corregida mediante las emisiones de fondo de células no transfectadas.

Preparaciones de membranas

Se prepararon membranas tal como se notificó anteriormente (Ma *et al*, 2007 (como anteriormente)) con las siguientes modificaciones: Se sembraron células HEK-293T a 13,5x10⁶ células por placa de 15 cm y se transfectaron 24 h más tarde mezclando 11 µg de ADN en 900 µl de DMEM, añadiendo 33 µl de FuGENE (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) gota a gota, incubando la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente, y añadiéndola a la placa. Las células no se centrifugaron tras el raspado de las células, sino que se recogieron directamente en la cámara de cavitación de nitrógeno enfriada con hielo.

Ensayos de unión de GTPγS

Se realizaron ensayos de unión de GTPγS tal como se describió previamente (Burstein ES, Ott TR, Feddock M, Ma JN, Fuhs S, Wong S, Schiffer HH, Brann MR, Nash NR. (2006b) "*Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors*". Br J Pharmacol. 147:73-82) con las siguientes modificaciones: Se incubaron 5 µg de membranas a 24°C en un agitador orbital a 100 RPM durante 1 hora en tampón de ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4) en presencia de GDP 10 mM, 35S-GTP-γS 0,4 nM (Perkin Elmer Life Sciences, Shelton, CT) y concentraciones variables de agonista (volumen total de 200 µl en una placa de 96 pocillos Pico Plate (Perkin Elmer, Shelton, CT)). Se añadieron 50 µl/pocillo de perlas SPA de aglutinina de germen de trigo (Perkin Elmer, Shelton, CT) a las placas y se incubaron las placas durante 1 hora. Entonces se centrifugaron las placas a 1.000 x g durante 10 minutos y se leyeron en un instrumento Top Count NXT (Perkin Elmer, Shelton, CT).

Ensayos de hidrólisis de fosfatidil inositol

Se realizaron los ensayos de hidrólisis de PI tal como se describió anteriormente (Gardell LR, Ma JN, Seitzberg JG, Knapp AE, Schiffer HH, Tabatabaei A, Davis CN, Owens M, Clemons B, Wong KK, Lund B, Nash NR, Gao Y, Lameh J, Schmelzer K, Olsson R, Burstein ES. (2008) "*Identification and characterization of novel small-molecule protease-activated receptor 2 agonists*". J Pharmacol Exp Ther. 327:799-808). En resumen, se sembraron células HEK-293T a 4,2 millones en placas de 10 cm y se transfectaron el día siguiente mezclando 10 µg de ADN en 500 µl de DMEM y 30 µl de reactivo de transfección FuGene HD (Roche). Tras lisar las células con 50 µl de ácido fórmico 0,1 M, se mezclaron 20 ml de cada lisado celular con 80 µl (1 mg) de perlas de YSi-SPA de unión a ARN (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, RU) en placas PICO (Perkin-Elmer) y se contaron en un instrumento TopCount (Packard).

Unión de radioligando en equilibrio a transportadores de monoamina

Se prepararon membranas tal como se describió anteriormente. Para ensayos de unión, se incubaron membranas

que expresaban DAT (0,8 µg/pocillo), SERT (5 µg/pocillo) y NET (5 µg/pocillo) con 125 I-RTI-55 50 pM (para DAT) o 3 H-imipramina 1 nM (NET y SERT) durante 2 h a temperatura ambiente en tampón de unión (SERT: Tris 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, pH 7,4; NET: Tris 50 mM, NaCl 300 mM, KCl 5 mM, pH 7,4; DAT: Tris 50 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4). Se terminaron las reacciones de unión mediante filtración a través de filtros UniFilter-96GF/B (de Perkin-Elmer, remojados previamente con polietilenimina al 0,1% durante 1 h) con un colector de 96 pocillos Brandel. Se lavaron los filtros con tampón de lavado enfriado con hielo (Tris 50 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4; 500 ml/placa) y luego se permitió que se secaran al aire durante 30 min. Se añadieron 50 µl de cóctel de centelleo MacroScint-20 a cada pocillo, se sellaron las placas y luego se contaron en un instrumento Top-Count (Packard).

10 Análisis de datos

Se ajustaron las curvas de agonistas a partir de los experimentos de R-SATTM, GTPγS y BRET a una función de respuesta a la dosis sigmoidea: $Y=B+(T-B)/(1+10^{-(\text{LogCE50}-\text{LogX})})$ en donde Y es la respuesta, B es el nivel inicial, T es la respuesta superior o máxima y X es la concentración de ligando. Se obtuvo el gráfico de Schild representando gráficamente log(DR-1) frente al log de la concentración de ligando antagonista y ajustando los datos a una función de línea recta usando regresión lineal. DR representa la razón de dosis de la CE₅₀ de dopamina en presencia de la concentración indicada de (-)-OSU6162 con respecto a la CE₅₀ de dopamina sola. Los datos para los ensayos de constante de disociación se ajustaron a una ecuación de desintegración monoexponencial de 1 fase: $Y=(T-B)\exp(-kX) + B$ en donde Y es la cantidad de ligando unido que queda en el momento = X comenzando en T a tiempo = 0 y acabando en B. Se realizó todo el análisis de datos usando GraphPad Prism version 4.0 (San Diego, CA).

Resultados

Los resultados a partir de los experimentos de comportamiento en ratas y ratones descritos anteriormente dieron lugar a una serie de ensayos funcionales para obtener el perfil de ambos enantiómeros de OSU6162 en los receptores 5-HT_{2A}. Se realizaron ensayos de tecnología de amplificación y selección de receptores (R-SATTM) usando receptores 5-HT_{2A} humanos expresados de manera transitoria en células NIH3T3 tal como se describe en los métodos usando las concentraciones indicadas de aripiprazol (cuadrados negros), 5-CT (cuadrados blancos), (-)-OSU-6162 (círculos negros) y (+)-OSU6162 (círculos abiertos). Cada punto de datos es la media de dos determinaciones a partir de un experimento independiente. Cada curva es representativa de al menos tres o más experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a 5-CT a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a 5-CT estaban normalmente 10 veces por encima del nivel inicial. La figura 12 muestra que en el ensayo de proliferación celular R-SATTM (Burstein *et al.*, 2005, 2006 (ambos como anteriormente); Ma *et al.* 2011 (como anteriormente)), ambos enantiómeros de OSU6162 eran agonistas completos en receptores 5-HT_{2A}, mostrando el enantiómero (+) mayor eficacia que el enantiómero (-) (véase también la tabla 1).

Tabla 1. Perfil funcional en los receptores 5-HT_{2A}

Ligandos	R-SAT TM		Hidrólisis de PI		BRET2	
	pCE50	Efic. (%)	pCE50	Efic. (%)	pEC50	Efic., %
5-HT	7,3 ± 0,2	93 ± 20	8,0 ± 0,3	100 ± 0	8,1 ± 0,1	100 ± 5
5-CT	7,2 ± 0,3	100 ± 0	6,6 ± 0,0	92 ± 4	6,7 ± 0,1	98 ± 3
Pergolida	8,9 ± 0,9	104 ± 28	9,1 ± 0,0	96 ± 8	7,6 ± 0,4	124 ± 4
Quinpirol	5,9 ± 0,3	131 ± 14	5,6 ± 0,1	88 ± 13	5,4 ± 0,1	91 ± 5
(+)-OSU-6162	5,8 ± 0,3	139 ± 14	5,7 ± 0,1	82 ± 4	4,8 ± 0,1	84 ± 2
(-)-OSU-6162	6,2 ± 0,4	113 ± 18	5,9 ± 0,2	65 ± 4	5,0 ± 0,1	63 ± 2
Pramipexol	5,9 ± 0,5	48 ± 9	nd	nd	4,7 ± 0,1	52 ± 3
(+)-3-PPP	5,2 ± 0,4	87 ± 26	<5,0 -	17 -	<4,0 -	42 ± 5
(+)-Tergurida	9,8 ± 0,9	89 ± 13	9,1 ± 0,2	52 ± 8	7,0 ± 0,0	42 ± 2
Aripiprazol	8,2 ± 0,3	68 ± 14	7,9 ± 0,1	26 ± 0	6,6 ± 0,3	30 ± 7
(-)-3-PPP	5,4 ± 0,5	47 ± 12	-	5 -	-	10 ± 4

Los valores son la media ± EEM de al menos tres (tecnología de amplificación y selección de receptores, R-SATTM), o dos (hidrólisis de Fosfatidil inositol (PI) o transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET2))) o más experimentos independientes. Un guión (-) indica no calculado. nd indica no realizado. La potencia se notifica como el logaritmo negativo de CE₅₀ en concentración molar (M). La eficacia se notifica como el porcentaje de respuesta del ligando de referencia que era 5-CT (R-SATTM) o 5-HT (hidrólisis de PI y BRET2). El 100% representa respuestas de 6-10 veces en RSAT, respuestas de 5 veces en ensayos de hidrólisis de PI y respuestas de 2 veces en ensayos de BRET2.

Para relacionar los resultados observados en R-SATTM con un sistema de ensayo más convencional, se sometieron a prueba los mismos ligandos en ensayos de hidrólisis de fosfatidil inositol (PI) (figura 13). Se llevaron a cabo los ensayos de PI usando receptores 5-HT_{2A} humanos expresados de manera transitoria en células HEK 293T tal como se describe en los métodos usando las concentraciones indicadas de (-) OSU-6162 (círculos blancos), (+) OSU-6162

(círculos negros), 5-CT (cuadrados blancos) y 5-HT (cuadrados negros). Cada punto de datos es la media de dos determinaciones a partir de un experimento independiente. Cada curva es representativa de al menos tres o más experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a 5-HT a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a 5-HT estaban normalmente de 6 a 10 veces por encima del nivel inicial. Se observaron resultados muy similares, sin embargo en los ensayos de PI ambos compuestos eran agonistas parciales (figura 13, tabla 1). (+)-OSU6162 mostró de nuevo eficacia más alta que el enantiómero (-), pero el enantiómero (-) era ligeramente más potente.

Se llevaron a cabo ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET2) (figura 14) usando receptores 5-HT2A humanos etiquetados en el extremo carboxilo terminal con luciferasa de *Renilla* y coexpresados de manera transitoria con beta-arrestina-2 etiquetada con GFP2 en células HEK 293T tal como se describe en los métodos usando las concentraciones indicadas de (-) OSU-6162 (círculos blancos), (+) OSU-6162 (círculos negros), 5-CT (cuadrados blancos) y 5-HT (cuadrados negros).

Cada punto de datos es la media de dos determinaciones a partir de un experimento independiente. Cada curva es representativa de al menos dos o más experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a 5-HT a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a 5-HT estaban normalmente 2 veces por encima del nivel inicial. Ambos enantiómeros indujeron eficazmente reclutamiento de beta-arrestina-2 a receptores 5-HT2A receptores, con respuestas máximas de aproximadamente el 60 y el 80 por ciento de 5-HT para los enantiómeros (-) y (+), respectivamente (figura 14, tabla 1).

Debido a que se notifica que algunos fármacos antipsicóticos y fármacos antiparkinsonianos tienen acciones agonistas en los receptores 5-HT2A, y puesto que se observó que ambos enantiómeros de OSU6162 también las tenían, se decidió someter a prueba la actividad en 5-HT2A de (-)-OSU6162 de manera más precisa obteniendo su perfil junto con muchos otros fármacos antipsicóticos y antiparkinsonianos en ensayos de R-SATTM, hidrólisis de fosfatidilinositol (PI) y BRET2. Tal como se muestra en la tabla 1, la mayoría de los agentes sometidos a prueba muestran actividad apreciable en los receptores 5-HT2A en R-SAT, y en menores grados en los ensayos de PI y BRET2. Sin embargo, sus potencias en los receptores 5-HT2A eran normalmente de 100 a 1000 veces más bajas que en los receptores D2 (véase la tabla 2 para D2). En cambio, (-)-OSU6162 era equipotente en receptores D2 y 5-HT2A, y (+)-OSU6162 era más potente en receptores 5-HT2A que en D2.

Tabla 2. Perfil funcional en receptores D2.

Ligandos	R-SAT TM		Hidrólisis de PI		BRET2	
	pCE50	Efic. (%)	pCE50	Efic. (%)	pCE50	Efic. (%)
Dopamina	nd	nd	8,0 ± 0,1	100 ± 0	6,3 ± 0,1	100 ± 0
Pramipexol	9,3 ± 0,4	84 ± 9	8,4 ± 0,2	87 ± 6	6,1 ± 0,1	104 ± 1
Quinpirol	9,0 ± 0,1	98 ± 6	8,1 ± 0,2	92 ± 5	6,2 ± 0,0	69 ± 1
Pergolida	9,8 ± 0,1	100 ± 0	9,0 ± 0,1	94 ± 7	6,7 ± 0,2	64 ± 3
(+)-3-PPP	7,4 ± 0,1	101 ± 8	7,1 ± 0,0	102 ± 4	5,3 ± 0,1	58 ± 2
(+)-Tergurida	11,1 ± 0,2	92 ± 20	9,3 ± 0,2	88 ± 8	7,2 ± 0,1	8 ± 1
(-)-3-PPP	8,0 ± 0,1	77 ± 4	7,7 ± 0,1	77 ± 4	6,5 ± 0,2	2 ± 0
Aripiprazol	10,5 ± 0,1	62 ± 3	8,1 ± 0,2	34 ± 6	-	0 ± 0
(-)-OSU-6162	6,1 ± 0,3	36 ± 3	6,3 ± 0,1	37 ± 9	-	0 ± 0
(+)-OSU-6162	-	*77 ± 5	-	*36 ± 0	-	0 ± 0
NDMC	7,9 ± 0,1	33 ± 2	7,4 ± 0,2	18 ± 1	-	0 ± 0

Los valores son la media ± EEM de al menos cinco (tecnología de amplificación y selección de receptores, R-SATTM), tres (GTP γ S), o dos (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET₂)) o más experimentos independientes. Un guión (-) indica no calculado. nd indica no realizado. La potencia se notifica como el logaritmo negativo de CE₅₀ en concentración molar. La eficacia se notifica como el porcentaje de respuesta del ligando de referencia que era pergolida (RSAT) o dopamina (GTP γ S y BRET₂). El 100% representa respuestas de 6-10 veces en RSAT, respuestas de 3 veces en ensayos de unión de GTP γ S y respuestas de 3 veces en ensayos de BRET₂. *Respuesta a 50 mM, la concentración máxima sometida a prueba.

Se ha notificado que (-)-OSU6162 es un agonista parcial de D2, por tanto también se obtuvo el perfil de ambos enantiómeros de OSU6162 en receptores D2. Tal como se describió previamente (Burstein *et al*, 2005, 2006 (como anteriormente)), el ensayo funcional de R-SATTM puede detectar respuestas funcionales incluso de agonistas parciales con muy baja actividad intrínseca. Por tanto, también se sometieron a prueba (-)-OSU6162 junto con una colección de ligandos dopaminérgicos para determinar la actividad agonista en el receptor de dopamina D2 humano en R-SATTM. Debido a que la dopamina es relativamente inestable en el ensayo R-SATTM, se usó pergolida como ligando de referencia para estos estudios. En la figura 15A) se llevaron a cabo ensayos de R-SATTM usando receptores D2 humanos expresados de manera transitoria en células NIH3T3 tal como se describe en los métodos usando las concentraciones indicadas de pergolida (cuadrados rellenos), (-)-3-PPP (cuadrados abiertos), (+)-OSU-6162 (triángulos rellenos) y (-)-OSU6162 (círculos abiertos). Cada punto de datos es la media de dos

determinaciones de un experimento independiente. Cada curva es representativa de al menos cinco o más experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a pergolida a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a pergolida estaban normalmente 6 veces por encima del nivel inicial. En comparación con pergolida, (-)-OSU6162 tuvo un 30% de eficacia, muy similar a N-desmetilclozapina (NDMC) (figura 15, tabla 2). El enantiómero (+) de OSU6162 era menos potente pero parecía tener mayor eficacia que el enantiómero (-), sin embargo no fue posible determinar su respuesta máxima a las concentraciones sometidas a prueba. Otros ligandos previamente caracterizados como agonistas parciales de D2 tales como aripiprazol y (-)-3-PPP tenían actividad agonista parcial en R-SAT™ con el 62% y el 77% de eficacia, respectivamente. Los demás ligandos sometidos a prueba tenían una eficacia completa o casi completa en R-SAT™ (tabla 2).

Para relacionar los resultados observados en R-SAT™ con un sistema de ensayo más convencional, también se sometieron a prueba estos ligandos para determinar su capacidad para inducir unión de GTPγS a través de receptores D2. Este formato de ensayo también permitía una comparación más directa con la propia dopamina (figura 16). Se llevaron a cabo ensayos de GTPγS usando receptores D2 humanos expresados de manera transitoria en células HEK293T tal como se describe en los métodos usando las concentraciones de dopamina indicadas (cuadrados negros), (-)-3-PPP (cuadrados abiertos), (-)-OSU-6162 (círculos abiertos) y (+)-OSU-6162 (círculos rellenos). Cada punto de datos es la media de dos determinaciones de un experimento independiente. Cada curva es representativa de al menos dos o más experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a dopamina a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a dopamina estaban normalmente 3 veces por encima del nivel inicial.

Tal como se observa en R-SAT™, el enantiómero (-) era significativamente más potente que el enantiómero (+), ambos eran agonistas parciales, y de nuevo el enantiómero (+) no alcanzó su respuesta máxima a las concentraciones sometidas a prueba, lo que sugiere que puede tener una mayor eficacia (figura 16). Globalmente el orden de clasificación de la actividad observada en los ensayos de unión de GTPγS era muy similar al observado en los ensayos de R-SAT™ con eficacias ligeramente inferiores observadas para algunos compuestos, especialmente NDMC y aripiprazol (tabla 2). (-)-3-PPP y (+)-tergurida siguieron siendo agonistas parciales fuertes, mientras que (+)-3-PPP siguió siendo un agonista completo.

Se construyeron ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET2) usando receptores D2 humanos etiquetados con luciferasa y beta arrestina 2 etiquetada con proteína fluorescente verde (GFP) para monitorizar el reclutamiento de beta-arrestina inducido por el agonista por receptores D2 (figura 17). Se llevaron a cabo ensayos de BRET2 usando receptores D2 humanos etiquetados en el extremo carboxilo terminal con luciferasa de *Renilla* y coexpresados de manera transitoria con β-arrestina-2 etiquetada con GFP2 en células HEK293T tal como se describe en los métodos usando las concentraciones de dopamina indicadas (cuadrados rellenos), (+)-3-PPP (cuadrados abiertos), (-)-3-PPP (círculos abiertos), y (-)-OSU-6162 (círculos rellenos). Cada punto de datos es la media de dos determinaciones de un experimento independiente. Cada curva es representativa de dos a tres experimentos independientes. Se normalizaron las respuestas a la respuesta a dopamina a la que se le asignó un valor del 100%. Las respuestas a dopamina estaban normalmente 3 veces por encima del nivel inicial.

