

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 375**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4545 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/539 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2015** **PCT/US2015/037629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015** **WO15200594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2015** **E 15811219 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021** **EP 3160469**

54 Título: **Procedimientos de manejo del miedo condicionado con antagonistas del receptor de neuroquinina**

30 Prioridad:

25.06.2014 US 201462016683 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

EMORY UNIVERSITY (100.0%)
Office of Technology Transfer 1599 Clifton Road
NE, 4th Floor
Atlanta, Georgia 30322, US

72 Inventor/es:

RESSLER, KERRY J. y
GALI, RAUL ANDERO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 879 375 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

Procedimientos de manejo del miedo condicionado con antagonistas del receptor de neuroquinina

Declaración sobre la investigación financiada con fondos federales

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo OD 51OD011132 otorgado por the National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Referencia cruzada a aplicación relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense número 62/016,683 presentada el 25 de junio de 2014.

Antecedentes

10 Los síntomas del trastorno por estrés postraumático (PTSD) incluyen volver a experimentar recuerdos de un evento traumático, tal como pensamientos intrusivos, recuerdos y pesadillas. El PTSD por lo general también va acompañado de síntomas de hiperactividad. Además, los recuerdos persistentes altamente aversivos relacionados con el trauma, los recuerdos potencialmente consolidados en exceso y la incapacidad de estos recuerdos para extinguirse son características frecuentes de este trastorno. Específicamente relevante es la fase de consolidación
15 de la memoria después del aprendizaje emocional, ya que se requiere para estabilizar el rastro inicial de la memoria del miedo. Los tratamientos farmacéuticos aprobados por la FDA para el PTSD son antidepresivos que han obtenido resultados limitados en ensayos clínicos. De este modo, se necesitan enfoques más eficaces y específicos para la prevención y el tratamiento del PTSD. Dunlop, et al. informar sobre intervenciones farmacológicas para el trastorno de estrés postraumático y psicoterapia potenciada con medicamentos. Current pharmaceutical design, 2012, 18, 5645-5658.

Ebner et al. informan los receptores de taquiquinina como dianas terapéuticas en los trastornos relacionados con el estrés. Curr Pharm Des, 2009, 15(14):1647-74.

Daoui et al. informan que un antagonista del receptor de taquiquinina NK3, osanetant, previene la hiperreactividad bronquial inducida por la sustancia P en cobayas. Pulm Pharmacol Ther, 1997, 10(5-6):261-70.

25 Emonds-Alt et al., informan sobre osanetant en el tratamiento de la depresión y los trastornos depresivos. Véase también la Patente de los Estados Unidos 6,420,388.

Kronenberg et al. informan de un estudio aleatorizado y doble ciego de osanetant en el trastorno de pánico inducido con desafíos con tetrapéptido de colecistoquinina (CCK-4). Pharmacopsychiatry, 2005, 38(1):24-9.

30 Véase también la Patente de los Estados Unidos 7,521,449, WO2004/056805, WO2004/056364, WO2002053140, U.S. App. 2008/026197.

Las referencias citadas en la presente memoria no son una admisión de la técnica anterior.

Sumario

Esta divulgación se refiere al manejo del miedo condicionado y las condiciones inducidas por experimentar o presenciar un evento traumático usando antagonistas del receptor de neuroquinina. En determinadas
35 realizaciones, la divulgación se refiere a procedimientos de tratamiento o prevención del miedo condicionado que comprenden administrar una cantidad eficaz del antagonista del receptor de neuroquinina 3 a un sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, al sujeto se le diagnostica un trastorno de estrés postraumático (PTSD). En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 es (R)-N-{{3-[1-Benzoil-3-(3,4-diclorofenil) piperidin-3- il]prop-1-il}-4-fenilpiperidin-4-il}-metilacetamina o sales de la misma.

40 En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en combinación con un segundo agente activo tal como un antidepresivo. En determinadas realizaciones, el agente es sertralina, paroxetina, fluoxetina, citalopram, baclofeno, modafinilo, eszopiclona, hidrocloridona, vareniclina, dexametasona o combinaciones de los mismos.

45 En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra dentro de una hora o dentro de un día de experimentar un evento traumático.

En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en el momento o dentro de una hora de psicoterapia, terapia cognitiva conductual, terapia de exposición, reestructuración cognitiva o entrenamiento de inoculación de estrés.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1A muestra datos que indican que los niveles de ARNm de Tac2 se regulan al alza rápidamente en la amígdala durante la consolidación del miedo 30 minutos después del condicionamiento del miedo.
- 5 La figura 1B muestra datos que indican que la regulación al alza de Tac2 ocurre cuando el estímulo condicionado (tono acústico) y el estímulo no condicionado (choque eléctrico de la pisada) están emparejados pero no cuando están desemparejados.
- 10 La figura 2A muestra datos que indican condicionamiento de miedo, expresión de Neuroquinina B en la amígdala. El producto Tac2, Neuroquinina B (NkB) se detecta mediante inmunocitoquímica en cultivo de células de amígdala de ratón. NkB se expresa mucho en el soma y en las dendritas. El rojo es la señal NkB. El azul es el núcleo neuronal, NeuN. Los estudios de inmunohistoquímica muestran una alta expresión de NkB en la amígdala central (CeA). NkB se regula al alza a las 2 horas en la amígdala después del condicionamiento del miedo.
- 15 La figura 2B muestra datos sobre cultivo de células de amígdala con osanetant, un antagonista de neuroquinina 3 (Nk3R) potente y específico. La incubación con 20 µg y 40 µg de osanetant mejora los niveles de ARNm de Nk3R. Esto sugiere que osanetant activa Nk3R y su señalización aguas abajo en la amígdala.
- 20 La figura 3A muestra datos que indican que el antagonista de Nk3R altera la consolidación de la memoria de miedo con señales cuando se infunde sistémicamente, en la amígdala central y en un modelo de ratón similar al PTSD. El osanetant deteriora la memoria del miedo con señales cuando se administra desde 30 minutos hasta 1 hora después de la adquisición del miedo. La figura muestra el tiempo empleado en congelar el comportamiento durante la prueba de expresión de miedo cuando se presenta el CS.
- 25 La figura 3B muestra los datos del osanetant administrado por vía intraperitoneal 30 minutos antes de que el condicionamiento del miedo deteriorara la mejora de los niveles de ARNm del receptor Pac1 (Adcyap1r1). La ruta PACAP-PAC1R está asociada con PTSD, el condicionamiento del miedo y el estrés.
- 30 La figura 3C muestra los datos del osanetant inyectado bilateralmente en la amígdala central inmediatamente después de que el condicionamiento del miedo provoque una consolidación de la memoria del miedo deteriorada, como se muestra por una congelación más baja en la prueba de expresión de miedo con señales.
- 35 La figura 3D muestra un cronograma del experimento.
- 40 La figura 3E muestra datos que indican que el condicionamiento de miedo con claves mejora los niveles de Tac2 30 minutos después del condicionamiento de miedo en ratones ingenuos, pero de forma más robusta en ratones con una exposición previa a la inmovilización en una tabla de madera (IMO), un modelo similar al PTSD.
- 45 La figura 3F muestra los datos en los que se administró Osanetant inmediatamente después de la FC y se deterioró la consolidación de la memoria del miedo en ratones que habían estado expuestos previamente a un estrés traumático, como se muestra por la reducción de la congelación en la prueba de expresión del miedo. Veh = vehículo; Osa = osanetant.
- 50 La figura 4A muestra datos. El lentivirus Tac2-FUGW provoca una sobreexpresión del 42% de Tac2 en la amígdala central. El lentivirus GFP-FUGW induce la expresión de GFP pero no la Neuroquinina B (NkB) en las células Hek293. El lentivirus Tac2-FUGW induce la expresión de NkB en células Hek293. Tac2-FUGW o GFP-FUGW se infundieron bilateralmente en la amígdala central y los ratones se dejaron tranquilos durante 14 días.
- La figura 4B muestra un cronograma de un experimento.
- La figura 4C muestra datos que indican que la sobreexpresión de Tac2 en la amígdala central no altera el comportamiento similar a la ansiedad evaluado por el tiempo pasado con los brazos abiertos en el laberinto más elevado.
- La figura 4D muestra datos que indican que la sobreexpresión de Tac2 mejora la consolidación de la memoria del miedo (LV-Tac2-Veh) y el osanetant afecta este efecto (LV-Tac2-Osa). Los lentivirus GFP-FUGW y Tac2-FUGW no provocan cambios en el condicionamiento del miedo. Osanetant o vehículo se administraron sistémicamente inmediatamente después de la adquisición del miedo.

La figura 5 muestra datos que indican que el silenciamiento inducible de neuronas que expresan Tac2 en la CeA con Gi-DREADD disminuye el miedo condicionado. Se infectaron ratones Tac2-Cre- o Tac2-Cre+ con el hM4Di-mCherry AAV en la CeA. El receptor Gi se insertó solo en las células Tac2-Cre de ratones Tac2-Cre+, CeM = amígdala centro-medial, CeL = amígdala centro-lateral. Se administró CNO sistémicamente 30 minutos antes del acondicionamiento del miedo a Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry y Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry. El silenciamiento temporal de las neuronas que expresan Tac2 en el grupo Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry no afectó la congelación durante la adquisición del miedo. Sin embargo, cuando los ratones fueron probados al día después de determinar la expresión del miedo sin CNO, los ratones Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry mostraron un miedo menos condicionado. Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry frente a Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry. Los ratones Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry y Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry se volvieron a entrenar a un tono acústico (CS) diferente sin recibir CNO. Ambos grupos adquirieron por igual el aprendizaje del miedo y mostraron niveles similares de consolidación de la memoria del miedo. El CNO administrado 30 minutos antes del laberinto más elevado no mostró ningún efecto sobre Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry ni Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry en un comportamiento similar a la ansiedad.

La figura 7 muestra datos que indican que el osanetant afecta el aprendizaje del miedo sin efectos sobre la ansiedad, la locomoción ni la reactividad al choque. Diferentes cohortes de ratones recibieron osanetant sistémico 30 minutos antes de campo abierto, laberinto más elevado o condicionamiento del miedo en la cámara de sobresalto. A) Osanetant no modificó el comportamiento similar a la ansiedad como lo muestra el tiempo en el centro del campo abierto. B) Los animales que recibieron vehículo u osanetant mostraron una distancia equivalente recorrida en campo abierto, lo que indica niveles similares de actividad locomotora. C, D y E) Osanetant no modificó el comportamiento similar a la ansiedad como lo muestra el tiempo con los brazos abiertos, las entradas con los brazos abiertos y el tiempo con los brazos cerrados en el laberinto de más elevado. F) Reactividad de choque equivalente mostrada cuando se administró vehículo u osanetant 30 minutos antes de la prueba en la cámara de choque. G) Osanetant administrado sistémicamente 30 minutos antes de la FC altera la consolidación de la memoria del miedo, sin afectar la expresión del miedo, como lo demuestra la disminución de la congelación en la prueba de expresión del miedo.

