

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 852**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2008 PCT/US2008/072066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09020897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2008 E 08782602 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2185155**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen ligandos del receptor de dopamina y procedimientos de tratamiento usando ligandos del receptor de dopamina**

30 Prioridad:

03.08.2007 US 953694 P

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

09.02.2018

73 Titular/es:

**RICHTER GEDEON NYRT. (100.0%)
GYOMROI UT 19-21.
1103 BUDAPEST, HU**

72 Inventor/es:

**ADHAM, NIKÁ y
SAMORISKI, GARY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 852 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

Composiciones farmacéuticas que contienen ligandos del receptor de dopamina y procedimientos de tratamiento usando ligandos del receptor de dopamina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la cariprazina y a sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento del trastorno depresivo mayor.

Antecedentes de la invención

10 La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico incapacitante de por vida con una prevalencia mundial notificada de aproximadamente el 1 %, incluyendo 3,2 millones de estadounidenses (véase, por ejemplo, Mueser y McGurk, *Lancet*, 363, 2063-72, 2004). El trastorno por lo general se manifiesta durante la adolescencia o en la adultez temprana; los síntomas cardinales se dividen en tres dominios: síntomas positivos, tales como delirios y alucinaciones, síntomas negativos, tales como la falta de impulso y el aislamiento social, y síntomas cognitivos, tales como problemas de atención y memoria. Esto conduce a la disfunción social y laboral, lo que inevitablemente tiene un efecto profundo sobre la familia y el lugar del individuo afectado en la sociedad en general. Además de los
15 síntomas psiquiátricos, los pacientes con esquizofrenia están en mayor riesgo de comorbilidades médicas que la población general.

20 Las directrices actuales recomiendan los antipsicóticos atípicos, incluyendo risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona y el aripiprazol, como tratamiento de primera línea para la esquizofrenia. Estos fármacos pueden caracterizarse de manera uniforme por su modo de acción doble: además del antagonismo del receptor de dopamina D₂, también son inhibidores potentes del receptor de serotonina 5-HT_{2A}.

Aunque son una mejora sobre los neurolépticos clásicos, los antipsicóticos atípicos aún tienen inconvenientes en el tratamiento eficaz de la enfermedad. En particular, estos fármacos se asocian a una alta incidencia de efectos secundarios (por ejemplo, síntomas extrapiramidales [SEP] a dosis altas, sedación, efectos cardiovasculares tales como prolongación del intervalo QTc, alteraciones hematológicas, efectos sobre la función sexual, aumento de peso, anomalías metabólicas). Además, la resistencia al tratamiento sigue siendo alta teniendo un 10-30 % de los
25 pacientes poca o ninguna respuesta a los medicamentos antipsicóticos disponibles actualmente y teniendo hasta un 30 % adicional de pacientes una respuesta al tratamiento solo parcial (véase, por ejemplo, Lehman y col., *Am. J. Psychiatry*, 161 (Supl 2), 1-56, 2004). Esto ha llevado a la práctica clínica común del uso experimental de altas dosis de fármacos atípicos, politerapia antipsicótica y potenciación con otros fármacos psicotrópicos (véase, por ejemplo, Zink y col., *Eur. Psychiatry*, 19: 56-58, 2004; Stahl y Grady, *Curr. Med. Chem.*, 11, 313-27, 2004).

30 El trastorno bipolar es una enfermedad compleja y crónica que provoca cambios de estado de ánimo drásticos y variaciones inusuales en la energía y el comportamiento y, en última instancia, da como resultado alteraciones funcionales; se asocia a una morbilidad y mortalidad significativas. Se manifiesta como alteraciones en el estado de ánimo y la energía, de la euforia y la excitación a la depresión y el retraso psicomotor (Goodwin y Jamison, 1990 (Goodwin FK, Jamison KR. En: *Manic-depressive illness*. Nueva York: Oxford University Press, 642-647, 1990), y se asocia a una morbilidad y mortalidad significativas. Las tasas de suicidio dentro de esta población se encuentran entre las más altas de todas las enfermedades psiquiátricas (Müller-Oerlinghausen y col., *Lancet*, 359 (9302), 241-7, 2002). El trastorno bipolar se trata en fases, presentando cada fase su propio conjunto de retos para el médico
35 especialista. La manía bipolar representa uno de cada siete emergencias psiquiátricas. Los episodios maníacos agudos y mixtos se asocian frecuentemente a alteraciones del comportamiento, físicas, funcionales y cognitivas graves, todas las cuales puede tener importantes consecuencias personales y sociales.

40 Una diversidad de agentes farmacológicos está disponible actualmente para el tratamiento de la manía aguda, incluyendo estabilizadores del ánimo, anticonvulsivos y antipsicóticos. En los últimos años, los antipsicóticos atípicos (por ejemplo, olanzapina, risperidona, quetiapina, ziprasidona, aripiprazol) se han aprobado para la manía en el trastorno bipolar. En comparación con los agentes convencionales, el perfil de efectos secundarios de los antipsicóticos atípicos es más favorable. Sin embargo, los antipsicóticos atípicos se han asociado a un mayor riesgo de efectos secundarios metabólicos, incluyendo la ganancia de peso corporal, dislipidemia, intolerancia a la glucosa y diabetes de tipo II. Debido a este riesgo aumentado, la FDA requiere una etiqueta de advertencia para la diabetes en todos los antipsicóticos atípicos. Otros efectos secundarios habitualmente asociados a las opciones de
45 tratamiento actualmente disponibles para la manía aguda en pacientes bipolares incluyen temblores, enlentecimiento psicomotor, deterioro cognitivo, exacerbación de la agitación, nefrotoxicidad, función tiroidea alterada y disfunción sexual.

50 Por tanto, a pesar de los avances sustanciales en el tratamiento farmacológico del trastorno bipolar, las necesidades de tratamiento aún no han sido satisfechas por las terapias disponibles actualmente y solo un bajo porcentaje de pacientes persistentemente se continúan del tratamiento (Sachs, *J. Clin. Psychopharmacol.*, 23 (3 Supl 1), S2-8, 2003). Un porcentaje significativo de pacientes no responde plenamente a estas opciones de tratamiento y continúa experimentando síntomas subumbral e incluso recaída. Estos inconvenientes limitan su aplicabilidad y dan como resultado o contribuyen a la falta de cumplimiento del paciente.

Los trastornos del estado de ánimo, de los cuales el trastorno depresivo mayor es uno de los más comunes, afectan a una de cada cinco personas durante su vida. La Organización Mundial de la Salud estima que la depresión es actualmente la cuarta causa mundial más importante de pérdida de años de vida ajustada por incapacidad, y que se convertirá en la segunda causa más importante en 2020 (Véase, por ejemplo, *Science*, 288, 39-40, 2000). El trastorno depresivo mayor es un trastorno mental grave que afecta profundamente a la calidad de vida de un individuo. A diferencia del duelo normal o un episodio ocasional de "tristeza", el TDM provoca un largo periodo de oscuridad y desesperanza, y puede robar al paciente la capacidad de disfrutar de actividades o relaciones que antes eran agradables. En algunos casos, los episodios depresivos parecen desencadenarse por un acontecimiento obviamente doloroso, pero el TDM también puede desarrollarse sin un factor estresante específico. Las investigaciones indican que es probable que un episodio inicial de depresión sea una respuesta a un estímulo específico, pero los episodios posteriores son progresivamente más propensos a comenzar sin ningún acontecimiento desencadenante. Una persona que padece depresión mayor encuentra pesadas las responsabilidades relacionadas con el trabajo y otras tareas de este tipo, como la crianza de los hijos, y solo puede realizarlas con gran esfuerzo. La eficiencia mental y la memoria se ven afectadas, provocando que incluso las tareas más simples sean agotadoras e irritantes. El interés sexual disminuye; muchas personas con TDM se abstraen y evitan cualquier tipo de actividad social. Incluso se pierde con frecuencia la capacidad de disfrutar de una buena comida o del sueño nocturno profundo; muchas personas deprimidas informan de una sensación crónica de malestar (molestia general o malestar). Para algunos, el dolor y el sufrimiento que acompañan al TDM se vuelven tan insoportables que se ve el suicidio como la única opción; el TDM tiene la tasa de mortalidad más alta de cualquier trastorno mental.

El estado de un individuo que padece un trastorno depresivo mayor a veces se complica por el hecho de que el individuo también padece ansiedad. Por tanto, además de los síntomas de su enfermedad depresiva, el paciente puede mostrar signos de preocupación excesiva o incontrolada, irritabilidad, sentimientos de tensión, miedos, inquietud e insomnio, dificultad para concentrarse y múltiples quejas somáticas tales como dolores y molestias, espasmos, rigidez, sacudidas mioclónicas, acúfenos, visión borrosa, sofocos calientes y fríos, etc., todos los cuales se suman al deterioro social y laboral del individuo.

El tratamiento farmacológico de la depresión es frecuentemente inadecuado, muchos pacientes normalmente no consiguen la remisión, incluso después de varios meses de tratamiento. Adicionalmente, hay altas tasas de reaparición - aproximadamente el 85 % de los pacientes que consiguen la remisión van a sufrir otro episodio de depresión mayor. Por último, muchos antidepresivos disponibles actualmente se asocian a efectos secundarios que conducen a algunos pacientes con riesgo de hundirse de nuevo (aún más) en la depresión a dejar de tomar sus medicamentos, y a la morbilidad en los demás.

El uso de risperidona en el tratamiento de trastornos con un síndrome psicótico y depresivo combinado se describe en *Pharmacopsychiat.* 25 (1992) páginas 213-217. El documento XP009156754 describe la monoterapia con risperidona frente a risperidona o haloperidol más sertralina para la depresión mayor con psicosis. La eficacia antidepresiva de la olanzapina como monoterapia en el trastorno depresivo mayor sin psicosis es el objeto de una publicación de J. Mathews y col., *Psychiatry Research: Neuroimaging* 146 (2006, páginas 149 - 155).

De este modo, muchos de los fármacos actuales no son ni completamente seguros ni completamente tolerables para muchos pacientes. Hay, por tanto, una necesidad existente y continua de nuevas formulaciones y nuevos procedimientos para el tratamiento de afecciones tales como la esquizofrenia, la depresión, el trastorno depresivo mayor, la manía aguda y el trastorno bipolar, donde los productos farmacéuticos son eficaces para una gama más amplia de pacientes (en particular pacientes resistentes al tratamiento), que sean seguros y más tolerables, o que complementen la eficacia de los fármacos existentes.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un trastorno depresivo mayor.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo e imipramina sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados).

La Figura 2 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo y clorhidrato de cariprazina sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados).

La Figura 3 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo y oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados).

La Figura 4 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram y clorhidrato de cariprazina sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados).

5 La Figura 5 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram y clorhidrato de cariprazina administrado solo o en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en animales expuestos a estrés leve crónico.

La Figura 6 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram y clorhidrato de cariprazina administrado solo o en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en animales expuestos a estrés leve crónico.

10 La Figura 7 muestra los efectos del tratamiento crónico con clorhidrato de cariprazina solo, oxalato de escitalopram solo o clorhidrato de cariprazina en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en animales expuestos a estrés leve crónico.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a cariprazina y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento del trastorno depresivo mayor.

La cariprazina es un compuesto de fórmula (I) y la síntesis de compuestos de fórmula (I) se desvela en, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2006/0229297. Los compuestos de fórmula (I) son activos por vía oral y antagonistas muy potentes del receptor de dopamina D₃/D₂, que se unen con una potencia significativamente mayor a los receptores D₃ que a los receptores D₂. El antagonismo del receptor D₃ es aproximadamente un orden de magnitud mayor que el antagonismo del receptor D₂, que se cree que contrarresta algunos de los efectos secundarios extrapiramidales producidos por los antagonistas del receptor D₂. Además del aumento de la afinidad relativa para la dopamina de D₃ a D₂, los compuestos de fórmula (I) tienen una potencia baja en otros sitios de receptores tales como 5-HT_{2C}, histamina H₁, y sitios de receptores adrenérgicos, lo que indica una menor probabilidad de efectos secundarios tales como los SEP y la ganancia de peso corporal.

25 En una realización preferida, el compuesto para su uso en el tratamiento del trastorno depresivo mayor es el clorhidrato de trans-4-[2-[4-(2,3-diclorofenil)-ilpiperazin-1]etil]-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina (clorhidrato de cariprazina).

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las obtenidas haciendo reaccionar el compuesto principal, que actúa como una base con un ácido inorgánico u orgánico para formar una sal, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido bromhídrico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido salicílico, ácido mandélico y ácido carbónico. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen aquellas en las que el compuesto principal actúa como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio y colina. Los expertos en la materia reconocerán adicionalmente que las sales de adición de ácido pueden prepararse mediante reacción de los compuestos con el ácido inorgánico u orgánico apropiado a través de cualquiera de un número de procedimientos conocidos. Como alternativa, pueden prepararse sales de metales alcalinos y alcalinotérreos haciendo reaccionar los compuestos de la invención con la base apropiada a través de una diversidad de procedimientos conocidos.

40 Los siguientes son ejemplos adicionales de sales de ácidos que pueden obtenerse por reacción con ácidos inorgánicos u orgánicos: acetatos, adipatos, alginatos, citratos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, butiratos, canforatos, digluconatos, ciclopentanopropionatos, dodecilsulfatos, etanosulfonatos, glucoheptanoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, fumaratos, bromhidratos, yodhidratos, 2-hidroxi-etanosulfonatos, lactatos, maleatos, metanosulfonatos, nicotinos, 2-naftalenosulfonatos, oxalatos, palmoatos, pectinatos, persulfatos, 3-fenilpropionatos, picratos, pivalatos, propionatos, succinatos, tartratos, tiocianatos, tosilatos, mesilatos y undecanoatos.

Por ejemplo, la sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de clorhidrato, una sal de bromhidrato o una sal de oxalato.