Puesto que esta configuración de ensayo monitoriza interacciones proteína-proteína, y puesto que no hay oportunidad para la amplificación de la transducción de señales como en ensayos de R-SAT™ y GTPγS, pueden evaluarse las actividades intrínsecas de agonistas en un sistema de ensayo con poca reserva de receptores. Se observó una discriminación mucho más nítida de la actividad intrínseca en este sistema de ensayo (figura 17, tabla 2). En BRET2, compuestos con perfiles de agonistas parciales en los ensayos de R-SAT™ y GTPγS, incluyendo ambos enantiómeros de OSU6162, NDMC y aripiprazol, no tenían actividad agonista en los ensayos de BRET2. (-)-3-PPP y (+)-tergurida, que eran agonistas casi completos en R-SAT™, experimentaron una reducción de sus respuestas del 2% y el 8% respectivamente en BRET2, mientras que los ligandos con eficacia completa en los ensayos de R-SAT™ y GTPγS tales como pergolida, (+)-3-PPP y quinpirol, eran agonistas parciales en ensayos de BRET2. Sólo el pramipexol siguió siendo un agonista completo en ensayos de BRET2.

La región del receptor a la que se une el agonista endógeno se denomina el sitio ortostérico mientras que otros ligandos pueden actuar a través de sitios alostéricos, o no solapante. Se ha descrito (-)-OSU6162 como un "estabilizador de dopamina", que interacciona de manera tanto ortostérica como alostérica con el receptor D2; más recientemente otros han encontrado algún apoyo, aunque no fuerte, para los efectos alostéricos de (-)-OSU6162 sobre el receptor D2. Para examinar si (-)-OSU6162 actúa o no de manera alostérica en los receptores D2, se sometieron a prueba concentraciones crecientes del compuesto como antagonista funcional de dopamina en ensayos de BRET2 (figura 18). Se llevaron a cabo ensayos de BRET2 tal como se describió anteriormente usando diluciones en serie de dopamina junto con las concentraciones indicadas de (-)-OSU6162. Se construyó un gráfico de Schild (B) usando los valores de CE₅₀ derivados de las curvas en (A). Se ajustó el gráfico de Schild usando regresión lineal en GraphPad Prism.

El análisis de Schild produjo una pendiente de casi la unidad, indicando una interacción competitiva de (-)-OSU6162 con dopamina en receptores D2, sugiriendo que (-)-OSU6162 se une de manera ortostérica a receptores D2. Se estimó que la pK_B de (-)-OSU6162 era de 5,9 a partir del análisis de Schild, lo que concuerda con las estimaciones

de pCE₅₀ de 6,1 y 6,3 en los ensayos de R-SAT™ y GTPγS, respectivamente. De manera similar, se observó que (-)-OSU6162 no alteraba significativamente la velocidad de disociación de dopamina de receptores D2 (datos no mostrados), sugiriendo también que (-)-OSU6162 no modula de manera alostérica los receptores de dopamina D2.

- 5 Para llevar a comprender bien la base mecánica de las acciones de (+)-OSU6162 y (-)-OSU6162, se obtuvo el perfil de estos compuestos en una variedad de otros transportadores y receptores monoaminérgicos (tabla 3).

Tabla 3. Perfil de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162.

Receptor	(-)-OSU6162		(+) -OSU6162		Referencia		
	pCE ₅₀	Efic. (%)	pCE ₅₀	Efic. (%)	pCE ₅₀	Efic. (%)	nombre
5-HT1A	-	14	-	24	6,6	100	8-OH-DPAT
5-HT1B	5,6	75	-	20	8,2	100	5-CT
5-HT1D	5,3	132	-	28	8,4	100	5-CT
5-HT1E	-	5	-	5	6,7	100	BRL 54443
5-HT1F	-	30	-	22	6,8	100	BRL 54443
5-HT2A	6,2	113	5,8	139	7,1	100	5-CT
5-HT2B	6,2	75	5,3	111	7,3	100	5-CT
5-HT2C	5,1	68	4,5	84	7,2	100	5-CT
5-HT6	<5	52	nd		6,6	100	5-CT
5-HT7	-	7	nd		9,0	100	5-C
D1	-	11	nd		7,3	100	SK F38393
D2	6,1	36	-	*77	9,2	100	Pergolida
D3	5,4	54	nd		9,9	100	Pergolida
D4	<5	40	nd		7,1	100	Pergolida
D5	-	10	nd		6,9	100	SKF 38393
H1	-	2	-	3	6,8	100	Histamina
M1	-	5	-	11	5,9	100	Carbacol
M2	-	9	-	22	6,8	100	Carbacol
M3	-	0	-	6	6,0	100	Carbacol
M4	-	2	-	4	5,9	100	Carbacol
M5	-	-5	nd		6,4	100	Carbacol
α1A	-	15	-	22	6,9	100	Fenilefrina
α1B	-	-1	-	10	6,4	100	Fenilefrina
α2A	-	2	-	5	7,9	100	UK 14.306
α2B	-	13	-	8	7,0	100	UK 14.306
α2C	-	6	-	13	6,9	100	UK 14.306
Transportador	pKi	% de inh.	pKi	% de inh.	pKi	% de inh.	nombre
SERT	-	26	-	38	8,5	100	Fluoxetina
DAT	-	6	-	5	8,4	100	Indatralina
NET	-	11	-	14	8,4	100	Desipramina

Se obtuvieron todos los datos de ensayos de tecnología de amplificación y selección de receptores (R-SAT™) excepto por los ensayos de transportadores en los que se midió el desplazamiento de ¹²⁵I-RTI-55 (para el transportador de dopamina (DAT)) o ³H-imipramina (transportador de norepinefrina (NET) y transportador de serotonina (SERT)). Un guión (-) indica no calculado. nd indica no realizado. La potencia se notifica como el logaritmo negativo de CE₅₀ en concentración molar. La eficacia se notifica como la respuesta de los ligandos de referencia indicados. Para receptores en los que (+) o (-)-OSU6162 no mostró actividad agonista, se sometieron a prueba para determinar el antagonismo funcional de respuestas de R-SAT™, y en todos los casos eran inactivos como antagonistas (datos no mostrados). Las respuestas a las referencias eran al menos de 2,5 a 10 veces para todos los receptores. *Respuesta a 50 mM, la concentración máxima sometida a prueba.

No era evidente actividad agonista o antagonista de cualquier enantiómero en ninguno de los subtipos de receptores muscarínicos, ni los subtipos de receptores adrenérgicos alfa, ni los receptores de histamina H1. No se observó actividad agonista o antagonista significativa de (-)-OSU6162 en receptores de dopamina D1 o D5 humanos. Era evidente actividad agonista parcial de (-)-OSU6162 en receptores D3 humanos, aunque era menos potente que en receptores D2. Era evidente una ligera actividad agonista de (-)-OSU-6162 en receptores D4, pero principalmente a concentraciones de 10 mM. Ningún enantiómero tenía actividad significativa en los receptores 5-HT1A, 1E y 1F, ni (-)-OSU6162 en los receptores 5-HT6 o 5-HT7, mientras que (-)-OSU6162 tenía actividad agonista en los receptores 5-HT1B y 5-HT1D, y en un menor grado en receptores 5-HT2C, pero era de aproximadamente 3 a 10 veces menos potente en estos subtipos de receptores que en los receptores 5-HT2A. (-)-OSU6162 tenía actividad agonista parcial en los receptores 5-HT2B, con potencia similar en receptores 5-HT2A, mientras que (+)-OSU6162 tenía mayor eficacia y aproximadamente 10 veces menos potencia en los receptores 5-HT2B que (-)-OSU6162. En ensayos de hidrólisis de PI sobre receptores 5-HT2B se observó que (-)-OSU6162 tenía potencia similar que en RSAT (pCE₅₀ = 6,2) pero una eficacia significativamente inferior (24%, datos no mostrados).

La prevención de la recaptación de serotonina o dopamina podría haber sido por otros factores que contribuyen a los efectos de comportamiento observados de (+)-OSU6162 o (-)-OSU6162. Por tanto, se evaluaron las afinidades de unión de (+)- y (-)-OSU6162 en el transportador de dopamina humano (DAT), el transportador de serotonina (SERT) y el transportador de norepinefrina (NET). Ningún enantiómero de OSU6162 tuvo afinidad de unión significativa por ninguno de estos transportadores (tabla 3).

Discusión

En los experimentos descritos anteriormente se caracterizó la activación inducida por (-)-OSU6162 de ratones empobrecidos en monoamina, usando antagonistas de receptores específicos. Sorprendentemente, ninguno de los antagonistas del receptor de dopamina D2 haloperidol y racloprida, ni los antagonistas del receptor de dopamina D1 SCH39166 y SCH23390, pudieron antagonizar la activación, mientras que el antagonista del receptor 5-HT2A selectivo M100907 antagonizó eficazmente la respuesta.

En paralelo a los estudios sobre (-)-OSU6162, se realizaron experimentos comparativos sobre (+)-OSU6162. Sorprendentemente, en vista del hecho de que se había establecido previamente que no inducía ningún cambio en la actividad de comportamiento (Sonesson 1995 (como anteriormente)), se encontró que la forma (+) era incluso más eficaz que la forma (-) en la activación de ratones empobrecidos en monoamina. De nuevo, esta acción era resistente al tratamiento con antagonistas de receptores D2 y D1 pero se bloqueó eficazmente por M100907.

Estos resultados sugieren fuertemente que (-)- y (+)-OSU6162 podían estimular los receptores 5-HT2A. De hecho, los resultados presentados en el presente documento, usando una batería de ensayos funcionales *in vitro*, muestran que ambos enantiómeros de OSU6162 tienen efectos agonistas parciales sobre los receptores 5-HT2A, presentando la forma (+) una mayor actividad intrínseca que la forma (-). Estos resultados coinciden con la activación más pronunciada, reversible mediante M100907, observada tras el tratamiento con el enantiómero (+) en ratones empobrecidos en monoamina.

Se obtuvo el perfil de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en una amplia gama de otras dianas monoaminérgicas que incluían muchos de los otros receptores de serotonina, receptores de dopamina, receptores adrenérgicos, receptores de histamina H1, y los transportadores de serotonina, dopamina y norepinefrina. Ambos enantiómeros de OSU6162 tenían poca o ninguna actividad en la mayoría de estas dianas. (-)-OSU6162 tenía actividad agonista significativa en los receptores 5-HT1B y 5-HT1D, y en menor grado en los receptores 5-HT2C, pero era de aproximadamente 3 a 10 veces menos potente en estos subtipos de receptor que en los receptores 5-HT2A. (-)-OSU6162 tenía actividad agonista parcial en los receptores 5-HT2B, a potencias similares que sus acciones en los receptores 5-HT2A, mientras que (+)-OSU6162 tenía mayor eficacia pero aproximadamente 10 veces menos potencia en los receptores 5-HT2B que (-)-OSU6162.

Los ensayos *in vitro* también mostraron que la actividad agonista de (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 en los receptores 5-HT2A se producía a concentraciones similares que sus acciones en los receptores D2 (véase a continuación), y esto los distingue de otros agonistas parciales de D2 como (-)-3-PPP y aripiprazol que activan los receptores 5-HT2A sólo a concentraciones mucho más altas que los receptores D2.

Las observaciones sobre las sacudidas de la cabeza también concuerdan bien con los hallazgos *in vitro*, un comportamiento observado de manera accidental en ratones empobrecidos en monoamina tras el tratamiento con (-)-OSU6162. Se investigó el comportamiento de sacudida de la cabeza de una manera más sistemática en ratones sin tratamiento previo con fármaco y se encontró que ambos enantiómeros de OSU6162 producían sacudidas de la cabeza, pero en un menor grado que el agonista del receptor 5-HT2 casi completo DOI. Además, ambos enantiómeros de OSU6162 contrarrestaron las sacudidas de la cabeza inducidas por DOI, siendo el enantiómero (-) considerablemente más eficaz que el enantiómero (+). De nuevo, estos resultados se ajustan muy bien con los datos *in vitro* que demuestran una mayor actividad intrínseca de (+)- que (-)-OSU6162 sobre los receptores 5-HT2A.

La conclusión, basándose en los datos recogidos *in vivo* e *in vitro*, de que los enantiómeros de OSU6162 son agonistas parciales en los receptores 5-HT2A receptores, concuerda con la observación clínica de que (-)-OSU6162, en contraposición al agonista casi completo DOI, no ha mostrado actividad alucinógena.

La conclusión de que (-)- y (+)-OSU6162 son agonistas parciales sobre los receptores 5-HT2A es compatible con los resultados en ratas habituadas: En ratas habituadas, con baja actividad, ambos enantiómeros de OSU6162 provocaron una estimulación dependiente de la dosis de la actividad motora y esta respuesta se contrarrestó mediante el tratamiento con M100907, más eficazmente así con respecto a la forma (+), indicando una contribución de la estimulación del receptor 5-HT2A receptor subyacente a la activación del comportamiento. También estaba implicado un mecanismo dopaminérgico en la estimulación locomotora inducida por (-) y (+)-OSU6162 en ratas habituadas, puesto que el haloperidol antagonizó eficazmente la respuesta.

Otro hallazgo de los ensayos funcionales *in vitro* fue que (-)-OSU6162 y (+)-OSU6162 se comportaban como agonistas parciales de D2. De manera interesante, en estos ensayos *in vitro* se encontró que (-)-OSU6162 era más

potente que (+)-OSU6162, lo que concuerda con la potencia superior del primero para inhibir la actividad motora en ratones sin tratamiento previo con fármaco y ratas activas (no habituadas).

- 5 En conclusión, los presentes resultados indican que tanto (-)-OSU6162 como (+)-OSU6162 actúan como estabilizadores no sólo sobre la señalización cerebral dopaminérgica, sino también sobre la serotoninérgica. Estos descubrimientos tienen importantes implicaciones para la posible utilidad clínica de ambos compuestos, así como para varios de sus congéneres.

REIVINDICACIONES

1. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento y/o la prevención de demencia seleccionada del grupo de trastornos que consisten en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy, en la que 3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma actúa como agonista parcial sobre el receptor de 5-HT.
2. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 1, en la que el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) se selecciona del grupo que consiste en los receptores 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆ y 5HT₇.
3. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) se selecciona del grupo que consiste en los receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1E}, 5HT_{1F}, 5HT_{2A}, 5HT_{2B}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT_{5A}, 5HT₆ y 5HT₇.
4. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) es un receptor 5HT₂.
5. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) se selecciona del grupo que consiste en 5HT_{2A}, 5HT_{2B} y 5HT_{2C}.
6. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el receptor de 5-hidroxitriptamina (receptor de 5-HT) es 5HT_{2A} o 5HT_{2B}.
7. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el compuesto es (3S)-3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una farmacéuticamente aceptable de la misma.
8. 3-[3-(Metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el compuesto es (3R)-3-[3-(metilsulfonyl)fenil]-1-propilpiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