Descripción detallada

Antes de que la presente divulgación se describa con mayor detalle, se debe entender que esta divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas y, como tal, puede variar, por supuesto, en la medida en que esté cubierta por las reivindicaciones. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria también se puede usar en la práctica o ensayo de la presente divulgación, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos.

La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de una divulgación previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características discretos que se pueden separar fácilmente o combinar con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones. Cualquier procedimiento citado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las realizaciones de la presente divulgación emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología y similares, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura.

Se debe tener en cuenta que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario. En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de las Patentes de los Estados Unidos y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" o

similares, cuando se aplica a procedimientos y composiciones abarcadas por la presente divulgación se refiere a composiciones como las divulgadas en la presente memoria, pero que pueden contener grupos estructurales adicionales, componentes de la composición o etapas del procedimiento (o análogos o derivados de los mismos como se discutió anteriormente). Sin embargo, tales grupos estructurales adicionales, componentes de composición o etapas de procedimiento, etc., no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosas de las composiciones o procedimientos, en comparación con las de las composiciones o procedimientos correspondientes divulgados en la presente memoria. "Que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" o similares, cuando se aplica a procedimientos y composiciones abarcados por la presente divulgación tiene el significado atribuido en la Ley de Patentes de los Estados Unidos, y el término es indefinido, lo que permite la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no se modifiquen por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye las realizaciones de la técnica anterior.

Como se usa en la presente memoria, el término "combinación con" cuando se usa para describir la administración con un tratamiento adicional significa que el agente se puede administrar antes, junto con o después del tratamiento adicional, o una combinación de los mismos.

Como se usa en la presente memoria, los términos "prevenir" y "que previene" incluyen la prevención de la recurrencia, diseminación o aparición. No se pretende que la presente divulgación se limite a la prevención completa. En algunas realizaciones, el inicio se retrasa o se reduce la gravedad.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar" y "que trata" no se limitan al caso en el que el sujeto (por ejemplo, el paciente) se cura y la afección o enfermedad se erradica. Más bien, las realizaciones de la presente divulgación también contemplan un tratamiento que simplemente reduce los síntomas y/o retrasa las afecciones o la progresión de la enfermedad.

Como se usa en la presente memoria, el término "derivado" se refiere a un compuesto estructuralmente similar que retiene suficientes atributos funcionales del análogo identificado. El derivado puede ser estructuralmente similar porque carece de uno o más átomos, sustituido, una sal, en diferentes estados de hidratación/oxidación, o porque uno o más átomos dentro de la molécula están intercambiados, tal como, pero no se limita, reemplazando un átomo oxígeno con un átomo de azufre o reemplazando un grupo amino con un grupo hidroxilo. El derivado contemplado incluye el cambio de anillos carbocíclicos, aromáticos o fenilo con anillos heterocíclicos o el cambio de anillos heterocíclicos con anillos carbocíclicos, aromáticos o fenilo, por lo general del mismo tamaño de anillo. Los derivados se pueden preparar mediante cualquier variedad de procedimientos sintéticos o adaptaciones apropiadas presentadas en libros de texto de química orgánica o sintética, tal como las que se proporcionan en March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Wiley, 6th Edition (2007) Michael B. Smith or Domino Reactions in Organic Synthesis, Wiley (2006) Lutz F. Fieser.

El término "sustituido" se refiere a una molécula en la que al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza con un sustituyente. Cuando están sustituidos, uno o más de los grupos son "sustituyentes". La molécula puede estar sustituida de forma múltiple. En el caso de un sustituyente oxo ("=O"), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. Ejemplos de sustituyentes dentro de este contexto pueden incluir halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, nitro, ciano, oxo, carbocicilo, carbocicloalquilo, heterocarbocicilo, heterocarbocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, -NRaRb, -NRaC(=O)Rb, -NRaC(=O)NRaNRb, -NRaC(=O)ORb, -NRaSO₂Rb, -C(=O)Ra, -C(=O)ORa, -C(=O)NRaRb, -OC(=O)NRaRb, -ORa, -SRa, -SORa, -S(=O)₂Ra, -OS(=O)₂Ra y -S(=O)₂ORa. Ra y Rb en este contexto pueden ser iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, carbocicilo, carbocicloalquilo, heterocarbocicilo, heterocarbocicloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo.

Como se usa en la presente memoria, "alquilo" significa un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificada, insaturado o saturado, tal como los que contienen desde 1 a 10 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-septilo, n-octilo, n-nonilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (denominados "alqueno" o "alquino", respectivamente). Los alquenos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen etileno, propileno, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutileno, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares; mientras que los alquinos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen acetileno, propino, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butenilo y similares.

Los alquilos mono o policíclicos no aromáticos se denominan en la presente memoria "carbociclos" o grupos "carbociclico". Los carbociclos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los carbociclos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares.

Los grupos "heterocarbociclos" o "heterocarbociclilo" son carbociclos que contienen desde 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre que pueden ser saturados o insaturados (pero no aromáticos), monocíclicos o policíclicos, y en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heterocarbociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

"Ariilo" significa un anillo carbocíclico aromático monocíclico o policíclico tal como fenilo o naftilo. Los sistemas de anillos policíclicos pueden contener uno o más anillos no aromáticos, pero no es obligatorio, siempre que uno de los anillos sea aromático.

Como se usa en la presente memoria, "heteroarilo" o "heteroaromático" se refiere a un heterocarbociclo aromático que tiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene al menos 1 átomo de carbono, incluyendo sistemas de anillos tanto mono como policíclicos. Los sistemas de anillos policíclicos pueden contener uno o más anillos no aromáticos, pero no es obligatorio, siempre que uno de los anillos sea aromático. Los heteroarilos representativos son furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, pirrolilo, indolilo, isoindolilo, azaindolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isooxazolilo, benzoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo. Se contempla que el uso del término "heteroarilo" incluye derivados N-alquilados tales como un sustituyente 1-metilimidazol-5-ilo.

Como se usa en la presente memoria, "heterociclo" o "heterociclilo" se refiere a sistemas de anillos mono y policíclicos que tienen de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contienen al menos 1 átomo de carbono. Los sistemas de anillos mono y policíclicos pueden ser aromáticos, no aromáticos o mezclas de anillos aromáticos y no aromáticos. El heterociclo incluye heterocarbociclos, heteroarilos y similares.

En el presente contexto, las sales incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como ácidos orgánicos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos apropiados incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, sulfámico, nítrico y similares. Ejemplos de ácidos orgánicos apropiados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, itacónico, láctico, metanosulfónico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilen salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ácidos teofilina acéticos, así como las 8-haloteofilinas por ejemplo 8-bromoteofilina y similares. Otros ejemplos de sales de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2. Los ejemplos de sales metálicas incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Ejemplos de sales de amonio y de amonio alquilado incluyen sales de amonio, metil-, dimetil-, trimetil-, etil-, hidroxietil-, dietil-, n-butil-, sec-butil-, tert-butil-, tetrametilamonio y similares.

Un papel de los receptores Tac2, NkB y Nk3 en la consolidación de la memoria del miedo normal y desregulada

Las taquiquininas se refieren a dos péptidos codificados en roedores por los genes de taquiquinina 1 (Tac1) y Tac2 (TAC3 en seres humanos) que están implicados en la neurotransmisión y neuromodulación en el sistema nervioso central. Tac1 codifica una proteína precursora que produce dos péptidos, sustancia P (SP) y neuroquinina A (NkA), mientras que Tac2/TAC3 codifica la neuroquinina B (NkB). SP y NkA están implicados en procesos de miedo y PTSD. Los ensayos clínicos con agentes farmacéuticos dirigidos a la ruta Tac1 no han mostrado previamente efectos beneficiosos en el tratamiento de PTSD (Dunlop et al., 2012). Una posible explicación de esta falta de efecto es que los receptores SP y NkA (receptor de Neuroquinina 1, Nk1R y receptor de Neuroquinina 2, Nk2R) se expresan ampliamente en el cerebro; cuando se administran fármacos que se dirigen específicamente a Nk1 y Nk2, interactúan con múltiples regiones del cerebro que afectan a múltiples funciones. Por el contrario, la expresión de Tac2, NkB y su receptor específico, el receptor de Neuroquinina 3 (Nk3R), están relativamente restringidos en roedores a las regiones del cerebro que regulan la emoción, como la amígdala. Nk3R es un receptor de taquiquinina acoplado a proteína G que se une a NkB con la mayor afinidad. Nk3R se acopla a las proteínas G Gq/G11 sensibles a la toxina pertussis, cuya activación da como resultado la producción de trifosfato de inositol y diacilglicerol, y la activación de la proteína quinasa C. TAC3 y Nk3R se expresan en áreas equivalentes en monos rhesus y humanos.

Los experimentos divulgados en la presente memoria indican que (1) el gen Tac2 se regula dinámicamente durante la consolidación del miedo condicionado dentro de la amígdala central (CeA) y (2) se requiere la activación de Nk3R para la consolidación normal de la formación de la memoria del miedo en ratones. El aumento de la expresión del gen Tac2, el péptido NkB y la activación de Nk3R pueden estar implicados en la sensibilización al estrés y la

consolidación excesiva del miedo. Por el contrario, el silenciamiento genético de las neuronas que expresan Tac2 altera la consolidación del miedo. El bloqueo de esta ruta puede proporcionar un enfoque terapéutico novedoso para los trastornos con aprendizaje del miedo alterado, tal como PTSD.

Los experimentos indican que la expresión potenciada del gen Tac2 en modelos de miedo potenció la producción de NkB en la amígdala, se unió a Nk3R y promovió la consolidación de la memoria del miedo. Esta regulación al alza de los niveles de ARNm de Tac2 principalmente dentro del CeM deja abiertos varios posibles escenarios mecanicistas no mutuamente excluyentes, aunque no se pretende que las realizaciones de esta divulgación se limiten a ningún mecanismo particular. Puede ser que el gen Tac2 sintetice NkB en la amígdala CeM, actuando específicamente sobre Nk3R local dentro del CeM. Otra posibilidad es que el ARNm de Tac2 y/o NkB sean transportados desde el CeM a otros núcleos dentro de la amígdala tal como CeL, CeC o BLA donde se unen al Nk3R. Los experimentos en la presente memoria indican que el cultivo de células de amígdala con osanetant, un antagonista de Nk3R informado, aumenta los niveles de ARNm de Nk3R. Una interpretación de estos resultados es que osanetant antagoniza el Nk3R de la amígdala y debido a su disponibilidad disminuida, por ejemplo, el ARNm de Nk3R aumenta para sintetizar más Nk3R de manera compensatoria. Estos datos indican un papel específico del gen Tac2, a través de la activación de NkB de Nk3R en la consolidación del miedo dentro de la CeA.