Algunos de los compuestos útiles en la presente divulgación pueden existir en diferentes formas polimórficas. Como se sabe en la técnica, el polimorfismo es una capacidad de un compuesto para cristalizarse en forma de más de una especie cristalina o "polimórfica" distinta. El uso de dichos polimorfos está dentro del ámbito de la presente divulgación. Algunos de los compuestos útiles en la presente divulgación pueden existir en diferentes formas de solvato. Los solvatos de los compuestos de la invención también pueden formarse cuando se incorporan moléculas de disolvente en la estructura reticular cristalina de la molécula de compuesto durante el procedimiento de cristalización. Por ejemplo, los solvatos adecuados incluyen hidratos, por ejemplo, monohidratos, dihidratos, sesquihidratos y hemihidratos. El uso de dichos solvatos está dentro del ámbito de la presente divulgación. Un experto habitual en la materia reconocerá que los compuestos de Fórmula I pueden existir en diferentes formas tautómeras e isómeras geométricas. Todos estos compuestos, incluyendo los isómeros *cis*, los isómeros *trans*,

mezclas diastereoméricas, racematos, mezclas no racémicas de enantiómeros, enantiómeros sustancialmente puros y puros, están dentro del ámbito de la presente divulgación. Los enantiómeros sustancialmente puros contienen no más del 5 % p/p del enantiómero opuesto correspondiente, tal como no más del 2 %, por ejemplo no más del 1 %.

5 Los isómeros ópticos pueden obtenerse por resolución de las mezclas racémicas de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante la formación de sales diastereoisoméricas usando un ácido o base ópticamente activos o la formación de diastereómeros covalentes. Son ejemplos de ácidos apropiados el ácido tartárico, diacetiltartárico, dibenzoiltartárico, ditoluoltartárico y canforsulfónico. Las mezclas de diastereoisómeros pueden separarse en sus diastereómeros individuales basándose en sus diferencias físicas y/o químicas mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante cromatografía o cristalización fraccionada. Después, las bases o ácidos ópticamente activos se liberan de las sales diastereoméricas separadas. 10 Un procedimiento diferente para la separación de isómeros ópticos implica el uso de cromatografía quiral (por ejemplo, columnas de HPLC quiral), con o sin derivación convencional, escogida óptimamente para maximizar la separación de los enantiómeros. Las columnas de HPLC quiral adecuadas son fabricadas por Diacel, por ejemplo, Chiracel OD y Chiracel OJ entre muchas otras, todas seleccionables habitualmente. También son útiles las separaciones enzimáticas, con o sin derivatización. Los compuestos ópticamente activos de Fórmula I pueden obtenerse análogamente mediante la utilización de materiales de partida ópticamente activos en procedimientos de síntesis quiral en condiciones de reacción que no provoquen racemización. 15

Además, un experto habitual en la materia reconocerá que los compuestos de Fórmula I pueden usarse en diferentes formas isotópicas enriquecidas, por ejemplo, enriquecidas en el contenido de ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C y/o ^{14}C . En una realización particular, los compuestos están deuterados. Dichas formas deuteradas pueden fabricarse mediante el procedimiento descrito en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.846.514 y 6.334.997. Como se describe en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.846.514 y 6.334.997, la deuteración puede mejorar la eficacia y aumentar la duración de acción de los fármacos. 20

Pueden sintetizarse compuestos sustituidos con deuterio usando diversos procedimientos tales como los que se describen en: Dean, Dennis C.; Editor. *Recent Advances in the Synthesis and Applications of Radiolabeled Compounds for Drug Discovery and Development*. [En: *Curr., Pharm. Des.*, 2000; 6(10)] (2000), página 110. CAN 133:68895 AN 2000:473538 CAPLUS; Kabalka, George W.; Varma, Rajender S. *The synthesis of radiolabeled compounds via organometallic intermediates*. *Tetrahedron* (1989), 45(21), 6601-21, CODEN: TETRAB ISSN:0040-4020. CAN 112:20527 AN 1990:20527 CAPLUS; y Evans, E. Anthony. *Synthesis of radiolabeled compounds*, *J. Radioanal. Chem.* (1981), 64(1-2), 9-32. CODEN: JRACBN ISSN:0022-4081, CAN 95:76229 AN 1981:476229 CAPLUS. 25 30

Formas de Dosificación

Hay disponibles numerosas referencias convencionales que describen procedimientos para preparar diversas formulaciones adecuadas para la administración de los compuestos de acuerdo con la invención. Ejemplos de posibles formulaciones y preparaciones están contenidos, por ejemplo, en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Asociación Farmacéutica Estadounidense (edición actual); *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (Lieberman, Lachman y Schwartz, editores) edición actual, publicado por Marcel Dekker, Inc., así como *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Arthur Osol, editor), 1553-1593 (edición actual). 35

El modo de administración y las formas de dosificación están estrechamente relacionados con las cantidades terapéuticas de los compuestos o composiciones que son deseables y eficaces para la aplicación del tratamiento dado. 40

Las formas de dosificación adecuadas incluyen la administración oral, rectal, sublingual, mucosa, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática e intrauterina, y otras formas de dosificación para la entrega sistémica de ingredientes activos. Se prefieren las formulaciones adecuadas para la administración oral. 45

Para preparar dichas formas de dosificación farmacéuticas, el ingrediente activo, se mezcla normalmente con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas convencionales de preparación de compuestos farmacéutica. El vehículo puede tomar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. 50

En la preparación de las composiciones en una forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Por tanto, para preparaciones orales líquidas, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos y aditivos adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes. Para las preparaciones orales sólidas tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los vehículos y aditivos adecuados incluyen almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse con azúcar o con revestimiento entérico mediante técnicas convencionales. 55

Para formulaciones parenterales, el vehículo comprenderá por lo general agua estéril, aunque pueden incluirse otros ingredientes, por ejemplo, ingredientes que ayudan a la solubilidad o para la conservación. También pueden prepararse soluciones inyectables en cuyo caso pueden emplearse agentes estabilizantes apropiados.

5 En algunas aplicaciones, puede ser ventajoso utilizar el agente activo en una forma "vectorizada", tal como mediante encapsulación del agente activo en un liposoma u otro medio encapsulador, o mediante fijación del agente activo, por ejemplo, mediante enlace covalente, quelación o coordinación asociativa, en una biomolécula adecuada, tal como las seleccionadas entre proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas y polisacáridos.

10 Los procedimientos de tratamiento de la presente invención usando formulaciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades aisladas tales como cápsulas, obleas, comprimidos o pastillas para chupar, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del ingrediente activo en forma de un polvo o gránulos. Opcionalmente, puede emplearse una suspensión en un licor acuoso o un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión o una poción.

15 Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, o granulación en húmedo, opcionalmente con uno o más ingredientes adyuvantes. Los comprimidos fabricados por compresión pueden prepararse mediante la compresión en una máquina adecuada, estando el compuesto activo en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos, que opcionalmente se mezcla con, por ejemplo, un aglutinante, disgregante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo agente o agente de descarga. Los comprimidos moldeados compuestos de una mezcla del compuesto activo en polvo con un vehículo adecuado pueden fabricarse mediante el moldeo en una máquina adecuada.

20 Un jarabe puede fabricarse mediante la adición del compuesto activo a una solución acuosa concentrada de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, a la que también puede añadirse cualquier ingrediente o ingredientes adyuvantes. Dicho ingrediente o ingredientes accesorios pueden incluir aromatizantes, conservantes adecuados, agentes para retardar la cristalización del azúcar y agentes para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, tal como un polihidroxi alcohol, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

25 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral por lo general comprenden una preparación acuosa estéril del compuesto activo, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor (por ejemplo, solución salina fisiológica). Dichas formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes y liposomas u otros sistemas de micropartículas que están diseñados para dirigir el compuesto a componentes de la sangre o uno o más órganos. Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitaria o de dosis múltiples.

30 La administración parenteral puede comprender cualquier forma adecuada de entrega sistémica o de entrega directamente al SNC. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intratecal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intraabdominal (por ejemplo, intraperitoneal), etc. y puede efectuarse mediante bombas de infusión (externas o implantables) o cualquier otro medio adecuado apropiado para la modalidad de administración deseada.

35 Las formulaciones de pulverización nasal o para otras mucosas (por ejemplo, formas inhalables) pueden comprender soluciones acuosas purificadas de los compuestos activos con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan preferentemente a un pH y a un estado isotónico compatibles con la membrana nasal u otras membranas mucosas. Como alternativa, pueden estar en forma de polvos sólidos finamente divididos suspendidos en un vehículo gaseoso. Dichas formulaciones pueden entregarse por cualquier medio o procedimiento adecuados, por ejemplo, mediante nebulizador, atomizador o inhalador de dosis dosificada.

40 Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse en forma de un supositorio con un vehículo adecuado tal como manteca de cacao, grasas hidrogenadas o ácidos carboxílicos grasos hidrogenados.

45 Las formulaciones transdérmicas pueden prepararse incorporando el agente activo en un vehículo tixotrópico o gelatinoso tal como un medio celulósico, por ejemplo, metilcelulosa o hidroxietilcelulosa, envasándose después la formulación resultante en un dispositivo transdérmico adaptado para que sea seguro en contacto dérmico con la piel de un usuario.

50 Además de los ingredientes mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir adicionalmente uno o más ingredientes adyuvantes seleccionados entre diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, disgregantes, tensioactivos, espesantes, lubricantes y conservantes (incluyendo antioxidantes). Las formulaciones de la presente invención pueden ser de liberación inmediata, liberación sostenida, liberación de inicio retardado o cualquier otro perfil de liberación conocido para un experto en la materia.

55 Los ingredientes activos presentes en la composición normalmente pueden administrarse en una pauta de dosificación diaria combinada (para un paciente adulto) de, por ejemplo, una dosis oral de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 500 mg, tal como de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 400 mg, por ejemplo, de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 250 mg o una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 100 mg, tal como de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 50 mg, por ejemplo, de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 mg.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica incluye aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg,

aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,25 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,75 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 5,5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 6,5 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 8,5 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 9,5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 10,5 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 11,5 mg, aproximadamente 12,0 mg, aproximadamente 12,5 mg, aproximadamente 13,0 mg, aproximadamente 13,5 mg, aproximadamente 14,0 mg, aproximadamente 14,5 mg o aproximadamente 15,0 mg de cariprazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina).

Por ejemplo, la composición farmacéutica incluye aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,25 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 12,5 mg o aproximadamente 15,0 mg de cariprazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina).

En otras realizaciones más, la cariprazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma están presentes en la composición en una cantidad que oscila entre dos cualesquiera de estas cantidades de dosificación (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 15 mg, entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 12,5 mg, entre aproximadamente 1,5 mg y aproximadamente 6 mg, entre aproximadamente 6 mg y aproximadamente 12,5 mg).

La dosis deseada puede administrarse como una o más subdosis diarias administradas a intervalos de tiempo apropiados a lo largo del día o, como alternativa, en una dosis única, por ejemplo, para la administración por la mañana o por la noche. Por ejemplo, la dosificación diaria puede dividirse en una, en dos, en tres o en cuatro dosis diarias divididas.

La duración del tratamiento puede ser de décadas, años, meses, semanas o días, a condición de que los beneficios continúen.

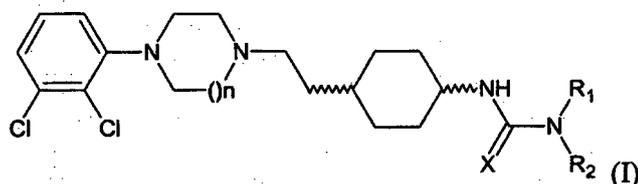
Procedimientos de Tratamiento

La presente invención se refiere a la cariprazina o a sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en el tratamiento del trastorno depresivo mayor, por ejemplo, en el tratamiento del trastorno depresivo mayor resistente.

La disfunción del sistema neurotransmisor dopaminérgico está implicada en la patología de varios trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos, tales como la esquizofrenia, el abuso de drogas y la enfermedad de Parkinson, respectivamente. El efecto de la dopamina está mediado a través de al menos cinco receptores de dopamina distintos que pertenecen a las familias D₁ - (D₁, D₅) o D₂ - (D₂, D₃, D₄). Se ha demostrado que los receptores D₃ tienen una distribución característica en los sistemas dopaminérgicos cerebrales. En concreto, se descubrieron densidades altas en ciertas estructuras límbicas, tales como el núcleo acuminado y las islas de Calleja. Por tanto, el direccionamiento preferente a los receptores D₃ puede ser un enfoque prometedor para una modulación más selectiva de las funciones dopaminérgicas y, por consiguiente, para la intervención terapéutica satisfactoria en varias anomalías, tales como la esquizofrenia, las disfunciones emocionales o cognitivas y la adicción (véase, por ejemplo, Sokoloff, P. y col.: *Nature*, 1990, 347, 146; Schwartz, J. C., y col.: *Clin. Neuropharmacol.* 1993, 16, 295; Levant, B.: *Pharmacol. Rev.* 1997, 49, 231), la adicción (véase, por ejemplo, Pilla, C. y col.: *Nature* 1999, 400, 371) y la enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, Levant, B. y col.: *CNS Drugs* 1999, 12, 391) el dolor (véase, por ejemplo, Levant, B. y col.: *Neurosci. Lett.* 2001, 303, 9).

Los receptores de dopamina D₂ están ampliamente distribuidos en el cerebro y se sabe que están implicados en numerosas funciones fisiológicas y estados patológicos. Los antagonistas de D₂ son fármacos utilizados ampliamente como antipsicóticos, por ejemplo. Sin embargo, también es bien sabido que el antagonismo masivo de los receptores D₂ conduce a efectos secundarios no deseados, tales como síntomas motores extrapiramidales, sedación psicomotora o trastornos cognitivos. Estos efectos secundarios restringen gravemente la utilización terapéutica de los compuestos antagonistas de D₂. (Wong A. H. C. y col.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003, 27, 269).

La presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I):



en la que

R₁ y R₂ son cada uno, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquenilo, arilo, cicloalquilo o aroilo,

o R₁ y R₂ forman un anillo heterocíclico con el átomo de nitrógeno adyacente;

X es O o S;

5 n es 1 o 2;

y/o isómeros geométricos y/o estereoisómeros y/o diastereómeros y/o sales y/o hidratos y/o disolventes y/o polimorfos del mismo, para su uso en el tratamiento del trastorno depresivo mayor, en el que

10 el compuesto de fórmula (I) es trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina (INN: cariprazina) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Por ejemplo, el compuesto de fórmula (I) es clorhidrato de trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina (clorhidrato de cariprazina).

15 Para el tratamiento del trastorno depresivo mayor, la cariprazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina) pueden administrarse normalmente en una pauta de dosificación diaria (para un paciente adulto) de, por ejemplo, una dosis oral de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 500 mg, tal como de entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 400 mg, por ejemplo, de entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 250 mg o una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 100 mg, tal como de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 50 mg, por ejemplo, de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 mg.

20 En ciertas realizaciones, la cantidad de cariprazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina) administrada para el tratamiento del trastorno depresivo mayor es de aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,25 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,75 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 5,5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 6,5 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 8,5 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 9,5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 10,5 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 11,5 mg, aproximadamente 12,0 mg, aproximadamente 12,5 mg, aproximadamente 13,0 mg, aproximadamente 13,5 mg, aproximadamente 14,0 mg, aproximadamente 14,5 mg o aproximadamente 15,0 mg. Por ejemplo, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina), se administran para el tratamiento de la depresión en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,25 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 12,5 mg o aproximadamente 15,0 mg.

35 En más realizaciones adicionales, la cantidad de cariprazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (por ejemplo, clorhidrato de cariprazina) administrada para el tratamiento del trastorno depresivo mayor oscila entre cualesquiera dos de estas cantidades de dosificación (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 15 mg, entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 12,5 mg, entre aproximadamente 1,5 mg y aproximadamente 6 mg, entre aproximadamente 6 mg y aproximadamente 12,5 mg).

45 En realizaciones adicionales, la cariprazina se administra para el tratamiento del trastorno depresivo mayor en una cantidad de dosificación diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg (tal como aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,065 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg).

Definiciones

50 El término "escitalopram" como se usa en el presente documento incluye 1-[3-(dimetil-amino)propil]-1-(p-fluorofenil)-5-ftalanocarbonitrilo que contiene preferentemente menos del 3,2, el 1, el 0,5 o el 0,2 % en peso de su enantiómero R (basado en un peso total del 100 % de 1-[3-(dimetil-amino)propil]-1-(p-fluorofenil)-5-ftalanocarbonitrilo), es decir, S-citalopram que tiene una pureza enantiomérica (en peso) del 97, el 98, el 99, el 99,5 o el 99,8 %. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas de escitalopram incluyen, pero no se limitan a, oxalato de escitalopram y bromhidrato de escitalopram. El término "escitalopram" también incluye polimorfos, hidratos, solvatos y formas amorfas de escitalopram y sus sales farmacéuticamente aceptables. Cristales de oxalato de escitalopram y bromhidrato de escitalopram, tales como los que se describen en la Publicación Internacional N° WO 03/011278 y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2004/0167209, 2005/019653 y 2005/0197388.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa compatible biológicamente o farmacológicamente para el uso *in vivo* en animales o seres humanos y preferentemente significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más en particular, en seres humanos.

- 5 Se pretende que el término "esquizofrenia" incluya el grupo de trastornos mentales caracterizados por interrupciones en el pensamiento y la percepción, e incluye la esquizofrenia (y todos sus subtipos; paranoide, catatónica, desorganizada, residual, indiferenciada) y otros trastornos psicóticos (según el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, Cuarta Edición, Washington, D.C. (1994): Asociación Estadounidense de Psiquiatría o la Clasificación de Trastornos Mentales y Conductuales CIE-10: Descripciones Clínicas y Directrices para el Diagnóstico, Ginebra (1992): Organización Mundial de la Salud) tales como trastornos esquizofreniformes y esquizoafectivos, trastorno psicótico breve, etc.

15 En una evaluación clínica, la esquizofrenia está marcada habitualmente por "síntomas positivos", tales como alucinaciones (especialmente alucinaciones auditivas que por lo general se experimentan como voces), procesos de pensamiento desorganizado y delirios, así como "síntomas negativos", que incluyen el aplanamiento afectivo, la alogia, la abulia y la anhedonia.

20 La expresión "síntomas negativos de la esquizofrenia" se refiere a una clase de síntomas de la esquizofrenia que puede considerarse que reflejan una 'pérdida' en el pensamiento o la actividad funcionales y dirigidos. Los síntomas negativos de la esquizofrenia se conocen bien en la técnica e incluyen el aplanamiento afectivo (caracterizado por, por ejemplo, una expresión facial inmóvil y/o que no responde a estímulos, poco contacto visual y lenguaje corporal reducido), la alogia ('pobreza del habla' o réplicas breves, lacónicas y/o vacías), la abulia (caracterizada por una capacidad reducida o ausente para iniciar y realizar actividades dirigidas a un objetivo), la anhedonia (pérdida de interés o placer), la asocialidad (impulso e interacción sociales reducidos), apatía y otros síntomas negativos conocidos para los expertos en la materia. Los síntomas negativos de la esquizofrenia pueden evaluarse usando cualquier metodología conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a, la Escala de Valoración Psiquiátrica Breve (EVPB) y la Escala de Síntomas Positivos y Negativos (ESPIN). La EVPB y ESPIN tienen subescalas o factores que pueden usarse para medir los síntomas negativos. Se han diseñado otras escalas para abordar los síntomas negativos en concreto: por ejemplo, la Escala para la Evaluación de Síntomas Negativos (EESN), la Evaluación de los Síntomas Negativos (ESN) y el Programa para el Síndrome de Déficit (PSD). También pueden usarse subescalas de la EVPB y la ESPIN para evaluar los síntomas positivos, aunque también hay procedimientos para evaluar específicamente los síntomas positivos disponibles (por ejemplo, la Escala para la Evaluación de los Síntomas Positivos o EESP).

35 La expresión "déficits cognitivos asociados a la esquizofrenia" se refiere a los déficits cognitivos en pacientes con esquizofrenia. El deterioro cognitivo en la esquizofrenia es una característica fundamental de la enfermedad (es decir, no es un resultado del tratamiento o los síntomas clínicos). Los déficits cognitivos incluyen, pero no se limitan a los déficits de atención/vigilancia, memoria de trabajo, aprendizaje verbal y memoria, memoria visuoespacial, razonamiento/resolución de problemas y cognición social. Existen numerosos ensayos neuropsicológicos utilizados para medir los déficits cognitivos en la esquizofrenia, tales como el Ensayo de Clasificación de Tarjetas de Wisconsin (ECTW).

Los términos "tratar", "tratamiento" y "trata" se refieren a uno o más de los siguientes:

- 40 (a) mitigar o aliviar al menos un síntoma de un trastorno en un sujeto, incluyendo, por ejemplo, trastornos alérgicos e inflamatorios, tales como el asma y la EPOC;
- (b) mitigar o aliviar la intensidad y/o duración de una manifestación de un trastorno experimentado por un sujeto incluyendo, pero no limitada a, aquellas que son la respuesta a un estímulo dado (por ejemplo, la presión, la lesión tisular, la temperatura fría, etc.);
- 45 (c) detener, retrasar el inicio (es decir, el periodo anterior a la manifestación clínica de un trastorno) y/o reducir el riesgo de desarrollo o de empeoramiento de un trastorno.

La expresión "trastorno del estado de ánimo" como se usa en el presente documento incluye los trastornos del estado de ánimo especificados en el DSM-IV-TR, incluyendo, pero no limitados a, trastornos depresivos, tales como el trastorno depresivo mayor.

50 Los pacientes que padecen "depresión resistente al tratamiento" incluyen (1) los que no responden a dosis convencionales (es decir, significativamente superiores al placebo en los estudios con ocultación doble) de antidepresivos (tales como los ISRS) administrados de forma continua durante un mínimo de 6 semanas y (2) los que no responden a dosis convencionales de un antidepresivo (tal como un AIRS) (monoterapia) administrado de forma continua durante un mínimo de 12 semanas. Uno de los criterios para determinar si la depresión de un paciente es resistente al tratamiento para un antidepresivo es si no se consigue una puntuación de Impresión Global Clínica de Mejora (IGCM) de 1 (extremadamente mejorado) o 2 (muy mejorado) al término de un ensayo de 6, 8, o 12 semanas de duración. La escala IGCM se define en Guy, W. (ed.): *ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology*, Revisado, Pub. DHEW N.º (ADM) 76-338, Rockville, MD, Instituto Nacional de Salud Mental

de los EE.UU., 1976.

Una "cantidad eficaz" significa la cantidad de una composición de acuerdo con la invención que, cuando se administra a un paciente para el tratamiento de un estado, trastorno o afección, es suficiente para efectuar dicho tratamiento. La "cantidad eficaz" variará dependiendo del ingrediente activo, del estado, trastorno o afección que se trata y su gravedad, y de la edad, el peso, el estado físico y la capacidad de respuesta del mamífero que se trata.

Un sujeto o paciente en el que la administración del compuesto terapéutico es una pauta terapéutica eficaz para una enfermedad o trastorno es preferentemente un ser humano, pero puede ser cualquier animal, incluyendo un animal de laboratorio en el contexto de un ensayo o cribado o experimento de actividad. Por tanto, como puede apreciar fácilmente un experto habitual en la materia, los procedimientos, compuestos y composiciones de la presente invención son particularmente adecuados para la administración a cualquier animal, en particular un mamífero, e incluyendo, pero no limitado de ningún modo, seres humanos, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, tales como, pero no limitados a, sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes (ya sea en la naturaleza o en un jardín zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., especies aviares, tales como pollos, pavos, pájaros cantores, etc., es decir, para su uso médico veterinario.

Las expresiones "aproximadamente" o "alrededor de" significan dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular según se determina por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o se determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación típica, por práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" con respecto a las composiciones puede significar más o menos un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente de hasta el 10 %, más preferentemente de hasta el 5 %.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención.

Ejemplo de Referencia 1: Análisis por microdiálisis de doble sonda de acetilcolina, dopamina y serotonina en la corteza frontal de ratas con libertad de movimiento

Se realizó un estudio de microdiálisis de doble sonda para determinar los efectos de la administración oral de clorhidrato de cariprazina, solo y en combinación con escitalopram oxalato (administrado por vía subcutánea), sobre las concentraciones extracelulares de acetilcolina (ACh), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en la corteza frontal de ratas con libertad de movimiento.

Animales y entorno

Se realizaron experimentos en ratas Sprague Dawley macho (250-350 g de peso corporal; Charles River, Reino Unido). Los animales se alojaron en grupos de seis en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h (luces encendidas a las 07,30 h), a una temperatura ambiente de 21 ± 2 °C y una humedad del 55 ± 20 %. Los alimentos y el agua estaban disponibles a demanda. A los animales se les permitió aclimatarse a estas condiciones durante al menos 5 días antes del estudio.

Cirugía

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (5 % para inducir, 2 % para mantener) en una mezcla O₂/N₂O (1 litro/min cada uno) entregada a través de una unidad anestésica (St Bernard Medical Services, Reino Unido). Se implantaron sondas de microdiálisis concéntricas con una punta de membrana de poliariletersulfona (PAES) expuesta de 2 mm (CMA) estereotáxicamente bilateralmente en la corteza prefrontal (coordenadas: AP: 3,2 mm; L: +/- 2,5 mm con respecto al bregma; V: -4,0 mm con respecto a la superficie del cráneo; tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson. (Paxinos G., Watson C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ª Edición, Londres: Academic Press, 1986). La barra incisiva superior se fijó a 3,3 mm por debajo la línea interaural de manera que la superficie del cráneo entre bregma y lambda era horizontal. Las coordenadas para cada sonda fueron idénticas desde el bregma excepto por la medición lateral ya que una sonda se colocó a la izquierda de la línea media y la otra a la derecha. Se midieron las muestras desde el mismo lado en cada rata (por ejemplo, la sonda izquierda se usó para medir la ACh y la sonda derecha se usó para medir la DA y la 5-HT). Se hicieron orificios de trepanación adicionales para los tornillos del cráneo (acero inoxidable) y las sondas se fijaron usando cemento dental.

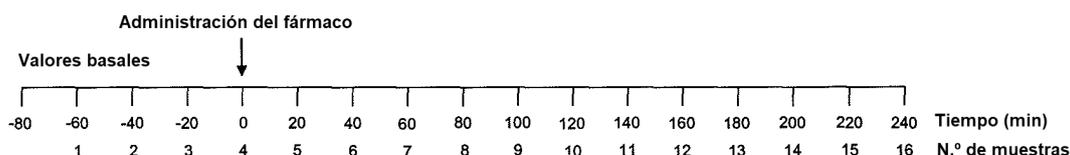
Después de la cirugía, los animales se alojaron individualmente en cámaras circulares (dimensiones: diámetro interno de 450 mm, altura de pared de 320 mm) con las sondas de microdiálisis conectadas a un eslabón giratorio de líquido y un brazo contra-equilibrado para permitir el movimiento sin restricciones. A las ratas se les permitió un periodo de recuperación de al menos 16 h con comida y agua disponibles a demanda. Durante este tiempo las sondas se perfundieron continuamente a un caudal de 1,2 µl/min con un líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa; Harvard Apparatus, Reino Unido) de la siguiente composición de electrolitos (en mM): sodio 150; potasio 3,0; magnesio 0,8; calcio 1,4; fosfato 1,0; cloruro 155,0. Además, el perfundido de LCRa para la sonda que mide los

niveles de ACh contenía neostigmina (1 μ M), un inhibidor de la colinesterasa que evitó la degradación de la ACh en estas muestras.