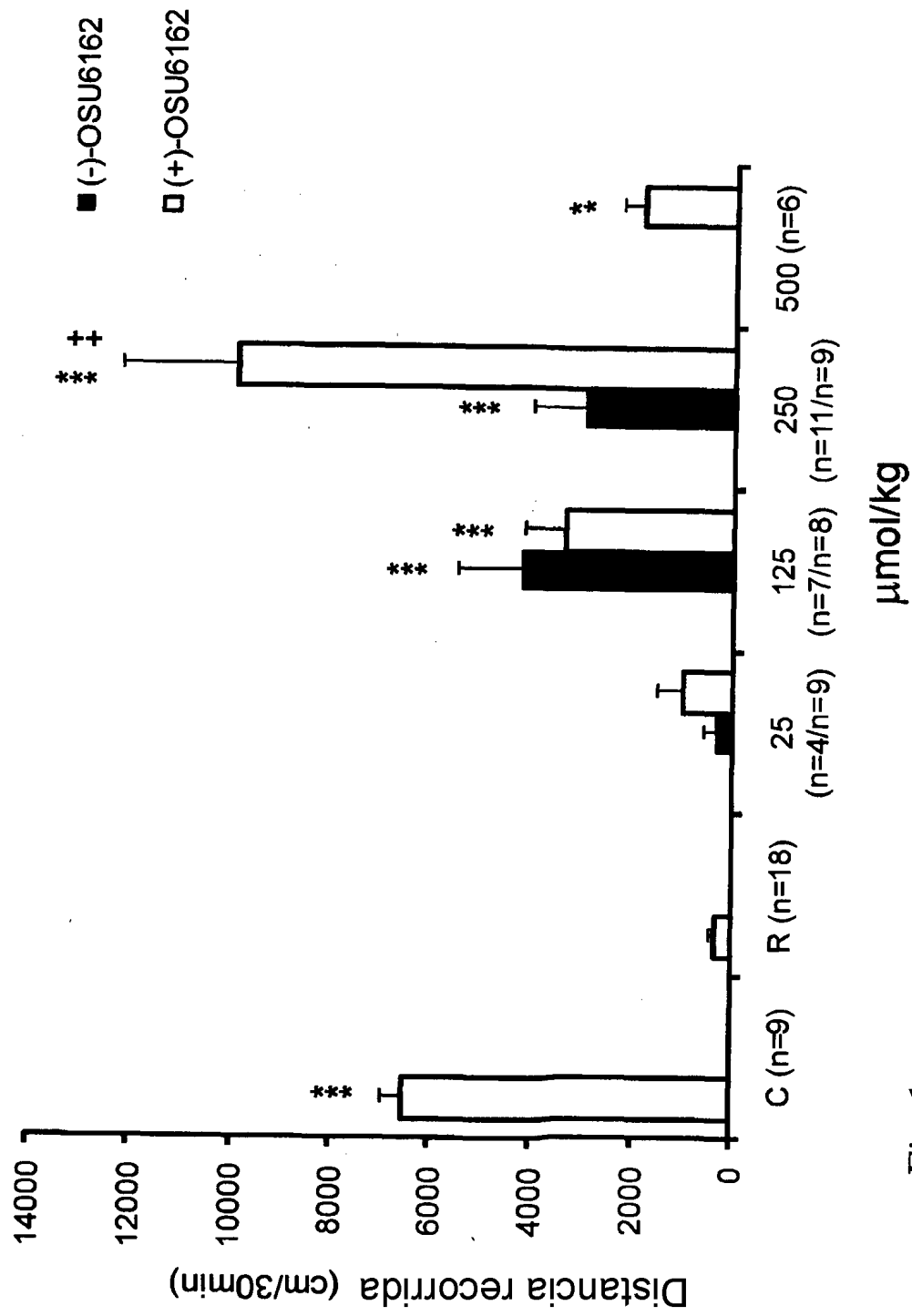


Fig. 1

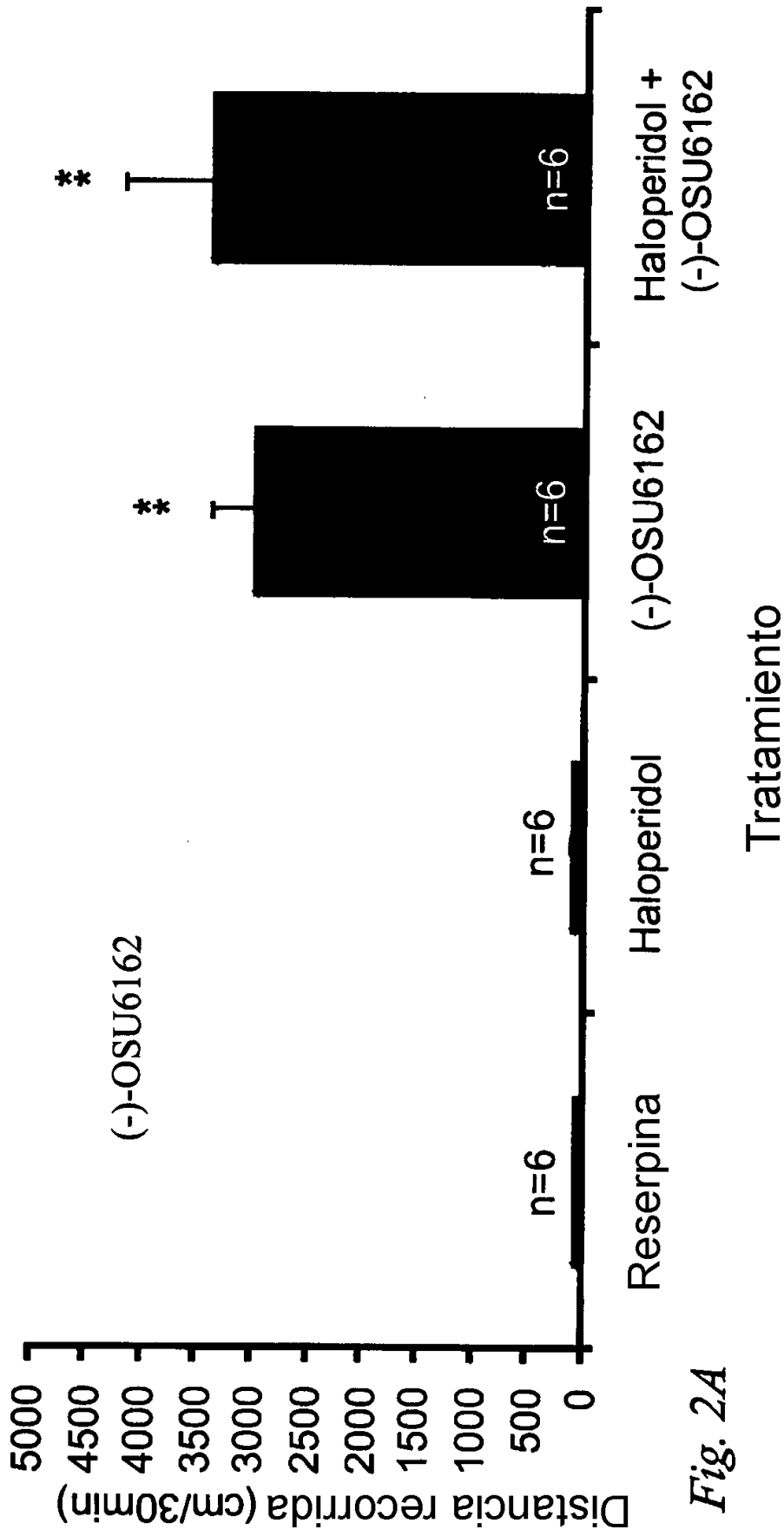


Fig. 2A

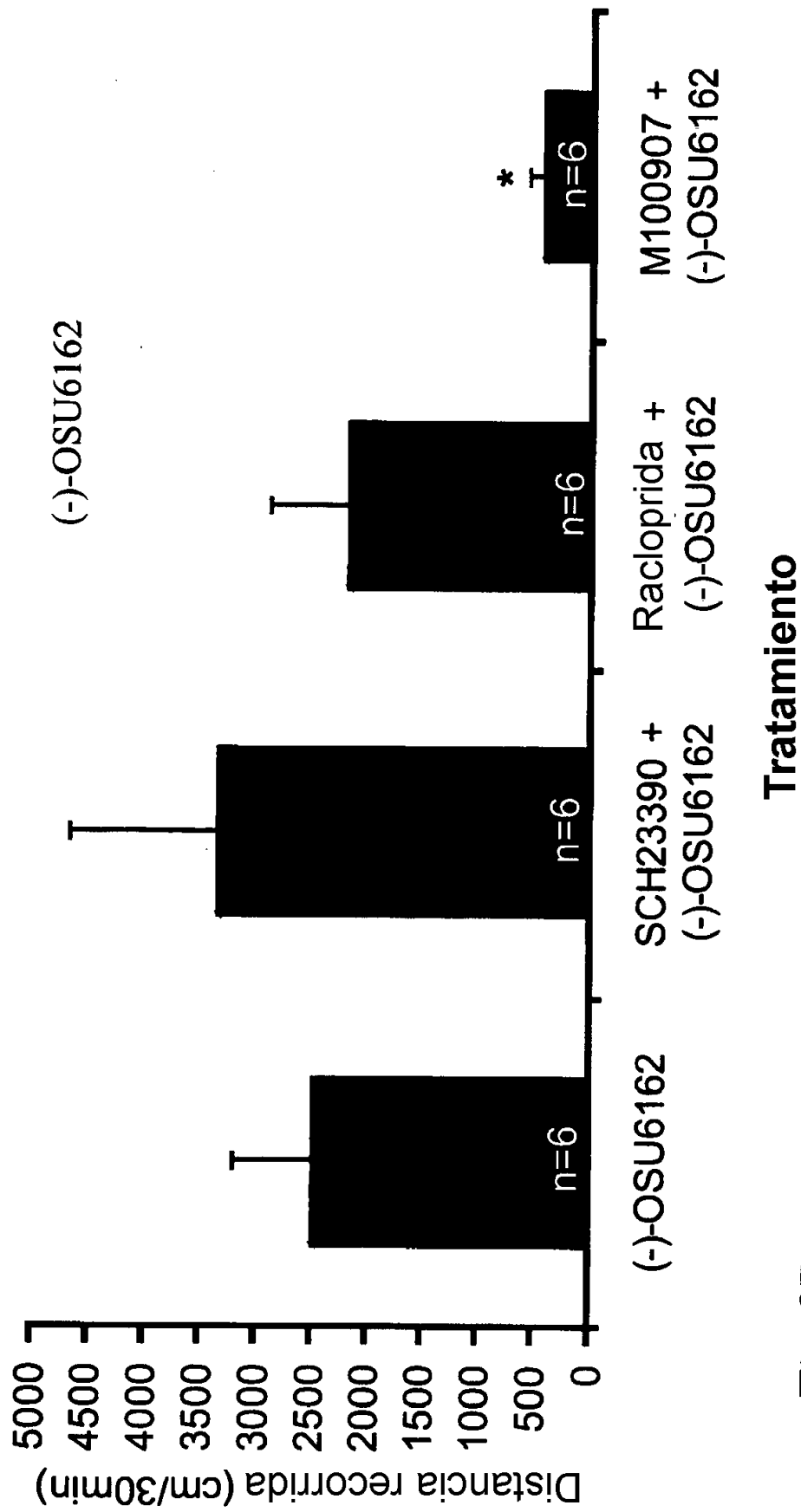
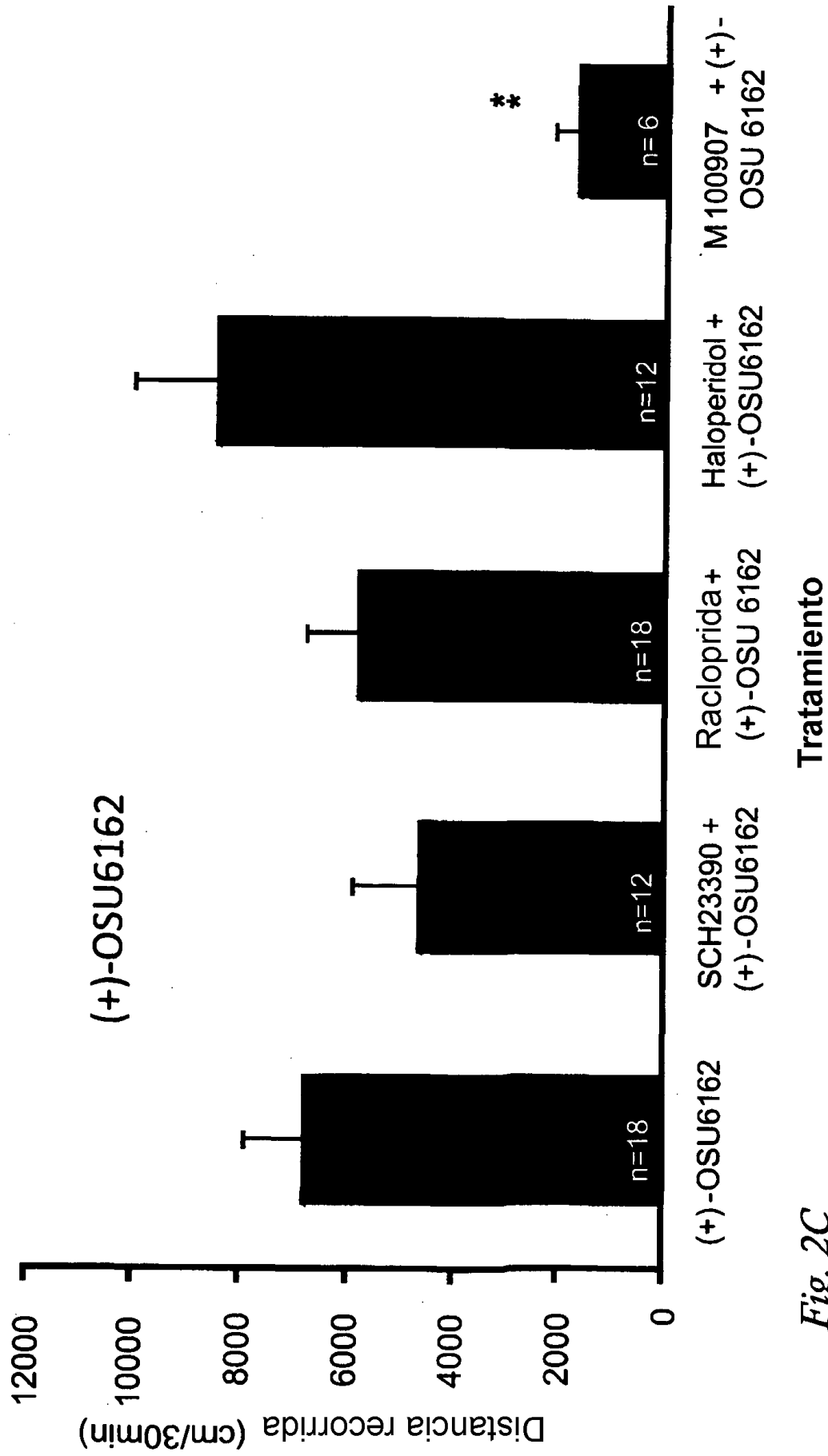