El CeM está bajo el control inhibitorio tónico de CeL por un cambio en el equilibrio de actividad entre las neuronas CeL_{activada} y CeL_{desactivada} durante FC. Las neuronas CeL_{activada} presentan una respuesta excitadora al estímulo condicionado durante la expresión del miedo, mientras que CeL_{desactivada} muestran una respuesta inhibitoria. De este modo, la inhibición de CeL_{activada} conduce a la FC inhibida y CeL_{desactivada} facilita la FC. Específicamente, las neuronas CeL_{desactivada} se superponen en gran medida con las neuronas PKCd+. Además, también se mostró que el gen Tac2 no está colocalizado con Enk en el CeM. Enk está colocalizada con PKCd en la CeL y la delección específica de CeA-Enk disminuye la expresión del miedo durante la FC sin afectar la consolidación de la memoria del miedo. De este modo, la población neuronal Tac2-CeM parece ser independiente y complementaria de otras poblaciones neuronales previamente descritas implicadas en FC. El péptido GAD65, que se encuentra abundantemente en las terminales nerviosas y las sinapsis, desempeña un papel en la neurotransmisión de GABA. Además, CaMKII es un marcador bien conocido de plasticidad sináptica. De este modo, la colocalización de los niveles de ARNm de Tac2 y los péptidos GAD65 y CaMKII α en el CeM sugiere que el gen Tac2 puede tener un papel en la neurotransmisión dentro de las neuronas que expresan GAD65 y CaMKII α , de acuerdo con los datos divulgados en la presente memoria que esta población de CeM se puede implicar en la consolidación de la memoria del miedo.

Los datos divulgados en la presente memoria indican el uso del osanetant antagonista de Nk3R como agente farmacológico para bloquear la consolidación de la memoria del miedo poco después de la exposición a un trauma.

Osanetant evitó la regulación al alza del gen Adcyap1r1, que codifica el receptor PAC1. La ruta PACAPPAC1R está implicada en el PTSD, el condicionamiento del miedo, la neurotransmisión excitadora de la amígdala y el estrés [Ressler et al. (2011). Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. Nature 470, 492-497; Almlil et al., (2013); and Stevens et al. report PACAP receptor gene polymorphism impacts fear responses in the amygdala and hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111, 3158-3163. ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics 162B, 262-272; Cho et al. (2012). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces postsynaptically expressed potentiation in the intra-amygdala circuit. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32, 14165-14177; Hashimoto et al. (2011). PACAP is implicated in the stress axes, Current pharmaceutical design 17, 985-989; Uddin et al. (2013). Adcyap1r1 genotype, posttraumatic stress disorder, and depression among women exposed to childhood maltreatment. Depression and anxiety 30, 251-258].

En resumen, estos estudios proporcionan una nueva comprensión del papel del gen Tac2 y el CeM en el procesamiento del miedo y proporcionan un enfoque de intervención para los trastornos relacionados con el miedo en sujetos humanos mediante la administración de antagonistas del receptor NK3.

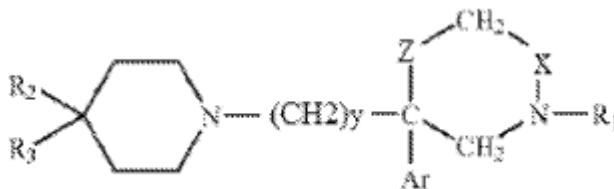
Antagonista del receptor de neuroquinina

Se describen numerosos antagonistas del receptor de neuroquinina 3. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Número 7,560,549, titulada, "Sulfonyloxy derivatives," la Patente de los Estados Unidos Número 8,138,334, titulada, "Substituted oxa-diaza-spiro-[5.5]-undecanone derivatives and their use as neurokinin antagonists", la Patente de los Estados Unidos Número 7,544,694 titulada, "Substituted diazaspiro-[5.5]-undecane derivatives and their use as neurokinin antagonists", la Patente de los Estados Unidos Número 7,435,736 titulada, "Substituted 1-piperidin-4-il-4-azetidin-3-il-piperazine derivatives and their use as neurokinin antagonists", y la Patente de los Estados Unidos Número 7,410,970. Todos los compuestos divulgados se contemplan para sus usos

divulgados en la presente memoria, mientras que la invención se limita a los compuestos cubiertos por las reivindicaciones.

En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 es (R)-N- {{3-[1-Benzoil-3-(3,4-diclorofenil) piperidin-3-il]prop-1-il}-4-fenilpiperidin-4-il}-N-metilacetamina, o sales de la misma.

- 5 Se divulga adicionalmente en la presente memoria un compuesto de la siguiente fórmula



o sales o derivados del mismo en los que

X es CH₂ o C = O;

Z es CH₂ u O;

- 10 y es 2 o 3;

Ar representa un fenilo mono- o disustituido con un átomo de halógeno;

R₁ representa un fenilo o benzoilo que no está sustituido o está sustituido una o dos veces con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente de un átomo de halógeno, un alquilo (C₁-C₄) y un alcoxi (C₁-C₄),

- 15 R₂ representa:

un piridilo;

un fenilo que no está sustituido o está sustituido una o dos veces con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente de un átomo de halógeno, un alquilo (C₁-C₄), un alcoxi (C₁-C₄), un grupo trifluorometilo y un grupo trifluorometoxi;

- 20 un bencilo que no está sustituido o está sustituido en el fenilo una o dos veces con uno o dos sustituyentes elegidos independientemente de un átomo de halógeno, un alquilo (C₁-C₄), un alcoxi (C₁-C₄), un grupo trifluorometilo y un grupo trifluorometoxi;

R₂ también puede representar:

- 25 un heterociclo elegido entre azetidina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina o perhidroazepina cuando

R₃ representa un ciano o un grupo - CONR₁₁R₁₂,

R₃ representa un grupo elegido entre:

(1) alquilo (C₁-C₄);

(2) alquilcarbonilo (C₁-C₄);

- 30 (3) ciano;

(4) - (CH₂)_q-OH;

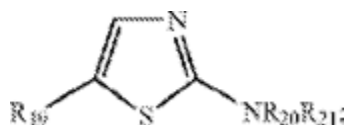
(5) - (CH₂)_q-O- alquilo (C₁-C₄);

(6) - (CH₂)_q-O-CO-R₄;

(7) - (CH₂)_q-O-CO-NH- alquilo (C₁-C₄);

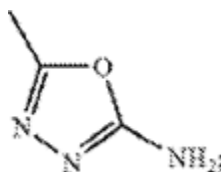
- 35 (8) -NR₅R₆;

- (9) $-\text{NR}_7\text{COR}_8$;
 (10) $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}_7\text{COR}_8$;
 (11) $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}_7\text{COOR}_9$;
 (12) $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}_7\text{SO}_2\text{R}_{10}$;
 (13) $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}_7\text{CONR}_{11}\text{R}_{12}$;
 (14) $-\text{CH}_2\text{NR}_{13}\text{R}_{14}$;
 (15) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NR}_{13}\text{R}_{14}$;
 (16) $-\text{COOH}$;
 (17) $-\text{COO}-$ alquilo (C_1-C_4);
 (18) $-\text{CONR}_{11}\text{R}_{12}$;
 (19) $-\text{CH}_2-\text{COOH}$;
 (20) $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ alquilo (C_1-C_4);
 (21) $-\text{CH}_2-\text{CONR}_{11}\text{R}_{12}$;
 (22) $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}_{15}$;
 (23) $-\text{NR}_7\text{COCOR}_{16}$;
 (24) $-\text{CONR}_7-\text{NR}_{17}\text{R}_{18}$;
 (25)



o

- (26)



q es 0, 1 o 2;

R_4 representa un alquilo (C_1-C_4); un cicloalquilo (C_3-C_7) que no está sustituido o está sustituido con uno o más grupos metilo;

un fenilo o un piridilo;

R_5 y R_6 representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1-C_4); R_6 también puede representar un cicloalquilmetilo (C_3-C_7), un bencilo o un fenilo; o R_5 y R_6 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, constituyen un heterociclo elegido entre azetidina, pirrolidina, piperidina, morfolina tiomorfolina, perhidroazepina o piperazina que no está sustituida o está sustituida en la posición 4 con un alquilo (C_1-C_4);

R_7 representa un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1-C_4);

R_8 representa un átomo de hidrógeno; un alquilo (C_1-C_4); un vinilo un fenilo; un bencilo; un piridilo; o un cicloalquilo (C_3-C_7) que no está sustituido o está sustituido con uno o más grupos metilo; un furilo; un tienilo; un pirrolilo; un imidazolilo;

o R_7 y R_8 juntos representan un grupo - $(CH_2)_p$;

p es 3 o 4;

R_9 representa un alquilo (C_1 - C_4) o un fenilo;

o R_7 y R_9 juntos representan un grupo - $(CH_2)_n$;

5 n es 2 o 3;

R_{10} representa un alquilo (C_1 - C_4) o un amino que está libre o sustituido con uno o dos alquilos (C_1 - C_4); un fenilo que está no sustituido o está sustituido una o más veces con un sustituyente elegido entre: un átomo de halógeno, un alquilo (C_1 - C_4), un trifluorometilo, un hidroxilo, un alcoxi (C_1 - C_4), un carboxilo, un alcoxycarbonilo (C_1 - C_4), un alquilcarboniloxi (C_1 - C_4), un ciano, un nitro, un amino que está libre o sustituido con uno o dos alquilos (C_1 - C_4), siendo dichos sustituyentes idénticos o diferentes;

10

R_{11} y R_{12} representan cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo (C_1 - C_4); R_{12} también puede representar un cicloalquilo (C_3 - C_7), un cicloalquilmetilo (C_3 - C_7), un hidroxilo, un alcoxi (C_1 - C_4), un bencilo o un fenilo; o R_{11} y R_{12} , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, constituyen un heterociclo elegido entre azetidina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina y perhidroazepina;

15

o R_7 y R_{12} juntos representan un grupo - $(CH_2)_m$;

m es 2 o 3;

R_{13} y R_{14} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1 - C_4); R_{14} también puede representar un cicloalquilmetilo (C_3 - C_7) o un bencilo;

R_{15} representa un átomo de hidrógeno; un alquilo (C_1 - C_4); un formilo; un alquilcarbonilo (C_1 - C_4);

20

R_{16} representa un alcoxi (C_1 - C_4);

R_{17} y R_{18} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1 - C_4);

o alternatively R_{17} y R_{18} , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, constituyen un heterociclo elegido entre pirrolidina, piperidina y morfolina;

R_{19} representa un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1 - C_4); y

25

R_{20} y R_{21} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un alquilo (C_1 - C_4); R_{21} también puede representar un formilo o un alquilcarbonilo (C_1 - C_4).