Microdiálisis y administración de fármacos

5 El experimento se realizó el día después de la cirugía. Muestras de dializado se recogieron cada 20 min desde 80 min antes de la administración del fármaco hasta 240 min después de la administración del fármaco (16 muestras en total de cada sonda; 4 anteriores al fármaco y 12 posteriores al fármaco). Las muestras se recogieron en tubos Eppendorf que contenían 5,0 μ l de ácido perclórico 0,1 M (muestras para la medición de DA y 5-HT solamente) para evitar la oxidación de los neurotransmisores. Las muestras de ACh se congelaron de forma instantánea inmediatamente usando nitrógeno líquido mientras que las muestras de DA/5-HT se almacenaron en hielo seco.

10 Después de la finalización del experimento, todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. El análisis por HPLC de DA y 5-HT en un conjunto de muestras y de ACh en el segundo conjunto se realizó durante el resto de la semana siguiente a la experimentación.



15 Se administraron clorhidrato de cariprazina (0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg) o vehículo (metilcelulosa al 1 %) por vía oral usando una sonda nasogástrica (vía oral) usando un volumen de dosificación de 2 ml/kg de peso corporal en combinación con oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg) o vehículo (solución salina) administrados a través de inyección subcutánea (volumen de dosificación de 1 ml/kg de peso corporal).

Análisis de dopamina y 5-HT

20 La detección y posterior cuantificación tanto de DA como de 5-HT en las mismas muestras de diálisis implicaron el uso de HPLC de pares iónicos de fase inversa, acoplada con detección electroquímica. Brevemente, el procedimiento empleó una columna de fase inversa Spherisil rellena con ODS2, partículas de 3 μ m (diámetro interno de 150 \times 2,1 mm, Capital HPLC, Reino Unido). Se usó una bomba de entrega de disolvente Gynkotek para hacer circular fase móvil (acetato de sodio 10,5 mM, EDTA 0,27 mM, ácido 1-octano sulfónico 2,5 mM, metanol al 18 %, ácido acético glacial al 0,18 %, pH 5,5) a un caudal de 0,2 ml/min y se usó una unidad de desgasificación en línea Jour X-Act para eliminar el aire. Se inyectaron las muestras (20 μ l) en la columna a través de un automuestreador Spark Holland Triathlon con una bandeja de enfriamiento fijada a 4 °C. Se usó un detector electroquímico Antec Intro y una célula Antec VT-03 que emplea un electrodo de trabajo de carbono vítreo de alta densidad (+0,70 V) combinada con un electrodo de referencia Ag/AgCl. La señal del electrodo se integró usando un sistema de obtención de datos Turbochrom (Perkin-Elmer). Se preparó una solución madre de DA y 5-HT (1,0 mM) mediante su disolución en una mezcla de cantidades iguales de agua desionizada y ácido perclórico 0,1 M (con el fin de evitar la oxidación) y se almacenó a 4 °C. Se preparó una solución de trabajo diariamente por dilución en LCRa.

25

30

Análisis de acetilcolina

35 La detección y posterior cuantificación de ACh en las muestras de diálisis implicó el uso de un kit Unijet microbore ACh/Ch (BASI) acoplado a detección electroquímica. En este procedimiento la ACh se separó en la columna analítica (1 mm \times 530 mm, 5 μ m ODS) y se convirtió en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la acción de la acetilcolinesterasa (AChE) y la colina oxidasa (ChOx) que se inmovilizaron sobre una postcolumna IMER (1 mm \times 50 mm, 10 μ m AChE-ChOx). El H₂O₂ resultante se redujo en la superficie de un electrodo de carbono vítreo modificado por enzima. Las altas concentraciones de colina (Ch) a veces pueden interferir con las cuantificaciones de ACh pero la adición de una precolumna IMER antes de la columna analítica, que contenía ChOx y catalasa inmovilizadas (1 mm \times 50 mm, 10 μ m ChOx/catalasa) eliminó cualquier colina presente en la muestra antes de la separación cromatográfica. Se usó una bomba de entrega de disolvente Gynkotek para hacer circular la fase móvil (ácido orto-fosfórico 50 mM en agua desionizada, reactivo ProClin al 1 % (BASI), pH 8,5) a un caudal de 0,12 ml/min y se usó una unidad de desgasificación en línea Jour X-Act para eliminar el aire. Se inyectaron las muestras (20 μ l) en la columna a través de un automuestreador Spark Holland Triathlon con una bandeja de enfriamiento fijada a 4 °C. Se usó un detector electroquímico Antec Intro y una célula Antec VT-03 que emplea un electrodo de trabajo de carbono vítreo de alta densidad (-0,1 V) combinada con un electrodo de referencia Ag/AgCl. La señal del electrodo se integró usando un sistema de obtención de datos Turbochrom (Perkin-Elmer). Se preparó una solución madre de ACh (1,0 mM) mediante su disolución en una solución de disolvente convencional y se almacenó a 4 °C. Se preparó una solución de trabajo diariamente por dilución en el diluyente convencional.

40

45

50 Histología

Al final de los experimentos, las ratas se sacrificaron y sus cerebros se retiraron rápidamente y se almacenaron en una solución salina formal al 10 % v/v durante un mínimo de 5 días. Se cortaron secciones (100 μ m) en un vibratomo y las colocaciones de las sondas se visualizaron y se localizaron con referencia a un atlas estereotáxico (Paxinos G.,

Watson C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ª Edición, Londres: Academic Press, 1986). Solo se notificaron los datos de animales donde las membranas de las sondas se habían posicionado correctamente en la corteza frontal.

Fármaco y reactivos

- 5 Se almacenó clorhidrato de cariprazina a temperatura ambiente. Se usó un factor de 1,09 durante la formulación y todas las dosis de los fármacos se refieren a la base libre. Se preparó una solución madre (0,1635 mg/ml) del fármaco fresca para cada día experimental a los 30 min de la administración del fármaco mediante la adición de metilcelulosa al 1 % y agitación suave con agua tibia. Se prepararon soluciones adicionales de fármacos mediante una dilución de la solución madre.
- 10 Se almacenó oxalato de escitalopram a temperatura ambiente. Se usó un factor de 1,28 durante la formulación y todas las dosis de los fármacos se refieren a la base libre. Se preparó una solución madre (1,28 mg/ml) del fármaco fresca para cada día experimental a los 30 min de la administración del fármaco mediante la adición de solución salina y agitación suave con agua tibia. La solución se tamponó mediante la adición gota a gota de NaOH 1 M (intervalo de pH de 6,8 a 7,6).
- 15 Todos los reactivos utilizados en el análisis por HPLC era de grado HPLC. Se obtuvieron EDTA, metanol, 1-octano ácido sulfónico, ácido perclórico, ácido acético glacial, acetato de sodio, ácido orto-fosfórico, solución salina formal al 10 % y metilcelulosa de Fisher Scientific (Reino Unido). Se adquirieron clorhidrato de dopamina y sulfato de 5-hidroxitriptamina creatinina de Sigma Chemical Company (Reino Unido) y se adquirió cloruro de acetilcolina de BASI (Reino Unido).

20 *Análisis estadístico*

En todos los experimentos, se transformaron logarítmicamente datos anteriores y posteriores al fármaco y los cuatro valores anteriores al fármaco se promediaron para proporcionar un valor basal. Los resultados se volvieron a transformar como anteriormente. Por tanto, se ajustaron las medias para determinar diferencias entre grupos de tratamiento en el momento basal. Debido a problemas ocasionales con la cromatografía no todas las muestras analizadas proporcionaron datos. Por tanto, el valor n real varía en cada punto temporal. En cada punto temporal después del tratamiento, se usó un análisis de la covarianza de una vía (AN-COVA) con el (log)valor basal como covariable y el tratamiento como el factor. Cada dosis de clorhidrato de cariprazina con solución salina se comparó con metilcelulosa al 1 % con solución salina mediante el ensayo de Williams. Cada dosis de clorhidrato de cariprazina con oxalato de escitalopram se comparó con metilcelulosa al 1 % con oxalato de escitalopram mediante el ensayo de Williams. Cada dosis de clorhidrato de cariprazina con oxalato de escitalopram se comparó con la misma dosis de clorhidrato de cariprazina con solución salina mediante el ensayo t múltiple. En un análisis inicial, se calcularon los residuos studentizados. Si la magnitud del residuo studentizado era mayor de 3, la muestra se excluía del análisis.

35 La administración de clorhidrato de cariprazina solo (0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg, por vía oral) no tuvo ningún efecto significativo sobre la descarga de DA en la corteza frontal. El oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea) no tuvo ningún efecto sobre los niveles basales de DA.

40 El clorhidrato de cariprazina (0,03 y 0,1 mg/kg, por vía oral), en combinación con oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea), no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de DA en comparación con los correspondientes controles tratados con vehículo. El clorhidrato de cariprazina (0,3 mg/kg, por vía oral) + el oxalato de escitalopram dieron como resultado una disminución pequeña pero significativa en la descarga de DA de 80 y 200 min después de la administración de los fármacos, en comparación con los controles tratados con clorhidrato de cariprazina + solución salina (-33 % y -40 %, respectivamente).

45 La administración de clorhidrato de cariprazina sola (0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg, por vía oral) no tuvo ningún efecto significativo sobre la descarga de 5-HT en la corteza frontal. El oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea) no tuvo ningún efecto sobre los niveles basales de 5-HT. El clorhidrato de cariprazina (0,03 mg/kg, por vía oral) + el oxalato de escitalopram dieron como resultado una pequeña pero significativa disminución de la descarga de 5-HT, 120 min después de la administración de los fármacos, en comparación con los controles tratados con clorhidrato de cariprazina + solución salina (-33 %). El clorhidrato de cariprazina (0,1 mg/kg, por vía oral) + el oxalato de escitalopram dieron como resultado un aumento significativo de la descarga de 5-HT, 60 min después de la administración de los fármacos, en comparación con los controles tratados con clorhidrato de cariprazina + solución salina (106 %). El clorhidrato de cariprazina (0,3 mg/kg, por vía oral) + el oxalato de escitalopram dieron como resultado disminuciones pequeñas pero significativas en la descarga de 5-HT, 200 y 240 min después de la administración de los fármacos, en comparación con los controles tratados con clorhidrato de cariprazina + solución salina (-32 % y -48 %, respectivamente).

55 La administración de clorhidrato de cariprazina solo (0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg, por vía oral) no tuvo ningún efecto significativo sobre la descarga de ACh en la corteza frontal. El oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea) dio lugar a disminuciones significativas en los niveles basales de ACh, 100 y 240 min después de la administración, en comparación con los controles tratados con vehículo + solución salina (-55 % y -56 %, respectivamente).

respectivamente).

El clorhidrato de cariprazina (0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg, por vía oral), en combinación con oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea), no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de ACh en comparación con los correspondientes controles tratados con vehículo.

- 5 El clorhidrato de cariprazina, a 0,03, 0,1 y 0,3 mg/kg, por vía oral, no tuvo ningún efecto sobre los niveles extracelulares de DA, 5-HT y ACh en la corteza frontal de rata. El oxalato de escitalopram (1,0 mg/kg, por vía subcutánea) tuvo poco o ningún efecto sobre estos neurotransmisores con la excepción de una pequeña disminución en los niveles de ACh en dos puntos temporales.

- 10 El clorhidrato de cariprazina y el escitalopram, administrados en combinación, también tuvieron poco o ningún efecto sobre los niveles extracelulares de DA, 5-HT y ACh en la corteza frontal de rata.

Ejemplo 2: Clorhidrato de cariprazina en un modelo de estrés leve crónico de depresión

Este estudio evaluó el efecto antidepresivo del clorhidrato de cariprazina en el modelo de estrés crónico leve (ECL) de depresión. También se hizo una comparación de la eficacia del compuesto antidepresivo tricíclico imipramina.

- 15 Se adaptaron ratas Wistar macho a condiciones de laboratorio y de alojamiento durante 3 semanas, seguido de adopción del consumo de solución de sacarosa al 1 % durante 5 semanas adicionales antes de separarlas en grupos que se van a someter a estrés y de control.

- 20 Se aplicó estrés crónico al grupo asignado durante siete semanas. Se utilizaron los siguientes factores estresantes: privación de alimentos y/o agua, inclinación de la jaula (45 grados hacia atrás), iluminación intermitente, alojamiento por pares, jaula sucia (250 ml de agua del grifo en lecho de serrín), iluminación estroboscópica (150 destellos por minuto), sin estrés. Todos los factores estresantes tuvieron 10-14 horas de duración y se aplicaron individualmente y de forma continua, una o dos veces por semana, durante el día y por la noche.

- 25 El consumo de solución de sacarosa se midió en ensayos de 1 hora realizadas en todos los animales (es decir, los de control y los sometidos a estrés) una vez por semana durante todo el experimento. Los ensayos fueron precedidos de 14 horas de privación de alimentos y agua. Sobre la base de sus ingestas de sacarosa tras las 2 semanas iniciales de estrés, tanto los animales sometidos a estrés como los de control recibieron una vez al día inyecciones intraperitoneales crónicas (5 semanas) de vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg), clorhidrato de cariprazina (0,0625, 0,25 o 1,0 mg/kg) o imipramina (10 mg/kg) como tratamiento de referencia. Los fármacos se administraron aproximadamente a las 10 a.m. y los ensayos de sacarosa semanales se realizaron 24 horas después de la última inyección de fármaco. El estrés continuó durante todo el periodo de tratamiento. Normalmente 2-3 animales de cada 8 no respondieron al tratamiento con fármacos en cada grupo. Estos animales se consideraron animales que responden débilmente/animales que no responden y se eliminaron del análisis.

- 30 Los efectos del tratamiento crónico con vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) e imipramina (10 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a ELC (símbolos cerrados) se muestran en la Figura 1.

- 35 Los efectos del tratamiento crónico con vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) y clorhidrato de cariprazina (0,065 y 0,25 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los controles (símbolos abiertos) y en animales expuestos a ELC (símbolos cerrados) se muestran en la Figura 2,

- 40 El ECL provocó una disminución sustancial en el consumo de solución de sacarosa al 1 %. Esta disminución se invirtió completamente por el tratamiento crónico con imipramina.

