

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-053154- -00008-0000

Fecha: 2012-10-08 16:14:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 14

Re: PI.-F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.-Solicitud de Patente de Invención en
Fase Nacional PCT para "DERIVADOS DE HETEROARIL-
PIRROLIDINIL- Y -PIPERIDINIL-CETONA".-Clase C07D 205/04.-
Expediente número 09-053.154-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 18 de Julio de 2012.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio **No. 12598**, con respecto a la Concisión y Sustento en la descripción del capítulo reivindicatorio, así como también con la Unidad de Invención y el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **CONCISIÓN Y SOPORTE EN LA DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Tomando en consideración los diferentes señalamientos realizados por el señor Examinador en su oficio antes referenciado con respecto al sustento en la descripción y concisión del capítulo reivindicatorio presentado para la solicitud, para comenzar me permito manifestar que es deseo del solicitante modificar el capítulo reivindicatorio actualmente en estudio con el propósito de definir de manera más adecuada el objeto de la presente invención e identificar con mayor claridad sus características técnicas novedosas e inventivas.

Respecto a estas modificaciones, me permito resaltar que no implican de ninguna manera una ampliación al alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está restringiendo significativamente el alcance de la

solicitud de conformidad con las realizaciones preferidas de la invención, como se presenta a continuación:

Reivindicación 1: Corresponde a la reivindicación 1 actualmente presentada en donde los significados de los sustituyentes de la formula 1 han sido considerablemente restringidos como se resumen a continuación:

- m ha sido limitado a 1, incorporando así a esta reivindicación la realización particular de la reivindicación 6 actualmente presentada.

- n ha sido limitado a 1, incluyendo así a esta reivindicación la realización particular de la reivindicación 7 actualmente presentada.

- Ar ha sido limitado a fenilo. Sustento para esta selección se encuentra en las líneas 5 a 13 de la página 33 del texto de la memoria descriptiva actualmente presentada para la solicitud.

Adicionalmente, a fin de restringir aun más la materia reclamada, los posibles sustituyentes del fenilo representado por Ar han sido restringidos a aquellos mostrados desde la línea 5 de la página 33 hasta la línea 7 de la página 34.

- R^1 ha sido restringido a los significados mas preferidos de los allí mostrados.

- R^2 ha sido restringido a hidrógeno, incorporando así a esta reivindicación la realización particular de la reivindicación 15 actualmente presentada.

- R^a y R^b han sido restringidos a hidrógeno, incluyendo así a esta reivindicación la realización particular de la reivindicación 16 actualmente presentada.

- En vista de las modificaciones anteriores se ha eliminado la condición final que incluía la reivindicación 1 actualmente presentada toda vez que ya no se hace necesaria.

Reivindicación 2: Corresponde a la reivindicación 12 actualmente presentada, la cual no ha sido modificada.

Reivindicación 3: Corresponde a la reivindicación 13 actualmente presentada, la cual no ha sido modificada.

Reivindicación 4: Corresponde a la reivindicación 14 actualmente presentada, la cual no ha sido modificada.

Reivindicación 5: Esta nueva reivindicación reclama una realización particular revelada en las líneas 24 a 26 de la página 43 del texto de la descripción actualmente presentado para la solicitud.

Reivindicación 6: Esta nueva reivindicación reclama los compuestos que conforman las realizaciones más preferidas de la invención, los cuales encuentran su sustento en las páginas 70 a 127 de la descripción actualmente presentada, y adicionalmente en las páginas 128 a 226 en donde se muestran los métodos de síntesis de los mismos.

Reivindicación 7: Corresponde a la reivindicación 21 actualmente presentada, la cual no ha sido modificada.

Reivindicación 8: Corresponde a una nueva reivindicación que reclama una realización preferida de la invención que encuentra sustento por ejemplo en las páginas 22 y 23.

Finalmente, las reivindicaciones 2 a 5, 8 a 11, 17, 18, 19 y 20 han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio ahora modificado.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por **8 reivindicaciones** que se refieren de manera clara y concisa a las realizaciones preferidas de los compuestos objeto de la presente invención, así como también a la composición farmacéutica que los contiene.

Ahora bien, en relación al señalamiento realizado por el señor Examinador en su Concepto Técnico antes referenciado en cuanto a que las reivindicaciones 1 a 21 actualmente presentadas no estaría debidamente sustentadas en la descripción porque las definiciones de las variables de la formula (I) generarían compuestos que no están ejemplificados en la descripción de la solicitud, me permito manifestar que tal objeción queda completamente superada toda vez que a través de la modificación ahora realizada al capítulo reivindicatorio las variables de la formula (I) han sido significativamente limitadas para reclamar los compuestos que conforman las realizaciones mas preferidas de la invención y los cuales se encuentran perfectamente sustentados por los ejemplos de las páginas 70 a 127 de la descripción actualmente presentada, y adicionalmente en las páginas 128 a 226 en donde se muestran los métodos de síntesis de los mismos.