En determinadas realizaciones, X es CH_2 , Z es CH_2 , Ar representa un fenilo disustituido con un átomo de halógeno, y es 3 y R_1 es benzoilo.

30

En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 talnetant, 3-hidroxi-2-fenil-N-(1-fenilpropil) quinolina-4-carboxamida, 3-metil-2-fenil-N-(1-fenilpropil) quinolina-4-carboxamida, derivado o sal del mismo. El documento WO95/32948 divulga una variedad de derivados de quinolina, que incluyen talnetant como antagonistas de NK3. Otros antagonistas de NK3 descritos se describen en los documentos WO 2006/130080, WO 2006/050991, WO 2006/050992, WO 2008/131779, WO 2009/130240.

Procedimientos de uso

35

En determinadas realizaciones, la divulgación se refiere a procedimientos de tratamiento o prevención del miedo condicionado que comprenden administrar una cantidad eficaz del antagonista del receptor de neuroquinina 3 a un sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, al sujeto se le diagnostica un trastorno de estrés postraumático. El DSMIV define el trastorno de estrés postraumático (PTSD) como un trastorno de ansiedad que un individuo puede desarrollar después de la exposición a un evento traumático y se caracteriza por (1) volver a experimentar el evento traumático, tal como pesadillas recurrentes, recuerdos intrusivos del evento, recuerdos, respuestas fisiológicas y psicológicas a señales internas o externas relacionadas con el evento, etc; (2) evitación persistente de pensamientos, personas o lugares asociados con el evento; (3) adormecimiento de la capacidad de respuesta general, tal como desapego emocional, afecto restringido o pérdida de interés en las actividades; y (4) persistencia de una mayor excitación tal como respuesta de sobresalto exagerada, hipervigilancia, irritabilidad, dificultad para dormir, etc. En determinadas realizaciones, la divulgación contempla un sujeto con miedo condicionado caracterizado por volver a experimentar el evento traumático; por ejemplo, pesadillas recurrentes, recuerdos intrusivos del evento, recuerdos, recurrentes diarios, quincenales o semanales; y uno, dos o todos los

40

45

síntomas (2)-(4). En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un alto riesgo de PTSD, tal como un veterano de combate, una víctima de un caos criminal o una víctima de violación.

5 En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en combinación con un segundo agente activo tal como un antidepresivo. En determinadas realizaciones, el agente es sertralina, paroxetina, fluoxetina, citalopram, baclofeno, modafinilo, eszopiclona, hidrocortisona, vareniclina, dexametasona o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra dentro de una hora o dentro de un día de experimentar un evento traumático.

10 En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra dentro (antes y/o después) de una hora, dos horas, tres horas, 1 día, 2 días o una semana de experimentar un evento traumático. En determinadas realizaciones, el evento traumático es que el sujeto vio la muerte de un ser humano. En determinadas realizaciones, el evento traumático es que el sujeto vio el cuerpo de un ser humano en el que al menos una extremidad del sujeto se separó del cuerpo de un humano.

15 En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en el momento de o dentro (antes y/o después) de una hora, dos horas, tres horas, 1 día, 2 días o una semana de psicoterapia, terapia cognitiva conductual, terapia de exposición, reestructuración cognitiva o entrenamiento de inoculación de estrés.

20 Los procedimientos de la divulgación abarcan el uso de cualquier tipo de psicoterapia que sea apropiado y se pueda realizar en una o más sesiones. Los procedimientos apropiados de psicoterapia incluyen la psicoterapia conductual, tal como la psicoterapia basada en la exposición, la psicoterapia cognitiva que incluye el entrenamiento cognitivo y la psicoterapia orientada psicodinámicamente (véase, por ejemplo, Foa (2000) J. Clin. Psych. 61(suppl. 5):43-38).

25 "Psicoterapia" se refiere en términos generales a formas de tratamiento psiquiátrico que emplean técnicas de comunicación especializadas practicadas por un médico, consejero o clínico debidamente capacitado con el fin de curar o reducir o aliviar un trastorno del comportamiento de un paciente y mejorar el estado emocional, salud social y/o mental del paciente.

30 Un procedimiento de psicoterapia contemplado específicamente es el uso de terapia de exposición a realidad virtual (VR) para tratar un trastorno psiquiátrico usando el protocolo de terapia de combinación de la divulgación. La terapia VR para tratar de terminadas afecciones tales como PTSD en, por ejemplo, los veteranos de Vietnam (Rothbaum et al. 30 (1999) J. Trauma Stress 12(2):263-71) o víctimas de violación (Rothbaum et al. (2001) J. Trauma Stress 14(2):283-93), una realización de la presente divulgación contempla específicamente el uso de dicha psicoterapia de exposición a VR en combinación con compuestos como se describe en otra parte en la presente memoria para tratar una afección psicológica.

35 El compuesto se puede administrar en una composición apropiada para administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más apropiada en cualquier caso dado dependerá del sujeto particular y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se administra el ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

40 Como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad del compuesto que, dependiendo del modo seleccionado, la frecuencia y la duración de la administración, y los resultados deseados. Una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de un trastorno psiquiátrico es aquella que, dependiendo del modo seleccionado, la frecuencia y la duración de la administración, inhibe la aparición o recurrencia del trastorno psiquiátrico en el paciente o alivia uno o más síntomas del trastorno en el paciente. Cantidades eficaces para inhibir la aparición o recurrencia del trastorno psiquiátrico en un paciente son dosificaciones profilácticas administradas preferiblemente en pequeñas cantidades durante un curso prolongado de terapia preventiva a pacientes con riesgo de desarrollar el trastorno. La determinación de dosificaciones eficaces en este caso se basa por lo general en ensayos clínicos en seres humanos y se aproxima determinando dosificaciones eficaces que reducen significativamente la aparición o incidencia del trastorno psiquiátrico en pacientes modelo y protocolos de administración.

50 La dosificación real variará según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto secundario tóxico o perjudicial del compuesto se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En determinadas realizaciones, el antagonista del receptor de neuroquinina 3 es (R)-N- {{3-[1-Benzoil-3-(3,4-diclorofenil) piperidin-3-il]prop-1-il}-4-fenilpiperidin-4-il}-N-metilacetamina, o una sal de la misma, y el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 25 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 10 y 40 mg por día.

- 5 En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 15 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 5 y 25 mg por día.

En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 35 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 25 y 45 mg por día.

- 10 En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 50 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 25 y 75 mg por día.

En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 75 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 25 y 125 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 50 y 100 mg por día.

- 15 En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 100 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 25 y 200 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 50 y 150 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 75 y 125 mg por día.

- 20 En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 150 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 25 y 250 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 50 y 250 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 100 y 200 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 125 y 175 mg por día.

- 25 En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano y una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 200 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 100 y 300 mg por día. En determinadas realizaciones, la dosis diaria está entre 150 y 250 mg por día.

Experimental

Tac2 está implicada en el aprendizaje del miedo

- Usando punciones de tejido de amígdala de ratones que habían sido sacrificados 30 minutos o 2 horas después del condicionamiento de miedo auditivo (FC) (CS, tono acústico; US, descargas eléctricas en las patas), se realizó una micromatriz de ARNm. Usando la agrupación jerárquica de enlace promedio, el mapa de calor de micromatrices muestra la regulación diferencial de genes a los 30 minutos y a las 2 horas después del aprendizaje del miedo, que es un período importante para la consolidación de los recuerdos del miedo, Figura 1A. El FDR se calculó con SAM 4.01 usando un criterio de corte estándar del 5%. El criterio de corte se estableció con un FDR al nivel de 1,3 veces para el grupo de acondicionamiento de miedo (FC) de 2 horas después, ya que con el corte de 1,5 veces más conservador usado en los 30 minutos después del grupo de FC, no se identificaron inicialmente genes. De los principales candidatos de esta micromatriz, se seleccionó Tac2 porque se expresa específicamente en gran medida en la amígdala y pertenece a una ruta "farmacológica" con agonistas y antagonistas disponibles que atraviesan la barrera hematoencefálica y se pueden usar sistémicamente. Se evaluó la comprensión y manipulación de la ruta Tac2. Estudios de replicación independientes con ratones condicionados por miedo adicional muestran que Tac2 se regula rápidamente al alza a los 30 minutos después de la FC, volviendo a los niveles basales a las 2 horas (ANOVA $F_{3,28} = 5,014$, $P \leq 0,01$, Post-hoc $*P \leq 0,05$ vs Jaula doméstica (HC) y 2 horas, la figura 1A). Además, en una replicación adicional, la regulación al alza del ARNm de Tac2 solo ocurrió cuando los estímulos condicionados e incondicionados están emparejados, pero no cuando no están emparejados, lo que sugiere que dentro de este paradigma, el aumento de la expresión de Tac2 es específico del aprendizaje asociativo del miedo con señales e independiente de estrés no específico y/o aprendizaje contextual (ANOVA $F_{2,36} = 3,93$, $P \leq 0,05$, Posthoc $*P \leq 0,05$ vs JD y no apareado, Figura 1B).

Tac2, NkB y Nk3R en la amígdala

- La hibridación radiactiva *in situ* indica que las áreas donde se expresa el gen Tac2 son bastante específicas y limitadas dentro del cerebro del ratón: núcleo del lecho de la estría terminal, hipotálamo, habénula, amígdala central (CeA), zona incerta y núcleo mamilar medial. Tac2 está altamente expresado en CeA dentro de la amígdala sin expresión en la amígdala basolateral (BLA) ni en la amígdala lateral (LA). La expresión más alta de Tac2 dentro de CeA ocurre en la subdivisión medial del núcleo amigdaloides central (CeM), mientras que la expresión más baja se observa en la amígdala centrolateral (CeL) y centro-central (CeC).