Fig. 2B



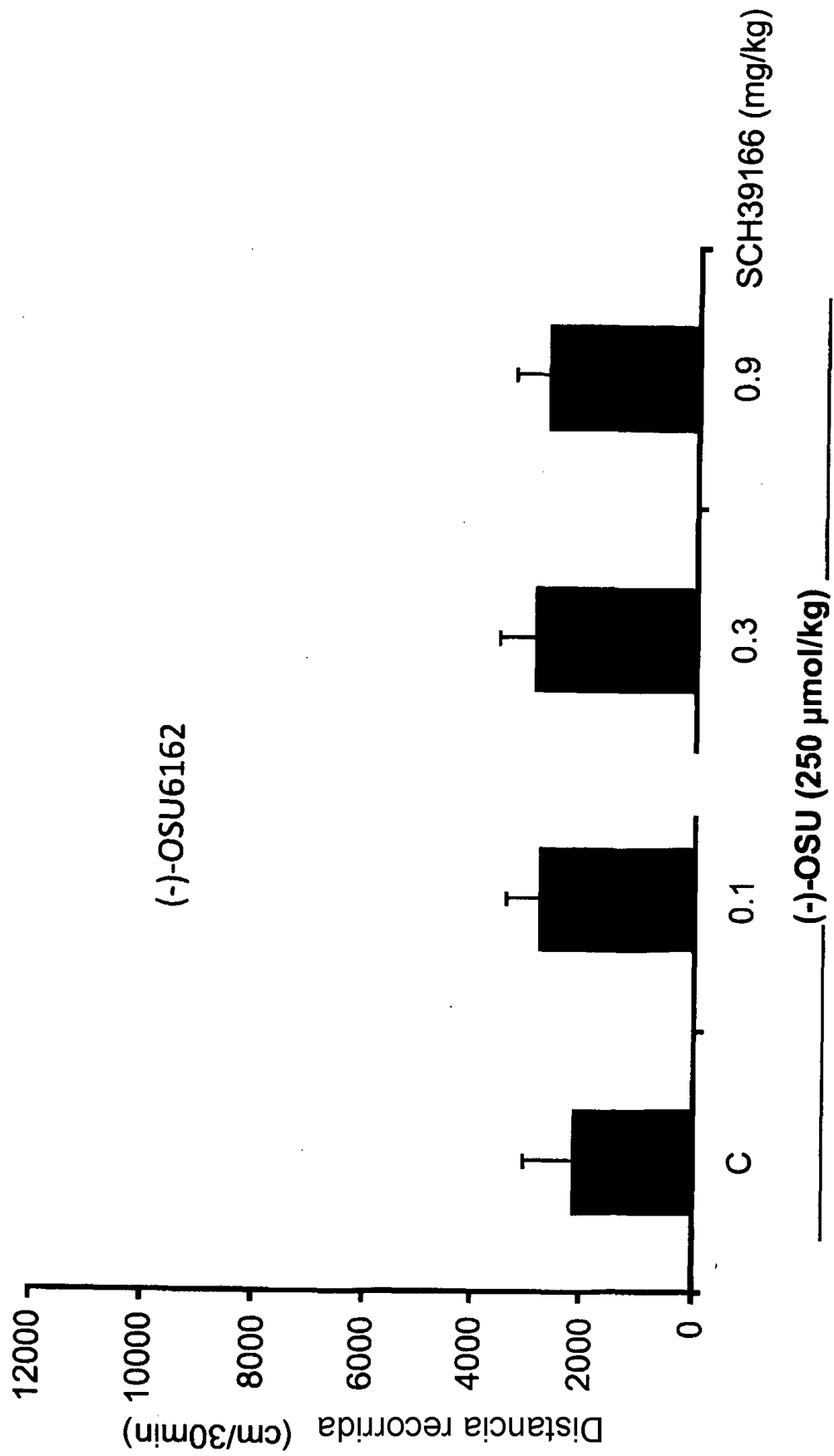


Fig. 2D

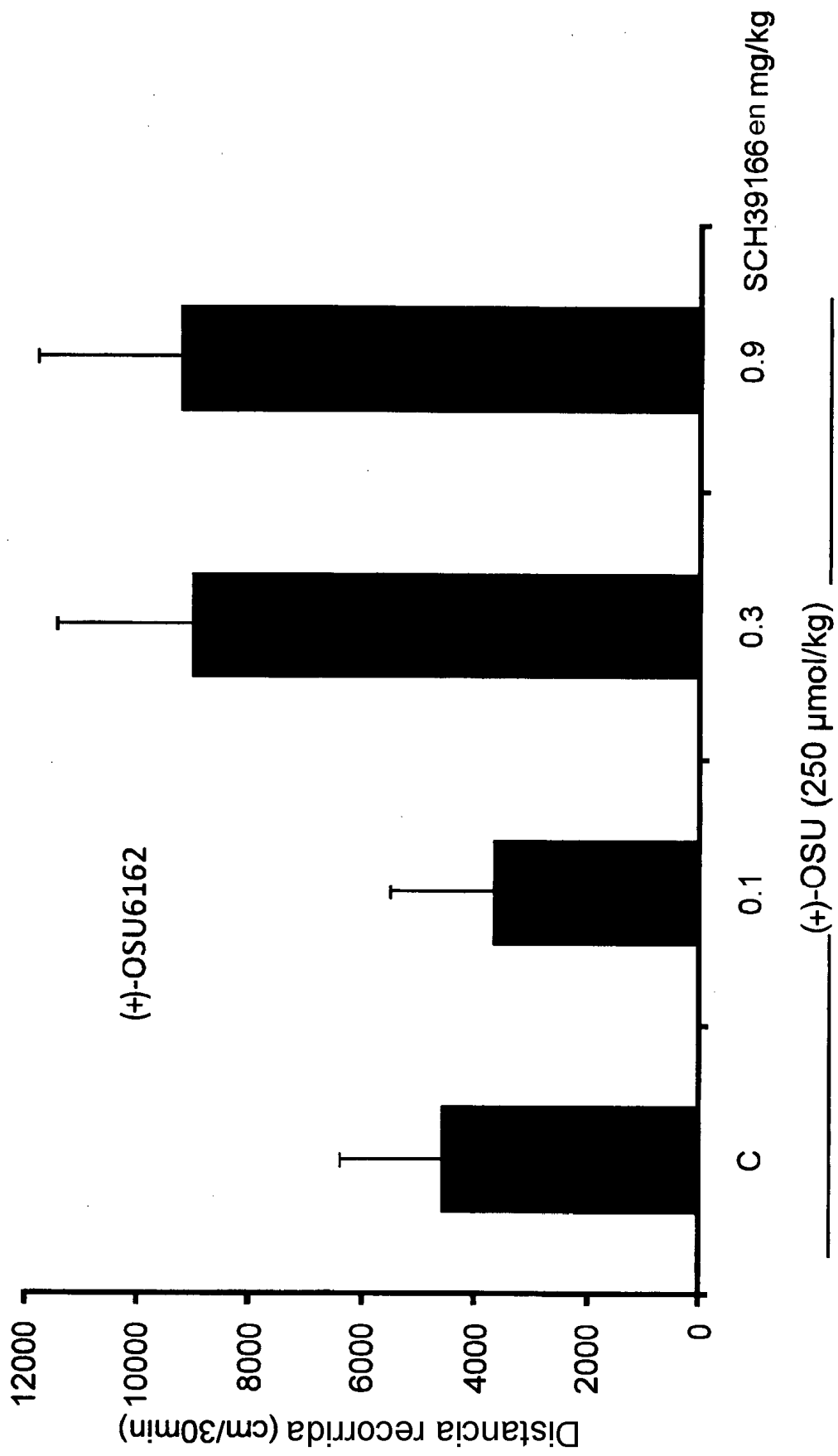


Fig. 2E

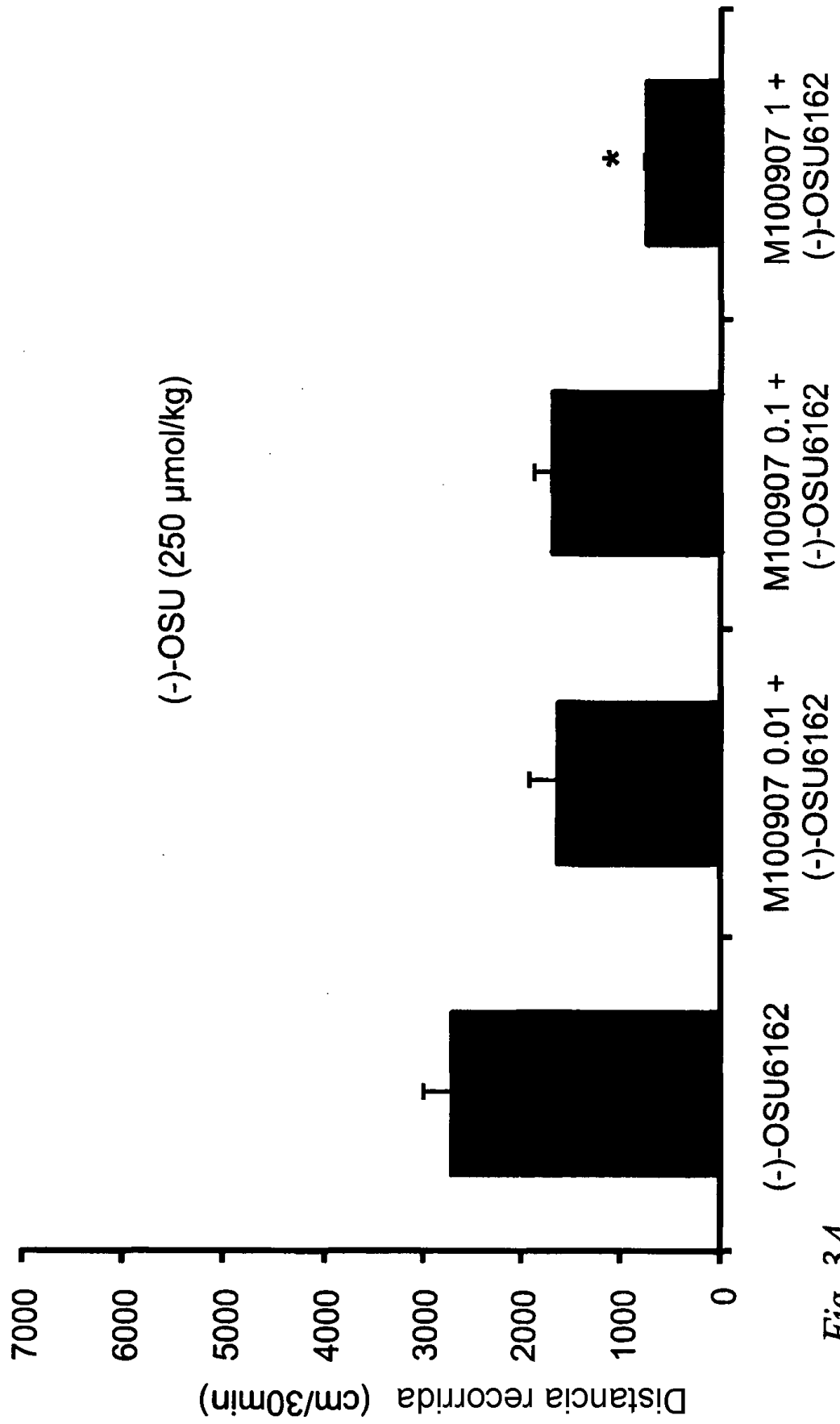


Fig. 3A

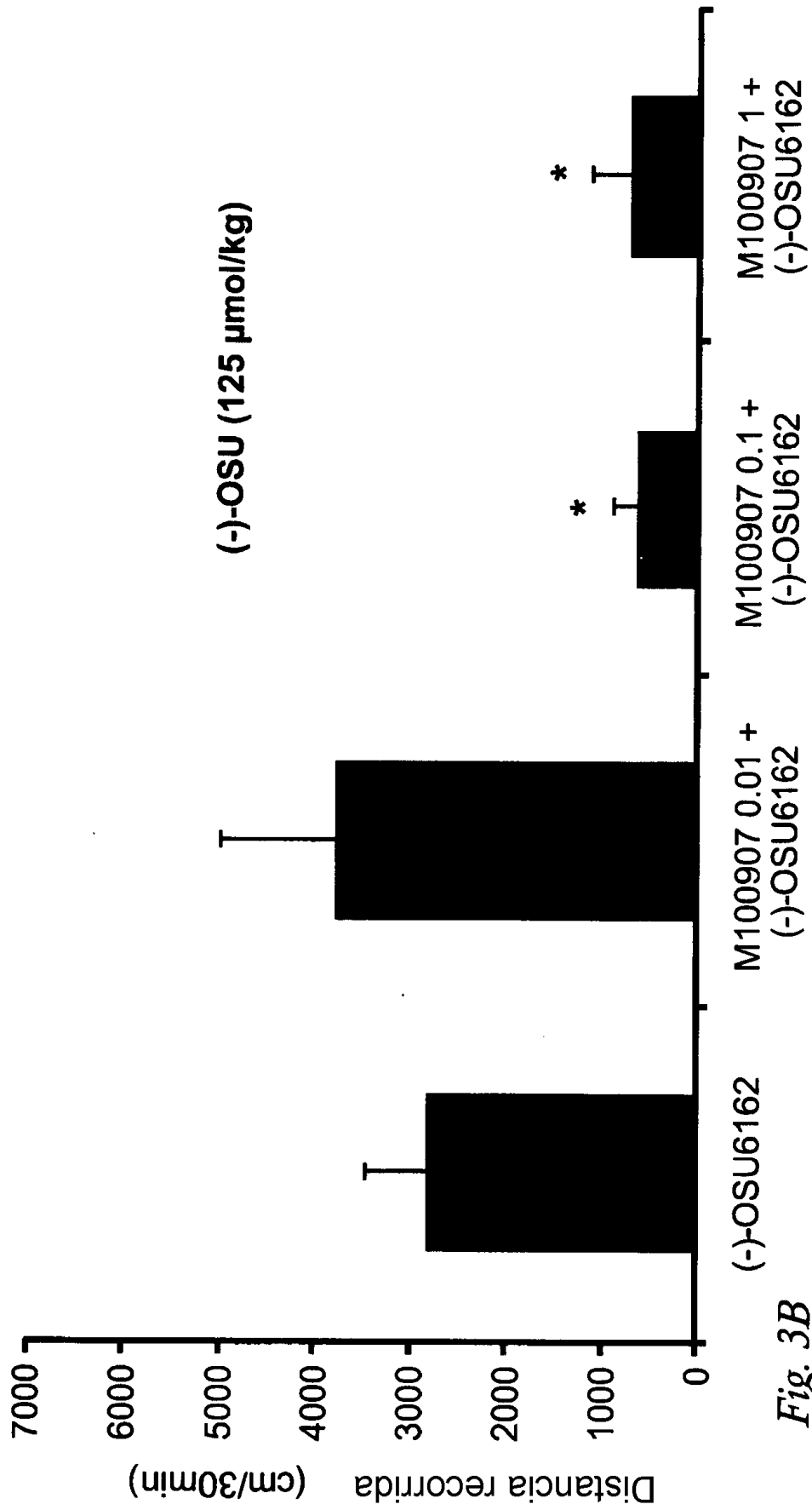


Fig. 3B

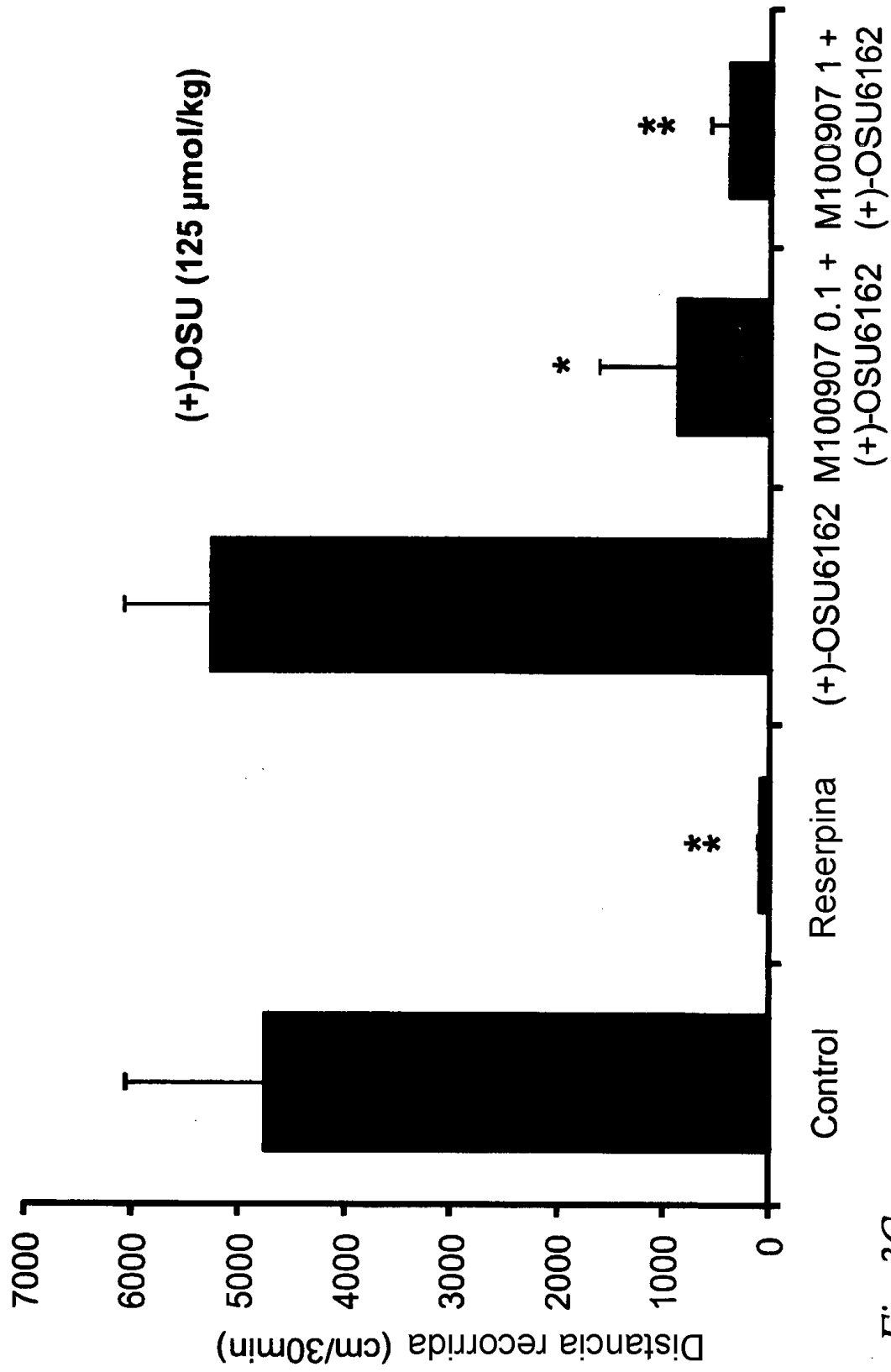


Fig. 3C