Del mismo modo, con relación a la objeción presentada por el señor Examinador en cuanto a la falta de concisión de las reivindicaciones 1 a 21 actualmente presentadas debido a que los términos como alquilo, haloalquilo, haloalcoxi, entre otros, se referirían a géneros funcionales, me permito manifestar que esta objeción también queda superada toda vez que en vista de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, como se expusieron anteriormente, los compuestos ahora reclamados por la presente solicitud son aquellos que conforman las realizaciones mas preferidas de la invención que se encuentran completamente ejemplificados en las páginas 70 a 127 de la descripción actualmente presentada y cuya síntesis se muestra en las páginas 128 a 226 de dicha memoria descriptiva.

Consecuentemente, me permito señalar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el Artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

4. **UNIDAD DE INVENCION**

A este respecto el señor Examinador señala que la presente solicitud no gozaría de unidad de invención toda vez el capítulo reivindicatorio actualmente presentado tendría 5 grupos inventivos que se diferencian por el numero de átomos de anillo del heterocíclico presente en el grupo central de los compuestos.

En respuesta a este señalamiento me permito manifestar que en virtud de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, tal como se expusieron anteriormente, la presente solicitud ahora reclama solo un grupo inventivo toda vez que todos los compuestos reclamados en el capítulo reivindicatorio ahora modificado tienen el mismo número de átomos de anillo en el heterociclo presente en el grupo central de los compuestos, de manera aún más particular todos los compuestos ahora reclamados tienen el heterociclo **pirrolidina** en el grupo central de los compuestos reclamados. En otras palabras, la solicitud ha sido restringida a las realizaciones particulares abarcadas por el segundo grupo inventivo señalado por el señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio **No. 12598**.

En consecuencia, la presente solicitud se relaciona a un único concepto inventivo y por lo tanto goza de unidad de invención cumpliendo así con las disposiciones legales del Artículo 25 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. NIVEL INVENTIVO

Finalmente el señor Examinador señala que para el primer grupo inventivo de la reivindicación 1, el cual consiste en compuestos derivados de 1-aril-4-(4-(sustituido))piperidinil-il)metadona, carecería de altura inventiva a la luz de las enseñanzas de los documentos **Rhoden J. B. et. al**, "**Structure-activity studies of 3'-4'-dichloro-meperidine analogues at dopamine and serotonin transporters**", **Bioorganic & Medical Chemistry**, 2005, Vol 13, pp. 5623-5634 (D1) and **Lomenzo M. A. et. al**, "**Synthesis and Biologicals Evaluation of Meperidine Analogues at Monoamine Transporters**", **Journal of Medical Chemistry**, 2005, Vol. 48, pp. 1336-1343 (D2).

En este sentido, me permito dirigir la atención de ese Despacho al hecho que **el señor Examinador en su Concepto Técnico antes mencionado objeta el nivel inventivo del primer grupo inventivo mencionado en dicho Concepto Técnico, es decir** compuestos derivados de 1-aril-4-(4-(sustituido))piperidinil-il)metadona. Esto salta de la vista de dicho Concepto Técnico cuando:

- El señor Examinador señala que "*La reivindicación 1 para el primer grupo inventivo consiste en 1-aril-4-(4-(sustituido))piperidinil-il)metadona.*".

- También en su cuadro comparativo de las características esenciales de la solicitud y los documentos del estado de la técnica mas cercados a la invención, en este sentido es evidente que el señor Examinador analiza los compuestos comprendidos para el primer grupo inventivo señalado por el señor Examinador para la reivindicación 1 actualmente presentada para la solicitud.

- Cuando señala que "*Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 para el primer grupo inventivo porque divulgan compuestos derivados 1-aril-4-(4-(sustituido))piperidinil-il)metadona como inhibidores de la reabsorción de monoaminas endogénicas.*"

Y consecuentemente en el resto del análisis de nivel inventivo realizado por el señor Examinador.

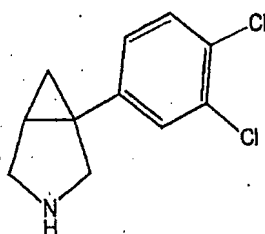
Así las cosas, en vista que los compuestos abarcados por el primer grupo inventivo señalado por el señor Examinador han sido eliminados del capítulo reivindicatorio modificado que se adjunta al presente memorial, me permito manifestar que quedan totalmente superadas las objeciones de

nivel inventivo que en este sentido fueron presentadas por el señor Examinador.

6. **CONSIDERACIONES ADICIONALES**

No obstante lo anterior, en gracia de discusión, a continuación me permito exponer argumentos que ponen de manifiesto el nivel inventivo que conlleva la materia ahora reclamada por el capítulo reivindicatorio modificado, como se expuso anteriormente, frente al documento de Skolnick P. et al., "*Antidepressant-like actions of DOV 21,947: a "triple" reuptake inhibitor*", **European Journal of Pharmacology, 2003, Vol. 461, pp. 99-104**, que es el documento del estado del arte que más cercano a la invención de acuerdo al International Preliminary Report on Patentability realizado a la correspondiente solicitud internacional de la presente solicitud, y el documento Rhoden J. B. et. al, "*Structure-activity studies of 3'-4'-dichloro-meperidine analogues at dopamine and serotonin transporters*", **Bioorganic & Medical Chemistry, 2005, Vol 13, pp. 5623-5634 (D1)**.

En este sentido, el documento de Skolnick et al. se refiere al inhibidor de la triple recaptación 1-(3,4-diclorofenil)-3-aza-biciclo[3.1.0]hexano que se muestra a continuación:



En contraste, los compuestos ahora reclamados por la presente solicitud difieren de los compuestos revelados en el documento de Skolnick et al. en i) R¹ y la resultante ausencia del anillo de ciclopropano fusionado y ii) el enlazante carbonilo.