Recientemente, se ha prestado atención a poblaciones de células específicas dentro del núcleo central por funciones distintas en el aprendizaje del miedo. Por ejemplo, se ha sugerido que PKCd es parte de un microcircuito en el que las neuronas de la amígdala CeL inhiben la salida neuronal al CeM durante el estímulo condicionado, que impulsa la expresión del miedo, llamadas unidades CeL_{desactivadas}. Además, alrededor del 40% de las neuronas que expresan la proteína quinasa C Delta (PKCd) también expresan encefalina (Enk) en la CeL. Es de destacar que los niveles de ARNm de Enk aumentan después de FC en la CeL. Dado que otras poblaciones neuronales se han relacionado previamente con procesos de miedo en la CeA, se examinó si el ARNm de Tac2 se colocaliza con ellos, lo que sugiere interacciones funcionales. Usando la hibridación *in situ* de doble fluorescencia (FISH), se demostró que la expresión del gen Tac2 no se colocaliza en su mayoría con PKCd ni Enk y se expresa principalmente en el CeM. De este modo, dada la falta de colocalización y especificidad regional y funcional de estas poblaciones celulares, se identifica una población celular específica de subdivisión que puede estar implicada en la consolidación de la memoria del miedo. La colocalización de los niveles de ARNm de Tac2 y la isoforma de 65 kDa del péptido descarboxilasa del ácido glutámico (GAD-65) en el CeM pueden proporcionar una comprensión más profunda de las funciones del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el aprendizaje del miedo. CaMKII α , una población neuronal implicada en la plasticidad sináptica, también se colocaliza con el ARNm de Tac2 en el CeM. Curiosamente, GAD65 y CaMKII están asociados con la consolidación de recuerdos de miedo en la amígdala.

También se examinó la presencia del péptido NkB en el cultivo de células de amígdala, lo que demuestra que el péptido está muy presente tanto en el soma de las neuronas como en las dendritas. Además, el péptido NkB también se expresa en gran medida en la CeA. Curiosamente, NkB se regula al alza en la amígdala 2 horas después de FC (prueba t de Student, $t = -2,902$, $**P \leq 0,01$ Acondicionamiento del miedo frente a la jaula doméstica, Figura 2A). El osanetant antagonista de Nk3R ya se ha usado en seres humanos en ensayos clínicos para la esquizofrenia. En el cultivo de células de amígdala, osanetant inactiva el Nk3R y conduce a un aumento compensatorio en la expresión de Nk3R como lo sugieren los niveles de ARNm de Nk3R potenciados dependientes de la dosis (ANOVA, $F_{3,5} = 10,014$, $P \leq 0,05$; Post-hoc $*P \leq 0,05$ vs Veh, $**P \leq 0,01$ vs Veh, Figura 2B).

Osanetant y aprendizaje emocional

Los estudios anteriores indican que el osanetant se dirigirá al Nk3R en la amígdala *in vivo*. Osanetant administrado sistémicamente, 30 minutos antes de campo abierto, laberinto de más elevado y la cámara de acondicionamiento no provoca cambios en el comportamiento de ansiedad, actividad locomotora o reactividad a descargas eléctricas (Figura 7). En particular, cuando se dosifica osanetant desde 30 min antes de la FC auditiva hasta 1 hora después del entrenamiento, no afecta la adquisición del miedo, pero altera la consolidación de la memoria del miedo, como se muestra por la disminución de la congelación en la prueba de expresión del miedo (Figura 3A; prueba t de Student, 30 min. $t = 3,042$; 10 minutos después de FC, $t = 2,277$; 1 hora después de FC, $t = 2,872$; $*P \leq 0,05$ vs vehículo).

Recientemente, la ruta PACAP-PAC1R se ha asociado con el PTSD en seres humanos así como en modelos animales. (Véase Stevens et al., 2014). Estos informes indicaron que la expresión del gen ADCYAP1R1 (que codifica el receptor PAC1) aumenta después de FC. Osanetant administrado antes de FC también normaliza los niveles de ARNm de ADCYAP1R1 en la amígdala (ANOVA $F_{2,31} = 5,541$, $P \leq 0,01$; Post-hoc $*P \leq 0,05$ vs Veh-FC; $**P \leq 0,01$ vs Veh-FC, Figura 3B). Estos datos sugieren que la inhibición de la ruta Tac2/NKB/Nk3R puede prevenir la activación de una ruta genética relacionada con el estrés previamente asociada con el PTSD. Concordantemente, la infusión bilateral de osanetant en la CeA también altera la consolidación de la memoria del miedo, lo que sugiere que se requieren CeA-NK3R para la formación de recuerdos emocionales (prueba t de Student; $t = 2,268$, $*P \leq 0,05$ vs vehículo, Figura 3C).

Los ratones expuestos durante 2 horas a un factor estresante severo por única vez, inmovilización sobre una tabla de madera (IMO), presentan síntomas similares al PTSD a largo plazo: deterioro de la extinción del miedo y memoria espacial, y comportamientos similares a la ansiedad potenciados. Además, la IMO en ratas provoca alteraciones del eje hipotálamico-pituitario-adrenal (HPA) que puede ser similar al proceso que inicia el PTSD en seres humanos. En particular, los niveles de ARNm de Tac2 se regularon al alza de manera más sólida en los ratones tratados con IMO que en los ratones ingenuos después de FC, de acuerdo con el procesamiento potenciado del miedo dependiente de Tac2 (ANOVA $F_{3,53} = 6,242$, $P \leq 0,001$, Post-hoc $*P \leq 0,05$ vs HC, $**P \leq 0,01$ vs IMO, Figura 3D). Además, osanetant administrado sistémicamente después de FC afectó la consolidación de la memoria en ratones tratados con IMO, como se muestra por la disminución de la congelación en la prueba de expresión de miedo (ANOVA medidas repetidas $F_{1,13} = 6,072$, $*P \leq 0,05$, Figura 3F). Esto sugiere que el antagonismo de Nk3R reduce la consolidación de la memoria de miedo potenciada en un modelo similar al PTSD.

Sobreexpresión de tac2 y bloqueo por osanetant

Se desarrolló un vector viral para sobreexpresar el gen Tac2 de una manera inducible dentro del cerebro, el lentivirus-Tac2 (LV-Tac2). Su expresión funcional se probó infectando células HEK 293 con LV-Tac2 en comparación con lentivirus LV-GFP de control, lo que demuestra que el péptido NkB se expresaba de manera

robusta. Se examinaron los efectos conductuales de la sobreexpresión de Tac2 en ratones. LV-Tac2 o LVGFP se infundieron bilateralmente en la CeA y 14 días después se encontró que Tac2 estaba sobreexpresado en un 42%, según lo determinado por los niveles de ARNm con hibridación *in situ*, en comparación con los ratones que habían recibido LV-GFP (prueba t de Student; $t = -3841$, $***P \leq 0,001$ frente a LV-GFP, Figura 4A). Los ratones infectados con LVTac2 o LVGFP recibieron osanetant sistémico o vehículo inmediatamente después de FC, y luego se probó la expresión de miedo 24 horas después. La sobreexpresión específica de CeA-Tac2 provocó una mejora significativa de la consolidación de la memoria del miedo. Curiosamente, la sobreexpresión de Tac2 en la CeA no indujo cambios en el comportamiento similar a la ansiedad ni en la adquisición del miedo. Replicando nuestros hallazgos anteriores, el osanetant afectó la consolidación de la memoria del miedo cuando se administró a ratones con el control LV-GFP (Post-hoc, $*P \leq 0,05$ vs LV-GFP-Veh, Figura 4D). Además, la consolidación de la memoria de miedo potenciada causada por la sobreexpresión de CeA-Tac2 fue revertida por osanetant (Post-hoc, $**P \leq 0,01$ vs LV-Tac2-Osa y LV-GFP-Osa Figura 4D).

Silenciamiento de células que expresan Tac2 y aprendizaje emocional

Para comprender mejor el papel del gen Tac2, la actividad de las neuronas que expresan este gen en la CeA se silenció temporalmente durante el aprendizaje del miedo usando receptores de diseño activados exclusivamente por tecnología de fármacos de diseño (DREADD). Los ratones B6.129-Tac2tm1.1 (cre) Qima/J (Tac2-cre) (Mar et al., Mol. Brain, 2012, 5, 3) se infectaron con un receptor acoplado a Gi DREADD a través del virus pAAV-hSyn-doble floxed hM4D-mCherry (hM4Di-mCherry AAV). Esto provocó la expresión específica del reportero mCherry en las células Tac2 dentro de la CeA, pero no en ninguna otra área del cerebro, lo que sugiere la inserción del receptor DREADD en la membrana plasmática. 14 días después, se administró clozapina-N-óxido (CNO), que se une al receptor insertado pero por lo demás es farmacológicamente inerte, 30 minutos antes de la FC sistémicamente en ambos grupos, Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry y Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry. CNO no tuvo ningún efecto sobre la adquisición del miedo como lo muestra la cantidad equivalente de congelación en ambos grupos (Figura 6). Sin embargo, cuando se evaluó la expresión del miedo en los animales, 24 horas después en ausencia de CNO, los ratones Tac2-Cre +/hM4Di-mCherry presentaron menos congelación, lo que sugiere una consolidación de la memoria del miedo deteriorada (prueba t de Student, $t = 3,257$, $**P \leq 0,01$ Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry frente a Tac2- Cre+/hM4Di-mCherry, Figura 6). Esto indica que los animales que expresan Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry y Gi inducible para silenciar temporalmente la actividad de las neuronas que expresan Tac2 exhiben significativamente menos consolidación del miedo cuando se prueban para el aprendizaje del miedo. A continuación, los ratones se volvieron a entrenar con un CS diferente y un contexto diferente en el mismo aparato de FC, como en experimentos anteriores pero sin dosificar CNO. Los ratones Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry y Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry mostraron una cantidad similar de congelación en la prueba de expresión de miedo y FC. Esto sugiere que cuando las neuronas que expresan Tac2 no se silencian, existe una consolidación normal de la memoria del miedo en los grupos Tac2-Cre-/hM4Di-mCherry y Tac2-Cre+/hM4Di-mCherry. Además, cuando se les administró CNO, estos dos grupos presentaron niveles equivalentes de comportamiento similar a la ansiedad y sensibilidad al dolor.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor de neuroquinina 3 que es (R)-N-{{3-[1-Benzoil-3-(3,4-diclorofenil) piperidin-3-il]prop-1-il}-4-fenilpiperidin- 4-il}-N-metilacetamina o una sal de la misma, para su uso en el tratamiento o la prevención del trastorno de estrés postraumático en un sujeto humano, en el que el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra dentro de las tres horas de experimentar un evento traumático.
2. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 1, en el que una cantidad eficaz es una dosis diaria de aproximadamente 25 mg por día.
3. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 2, en el que la dosis diaria está entre 10 y 40 mg por día.
4. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en combinación con un segundo agente activo, tal como un antidepresivo.
5. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 4, en el que el agente es sertralina, paroxetina, fluoxetina, citalopram, baclofeno, modafinilo, eszopiclona, hidrocloridona, vareniclina, dexametasona o combinaciones de los mismos.
6. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra dentro de una hora después de experimentar un evento traumático.
7. El antagonista del receptor de neuroquinina 3, para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor de neuroquinina 3 se administra en el momento o dentro de una hora de psicoterapia, terapia cognitiva conductual, terapia de exposición, reestructuración cognitiva o entrenamiento de inoculación de estrés.