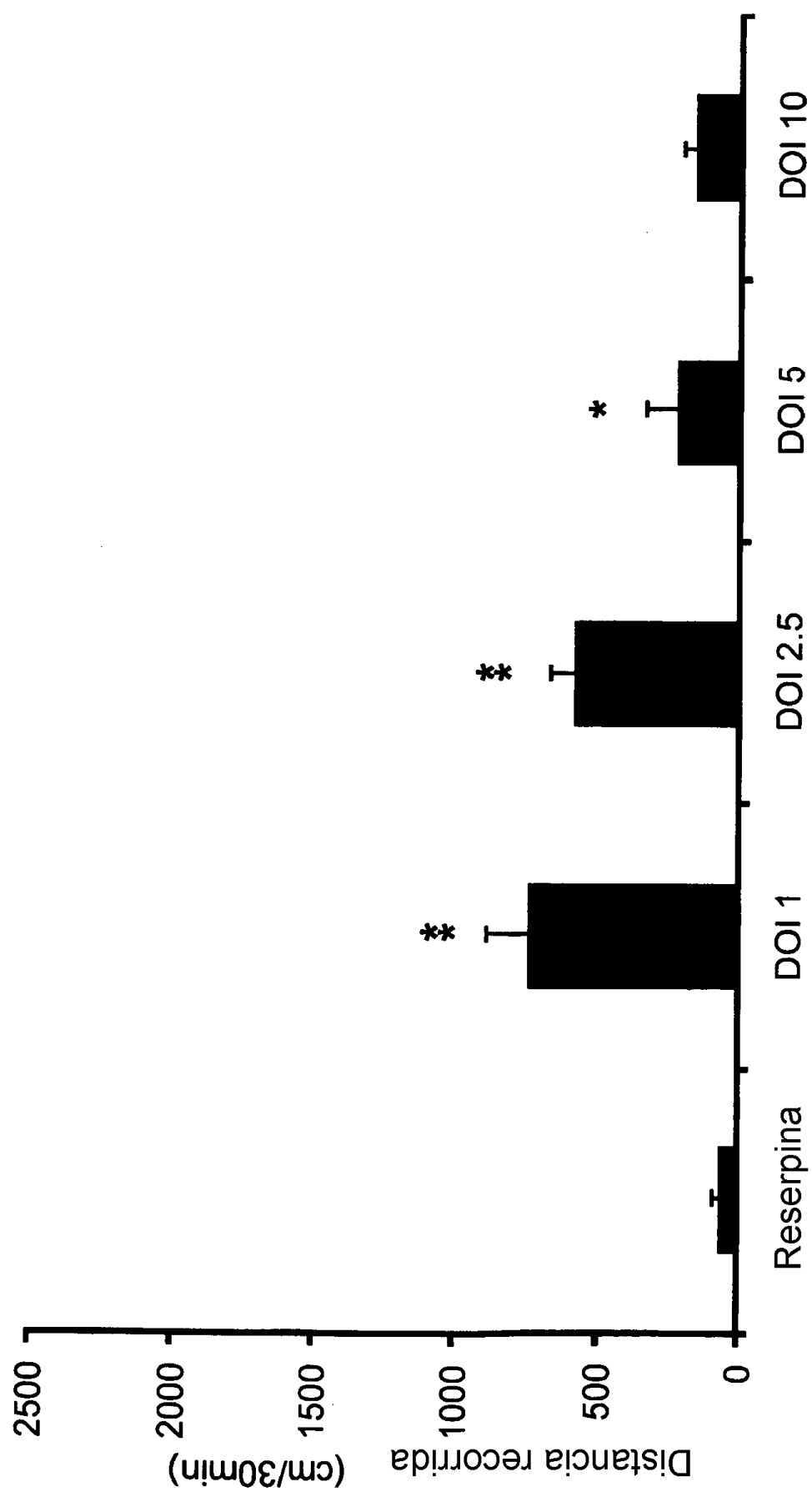


Fig. 4A

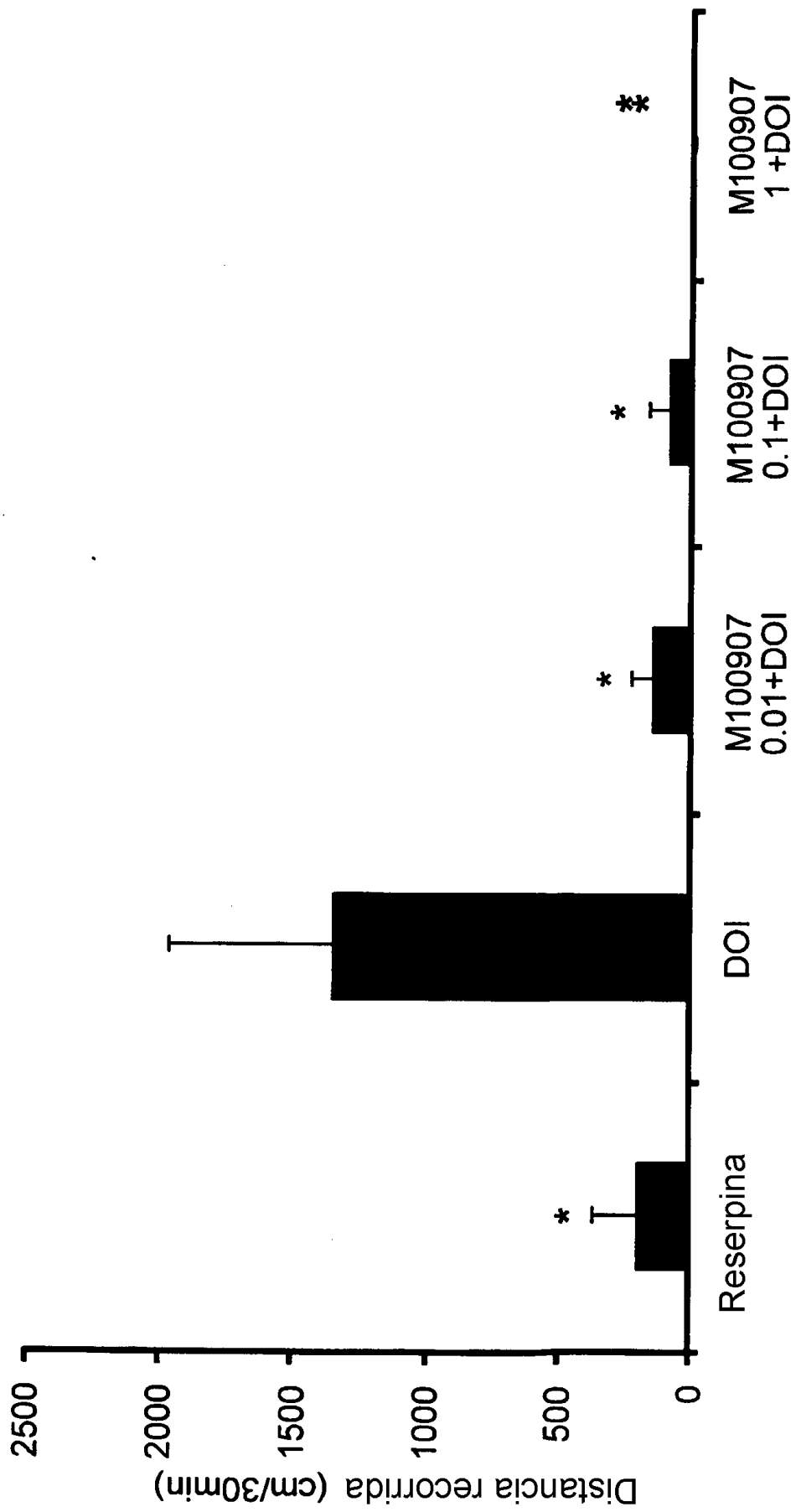


Fig. 4B

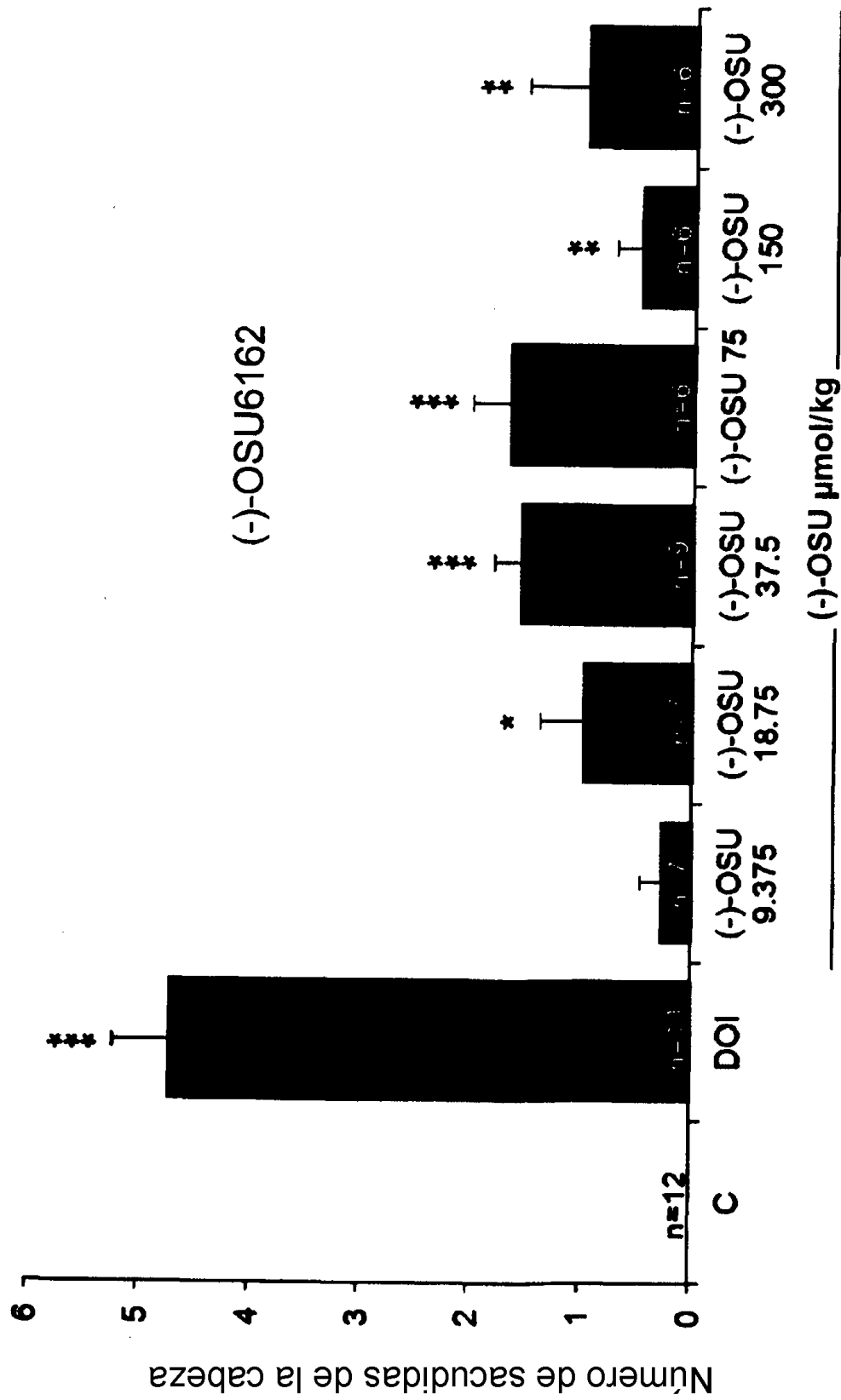


Fig. 5A

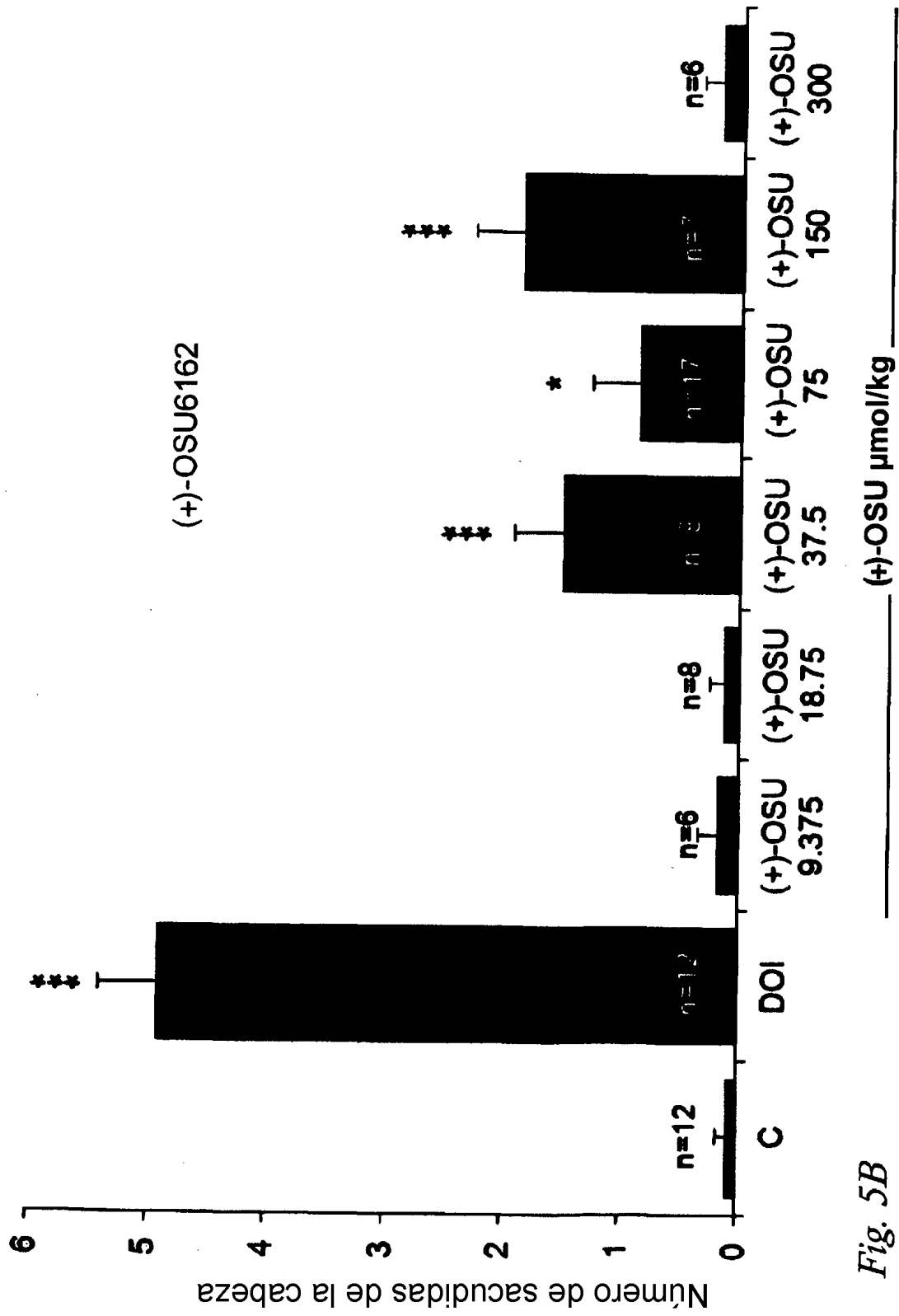


Fig. 5B

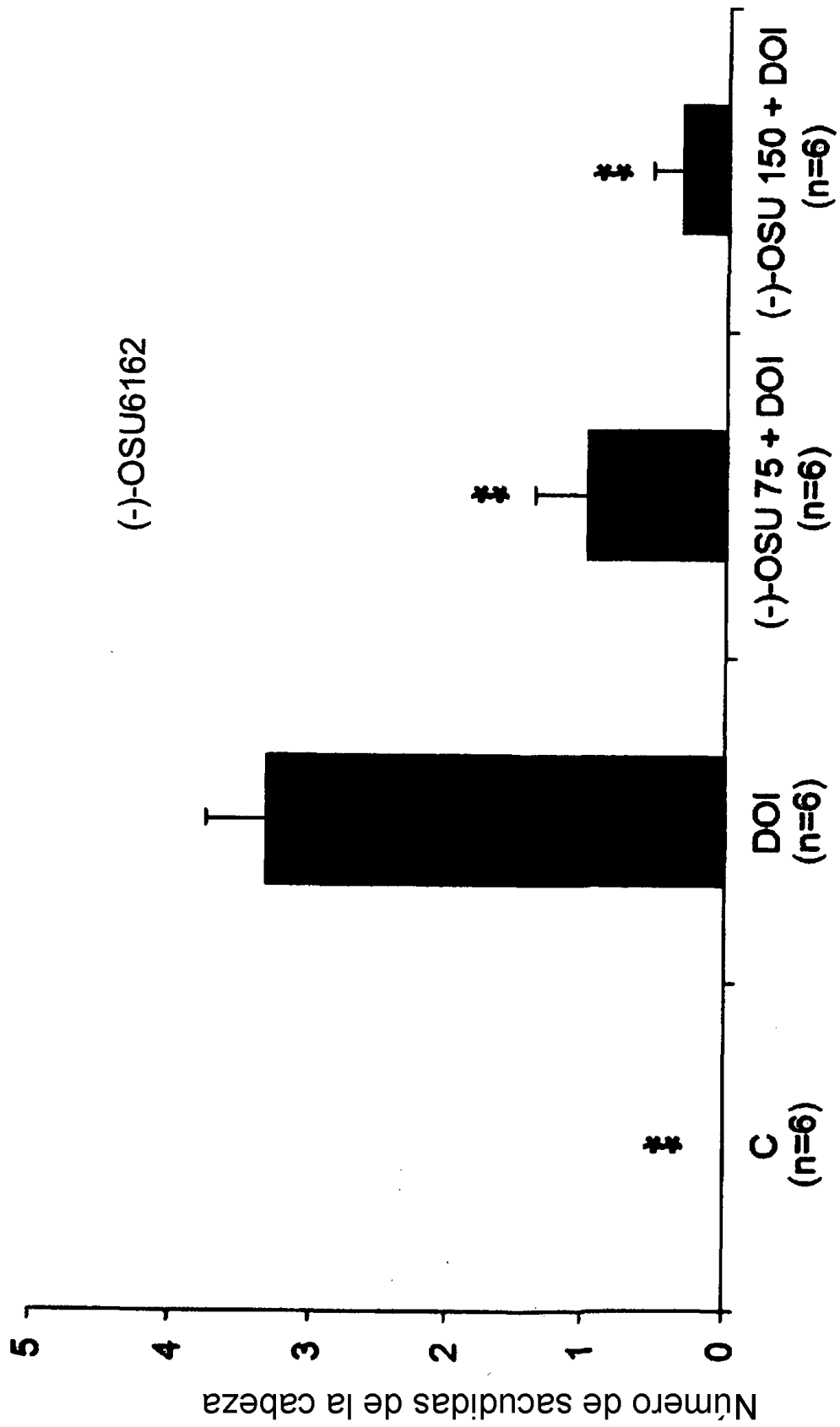


Fig. 6A

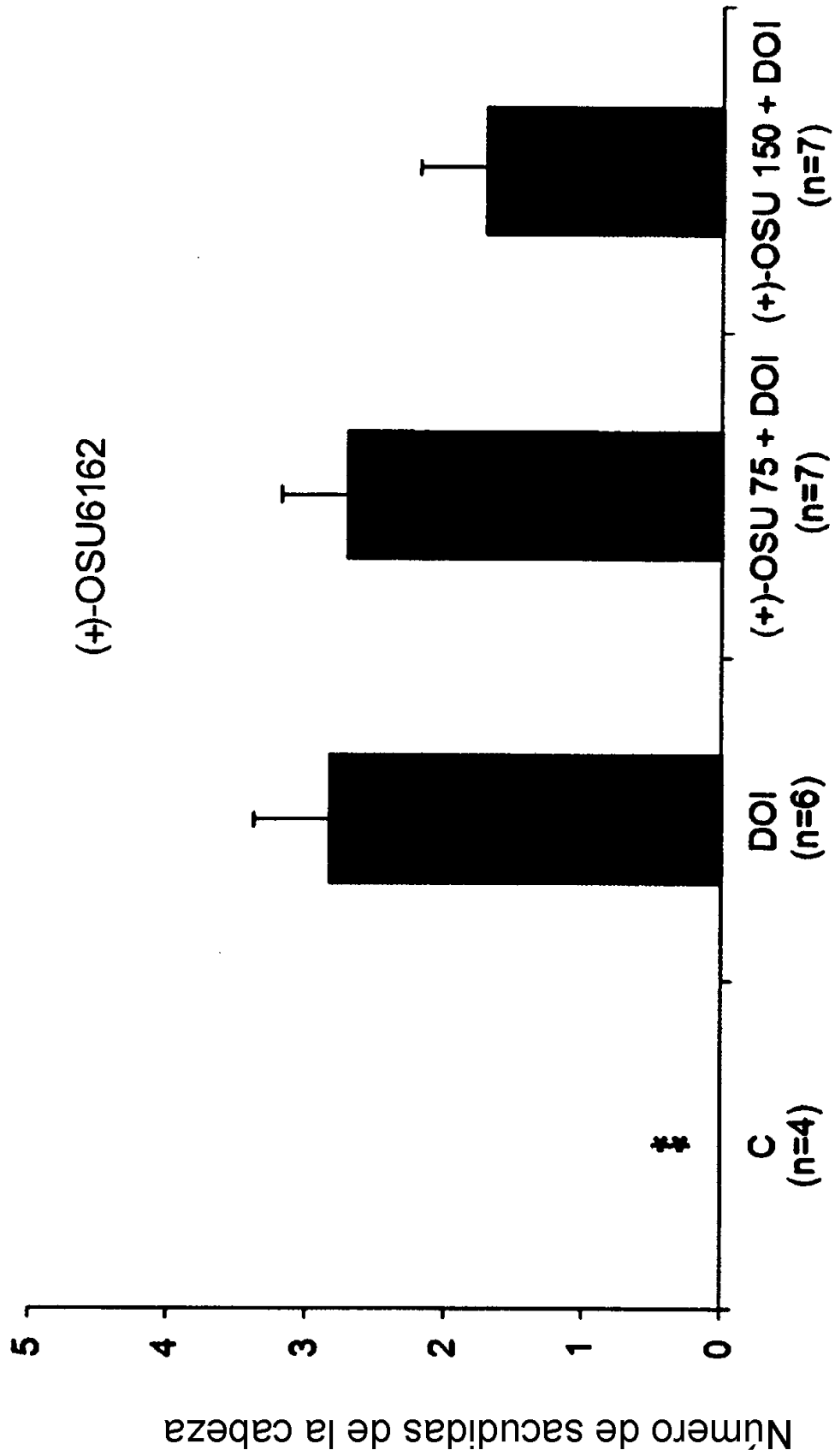