- 45 El clorhidrato de cariprazina administrado a dosis de 0,065 y 0,25 mg/kg aumentó de forma dependiente de la dosis la ingesta de sacarosa en los animales sometidos a estrés sin ningún efecto significativo en los controles (no sometidos a estrés). La magnitud del efecto de la dosis más activa de 0,065 mg/kg fue mayor que la de la imipramina. Además, el inicio de la acción de esta dosis de clorhidrato de cariprazina fue más rápido, es decir, los aumentos en la ingesta de sacarosa fueron evidentes ya en la semana 1, mientras que el efecto de la imipramina fue evidente en la semana 3.

- 50 La dosis más alta de clorhidrato de cariprazina sometida a ensayo, 1 mg/kg, fue inactiva en el modelo de ELC. A esta dosis, el clorhidrato de cariprazina no cambió el consumo de sacarosa en los animales sometidos a estrés y disminuyó significativamente el consumo de sacarosa en los animales de control. La dosis de 1 mg/kg es una dosis fuertemente sedante en el que la antagonista D₂ del compuesto puede dar como resultado predominantemente una disminución de la ingesta de sacarosa incluso en los animales no sometidos a estrés.

Ejemplo 3: Clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram en un modelo de estrés leve crónico de depresión

De forma similar al estudio descrito en el Ejemplo 2, se realizaron estudios adicionales para evaluar adicionalmente el efecto antidepresivo del clorhidrato de cariprazina, administrado solo o en combinación con oxalato de escitalopram, en un modelo de estrés leve crónico de depresión.

5 En el modelo de estrés crónico leve (ECL), las ratas sometidas a una diversidad de factores estresantes leves durante un periodo prolongado de tiempo muestran una disminución sustancial en su capacidad de respuesta a los estímulos de recompensa. Este déficit por lo general se monitoriza mediante una disminución en el consumo de una solución de sacarosa al 1 %, pero también puede observarse en otros ensayos, tales como el condicionamiento de preferencia de lugar o la autoestimulación intracraneal. El subsensibilidad a la recompensa parece reflejar anhedonia (incapacidad para experimentar placer), que es un síntoma fundamental de los trastornos depresivos mayores. Los antidepresivos clínicamente aprobados han mostrado actividad en este modelo animal mediante revirtiendo los efectos del ELC sobre el consumo de sacarosa. Véase, por ejemplo, Sánchez C, Gruca P, Papp M, *Behavioral Pharmacology* 14, 465-470, 2003.

Animales

15 Se llevaron al laboratorio ratas Wistar macho (Charles River, Alemania) dos meses antes del inicio del experimento. Excepto como se describe a continuación, los animales fueron alojados individualmente con alimento y agua libremente disponibles y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y a unas condiciones de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (50 ± 5 %) constantes.

Procedimiento de estrés

20 En primer lugar, se entrenó a los animales para que consumieran una solución de sacarosa al 1 %; el entrenamiento consistió en nueve ensayos basales de 1 h en los que se presentó sacarosa, en la jaula de alojamiento, después de una privación de comida y agua de 14 h. El consumo de sacarosa se midió pesando botellas pesadas previamente que contenían la solución de sacarosa, al final del ensayo. Posteriormente, el consumo de sacarosa se monitorizó, en condiciones similares, a intervalos semanales a lo largo de todo el experimento.

25 Sobre la base de sus ingestas de sacarosa en el ensayo de valores basales final, los animales se dividieron en dos grupos emparejados. Un grupo de animales se sometió al procedimiento de estrés leve crónico durante un periodo de 7 semanas consecutivas. Cada semana de régimen de estrés consistió en: dos periodos de privación de alimento o agua, dos periodos de inclinación de la jaula a 45 grados, dos periodos de iluminación intermitente (luces encendidas y apagadas cada 2 horas), dos periodos de jaula sucia (250 ml de agua en lecho de serrín), un periodo alojamiento por pares, dos periodos de iluminación estroboscópica de baja intensidad (150 destellos/min) y tres periodos sin estrés. Todos los factores estresantes tuvieron una duración de 10-14 h y se aplicaron individualmente y continuamente, día y noche. Los animales de control fueron alojados en habitaciones separadas y no tuvieron contacto con los animales sometidos a estrés. Se les privó de comida y agua durante 14 h antes de cada ensayo de sacarosa, pero por lo demás la comida y el agua estuvieron disponibles libremente en la jaula de alojamiento.

Administración de fármacos

35 Sobre la base de sus puntuaciones de ingesta de sacarosa después de las 2 semanas iniciales de estrés, los animales sometidos a estrés se dividieron adicionalmente en subgrupos emparejados ($n = 8$ por grupo) y durante las cinco semanas posteriores recibieron inyecciones intraperitoneales una vez al día de vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg), clorhidrato de cariprazina (0,01, 0,03 y 0,065 mg/kg) solo, oxalato de escitalopram (2 mg/kg) solo o clorhidrato de cariprazina (0,01 y 0,03 mg/kg) en combinación con oxalato de escitalopram (2 mg /kg). Un grupo de control, los animales no sometidos a estrés ($n = 8$), recibió una administración similar de vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg). Los fármacos se administraron aprox. a las 10.00 horas y los ensayos de sacarosa semanales se realizaron 24 horas después de las últimas inyecciones de fármaco. El estrés continuó durante todo el periodo de tratamiento. Las dosis de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram se expresan en mg de base libre por kg de peso corporal.

45 *Estadísticas*

Todos los resultados obtenidos en este estudio se analizaron mediante análisis múltiple de varianza con tres factores interindividuales (estrés/control, tratamientos farmacológicos y ensayos de sacarosa sucesivos). Se usó el ensayo de DMS de Fisher para las comparaciones de medias a posteriori.

50 El estrés leve crónico provocó una disminución gradual en el consumo de solución de sacarosa al 1 %. En el ensayo de valor basal final, todos los animales bebieron aproximadamente 13 g de solución de sacarosa. Tras dos semanas de estrés iniciales, las ingestas se mantuvieron en niveles similares en los controles, pero cayeron a 7,5 g en los animales sometidos a estrés, dando como resultado un efecto de Grupo significativo [$F(1,62) = 92,179$; $p < 0,001$]. Una diferencia de este tipo entre los animales de control y los sometidos a estrés tratados con vehículo se mantuvo a un nivel similar durante el resto del experimento.

55 La Figura 3 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo (metilcelulosa al 1 %, 1 ml/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) y oxalato de escitalopram (2 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) sobre el

consumo de solución de sacarosa al 1 % en los animales de control (símbolos abiertos) y los animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados). El tratamiento comenzó después de 2 semanas de estrés. Los valores son medias +/- ETM (error típico de la media).

5 En comparación con la administración de vehículo, el oxalato de escitalopram aumentó gradualmente el consumo de sacarosa en todos los animales sometidos a estrés, dando como resultado un efecto de Tratamiento significativo [F(1,84) = 27,447; p < 0,001] y una interacción de Tratamiento x Semanas [F(5,84) = 4,135; p = 0,002].

En comparación con las puntuaciones de la semana 0, los aumentos en la ingesta de sacarosa en los animales sometidos a estrés tratados con oxalato de escitalopram alcanzaron significación estadística después de tres semanas de tratamiento (p = 0,024) y este efecto se potenció a partir de entonces.

10 La Figura 4 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram (2 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) y clorhidrato de cariprazina (0,065 mg/base kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los animales de control (símbolos abiertos) y en los animales expuestos a estrés leve crónico (símbolos cerrados). El tratamiento comenzó después de 2 semanas de estrés inicial. Los valores son medias +/- ETM.

15 En comparación con la administración del vehículo, el clorhidrato de cariprazina aumentó gradualmente el consumo de sacarosa en los animales sometidos a estrés, dando como resultado un efecto de Tratamiento significativo [F(1,84) = 37,782; p < 0,001], pero no una interacción de Tratamiento x Semanas [F(5,84) = 2,057; p = 0,0784].

20 Como comparación con las puntuaciones de la semana 0, los aumentos en la ingesta de sacarosa en los animales sometidos a estrés tratados con clorhidrato cariprazina alcanzaron significación estadística después de la primera semana de tratamiento (p = 0,009) y este efecto se mantuvo y se potenció a partir de entonces. Un animal sometido a estrés mostró una respuesta más bien débil a 0,065 mg/kg de clorhidrato de cariprazina, pero no se eliminó del análisis.

25 La Figura 5 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram (2 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) y clorhidrato de cariprazina (0,03 mg/base kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) administrado solo o en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los animales expuestos a estrés leve crónico. El tratamiento comenzó después de 2 semanas de estrés inicial. Los valores son medias +/- ETM.

30 En comparación con la administración del vehículo, el clorhidrato de cariprazina solo aumentó gradualmente la ingesta de sacarosa en animales sometidos a estrés, dando como resultado un efecto de Tratamiento significativo [F(1,84) = 16,437; p < 0,001], pero no una interacción Tratamiento x Semanas [F(5,84) = 1,819; NS].

En comparación con la semana 0 puntuaciones, los aumentos en la ingesta de sacarosa en los animales sometidos a estrés administrados clorhidrato cariprazina alcanzaron significación estadística después de cuatro semanas de tratamiento (p = 0,003) y este efecto se mejoró a partir de entonces. Dos animales sometidos a estrés mostraron respuesta más bien débil a 0,03 mg/kg de clorhidrato de tratamiento cariprazina, pero no se eliminaron del análisis.

35 En comparación con la administración del vehículo, clorhidrato de cariprazina se administra en combinación con oxalato de escitalopram produce efectos similares, es decir, aumento gradual del consumo de sacarosa en los animales sometidos a estrés, dando como resultado un efecto significativo del tratamiento [F (1,84) = 12.595; p <0,001], pero no Tratamiento x Semanas de interacción [F (5,84) = 1,639; NS].

40 En comparación con las puntuaciones de la semana 0, los aumentos en la ingesta de sacarosa en los animales sometidos a estrés tratados con clorhidrato cariprazina alcanzaron significación estadística después de tres semanas de tratamiento (p = 0,032) y este efecto se potenció a partir de entonces. Tres animales sometidos a estrés mostraron una respuesta débil o falta de respuesta a las inyecciones en las articulaciones de clorhidrato de cariprazina (0,03 mg/kg) y oxalato de escitalopram, pero no se eliminaron del análisis.

45 La Figura 6 muestra los efectos del tratamiento crónico con vehículo, oxalato de escitalopram (2 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día) y clorhidrato de cariprazina (0,01 mg/kg de base, por vía intraperitoneal, una vez al día) administrado solo o en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en los animales expuestos a estrés leve crónico. El tratamiento comenzó después de 2 semanas de estrés inicial. Los valores son medias +/- ETM.

50 En comparación con la administración del vehículo, el clorhidrato de cariprazina disminuyó significativamente el consumo de sacarosa cuando se administró solo [Efecto de Tratamiento: F(1,84) = 5,035; p = 0,027, interacción de Tratamiento x Semanas [F (5,84) = 0,561; NS], pero este efecto no alcanzó significación estadística en comparación con las puntuaciones de la semana 0.

55 Cuando se administra en combinación con el oxalato de escitalopram, el clorhidrato de cariprazina disminuyó el consumo de sacarosa durante las dos primeras semanas de tratamiento y aumentó las ingestas en las últimas dos semanas, dando como resultado un efecto de Tratamiento no significativa [F(1,84) = 0,12; NS] y una interacción de

Tratamiento x Semanas no significativa [$F(5,84) = 1,562$; NS]. Al final del periodo de tratamiento, tres animales que recibieron 0,1 mg/kg de clorhidrato de cariprazina más oxalato de escitalopram no mostraron ninguna potenciación del consumo de sacarosa por encima de los valores de la semana 0.

5 La Figura 7 muestra los efectos del tratamiento crónico con clorhidrato de cariprazina (0,01, 0,03 y 0,065 mg/kg) solo, oxalato de escitalopram (2 mg/kg) solo o clorhidrato cariprazina (0,01 y 0,03 mg/kg) en combinación con oxalato de escitalopram sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % en animales expuestos a estrés leve crónico. El tratamiento comenzó después de 2 semanas de estrés inicial. Los valores son medias +/- ETM.

10 Antes de que se iniciara el procedimiento de estrés (momento basal) los animales que se iban a someter a ensayo eran ligeramente más pequeños que los controles (418 y 433 g, respectivamente) y después de dos semanas iniciales de estrés (Semana 0) esta diferencia se potenció, dando como resultado un efecto de Grupo significativo [$F(1,62) = 8,310$; $p = 0,005$].

15 En comparación con el grupo tratado con vehículo, ni el oxalato de escitalopram [$F(1,14) = 0,157$; NS] ni el clorhidrato de cariprazina solo [0,065 mg/kg: $F(1,14) = 2,111$; NS, 0,03 mg/kg: $F(1,14) = 0,406$; NS, 0,01 mg/kg: $F(1,14) = 1,229$; NS] o en combinación con oxalato de escitalopram [0,03 mg/kg: $F(1,14) = 0,308$; NS, 0,01 mg: $F(1,14) = 0,022$; NS] afectaron a los pesos corporales de los animales sometidos a estrés.

20 Los resultados de este estudio muestran que el procedimiento de ELC provoca una disminución sustancial sobre el consumo de solución de sacarosa al 1 % y que este déficit puede revertirse completamente mediante el tratamiento crónico con oxalato de escitalopram (tres semanas hasta los primeros efectos significativos). El efecto de la imipramina, que se sometió a ensayo como tratamiento de referencia en estudios paralelos, también alcanzó significación después de tres semanas de administración.

El clorhidrato de cariprazina parece ser activa en el modelo de ELC de depresión; cuando se administra solo a dosis de 0,065 y 0,03 mg/kg, el compuesto aumenta gradualmente la ingesta de sacarosa en la mayoría de los animales sometidos a estrés.