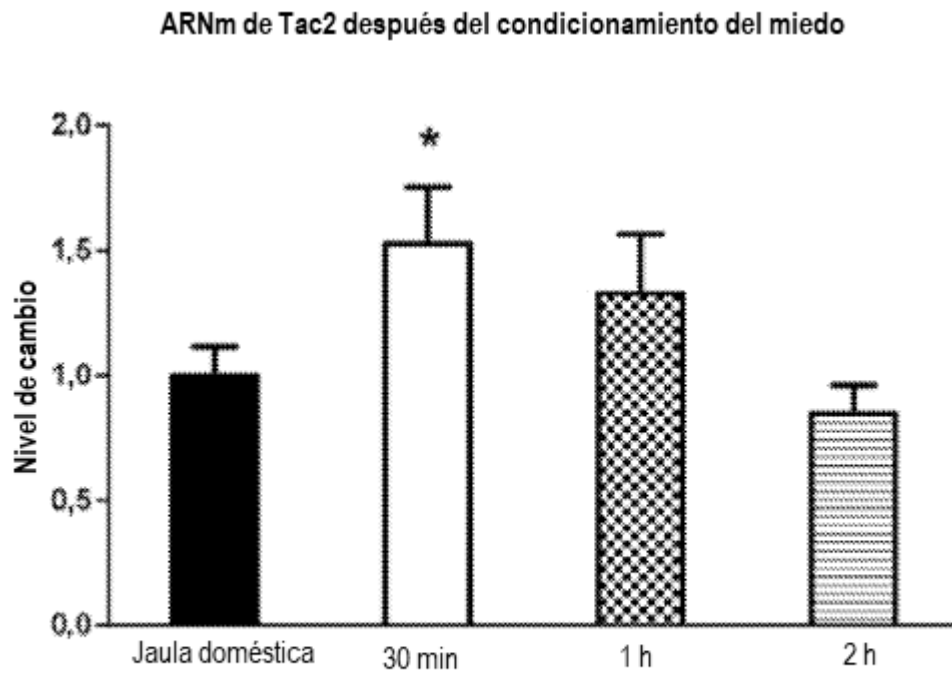


FIG. 1A

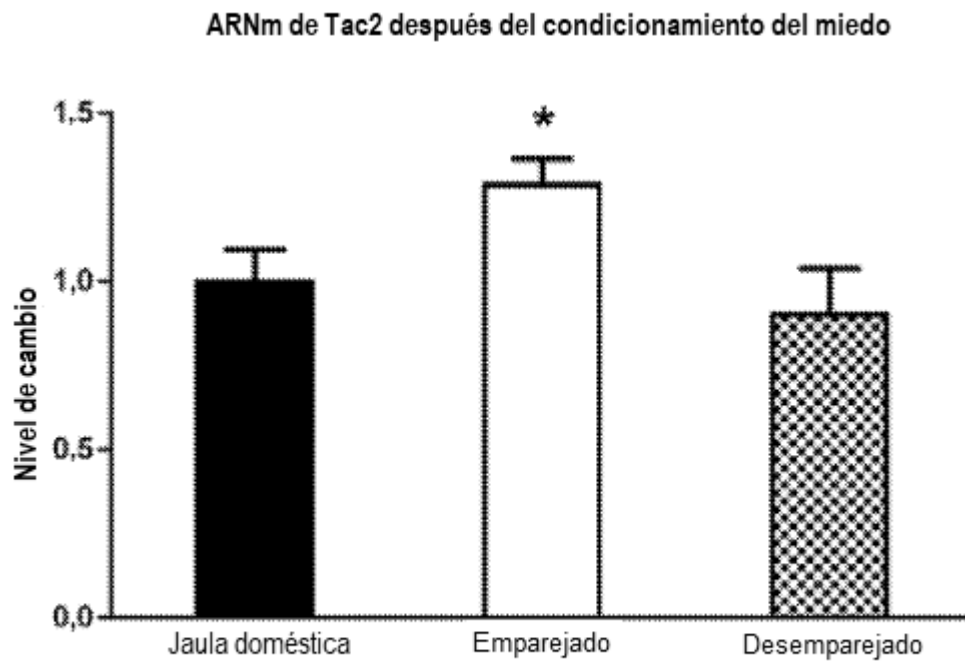


FIG. 1B

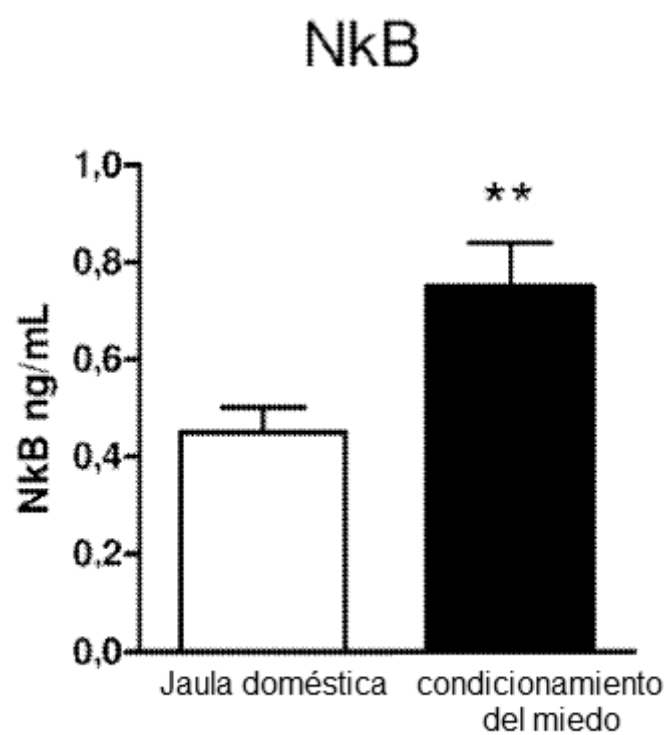


FIG. 2A

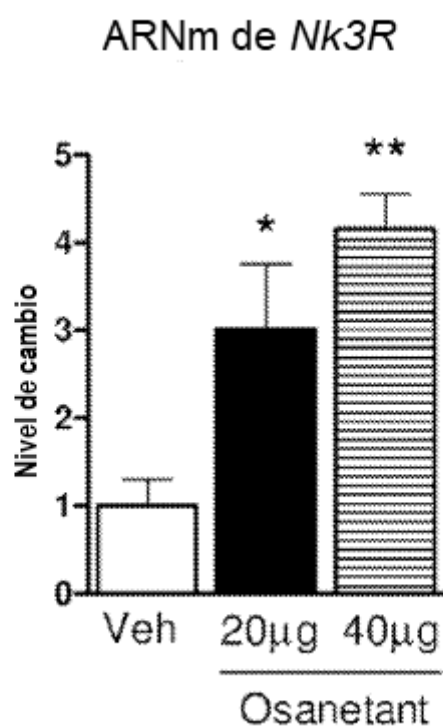


FIG. 2B

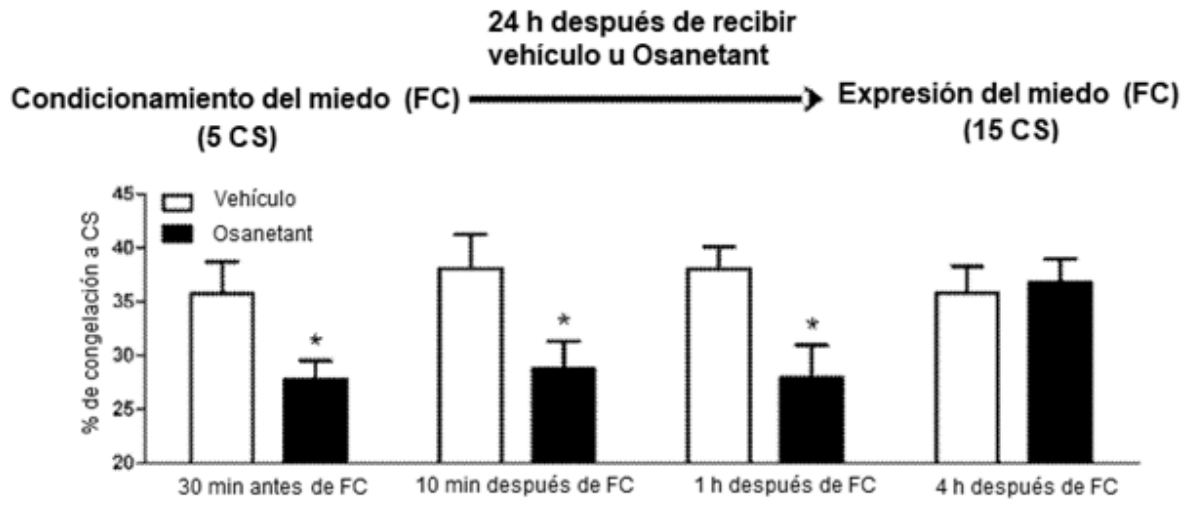


FIG. 3A

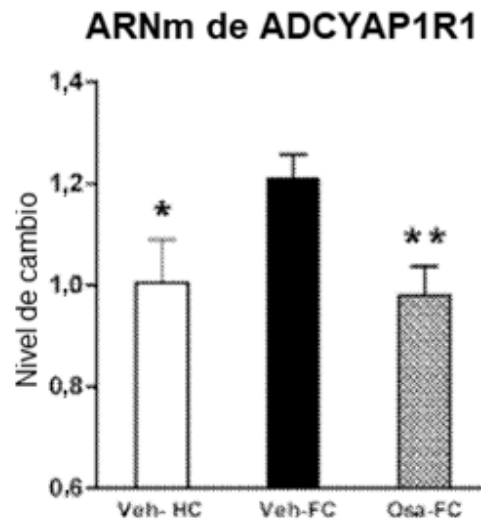


FIG. 3B

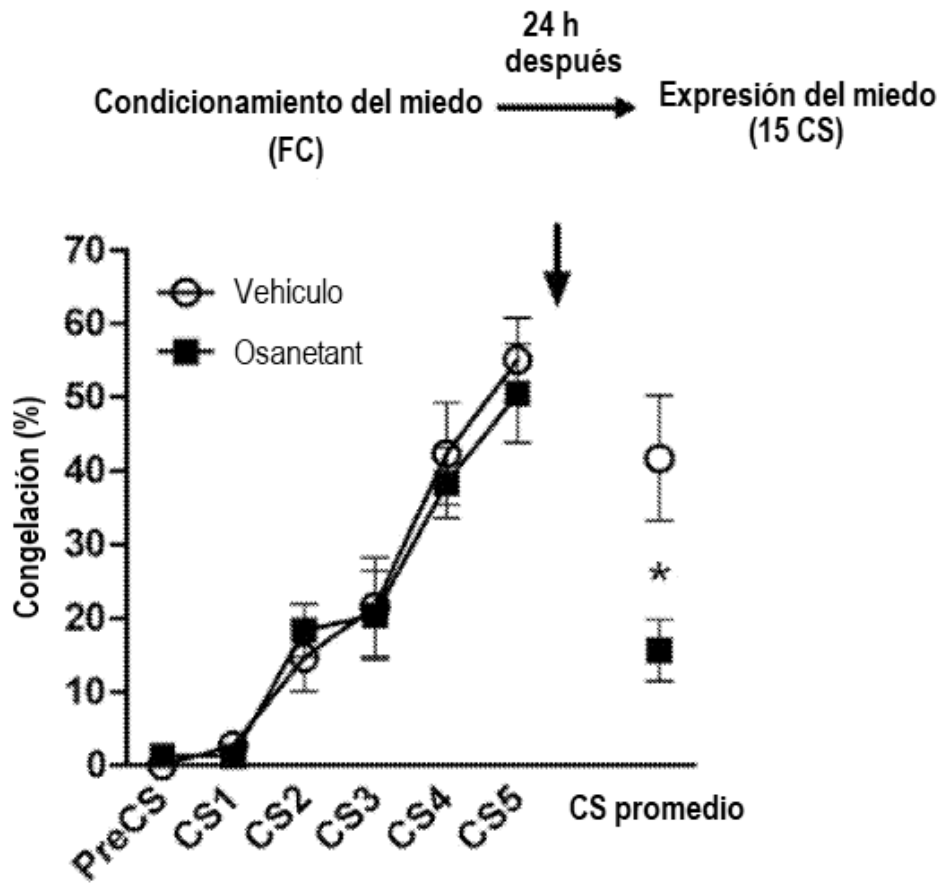