Fig. 6B

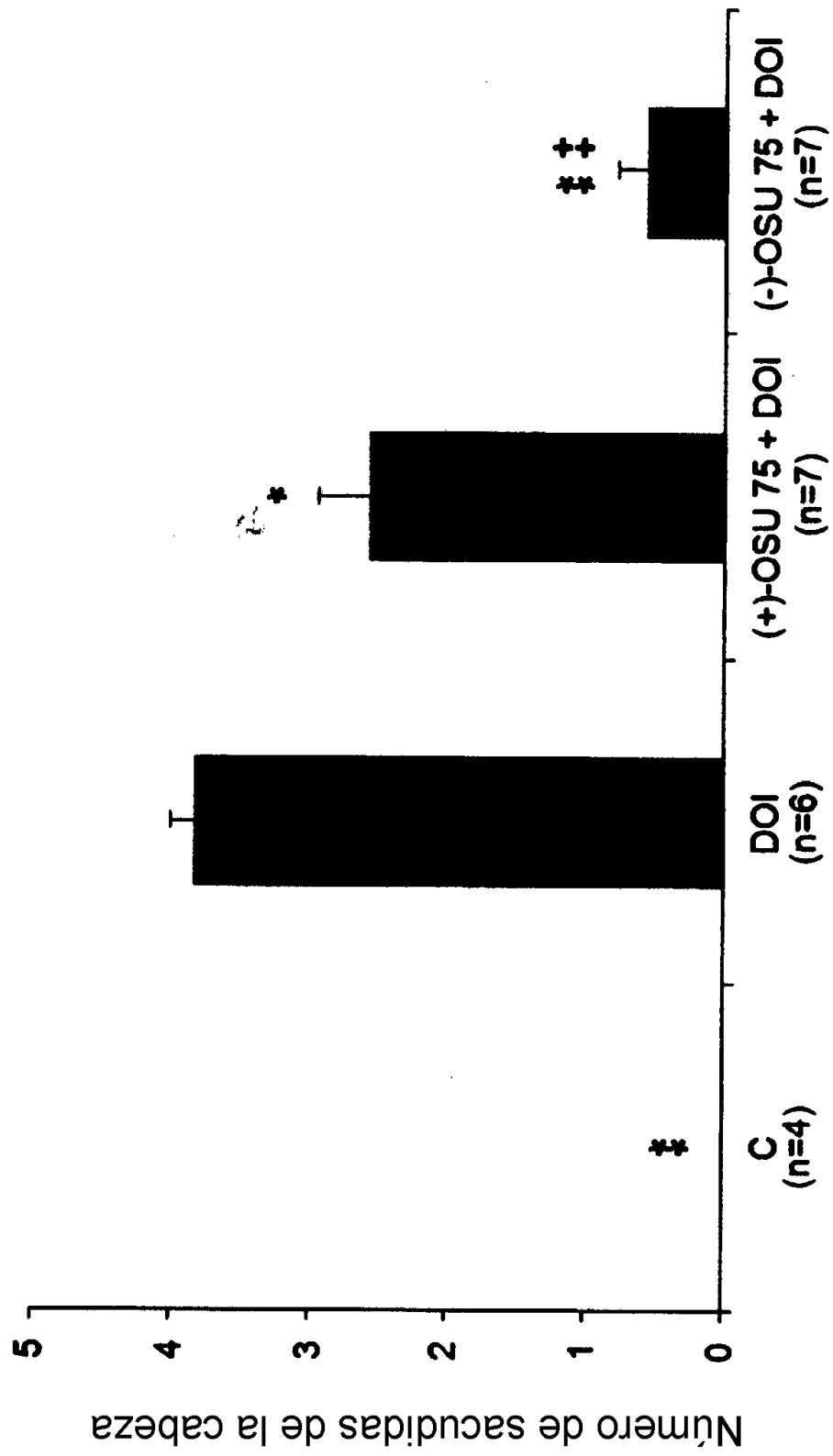


Fig. 6C

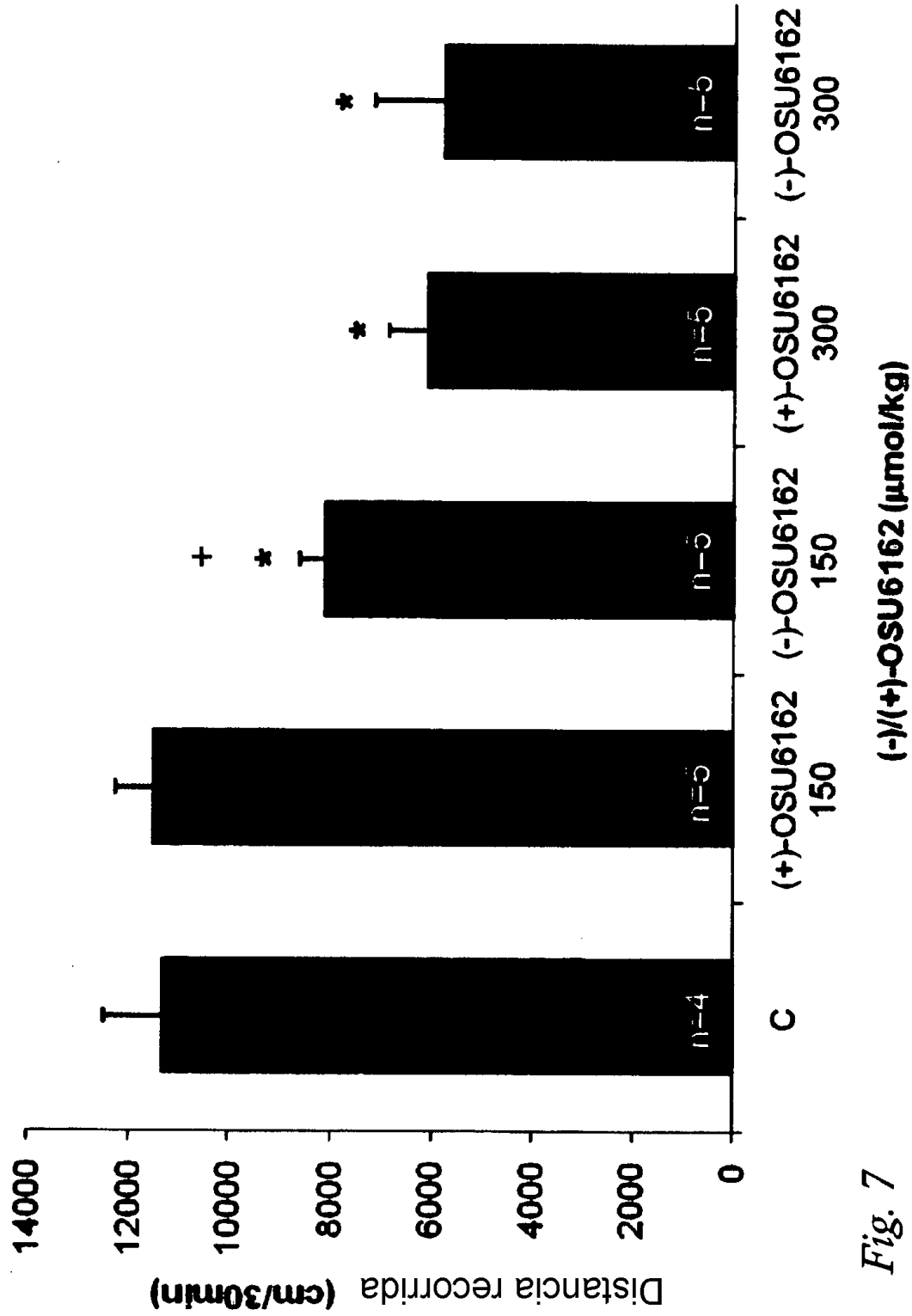


Fig. 7

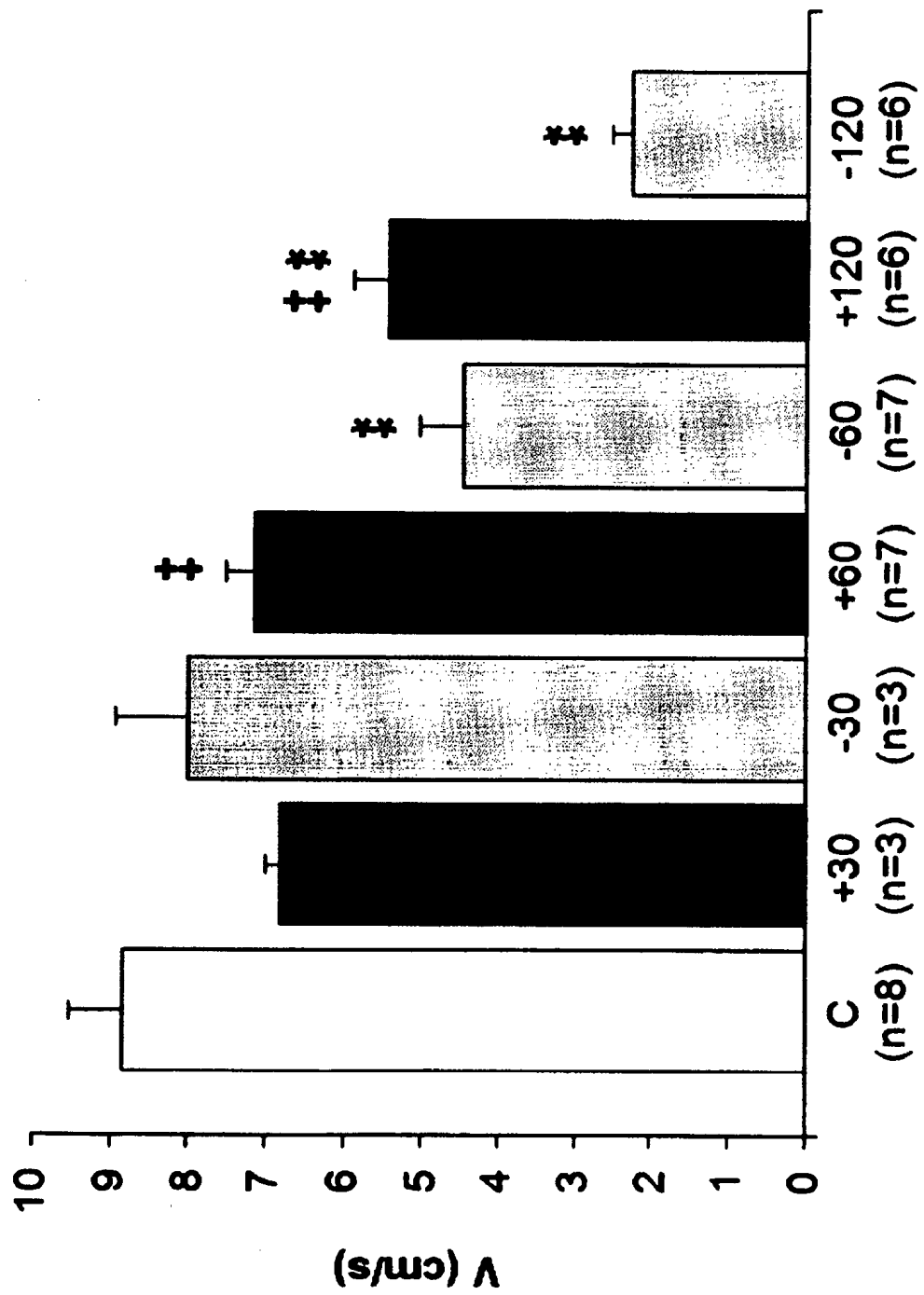


Fig. 8
(+/-)-OSU6162 ($\mu\text{mol/kg}$)

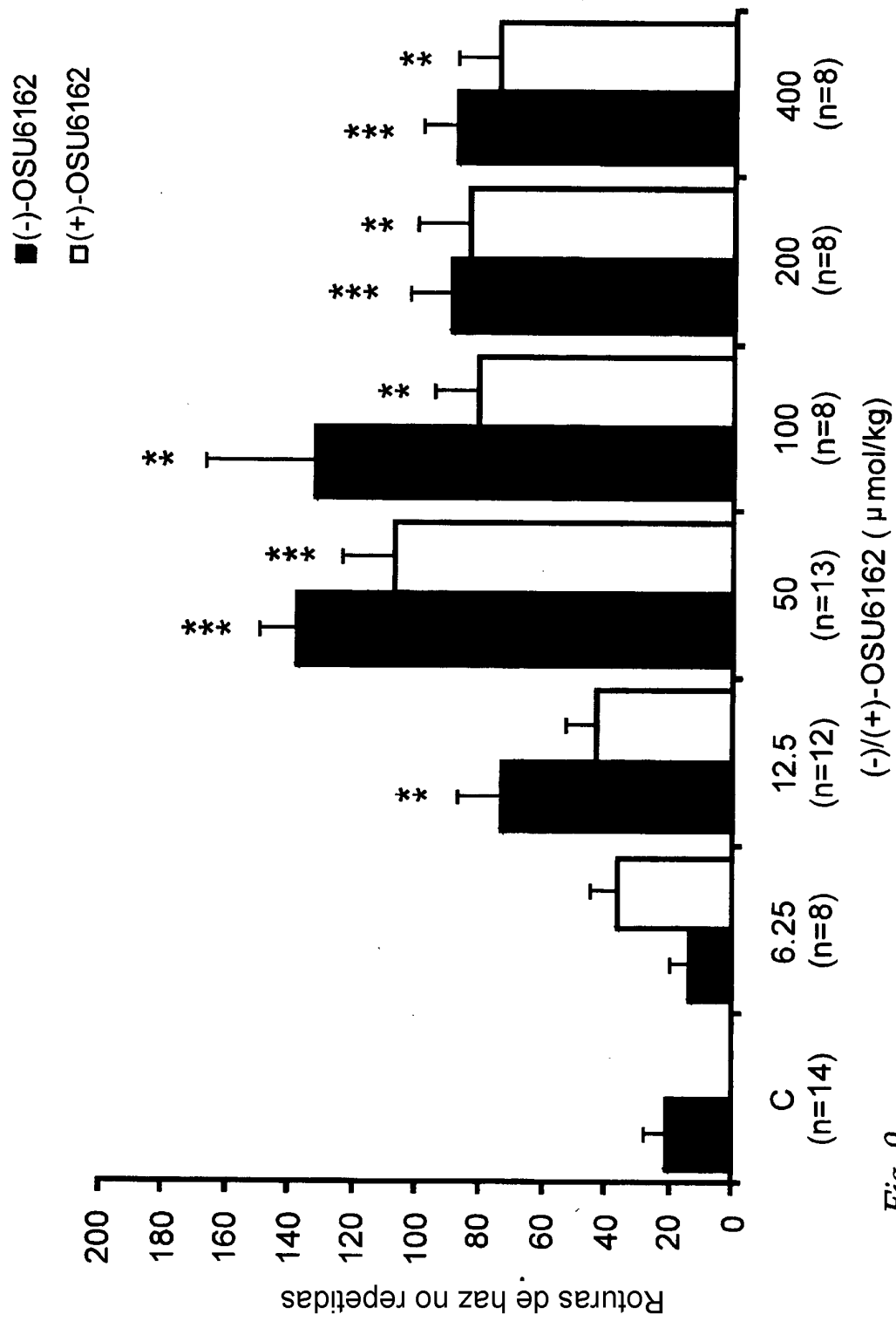
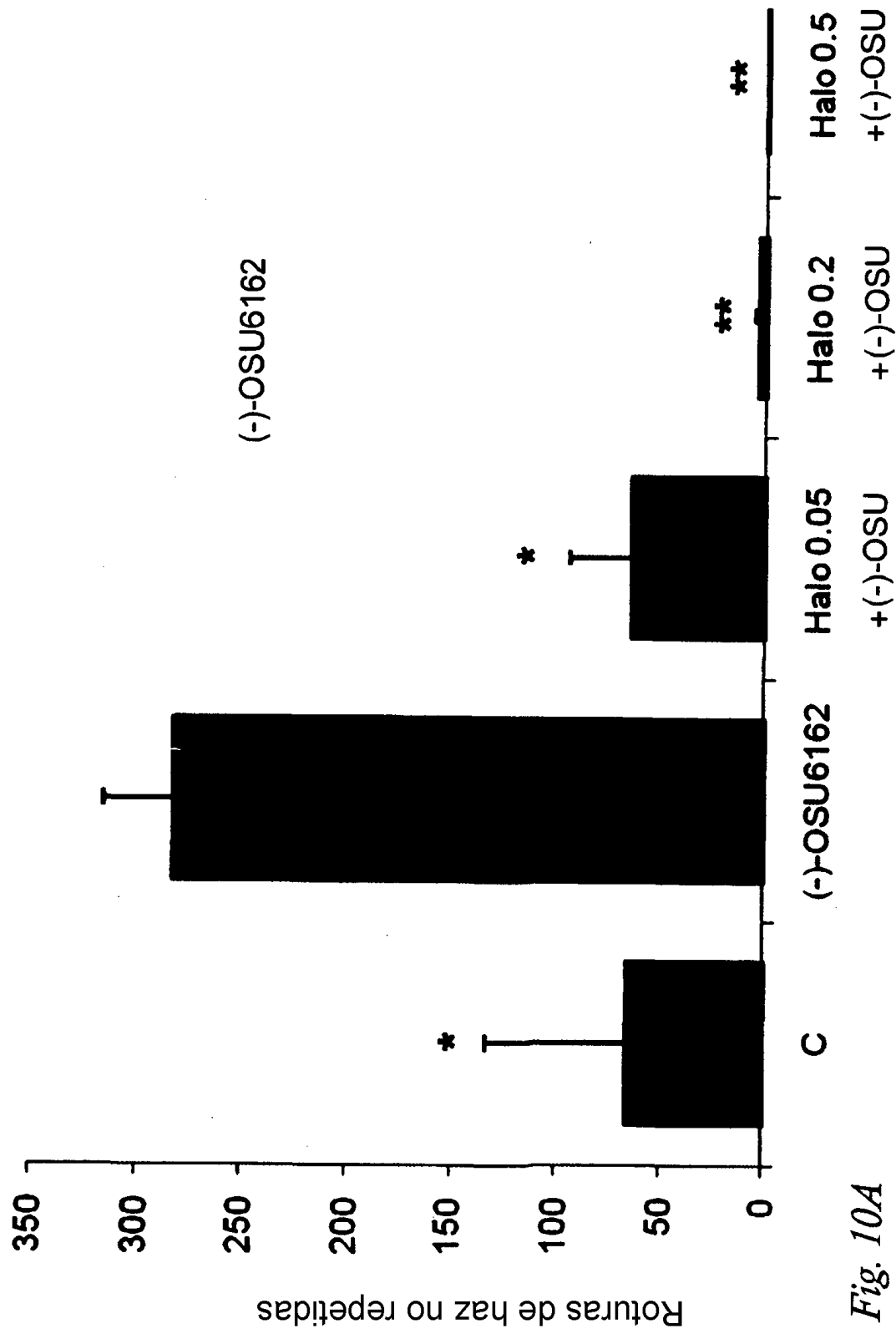