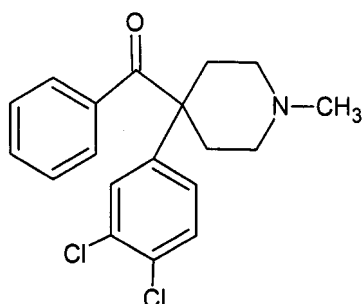
Por otro lado, me permito señalar que el problema técnico a ser resuelto por la presente invención es proporcionar compuestos alternativos que actúen como inhibidores de la triple recaptación, por ejemplo que actúen siendo simultáneamente activos en los transportadores de serotonina, norepinefrina y dopamina.

En este sentido, la presente invención resuelve dicho problema proporcionando compuestos que inhiben la triple recaptación (véase la tabla 1 de las páginas 70 - 127 de la memoria descriptiva de la solicitud).

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

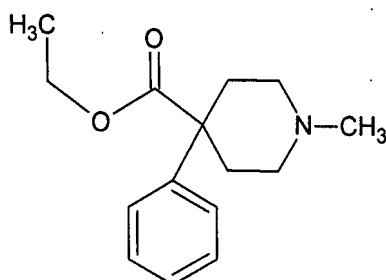
Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Ahora bien, el documento de Rhoden et al. (D1) revela el compuesto [4-(3,4-dicloro-fenil)-1-metil-piperidin-4-il] fenil-metanona (Ejemplo 12, pag. 5625) y su sal clorhidrato (pag. 5632).



Dicho documento D1 muestra estudios de actividad-estructura de análogos de 3'-4' dicloro-meperidina en transportadores de dopamina y serotonina. En este sentido D1 describe que esos análogos son generalmente más selectivos por el SERT que por el DAT (véase el abstract de D1).

Adicionalmente, D1 señala que la meperidina tiene la estructura química que se muestra a continuación y revela que se encontró que es selectiva por el transportador de serotonina sobre el transportador de dopamina (véase la introducción de D1):



De manera particular, el documento D1 describe que esos análogos son generalmente más selectivos por el SERT que por el DAT (véase el Abstract de D1) y en consecuencia D1 concluye, en contraste con la presente solicitud, que los compuestos revelados son útiles como inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) (véase la página 5626 de D1 en las últimas líneas de la columna derecha).

Así las cosas es evidente que el documento D1 no se dirige a compuestos que actúen sobre todos los tres transportadores.

Adicionalmente, los compuestos de la presente solicitud se diferencian de los compuestos revelados en D1 en que R¹ no puede ser arilo.

En vista de lo anterior es evidente que la persona versada en la materia que estuviera enfrentada al problema técnico objetivo identificado por la presente solicitud no encontraría en el documento de Skolnick et al. ninguna enseñanza que lo hubiera motivado a modificar o adaptar los compuestos de Skolnick et al. con las enseñanzas de D1 de tal manera que llegara a los compuestos de la presente solicitud.

A este respecto me permito señalar que en la evaluación de nivel inventivo de una solicitud el punto no es si la persona medianamente versada en la materia podría llegar a la materia de la solicitud en estudio por adaptación o modificación de las enseñanzas de dos documentos, para el presente caso los documentos de Skolnick et al. y D1; sino si dicha persona hubiera tenido una motivación a partir de las enseñanzas de tales documentos para hacer las adaptaciones o modificaciones en los compuestos allí revelados para obtener otros (los de la presente invención) con la esperanza de resolver el problema técnico objetivo o la expectativa de alguna mejora o ventaja técnica.

En consecuencia, salta a la vista que la materia reclamada por la presente solicitud goza de nivel inventivo frente a las enseñanzas de Skolnick et al. y D1 toda vez que a partir de las enseñanzas de estos documentos la persona versada en la materia no hubiera tenido una motivación para hacer las modificaciones necesarias a los compuestos de Skolnick et al. para obtener así los compuestos de la presente solicitud con base en las enseñanzas de los de D1 y que a partir de las enseñanzas de tales documentos dicha persona tuviera una expectativa de resolver con tales compuestos obtenidos el problema técnico objetivo.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1 a 8 del capítulo reivindicatorio modificado que se adjunta al presente memorial goza de nivel inventivo frente a las enseñanzas de Skolnick et al. y D1.

7. Anexo me permito presentar:

- i) Copia de las páginas **243 a 248** que corresponden al capítulo reivindicatorio modificado, tal como se discutió en el presente memorial, constituido por **8 reivindicaciones**;
- ii) Copia del documento de Skolnick P. et al., "*Antidepressant-like actions of DOV 21,947: a "triple" reuptake inhibitor*", European Journal of Pharmacology, 2003, Vol. 461, pp. 99-104.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

8. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte identificada (o) con: CC 39.690.713 y tarjeta profesional de abogado No. 53715 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 36)