25 La magnitud de la acción del clorhidrato de cariprazina fue comparable a la del oxalato de escitalopram (recuperación total al final del periodo de tratamiento), pero el inicio de acción de la dosis más activa de 0,065 mg/kg fue sustancialmente más rápida; el primer efecto significativo ya se observó después de la primera semana de administración (en comparación con las tres semanas necesarias para la dosis de 0,03 mg/kg de clorhidrato de cariprazina y para el oxalato de escitalopram) y este efecto se potenció a partir de entonces.

30 El clorhidrato de cariprazina, administrado en combinación con oxalato de escitalopram, provocó efectos similares (tanto en términos de la magnitud como del inicio de acción) a los observados después de inyecciones únicas de ambos compuestos.

A la dosis más baja, de 0,01 mg/kg, el clorhidrato de cariprazina disminuyó el consumo de sacarosa cuando se administró solo y el oxalato de escitalopram revirtió esta disminución en las dos últimas semanas de tratamiento.

35 **Ejemplo de Referencia 4A: Evaluación del clorhidrato de cariprazina y el oxalato de escitalopram para determinar los efectos antimaniacos en el modelo de hiperactividad por anfetamina-clordiazepóxido en ratón**

Se evaluaron clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram para determinar los efectos antimaniacos usando el ensayo de hiperactividad por anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP).

Animales

40 En este estudio se usaron ratones C57B1/6J macho de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ratones se recibieron a las 6 semanas de edad. Tras la recepción, a los ratones se les asignaron números de identificación únicos (marcados en la cola) y se alojaron en grupo con 4 ratones/jaula. Todos los animales permanecieron alojados en grupos de cuatro durante el resto del estudio. Todos los ratones se aclimataron a la sala de colonia durante al menos dos semanas antes del ensayo y se sometieron a ensayo posteriormente a una edad promedio de 8 semanas de edad. Durante el periodo de aclimatación, los ratones fueron examinados de forma regular, se manipularon y se pesaron para asegurar la salud y la aptitud adecuadas. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12/12. La temperatura ambiente se mantuvo entre 20 y 23 °C con una humedad relativa mantenida entre el 30 % y el 70 %. Se proporcionaron pienso y agua a demanda durante todo el estudio. En cada ensayo, los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento.

Administración de los fármacos

50 Se usaron los siguientes compuestos:

- Se disolvieron sulfato de d-anfetamina (*Sigma*, 4,0 mg/kg) y clordiazepóxido (CDP; *Sigma*, 2,5 mg/kg) en agua estéril y se administraron por vía intraperitoneal a un volumen de dosis de 10 ml/kg.
- Se disolvió valproato (VPA; *Sigma*, Lote 064K1585, 400 mg/kg) en agua estéril y se administró por vía

intraperitoneal en un volumen de dosis de 10 ml/kg 30 min antes del agua o de la mezcla de d-anfetamina/CDP.

- Se disolvieron clorhidrato de cariprazina (0,03, 0,10 y 0,30 mg/kg) y oxalato de escitalopram (0,5, 2,0 y 5,0 mg/kg) en agua estéril y se administraron por vía oral a un volumen de dosis de 10 ml/kg 60 min antes del agua o de la mezcla de d-anfetamina/CDP. Las dosis de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram se expresan en mg de base libre por kg de peso corporal.

Procedimientos

El ensayo de campo abierto (CA) se usó para evaluar tanto el comportamiento similar a la ansiedad como la actividad motora. Las cámaras de campo abierto eran cámaras de plexiglás cuadradas (27,3 x 27,3 x 20,3 cm; Med Associates Inc., St Albans, VT), rodeadas de fuentes de fotohaz de infrarrojos (16 x 16 x 16). La distancia recorrida se midió por roturas del haz consecutivo. La distancia total recorrida durante la sesión de ensayo se usó como índice de la actividad. Después del pretratamiento de 60 minutos con agua, clorhidrato de cariprazina u oxalato de escitalopram, o del pretratamiento de 30 minutos con valproato, a los ratones se les inyectó agua o mezcla de d-anfetamina/CDP ('mezcla') y se colocaron en las cámaras de CA para una sesión de ensayo 60 min. Al final de cada sesión de ensayo de campo abierto las cámaras de CA se limpiaron minuciosamente.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de análisis de DMSP de Fisher a posteriori cuando fue pertinente. Un efecto se consideró significativo si $p < 0,05$. Los valores atípicos que cayeron encima y debajo de dos desviaciones típicas de la media se eliminaron del análisis final.

Los ratones tratados con clorhidrato de cariprazina u oxalato de escitalopram no mostraron ningún signo de toxicidad o sedación durante el pretratamiento o el ensayo.

Distancia total recorrida

El sumario de los efectos (es decir, la distancia total recorrida sumada durante el periodo de ensayo de 60 minutos) producidos por diferentes pautas de tratamiento en el modelo en ratón con anfetamina-clordiazepóxido de manía, se muestra en las Tablas 1-4.

TABLA 1: Efecto de la administración de clorhidrato de cariprazina u oxalato de escitalopram sobre la actividad locomotora basal de los ratones

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
Agua	Vehículo	5103 ± 679	12
	Valproato (400 mg/kg)	4471 ± 298	10
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg)	4056 ± 427	12
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg)	1726 ± 112	11
	HCl de cariprazina (0,30 mg/kg)	917 ± 73 [#]	12
	Oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	4435 ± 389	11
	Oxalato de escitalopram (2,0 mg/kg)	5939 ± 369	11
	Oxalato de escitalopram (5,0 mg/kg)	6499 ± 445	11

[#] diferencia significativa con los controles tratados con vehículo ($p < 0,05$)

Ni el valproato ni el oxalato de escitalopram (0,5, 2,0 y 5,0 mg/kg) tuvieron un efecto significativo sobre la actividad basal en comparación con los ratones tratados con el agua. El clorhidrato de cariprazina (0,30 mg/kg) disminuyó significativamente la actividad basal de los ratones en comparación con el agua ($p = 0,032$) y el clorhidrato de cariprazina 0,10 mg/kg mostró una tendencia hacia una disminución significativa en la actividad locomotora basal en comparación con el agua ($p = 0,090$).

TABLA 2

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
agua	Vehículo	5103 ± 679	12
AMPH/CDP	Vehículo	33591 ± 1106 [#]	11

[#] diferencia significativa con los controles de agua ($p < 0,05$)

La administración de la mezcla de d-anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP) dio como resultado un incremento notable en la actividad locomotora en comparación con el agua.

TABLA 3

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
AMPH/CDP	vehículo	33591 ± 1106	11
AMPH/CDP	Valproato (400 mg/kg)	17496 ± 1788*	12

* diferencia significativa con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$)

La administración de valproato disminuyó significativamente la hiperactividad inducida por la mezcla de d-anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP) en ratones.

5 **TABLA 4: Efecto de la administración de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram sobre la hiperactividad inducida por la mezcla de d-anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP) en ratones**

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
AMPH/CDP	Vehículo	33591 ± 1106	11
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg)	32122 ± 2942	12
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg)	13688 ± 2349	12
	HCl de cariprazina (0,30 mg/kg)	2525 ± 204 *	11
	Oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	30067 ± 1901	12
	Oxalato de escitalopram (2,0 mg/kg)	36112 ± 11934	11
	Oxalato de escitalopram (5,0 mg/kg)	39639 ± 1582 *	11

* diferencia significativa con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$)

10 El valproato (400 mg/kg) y el clorhidrato de cariprazina (0,10 y 0,30 mg/kg) disminuyeron significativamente la hiperactividad inducida por la mezcla en comparación con el agua ($p < 0,0001$). El oxalato de escitalopram (5,0 mg/kg) aumentó la hiperactividad inducida por la mezcla en comparación con el agua ($p = 0,003$). El oxalato de escitalopram (0,5 mg/kg) mostró una tendencia hacia una disminución significativa en la hiperactividad inducida por la mezcla en comparación con el agua ($p = 0,077$).

Ejemplo de Referencia 4B: Evaluación del clorhidrato de cariprazina y el oxalato de escitalopram para determinar los efectos antimaniacos en el modelo de hiperactividad por anfetamina-clordiazepóxido en ratón

Se evaluaron clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram para determinar los efectos antimaniacos usando el ensayo de hiperactividad por anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP).

15 Animales

En este estudio se usaron ratones C57B1/6J macho de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ratones se recibieron a las 6 semanas de edad. Tras la recepción, a los ratones se les asignaron números de identificación únicos (marcados en la cola) y se alojaron en grupo (4 ratones/jaula) en jaulas ventiladas para ratones OPTI. Todos los animales permanecieron alojados en grupos de cuatro durante el resto del estudio. Durante el periodo de aclimatación, los ratones fueron examinados de forma regular, se manipularon y se pesaron para asegurar la salud y la aptitud adecuadas. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad 12/12. La temperatura ambiente se mantuvo entre 20 y 23 °C con una humedad relativa mantenida entre el 30 % y el 70 %. Se proporcionaron pienso y agua a demanda durante todo el estudio. En cada ensayo, los animales se asignaron aleatoriamente en grupos de tratamiento.

25 Administración de los fármacos

Se usaron los siguientes compuestos:

- Se disolvieron sulfato de d-anfetamina (*Sigma*, 4,0 mg/kg) y clordiazepóxido (CDP; *Sigma*, 2,5 mg/kg) en agua estéril y se administraron por vía intraperitoneal a un volumen de dosis de 10 ml/kg.
- Se disolvió valproato (VPA; *Sigma*, 400 mg/kg) en agua estéril y se administró por vía intraperitoneal en un volumen de dosis de 10 ml/kg 30 min antes del agua o de la mezcla de d-anfetamina/CDP.
- Se disolvieron clorhidrato de cariprazina (0,03 y 0,10 mg/kg) y oxalato de escitalopram (0,10 y 0,50 mg/kg) en agua estéril y se administraron por vía oral a un volumen de dosis de 10 ml/kg 60 min antes del agua o de la mezcla de d-anfetamina/CDP. Las dosis de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram se expresan en mg de base libre por kg de peso corporal.

Procedimientos

5 El ensayo de campo abierto (CA) se usó para evaluar tanto el comportamiento similar a la ansiedad como la actividad motora. Las cámaras de campo abierto eran cámaras de plexiglás cuadradas (27,3 x 27,3 x 20,3 cm; Med Associates Inc., St Albans, VT), rodeadas de fuentes de fotohaz de infrarrojos (16 x 16 x 16). La distancia recorrida se midió por roturas del haz consecutivo. La distancia total recorrida durante la sesión de ensayo se usó como índice de la actividad. Después del pretratamiento de 60 minutos con agua, clorhidrato de cariprazina u oxalato de escitalopram, o del pretratamiento de 30 minutos con valproato, a los ratones se les inyectó agua o mezcla de d-anfetamina/CDP ('mezcla') y se colocaron en las cámaras de CA para una sesión de ensayo 60 min. Al final de cada sesión de ensayo de campo abierto las cámaras de CA se limpiaron minuciosamente.

10 *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de análisis de DMSP de Fisher a posteriori cuando fue pertinente. Un efecto se consideró significativo si $p < 0,05$. Los valores atípicos que cayeron encima y debajo de dos desviaciones típicas de la media se eliminaron del análisis final.

15 Los ratones tratados con clorhidrato de cariprazina u oxalato de escitalopram no mostraron ningún signo de toxicidad o sedación durante el pretratamiento o el ensayo.

Distancia total recorrida

El sumario de los efectos (es decir, la distancia total recorrida sumada durante el periodo de ensayo de 60 minutos) producidos por diferentes pautas de tratamiento en el modelo en ratón con anfetamina-clordiazepóxido de manía, se muestra en las Tablas 5-8.

20

TABLA 5

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
Agua	Vehículo	4316 ± 631	12
	Valproato (400 mg/kg)	3365 ± 612	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg)	4013 ± 343	11
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg)	2697 ± 259	11
	Oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	5551 ± 382	12
	Oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	5238 ± 242	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	4160 ± 296	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	3830 ± 410	11
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	2771 ± 343	11
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	1972 ± 309	12

En comparación con el agua, los tratamientos farmacológicos que se muestran en la Tabla 5 no produjeron un efecto significativo sobre la actividad locomotora basal de los ratones.

TABLA 6

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
Agua	Vehículo	4316 ± 631	12
AMPH/CDP	Vehículo	36086 ± 2978 #	12

diferencia significativa con los controles de agua ($p < 0,05$)

25 Los ratones tratados con la mezcla (CDP + anfetamina) mostraron una actividad locomotora significativamente mayor en comparación con los ratones tratados con agua.

TABLA 7

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
AMPH/CDP	Vehículo	36086 ± 2978	12
AMPH/CDP	Valproato (400 mg/kg)	18478 ± 2961 *	12

* Diferencia significativa con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$)

La administración de valproato (400 mg/kg) disminuyó significativamente la hiperactividad inducida por la mezcla de d-anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP) en ratones.