Fig. 9



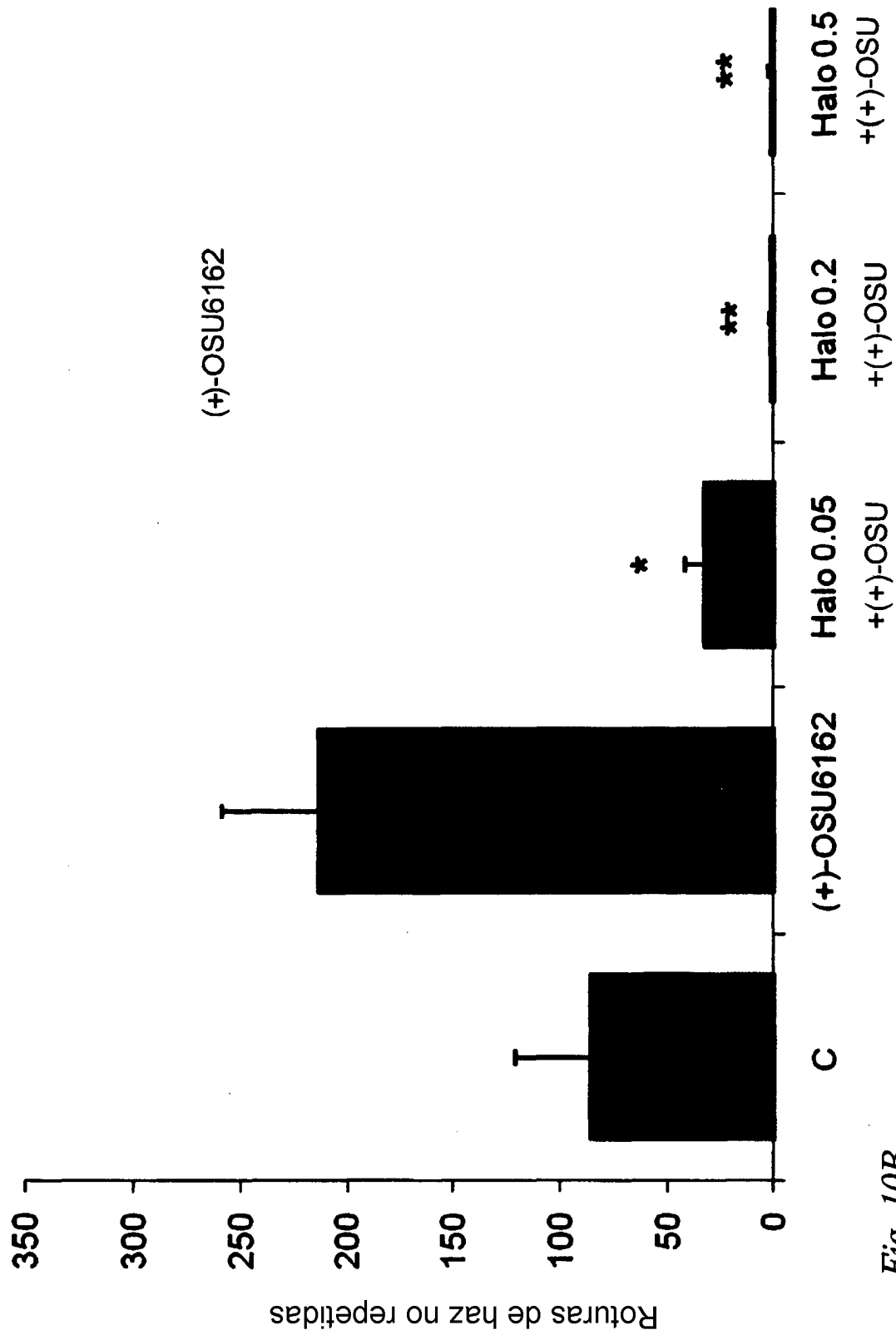
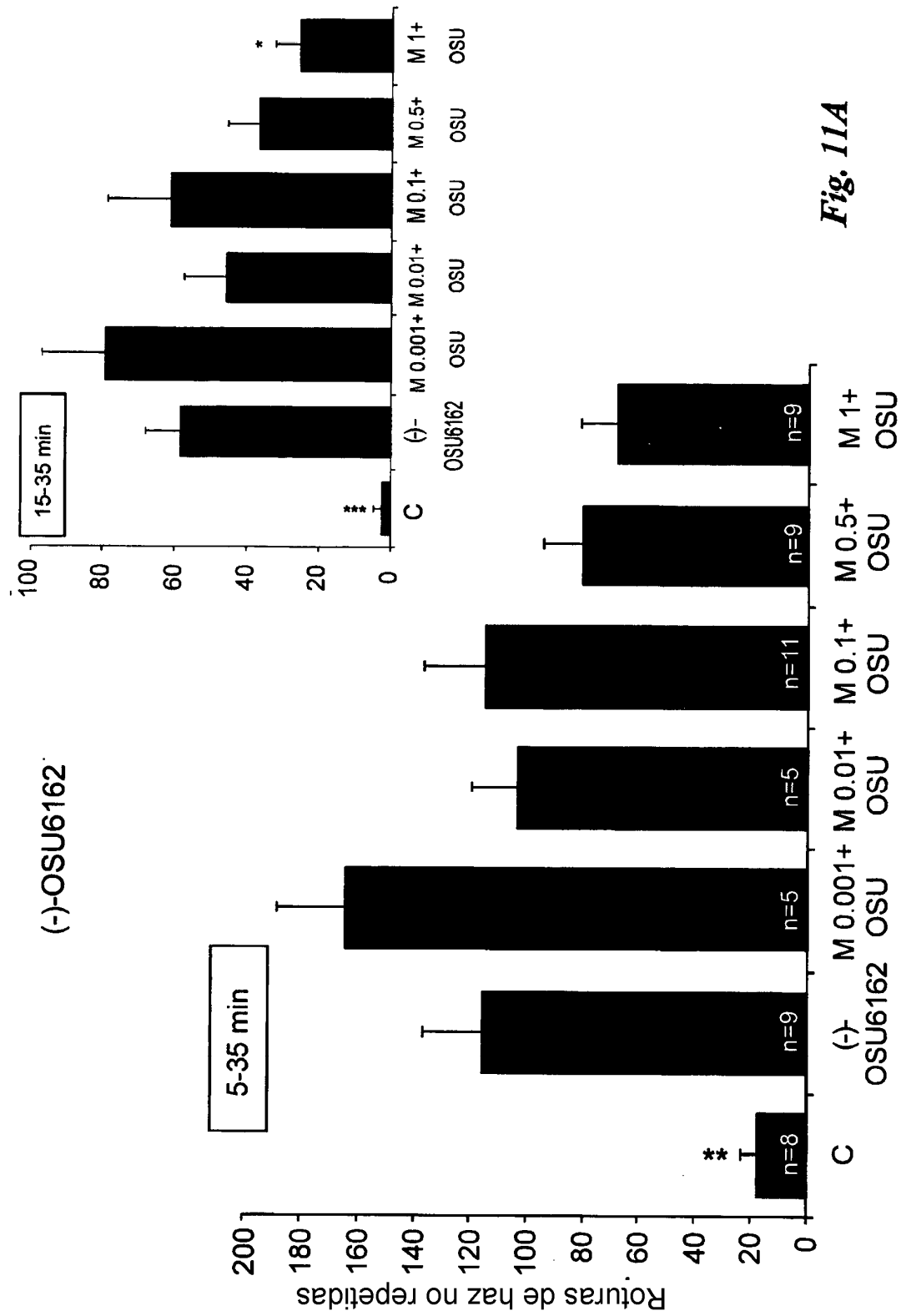