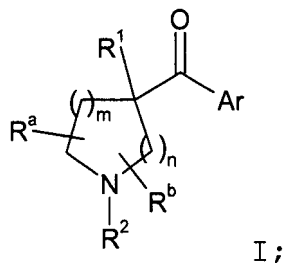
Bogotá D.C. 18 SET 2012

Alicia Lloreda Ricaurte
CFORM No 39.690.713 de Usaquén

Jenny Nataly
Monica Beltrán
C.C. 1.015.393.013
V.B.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en la que:

m es 1;

n es 1;

Ar es fenilo opcionalmente sustituido;

10 dichos sustituyentes opcionales puede comprender uno, dos o
tres grupos cada uno independientemente seleccionado de:

halógeno;

alquilo C₁₋₆;

halo-alquilo C₁₋₆;

15 halo-alcoxi C₁₋₆;

alcoxi C₁₋₆;

hidroxi;

hetero-alquilo C₁₋₆ elegido entre:

hidroxi-alquilo C₁₋₆;

20 (alquil C₁₋₆)-sulfonil-alquilo C₁₋₆; y

alcoxi C₁₋₆-alquilo C₁₋₆;

ciano;

nitro;

amino;

25 N-(alquil C₁₋₆)-amino;

N,N-di(alquil C₁₋₆)-amino; o

(alquil C₁₋₆)-sulfonilo; o

-C(O)R^c, en el que R^c es:

- alquilo C₁₋₆;
amino;
(alquil C₁₋₆)-amino; o
N,N-di(alquil C₁₋₆)-amino
- 5 R¹ es:
- alquilo C₁₋₆;
alquenilo C₂₋₆;
alquinilo C₂₋₆;
hetero-alquilo C₁₋₆;
- 10 halo-alquilo C₁₋₆;
halo-alquenilo C₂₋₆;
cicloalquilo C₃₋₇;
(cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₆;
(alquil C₁₋₆)-(cicloalquil C₃₋₆)-alquilo C₁₋₆;
- 15 alcoxi C₁₋₆;
alquilsulfonilo C₁₋₆;
alquilsulfanilo C₁₋₆;
heteroarilo;
heterociclil-alquilo C₁₋₆;
- 20 aril-alquilo C₁₋₃;
heteroaril-alquilo C₁₋₃;
ariloxi;
aril-alcoxi C₁₋₆;
heteroariloxi; o
- 25 heteroaril-alcoxi C₁₋₆;

R² es:

hidrógeno;

R^a y R^b con independencia entre sí son hidrógeno.

- 30 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es:
- alquilo C₃₋₆;
aril-alquilo C₁₋₆;

(cicloalquil C₃₋₆)-alquilo C₁₋₆;
hetero-alquilo C₁₋₆;
halo-alquilo C₁₋₆; o
(alquil C₁₋₆)-(cicloalquil C₁₋₃)-alquilo C₁₋₆.

5

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es
alquilo C₃₋₆;

(cicloalquil C₃₋₆)-alquilo C₁₋₆; o
(alquil C₁₋₆)-(cicloalquil C₁₋₃)-alquilo C₁₋₆.

10

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es
alquilo C₃₋₆.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Ar es
15 3,4-dicloro-fenilo.

6. Un compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del
grupo conformado por las sales de clorhidrato de:

(3-bencil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;

20 fenil-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(4-metoxi-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(4-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(3,4-dicloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(3-clorofenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

25 (3,4-dicloro-fenil)-(3-etoximetil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(4-cloro-3-metoxi-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

N-[2-cloro-4-(3-propil-pirrolidina-3-carbonil)-fenil]-acetamida;

(3-cloro-4-metoxi-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(3,4-dicloro-fenil)-((S)-3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

30 (3,4- dicloro-fenil)-((R)-3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(4-cloro-3-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

(3-cloro-4-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;

- (3,5-dicloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3,4-difluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3,4-dicloro-fenil)-(3-isopropoximetil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-butil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
 5 (4-cloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-cloro-4-metil-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (4-cloro-3-metil-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-propil-pirrolidin-3-il)-(4-trifluormetoxi-fenil)-metanona;
 (4-cloro-3-trifluormetil-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 10 (3-propil-pirrolidin-3-il)-(3,4,5-trifluor-fenil)-metanona;
 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (4-bromo-3-cloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (4-cloro-3-isopropoxi-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 [3-(2-ciclohexil-etil)-pirrolidin-3-il]-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
 15 (3,4-dicloro-fenil)-[3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona; (4-amino-3-cloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (2,3-dicloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-propil-pirrolidin-3-il)-(3,4,5-tricloro-fenil)-metanona;
 (3,4-dibromo-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 20 (3,4-dicloro-fenil)-[3-(4,4,4-trifluor-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-((S)-3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-((R)-3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (4-cloro-3-etil-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-bromo-4-cloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 25 (3-ciclopropilmetil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
 (3,4-Dicloro-fenil)-[3-(tetrahidro-piran-4-ilmetil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
 (4-bromo-3-metil-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (4-amino-3-cloro-5-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 30 (4-bromo-3-cloro-5-fluor-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
 (3-butil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-metanona;
 ((R)-3-butil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-metanona;
 ((S)-3-butil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-metanona;