TABLA 8: Efecto de la administración de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram, solos o en combinación, sobre la hiperactividad inducida por la mezcla de d-anfetamina/clordiazepóxido (AMPH/CDP) en ratones

Condición de ensayo	Tratamiento farmacológico	Distancia total recorrida (cm/60 min) [media ± ETM]	n
AMPH/CDP	Vehículo	36086 ± 2978	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg)	32628 ± 2510	11
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg)	22594 ± 2838 *	12
	Oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	39700 ± 3477	12
	Oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	40881 ± 3123	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	30350 ± 1313 *, &	12
	HCl de cariprazina (0,03 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	33343 ± 2060 %	12
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg)	16191 ± 2101 *, -, &	11
	HCl de cariprazina (0,10 mg/kg) + oxalato de escitalopram (0,50 mg/kg)	10730 ± 790 *, -, %	11

* diferencia significativa con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$)
 - diferencia significativa con el grupo tratado con HCl de cariprazina (0,10 mg/kg) ($p < 0,05$)
 & diferencia significativa con el grupo tratado con escitalopram (0,10 mg/kg) ($p < 0,05$)
 % diferencia significativa con el grupo tratado con escitalopram (0,50 mg/kg) ($p < 0,05$)

La actividad locomotora potenciada producida por la mezcla de CDP + anfetamina fue atenuada significativamente por el valproato y el clorhidrato de cariprazina (0,10 mg/kg). El oxalato de escitalopram solo, en cualquiera de las dosis sometidas a ensayo, no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad locomotora inducida por la mezcla. Las combinaciones de clorhidrato de cariprazina (0,10 mg/kg) y oxalato de escitalopram (0,10 y 0,50 mg/kg) disminuyeron significativamente la hiperactividad inducida por la mezcla. Además, la disminución producida por las combinaciones fue significativamente mayor en magnitud que la producida por el clorhidrato de cariprazina (0,10 mg/kg) solo. La combinación de la dosis baja de clorhidrato de cariprazina (0,03 mg/kg) y oxalato de escitalopram (0,10 mg/kg) también produjo una disminución significativa en la actividad locomotora inducida por la mezcla.

15 Ejemplo de Referencia 5: El efecto de una combinación de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram sobre la actividad de la glucógeno sintasa cinasa-3 en el cerebro de ratón

La glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK) es una enzima importante que modula la función neuronal. Se ha implicado a la actividad anormal de la GSK3 en los trastornos del estado de ánimo y la esquizofrenia.

El objetivo de este estudio es evaluar combinaciones de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram para determinar la capacidad de estimular la fosforilación de GSK3 en el cerebro de ratón.

Animales y entorno

Los experimentos se realizaron en C57BL/6 machos adultos obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Antes de los experimentos, los animales se alojaron de a cuatro o cinco en una jaula a 23 °C en un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad con acceso a alimento y agua a demanda.

25 Administración de los fármacos

Se usó LiCl (200 mg/kg) como compuesto de referencia y se usaron animales inyectados con vehículo como control. El litio se disolvió en agua inyectable estéril y se administró por vía intraperitoneal en un volumen de dosis de 10 ml/kg 30 min antes de que se sacrificara el animal. Se administró clorhidrato de cariprazina, disuelto en agua inyectable estéril, por vía oral (sonda nasogástrica) a una dosis de 0,2 mg/kg (volumen de dosis de 10 ml/kg) 60 minutos antes de que se sacrificaran los animales. Las dosis se expresan como mg de base libre/kg de peso corporal. Se disolvió oxalato de escitalopram en agua inyectable estéril, se administró por vía subcutánea (SC) a una dosis de 1 mg/kg (volumen de dosis de 10 ml/kg) 60 minutos antes de que se sacrificaran los animales. Las dosis se expresan como mg de base libre/kg de peso corporal. El efecto de la combinación se evaluó después de la coadministración de clorhidrato de cariprazina (0,2 mg/kg, por vía oral) y oxalato de escitalopram (1 mg/kg, por vía subcutánea) 60 minutos antes de que se sacrificaran los animales.

Anticuerpos

La Ser-21/9 anti-fosfo-GSK-3 α/β pueden adquirirse en Cell Signaling Technology (Beverly, MA). El anti-DARPP-32 puede obtenerse de BD Transduction Laboratories (Lexington, KY).

Ensayo de actividad de GSK-3

- 5 Para cada determinación de la actividad cinasa, se disecaron rápidamente varias regiones del cerebro de los ratones en una superficie enfriada con hielo y se homogenizaron a 4 °C en tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 8,0/NaCl 137 mM/glicerol al 10 %/Nonidet P-40 al 1 %/ortovanadato de sodio 0,5 mM/ácido okadaico 2 μ M y una mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich). Se inmunoprecipitaron GSK-3 α y-3 β a 4 °C a partir de 1 mg de extracto de proteína con 2 μ g de anticuerpo monoclonal anti-GSK-3 α/β y proteína-A Sepharose (Amersham Pharmacia Bioscience). Los inmunoprecipitados después se incubaron en tampón de ensayo (Tris 20 mM, pH 7,5/MgCl₂ 10 mM/DTT 5 mM/ATP 0,2 mM/0,5 μ Ci de [γ -³²P]ATP) durante 10 min a 30 °C con 0,5 μ g de inhibidor de fosfatasa 2 recombinante (New England Biolabs). También se realizaron ensayos de control en presencia del inhibidor de GSK-3 Kenpaulona (2 μ M, Sigma-Aldrich). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón de carga de Laemmli, se hirvieron durante 5 min y se resolvieron en DSS/EGPA al 10 %. Después, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se autorradiografiaron. La incorporación de ³²P en el inhibidor de fosfatasa 2 recombinante se midió mediante análisis por densitometría.
- 10
- 15

Análisis

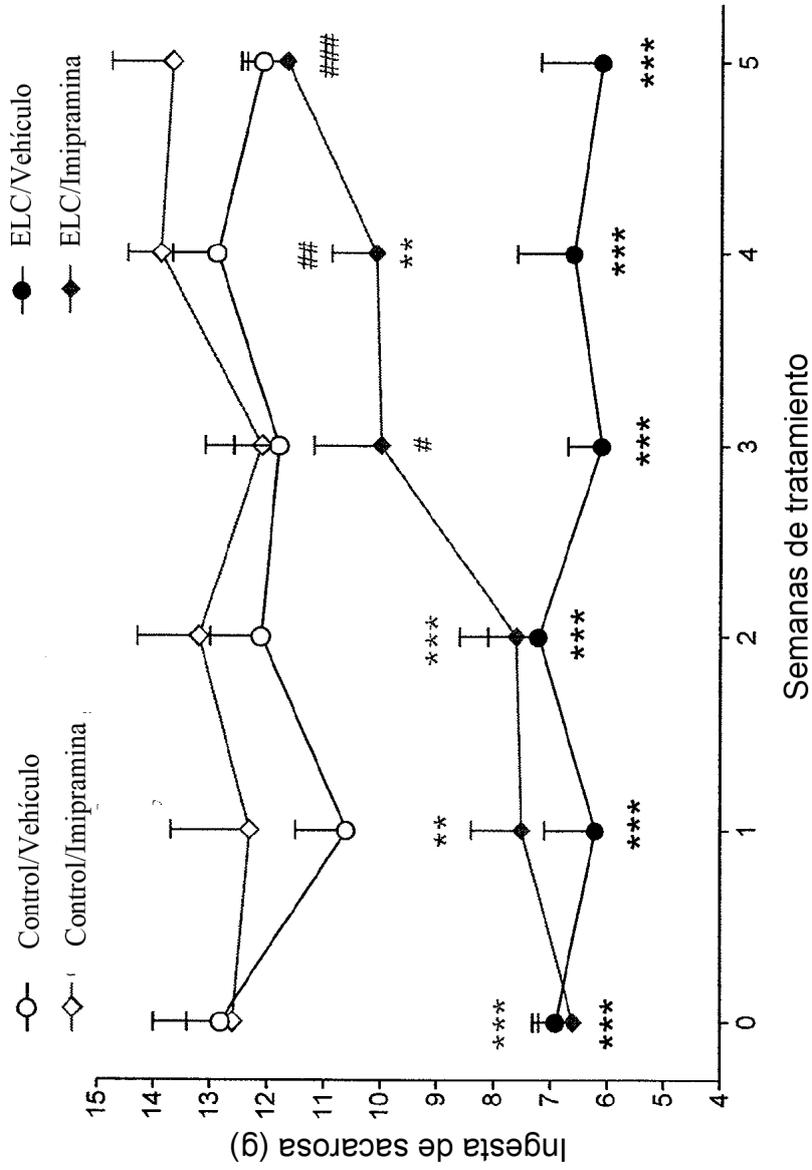
Todos los resultados obtenidos en este estudio se cuantificaron y se analizaron por espectrometría de infrarrojos usando un instrumento LiCor.

- 20 La administración de una combinación de clorhidrato de cariprazina y oxalato de escitalopram puede estimular sinérgicamente la fosforilación de GSK3 en el cerebro de ratón, en comparación con cada compuesto administrado solo.

REIVINDICACIONES

1. Trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento del trastorno depresivo mayor.
2. Trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de clorhidrato de trans-4-{2-[4-(2,3-diclorofenil)-piperazin-1-il]-etil}-N,N-dimetilcarbamoil-ciclohexilamina.

FIGURA 1



* $p < 0,05$ con respecto a grupos de control tratados con vehículo o fármaco
 ** $p < 0,01$ con respecto a grupos de control tratados con vehículo o fármaco
 *** $p < 0,001$ con respecto a grupos de control tratados con vehículo o fármaco
 # $p < 0,05$ con respecto a animales sometidos a estrés tratados con fármaco en la semana 0
 ## $p < 0,01$ con respecto a animales sometidos a estrés tratados con fármaco en la semana 0
 ### $p < 0,001$ con respecto a animales sometidos a estrés tratados con fármaco en la semana 0