FIG. 3C

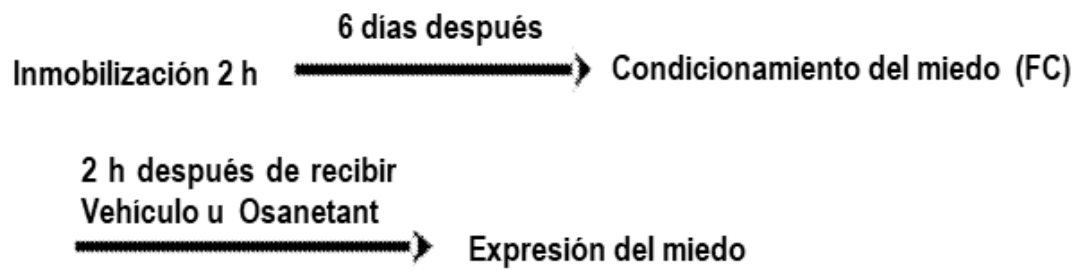


FIG. 3D

ARNm de *Tac2* después del condicionamiento del miedo

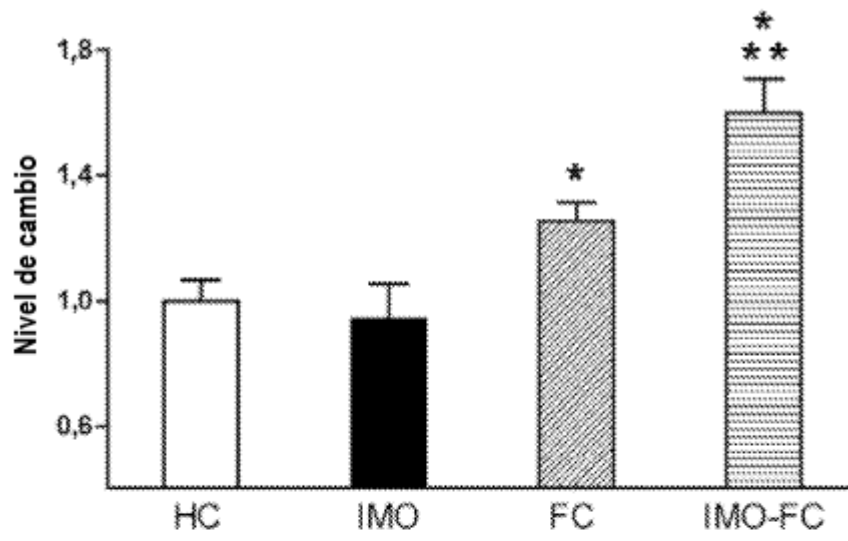


FIG. 3E

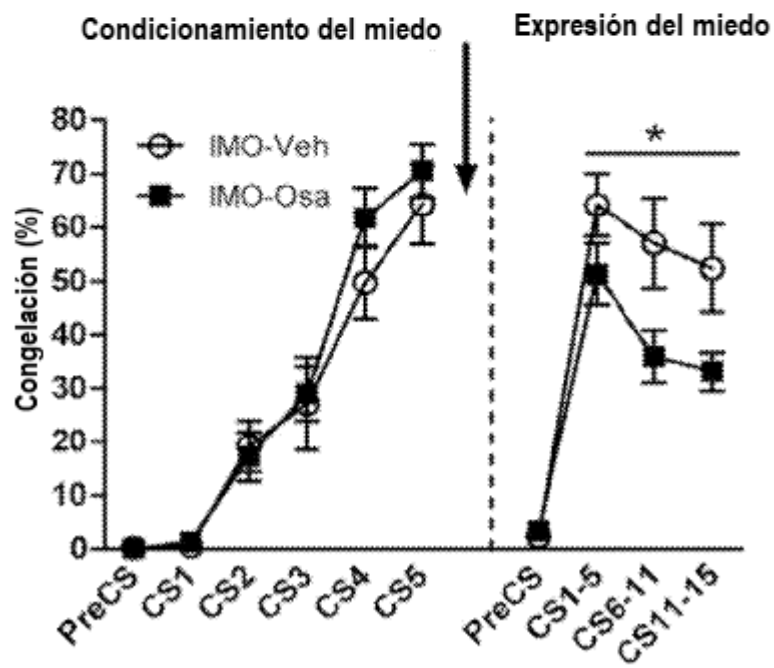


FIG. 3F

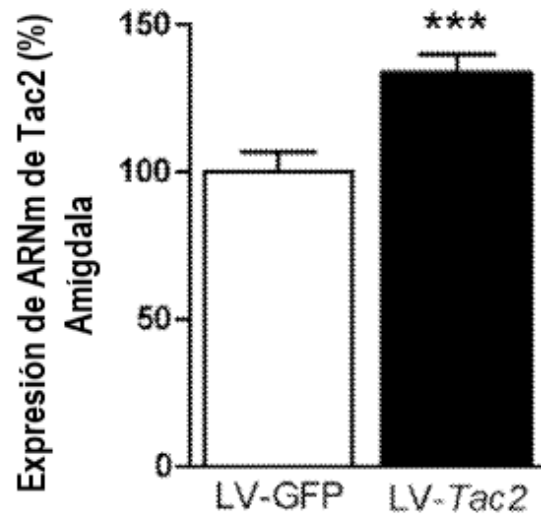


FIG. 4A

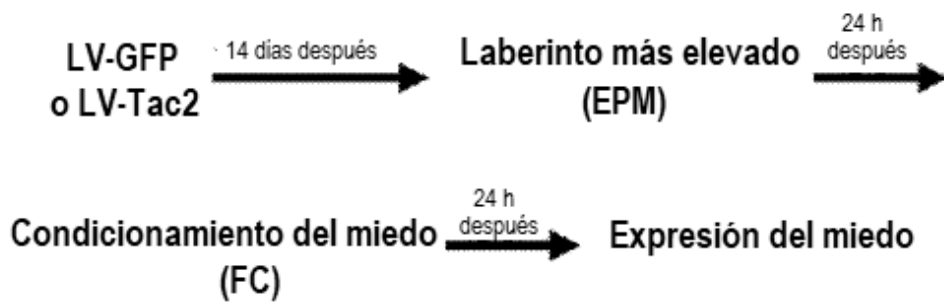


FIG. 4B