- ((S)-3-butil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
- ((R)-3-butilpirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
- (3,4-dicloro-2-hidroxi-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3-butil-pirrolidin-3-il)-(3-cloro-5-fluor-4-hidroxi-fenil)-metanona;
- 5 (3,4-dicloro-fenil)-(3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-(3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona; (3,4-dicloro-fenil)-[(S)-3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-(3-isopropil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-[(S)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- 10 metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-[(R)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-((S)-3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[3-(3-metil-butil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-((R)-3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- 15 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-[(R)-3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[(R)-3-(3-metil-butil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- 20 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[(S)-3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona,
- (3,4-dicloro-fenil)-[3-(2-etoxi-etil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-fenil)-[3-[2-(1-metil-ciclopropil)-etil]-pirrolidin-3-il]-metanona;
- 25 (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[(R)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[(S)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (4-amino-3-cloro-5-fluor-fenil)-[3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- 30 metanona;
- (4-amino-3-cloro-5-fluor-fenil)-(3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
- (3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-[3-(tetrahidro-piran-4-ilmetil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- (4-amino-3-cloro-fenil)-[3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
- 35 (4-amino-3-cloro-fenil)-(3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;

- (3,4-dicloro-fenil)-(3-pirazol-1-ilmetil-pirrolidin-3-il)-metanona;
(3-ciclopentil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona;
(4-amino-3-cloro-fenil)-[3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona,
(3,4-dicloro-5-fluor-fenil)-((S)-3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
5 (4-amino-3-cloro-5-fluor-fenil)-[3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-
metanona;
(3,4-dicloro-fenil)-[3-(2,2-dimetil-propil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
(3,4-dicloro-fenil)-[3-(3-metoxi-3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-
metanona;
10 (2-amino-3,4-dicloro-fenil)-(3-isobutil-pirrolidin-3-il)-metanona;
(3-cloro-4-metil-fenil)-[3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
(2-amino-3,4-dicloro-fenil)-((S)-3-etil-pirrolidin-3-il)-metanona;
(4-amino-3-cloro-fenil)-[(S)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-
metanona;
15 (4-Amino-3-cloro-fenil)-[(R)-3-(3,3-dimetil-butil)-pirrolidin-3-il]-
metanona;
(2-amino-3,4-diclorofenil)-((R)-3-etil-pirrolidin-3-il)-metanona;
(4-amino-3-cloro-fenil)-[(S)-3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona
(4-amino-3-cloro-fenil)-[(R)-3-(3-metil-butil)-pirrolidin-3-il]-metanona;
20 (3,4-dicloro-fenil)-[3-(1-metil-ciclopropilmetil)-pirrolidin-3-il]-
metanona;
(2,4-dicloro-fenil)-(3-propil-pirrolidin-3-il)-metanona;
(3-Ciclopentilmetil-pirrolidin-3-il)-(3,4-dicloro-fenil)-metanona; y
(3,4-Dicloro-fenil)-[3-(2-metoxi-2-metil-propil)-pirrolidin-3-il]-
25 metanona.

7. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 8. Un compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la depresión, ansiedad o ambas.



Antidepressant-like actions of DOV 21,947: a “triple” reuptake inhibitor

Phil Skolnick^{a,*}, Piotr Popik^b, Aaron Janowsky^c, Bernard Beer^a, Arnold S. Lippa^a

^a DOV Pharmaceutical, Inc., Continental Plaza, 433 Hackensack Avenue, Hackensack, NJ 07601, USA

^b Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 21 Smetna Street, Cracow 31-343, Poland

^c Departments of Psychiatry and Behavioral Neuroscience, Oregon Health and Science University, and VA Medical Center, 3710 SW US Veterans Hospital Road, Portland, OR 97201, USA

Received 4 November 2002; received in revised form 4 January 2003; accepted 8 January 2003

Abstract

DOV 21,947 [(+)-1-(3,4-dichlorophenyl)-3-azabicyclo-[3.1.0]hexane hydrochloride] inhibits the reuptake of [³H]serotonin, [³H]norepinephrine, and [³H]dopamine in human embryonic kidney (HEK) 293 cells expressing the corresponding human recombinant transporters (IC₅₀ values of 12, 23, and 96 nM, respectively). This compound also inhibits [¹²⁵I]RTI 55 (3β-(4-iodophenyl)tropane-2β-carboxylic acid methyl ester) binding to the corresponding transporter proteins in membranes prepared from these cells (K_i values of 99, 262, and 213 nM, respectively). DOV 21,947 reduces the duration of immobility in the forced swim test (using rats) with an oral minimum effective dose of 5 mg/kg. This antidepressant-like effect manifests in the absence of significant increases in motor activity at doses of up to 20 mg/kg. DOV 21,947 also produces a dose-dependent reduction in immobility in the tail suspension test, with a minimum effective oral dose of 5 mg/kg. The ability of DOV 21,947 to inhibit the reuptake of three biogenic amines closely linked to the etiology of depression may result in a therapeutic profile different from antidepressants that inhibit the reuptake of serotonin and/or norepinephrine.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: DOV 21,947; “Broad-spectrum” antidepressant; Norepinephrine; Dopamine; 5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonin); Reuptake inhibitor

1. Introduction

Most antidepressants in current use increase the synaptic availability of biogenic amines, with the majority of these drugs selectively inhibiting norepinephrine and/or serotonin reuptake (Briley and Moret, 1997; Skolnick and Krystal, 2002). These compounds include serotonin and norepinephrine (dual) reuptake inhibitors such as venlafaxine and milnacipran, serotonin-selective reuptake inhibitors including citalopram, fluoxetine and paroxetine, and norepinephrine-specific reuptake inhibitors such as reboxetine (Briley and Moret, 1997; Kent, 2000). While these “second” and “third” generation antidepressants are safer and easier to use than “first” generation agents such as imipramine (Skolnick, 1997), most double-blind, placebo-controlled studies indicate that these biogenic-amine-based therapies require ≥3 weeks of treatment to achieve clinically

meaningful symptom relief. Further, a significant number of patients (estimated at 30–40%) do not benefit from these therapies (reviewed in Paul, 2001).