Fig. 10B



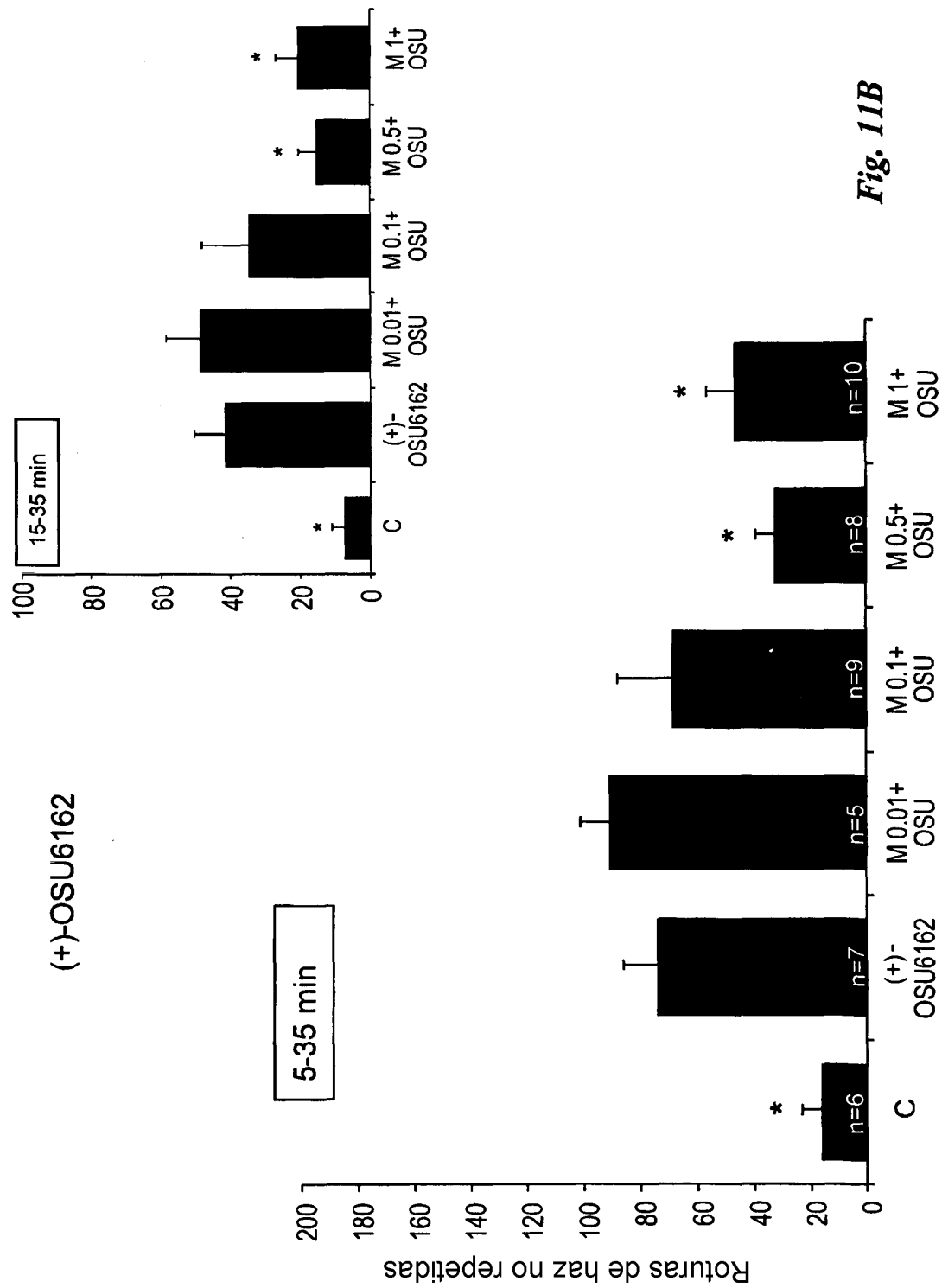


Fig. 11B

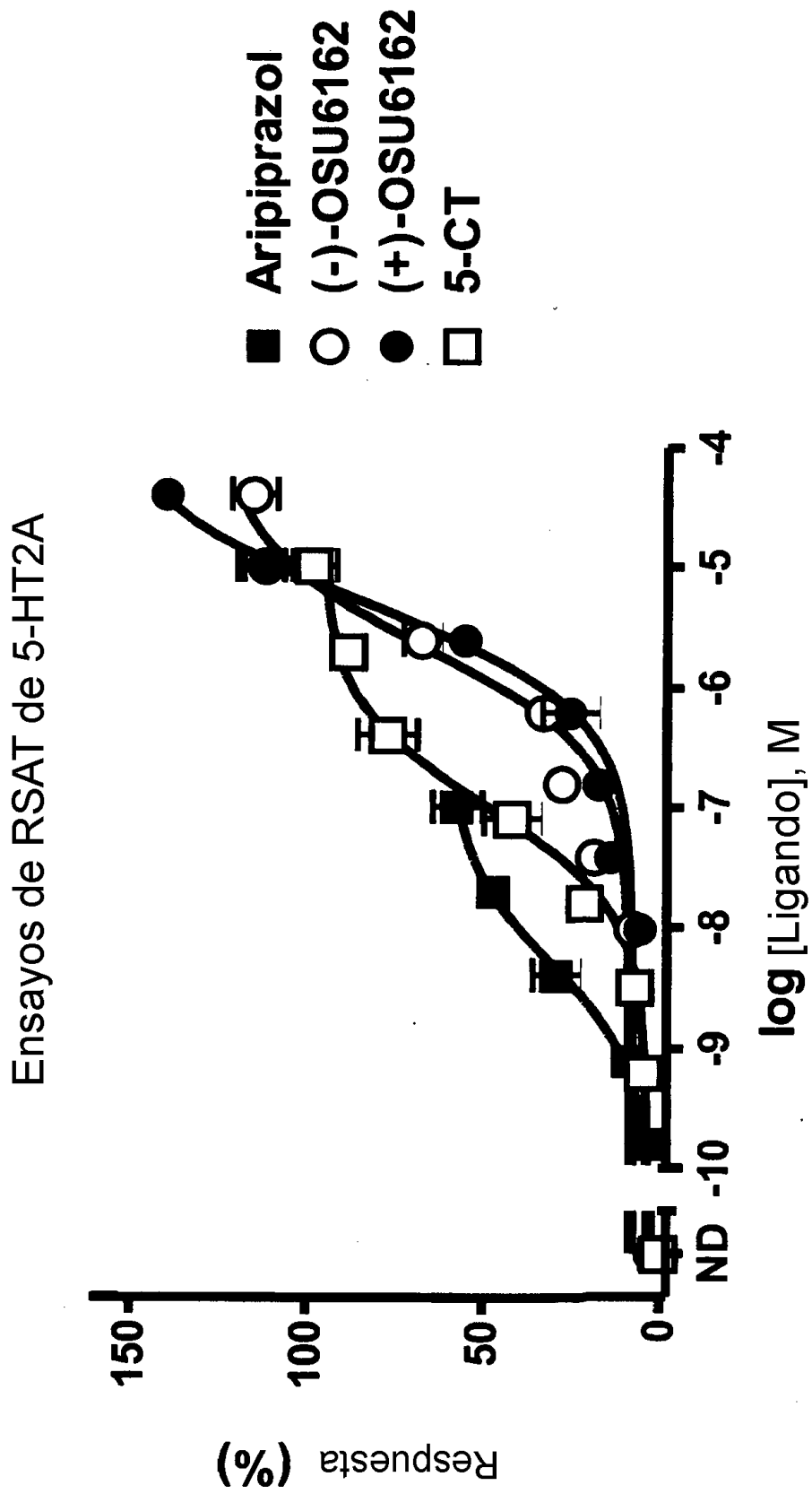


Fig. 12

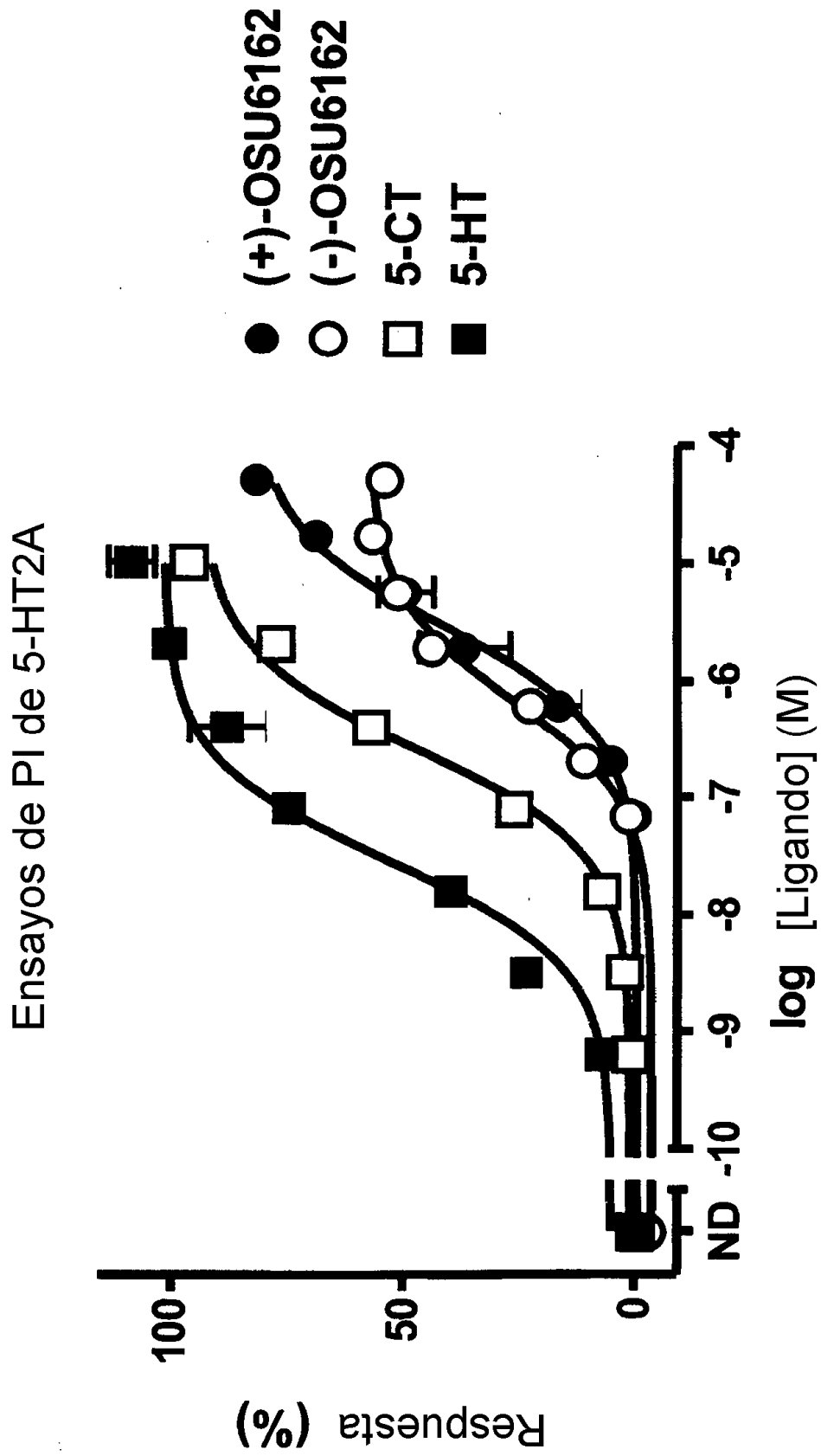


Fig. 13

Ensayos de BRET2 de 5-HT2A

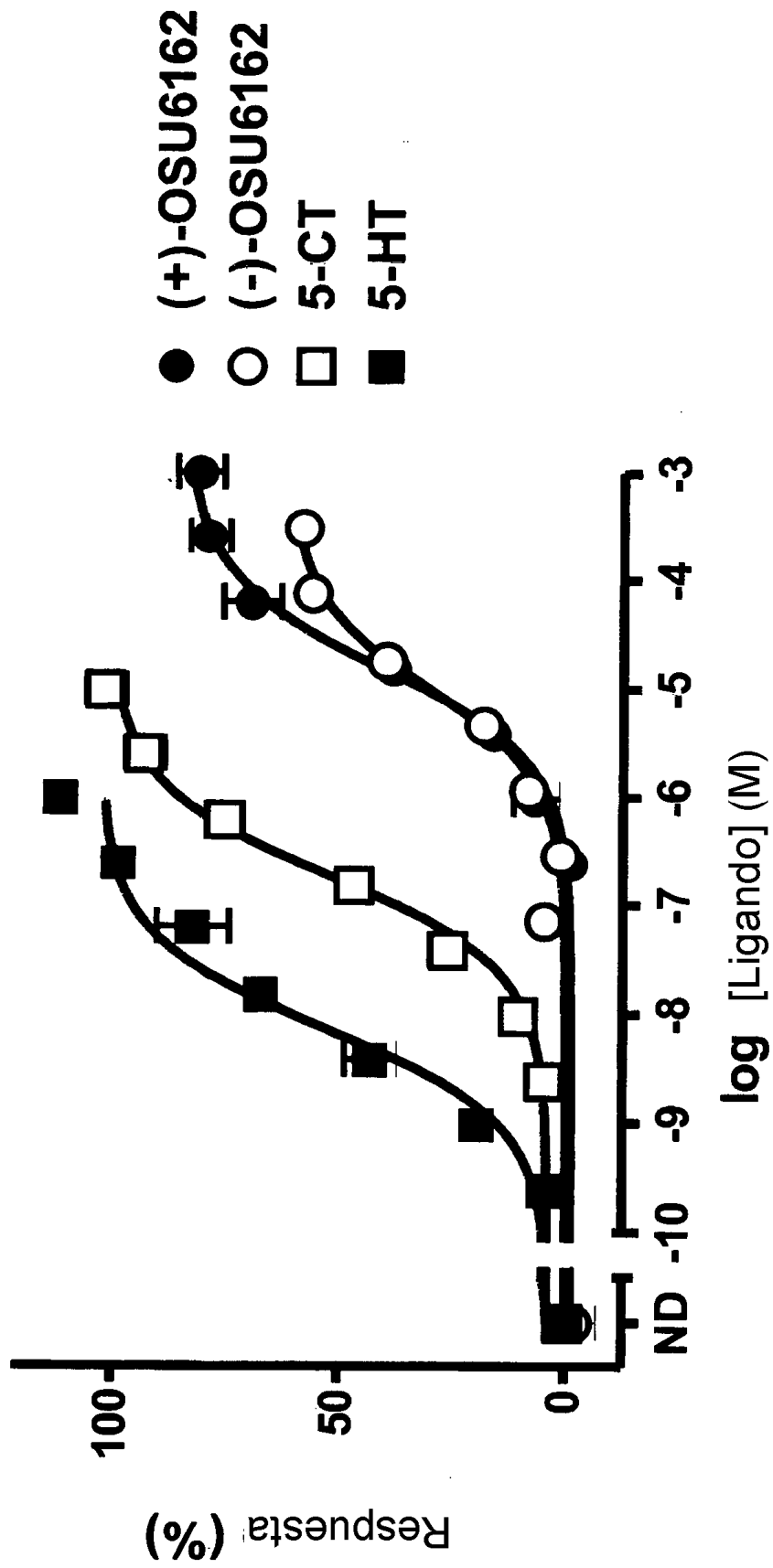


Fig. 14

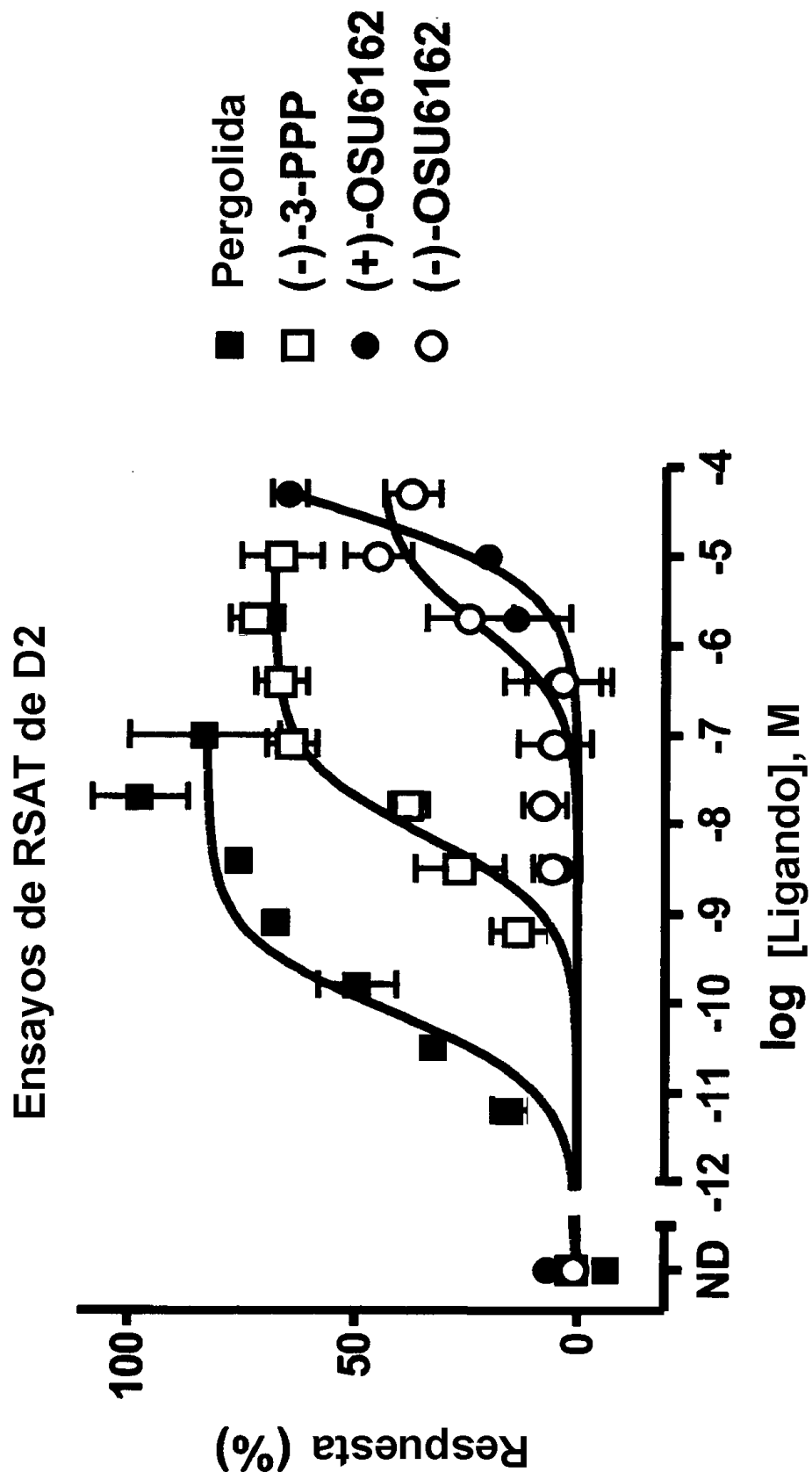


Fig. 15

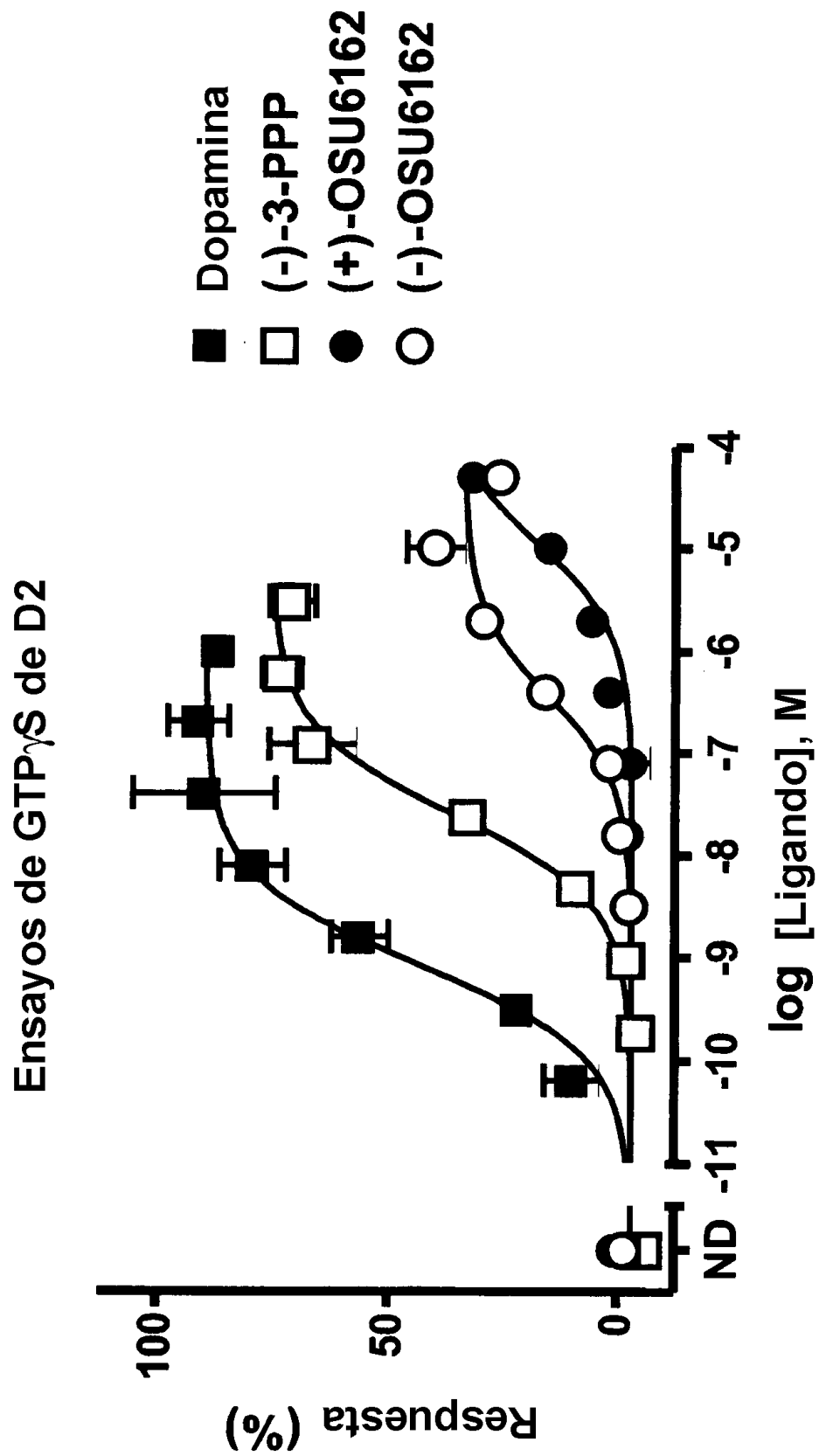


Fig. 16

Ensayos de BRET2 de D2

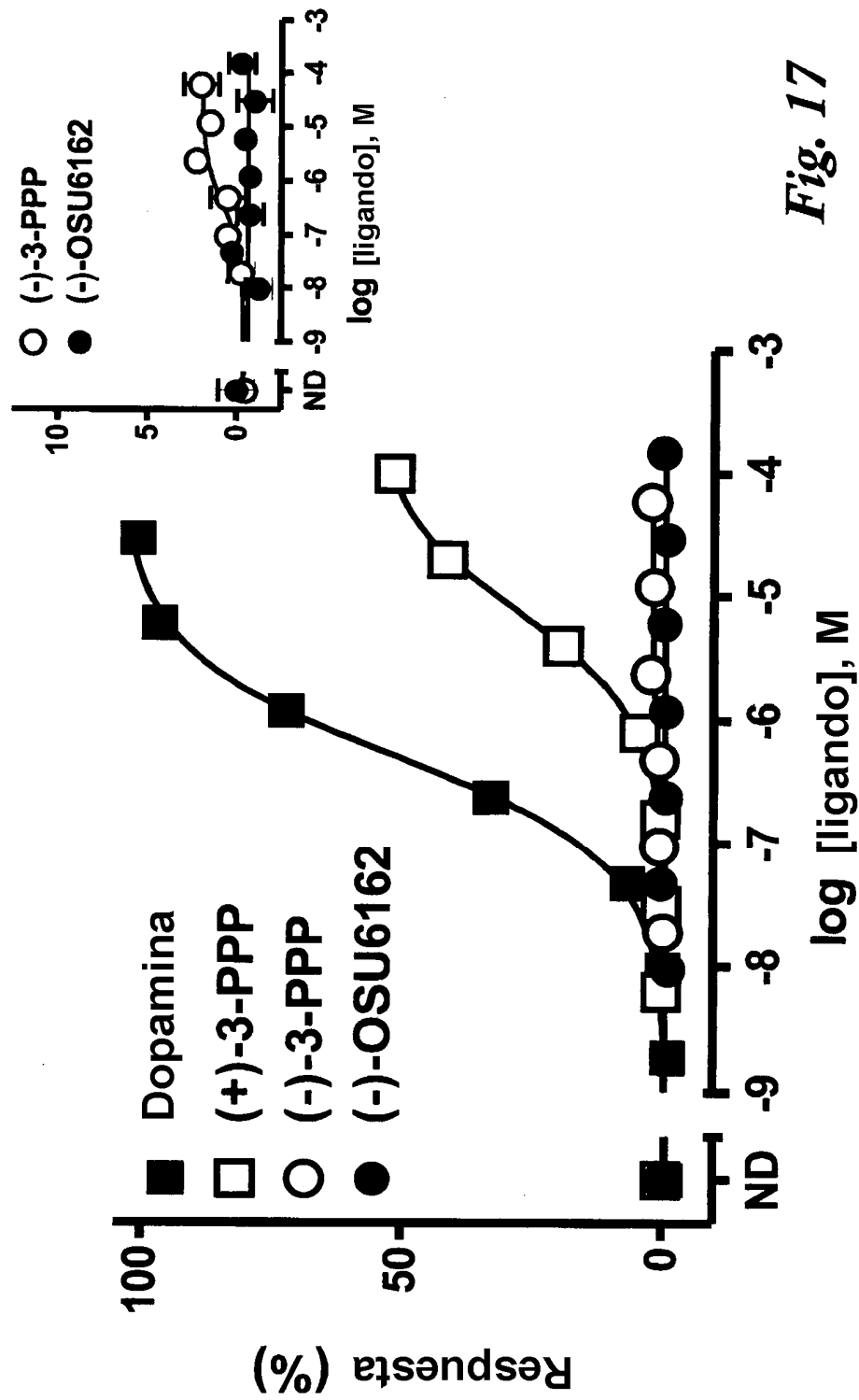


Fig. 17

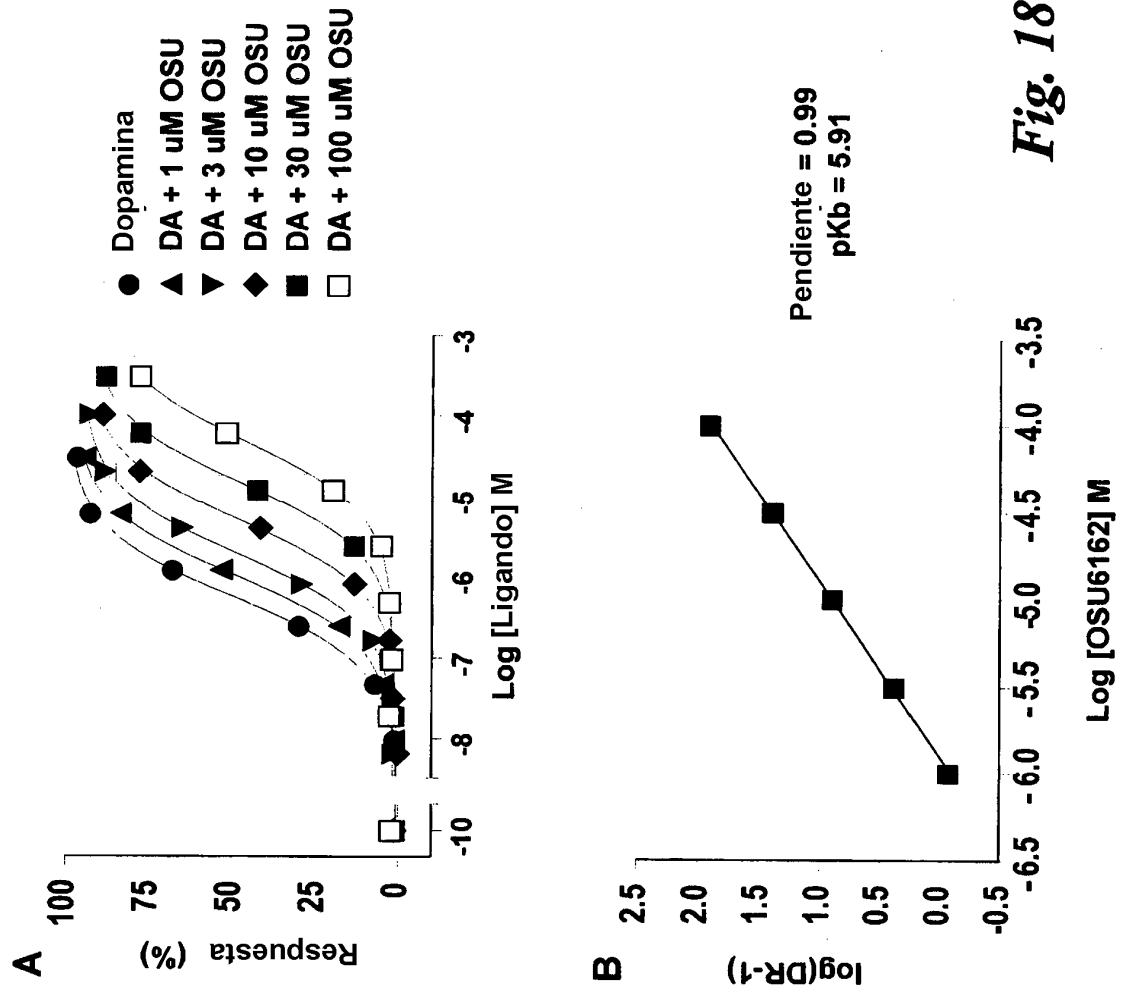


Fig. 18