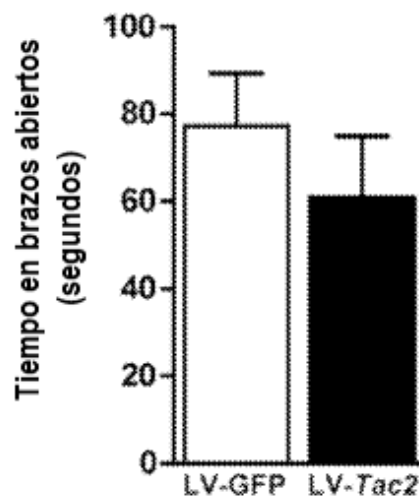


FIG. 4C

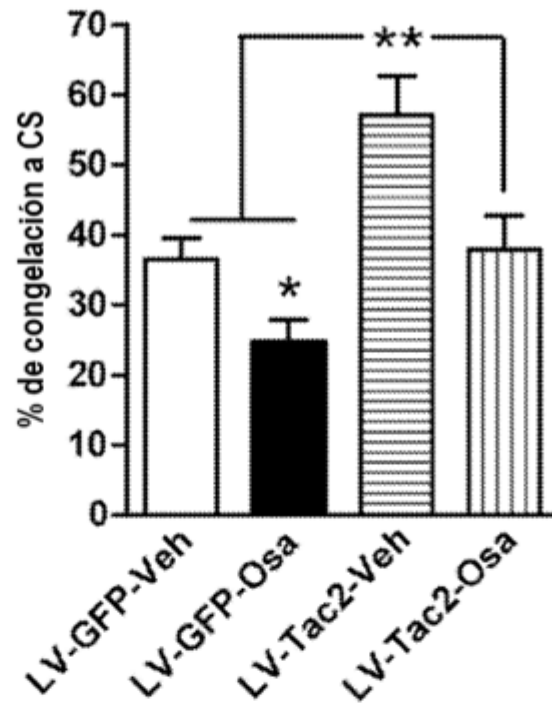


FIG. 4D

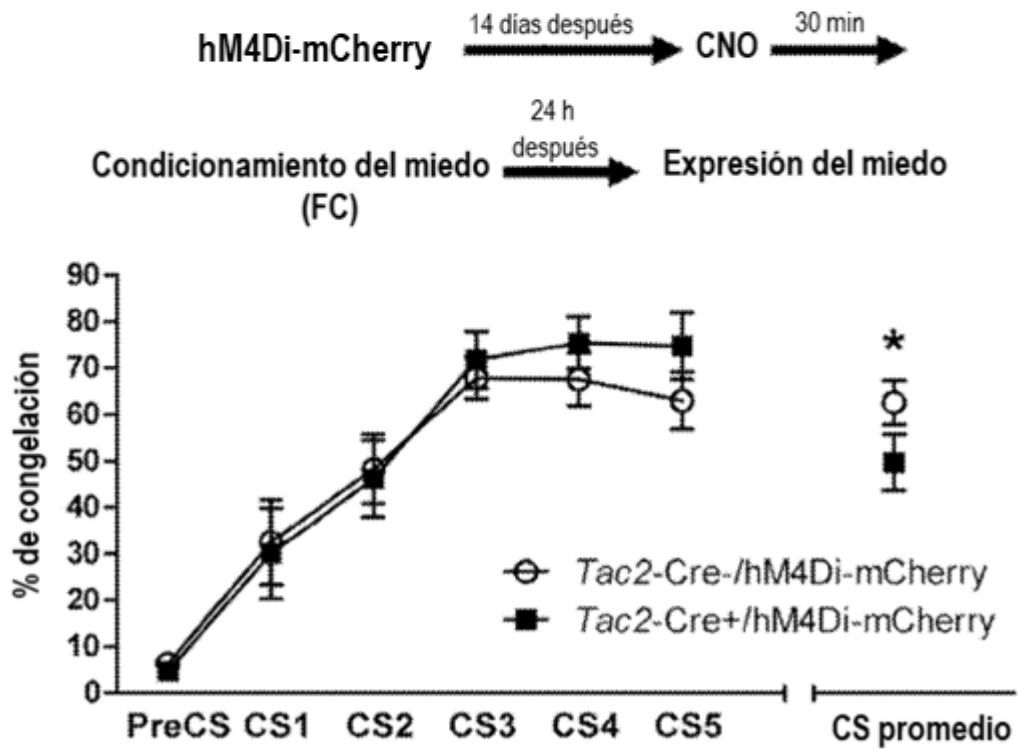


FIG. 5

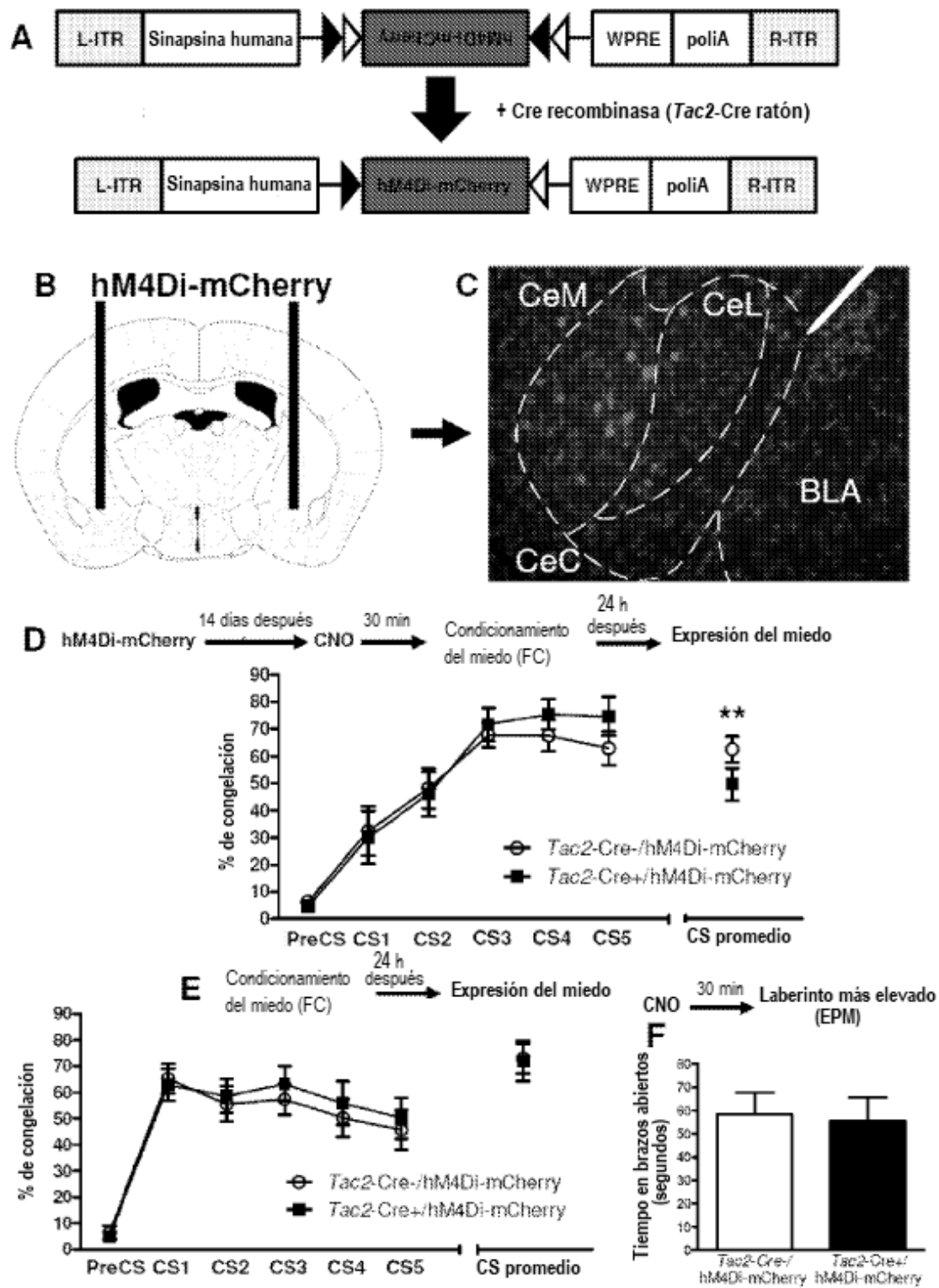
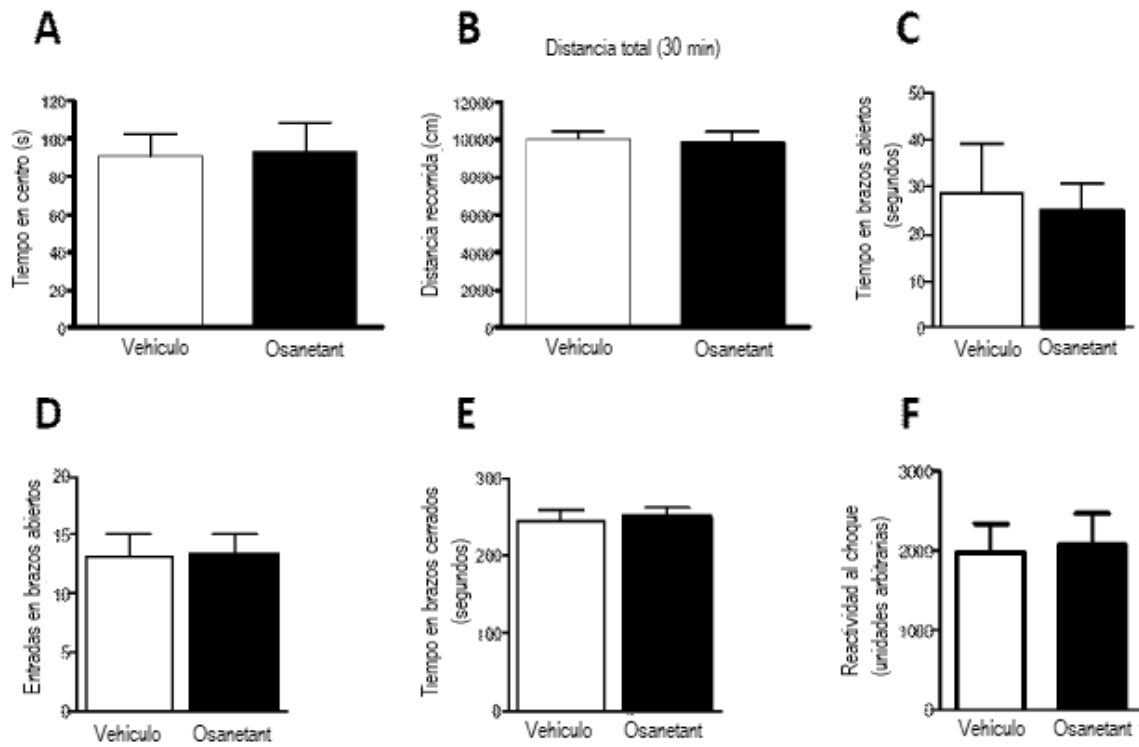


FIG. 6



Osanetant o
Vehículo (30 minutos antes)

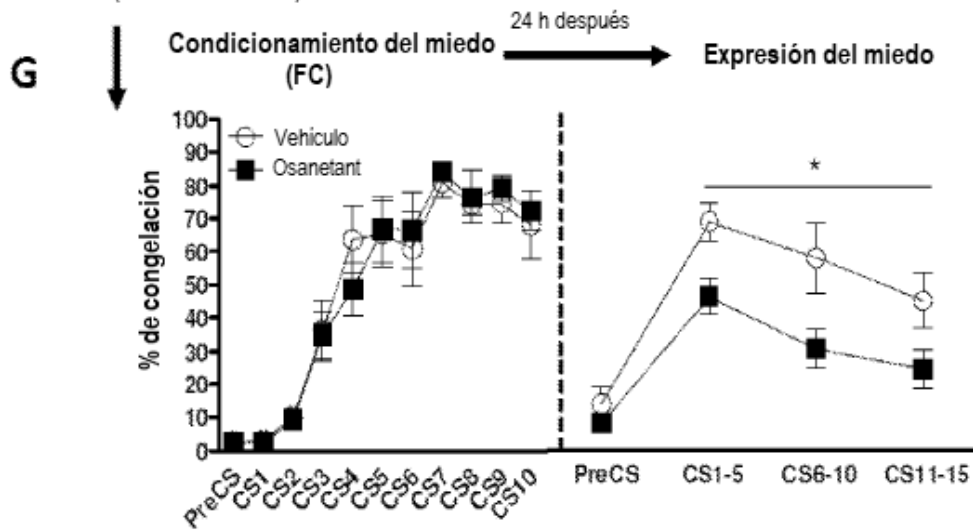


FIG. 7