During the past decade, a number of strategies have emerged to reduce the so-called therapeutic lag and/or increase the efficacy of newly developed agents compared to compounds in current use (Skolnick, 1997; Skolnick et al., 2001; Paul, 2001; Vetulani and Nalepa, 2000). Among these strategies is the “broad-spectrum” antidepressant (Skolnick, 2002) capable of simultaneously inhibiting the reuptake of norepinephrine, serotonin, and dopamine. The rationale for this approach is grounded, in large part, on a body of clinical and preclinical evidence linking deficits in mesocorticolimbic dopaminergic function to anhedonia, a core symptom of depression (reviewed in D’Aquila et al., 2000; Naranjo et al., 2001; Willner, 2000).

In this report, we demonstrate that DOV 21,947 [(+)-1-(3,4-dichlorophenyl)-3-azabicyclo-[3.1.0]hexane hydrochloride] (Fig. 1) is a potent inhibitor of serotonin, norepinephrine, and dopamine reuptake in human embryonic kidney (HEK) 293 cells expressing recombinant forms of

* Corresponding author. Tel.: +1-201-968-0980; fax: +1-201-968-0986.

E-mail address: pskolnick@doxpharm.com (P. Skolnick).

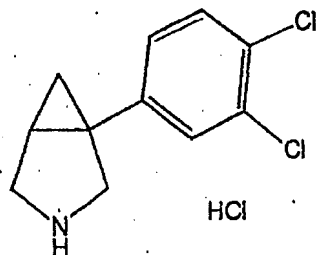


Fig. 1. Structure of DOV 21,947 ([(+)-1-(3,4-dichlorophenyl)-3-azabicyclo-[3.1.0]hexane hydrochloride]).

the respective human transporters, and inhibits [^{125} I]RTI-55 (3 β -(4-iodophenyl)tropane-2 β -carboxylic acid methyl ester) binding to the corresponding transporter proteins in membranes prepared from the cells. Further, DOV 21,947 exhibits antidepressant-like actions in both the forced swim and tail suspension tests, preclinical procedures often used to predict activity in humans (Borsini and Meli, 1988; Porsolt and Lenegre, 1992).

2. Materials and methods

2.1. In vitro studies

2.1.1. Expression of the human dopamine (hDAT), serotonin (hSERT), and norepinephrine (hNET) transporters in HEK-293 cells

The cloning and characterization of the hDAT cDNA used in these experiments (pcDNA1-hDAT) was described previously (Eshleman et al., 1994, 1995). The cDNA for the hSERT (Ramamoorthy et al., 1993) and HEK cells expressing the hNET (HEK-hNET; Galli et al., 1995) were generously provided by Dr. Randy Blakely.

2.1.2. Inhibition of [^{3} H]neurotransmitter uptake in HEK-293 cells expressing the hDAT, hSERT, and hNET

Assays were conducted using procedures identical to those described by Eshleman et al. (1999). Cells were grown on 150-mm-diameter tissue culture dishes. The medium was removed, and plates were washed twice with Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline (PBS). Fresh Ca^{2+} , Mg^{2+} -free PBS (2.5 ml) was then added to each plate. The plates were placed in a 25 °C water bath for 5 min and the cells were gently scraped from the plates. Cell clusters were separated by trituration with a pipette for 5–10 aspirations and ejections. Aliquots (50 μ l) of the suspended cells were added to assay tubes (in triplicate) containing DOV 21,947 (31.6 nM to 10 μ M in cells expressing hDAT and hSERT cells; 3.16 nM to 1 μ M in cells expressing hNET) and Krebs–HEPES assay buffer in a final assay volume of 0.5 ml. Following a 10-min preincubation in a 25 °C water bath, [^{3} H]neurotransmitter (final concentration, 20 nM; specific activity of [^{3} H]dopamine, [^{3} H]serotonin, and [^{3} H]norepinephrine: 40–60, 23.7, and 56 Ci/mmol, respec-

tively) was added and incubated for 10 min. The reaction was terminated by filtration through Wallac filtermat A filters, presoaked in 0.05% polyethylenimine, using a 96-well Tomtec cell harvester. Scintillation fluid was added to each filtered spot, and radioactivity remaining on the filters was measured by liquid scintillation spectrometry. Specific uptake was defined as the difference in uptake observed in the absence and presence of 5 μ M mazindol (hDAT and hNET) or 5 μ M imipramine (hSERT).