FIGURA 2

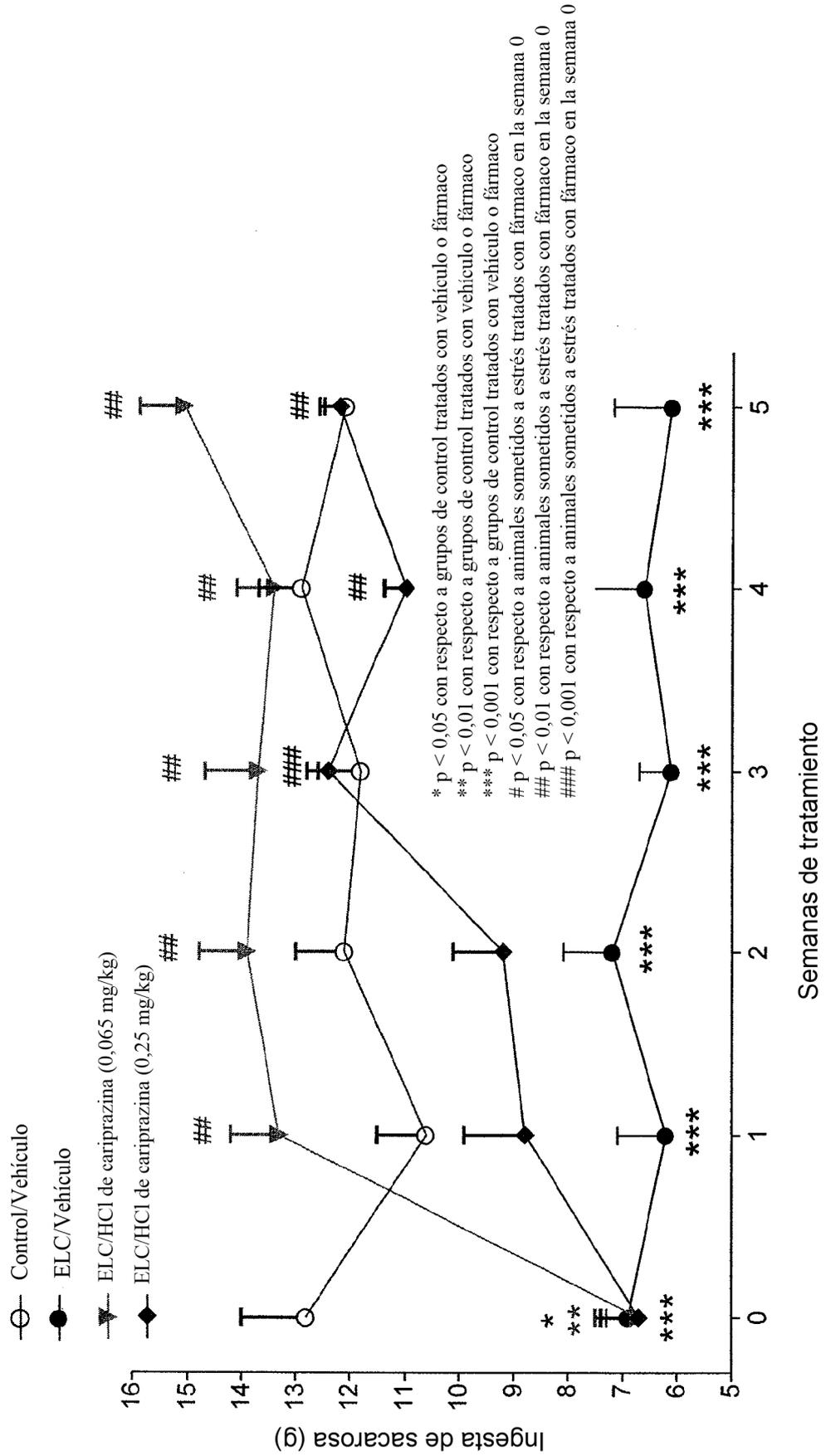


FIGURA 3

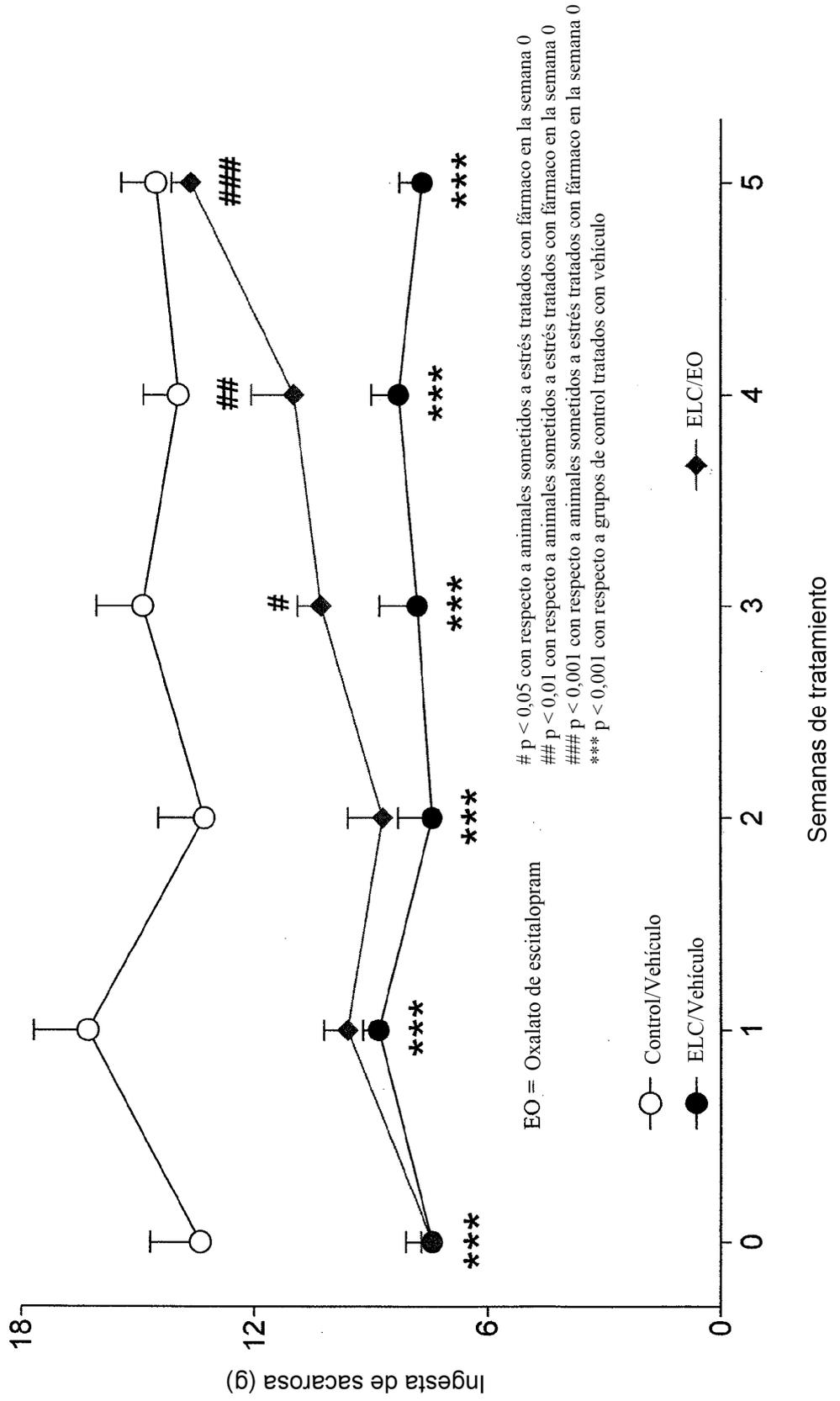


FIGURA 4

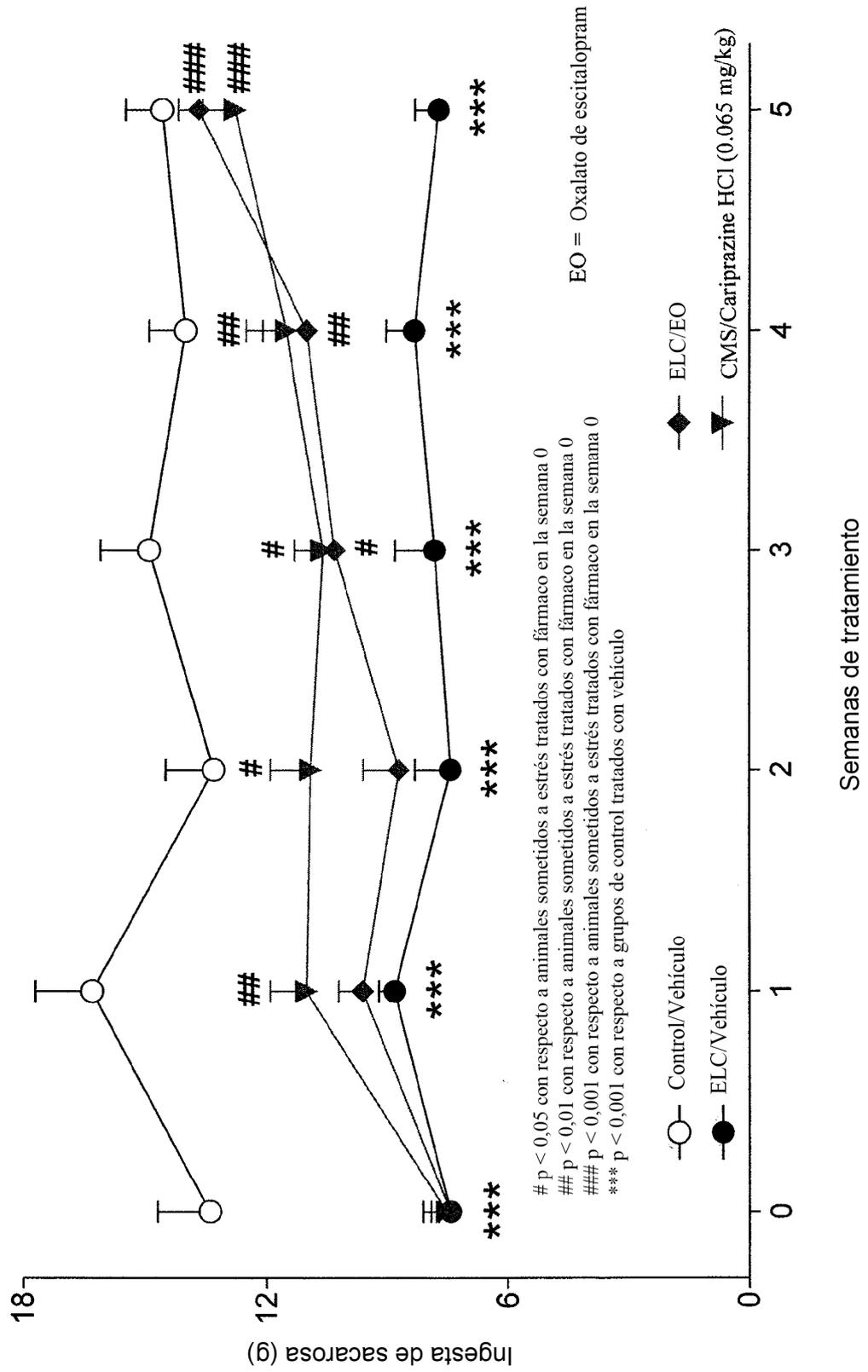


FIGURA 5

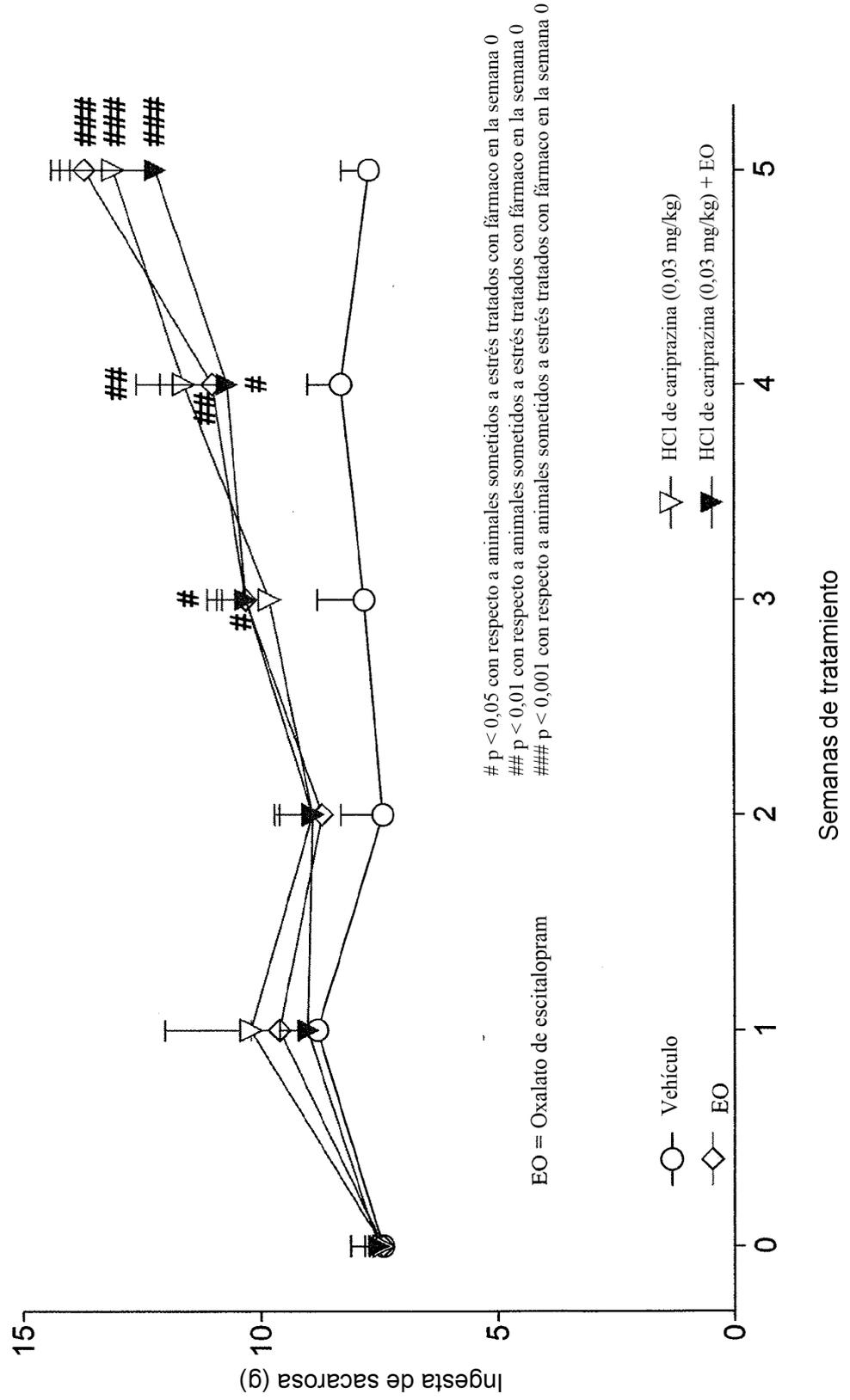


FIGURA 6

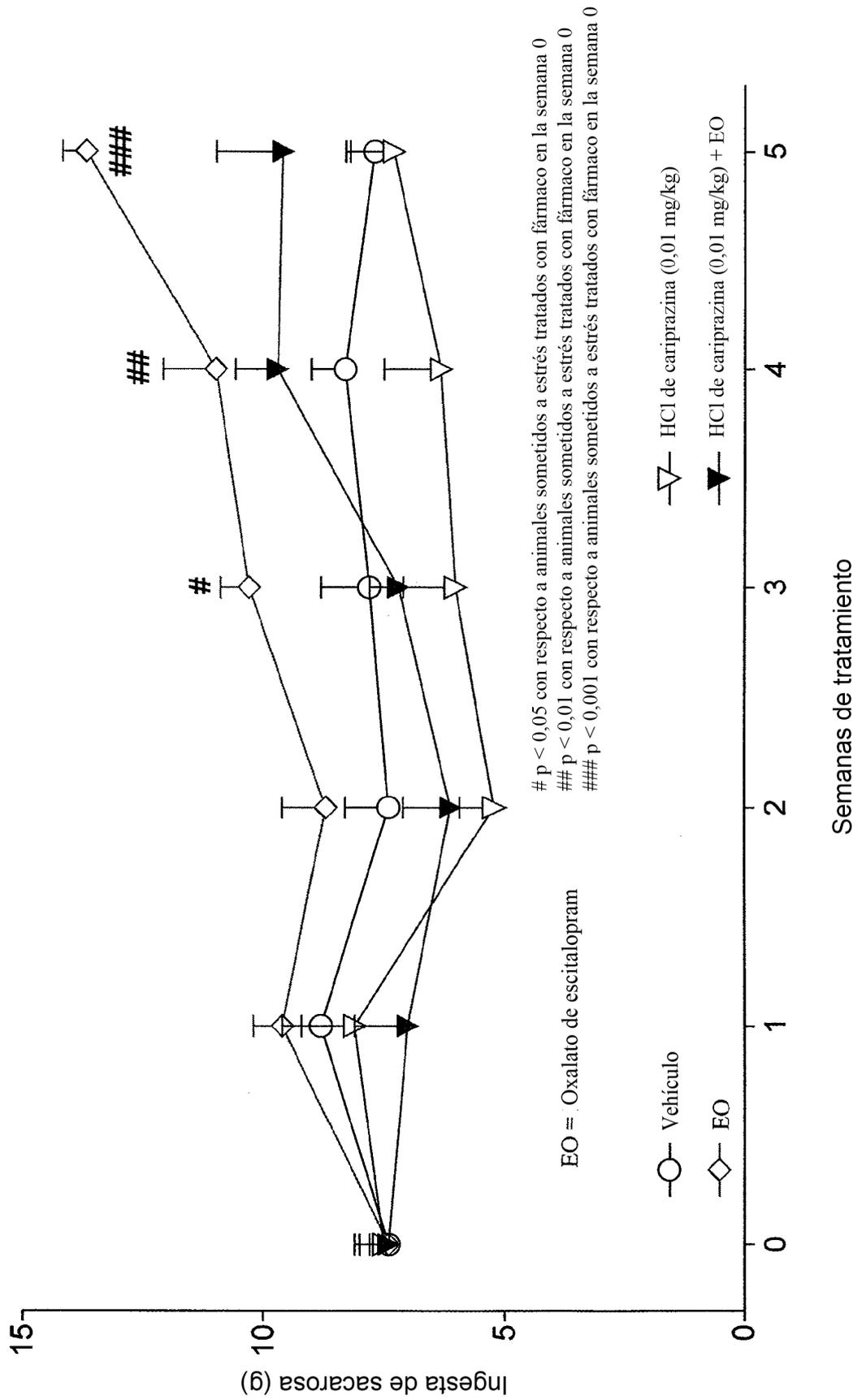


FIGURA 7