2.1.3. Inhibition of [^{125} I]RTI-55 binding

Assays were conducted using procedures identical to those described by Eshleman et al. (1999). HEK-293 cells expressing the recombinant hDAT and hSERT cells were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% calf bovine serum, 0.05 U penicillin/streptomycin, and puromycin (2 μ g/ml). Cells expressing the hNET were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.05 U penicillin/streptomycin, and geneticin (300 μ g/ml). Cells were grown until confluent on 150-mm-diameter tissue culture dishes in a humidified 10% CO_2 environment at 37 °C. Medium was removed from culture dishes, and cells were washed with 10 ml of lysis buffer (PBS containing 2 mM HEPES and 1 mM EDTA). The culture dishes were then placed on ice for 10 min. Cells were scraped from these culture dishes and centrifuged for 20 min at 30,000 $\times$ g. The resulting pellet was resuspended in 6–24 ml of 0.32 M sucrose with a Polytron disruptor (setting 7) for 5 s.

Assays contained an aliquot of membrane preparation (ranging from ~12 to 30 μ g protein, which, depending on the cell line, resulted in binding <10% of the added radioactivity), DOV 21,947, and [^{125} I]RTI-55 (40–80 pM final concentration) in a final volume of 250 μ l. Krebs–HEPES assay buffer (25 mM HEPES, 122 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 1 μ M pargyline, 100 μ M tropolone, 2 mg glucose/ml, 0.2 mg ascorbic acid/ml, pH 7.4) was used for all assays. Specific binding was defined as the difference in binding observed in the presence and absence of 5 μ M mazindol (HEK-hDAT and -NET) or 5 μ M imipramine (HEK-hSERT). Membranes were preincubated with DOV 21,947 (21.6 nM to 10 μ M) at room temperature for 10 min before the addition of [^{125} I]RTI-55, unless indicated otherwise. The reaction (performed in duplicate at each concentration of DOV 21,947) was incubated for 90 min at room temperature in the dark and was terminated by filtration through Wallac Filtermat A filters using a 96-well Tomtec cell harvester. Radioactivity remaining on the filters was determined as described for uptake assays (above).

2.2. In vivo studies

In vivo studies were conducted in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (revised 1996). These studies were approved by the Animal

Care and Use Committee of the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences.

2.2.1. Animals

Male Wistar rats (~250 g) were obtained from the breeding facility of the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland. Male C57/B1 mice (~25 g) were obtained from the breeding facility of the University Children's Hospital, Prokocim, Cracow, Poland. Animals were group-housed in standard laboratory cages and maintained in a temperature-controlled colony room ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-h light/dark cycle (lights on: 07:00). Commercial food and tap water were freely available.

2.2.2. Forced swim test

Rats were placed in transparent, cylindrical 10-l glass beakers (height ~40 cm, internal diameter ~19 cm) containing water ($24\text{--}25^\circ\text{C}$) to a level of 22 cm, as described by Porsolt et al. (1977). Two to three rats, separated by opaque screens, were exposed simultaneously. Water was always changed between trials. The procedure consisted of a pretest and test separated by 24 h (Porsolt et al., 1978). During the pretest, rats (adapted to the experimental room for no less than 1 h) were placed in the glass beakers for 15 min. Following this initial exposure, the rats were wiped dry with paper towels and transferred to a "drying cage" with an IR lamp suspended over this cage. Fifteen minutes later, rats were administered either drugs or vehicle and transferred to their home cages. The following day, rats were transferred to the experimental room and reacclimated for at least 1 h. Rats were administered either drugs or vehicle (imipramine and DOV 21,947 were administered 30 and 60 min before testing, respectively) and placed in the test chambers. The time each animal spent immobile was measured during a 5-min period by an observer unaware of the treatment conditions, using the "PORSOLT" program (Layer et al., 1995). As described by Porsolt et al. (1977), a rat was considered immobile when floating motionless or making only those movements necessary to keep his head above water surface.

2.2.3. Tail suspension test

This procedure was performed essentially as described by Steru et al. (1985). C57/B1 mice were individually suspended 75 cm above the tabletop with an adhesive tape placed ~1 cm from the tip of the tail. Immobility duration was recorded for 6 min. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. A trained observer, using the "PORSOLT" program (Layer et al., 1995), measured the duration of immobility.

2.2.4. Locomotor activity

Rats were transferred into the testing room at least 2 h prior to drug administration. Sixty minutes after administration of MK-801 or DOV 21,947, rats were placed in a custom fabricated, $50 \times 50 \times 25$ cm ($l \times w \times h$) activity

chambers. Locomotor activity was recorded for a total of 30 min in 10-min epochs.

2.3. Data analysis

Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for data analysis. Immobility time (in seconds) was used for statistical analyses of data in the forced swim and tail suspension tests. Data from vehicle and imipramine treatment were pooled across several independent experiments to create one "negative" and "positive" control. Locomotor activity of rats calculated as area under the curve (AUC) on measurements 0–30 min (at 10-min intervals) after drug administration with the use of the trapezoidal rule.

2.4. Drugs

DOV 21,947 was prepared from a racemic mixture using simulated moving bed chromatography (Huthmann and Juza, 2000) by CarboGen, Laboratories (Aarau, Switzerland). MK-801 was the gift of Prof. Kenner Rice, NIH. Other compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). DOV 21,947 (dissolved in deionized water) was administered orally via feeding tube. Imipramine and MK-801 (dissolved in saline) were administered intraperitoneally. Drugs were administered to rats and mice in volumes of 1 and 10 mg/kg, respectively.

3. Results

3.1. Inhibition of [^3H]biogenic amine reuptake

DOV 21,947 produced a concentration-dependent inhibition of [^3H]norepinephrine, [^3H]serotonin, and [^3H]dopamine reuptake in HEK 293 cells transfected with the respective amine transporters. Under the conditions described in Materials and methods, the IC_{50} values for DOV 21,947 to inhibit [^3H]amine uptake were 22.8 ± 3.3 , 12.3 ± 2.8 , and 96 ± 20 nM, respectively (Table 1).

3.2. Inhibition of [^{125}I]RTI-55 binding

DOV 21,947 inhibited [^{125}I]RTI-55 binding to membranes prepared from HEK 293 cells expressing recombinant human norepinephrine, serotonin, and dopamine transporters with K_i values of 262 ± 41 , 99 ± 16 , and 213 ± 56 nM, respectively; Hill slopes did not differ from unity (Table 1).

3.3. Effects of DOV 21,947 in the forced swim test

Sixty minutes following oral administration, DOV 21,947 produced a dose-dependent reduction in immobility in the forced swim test (Fig. 2, top panel). The MED of DOV 21,947 was 5 mg/kg, with a maximum reduction in immobility at 20 mg/kg comparable to that produced

Table 1

Inhibition of [^{3} H]neurotransmitter uptake and [^{125} I]RTI-55 binding to neurotransmitter transporters by DOV 21,947: comparison with other antidepressants

Compound	hDAT, binding	[^{3} H]DA uptake	hSERT, binding	[^{3} H]5-HT uptake	hNET, binding	[^{3} H]NE uptake
DOV 21,947	213 $\pm$ 56	96 $\pm$ 20	99 $\pm$ 16	12.3 $\pm$ 2.8	262 $\pm$ 41	22.8 $\pm$ 3.3
Desmethylimipramine	>10,000	>10,000	55 $\pm$ 4	64 $\pm$ 17	13.9 $\pm$ 1.5	4.2 $\pm$ 1.1
Fluoxetine	6670 $\pm$ 850	>10,000	1.1 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 2.9	1560 $\pm$ 30	1020 $\pm$ 180
Imipramine	>10,000	>10,000	3.3 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 2.3	215 $\pm$ 72	70 $\pm$ 21
Nomifensine	87 $\pm$ 23	72 $\pm$ 9	2350 $\pm$ 200	2780 $\pm$ 650	119 $\pm$ 16	42 $\pm$ 15

Values are expressed in nM (K_i for inhibition of radioligand binding, IC_{50} for inhibition of neurotransmitter uptake) and represent the $X \pm$ S.E.M. of at least three independent experiments for DOV 21,947. Comparative values for the other antidepressants are taken from Esbleman et al. (1999) and represent the $X \pm$ S.E.M. of three to eight experiments assayed under conditions identical to those employed in the present study. Hill slopes were not different from unity. Abbreviations: hDAT, human dopamine transporter; DA, dopamine; hSERT, human serotonin transporter; 5-HT, serotonin; hNET, human norepinephrine transporter; NE, norepinephrine.

by the positive control, an intraperitoneal dose of imipramine (15 mg/kg) administered 15 min prior to testing (Fig. 2, top panel).

3.4. Effects of DOV 21,947 on locomotor activity

DOV 21,947 did not produce a statistically significant increase in locomotor activity at doses (10 and 20 mg/kg) active in the forced swim test (Fig. 2, bottom panel). By contrast, the positive control in this study, MK-801 (0.15 mg/

kg, i.p.), significantly increased locomotor activity (Fig. 2, bottom panel).

3.5. Effects of DOV 21,947 in the tail suspension test

DOV 21,947 produced a dose-dependent reduction in immobility in the tail suspension test with an MED of 5 mg/kg,

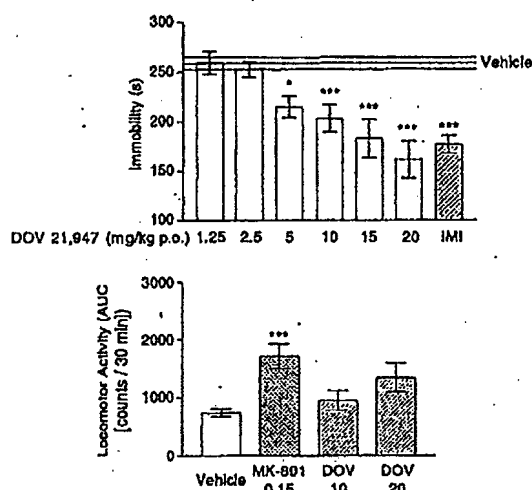


Fig. 2. Effects of DOV 21,947 on immobility in the forced swim test (top panel) and locomotor activity (bottom panel). Top panel: DOV 21,947 was administered to male Wistar rats as described in Materials and methods. Imipramine (15 mg/kg, i.p.) was included as a positive control. Values represent $X \pm$ S.E.M. of 8–18 rats/group. The solid horizontal lines flanked by two dotted lines represent immobility times ($X \pm$ S.E.M.) of saline-treated rats. The hatched bar represents immobility times ($X \pm$ S.E.M.) of imipramine-treated rats. ANOVA demonstrates significant effects among treatments: $F(7,90)=9.13$, $P<0.001$. Asterisks indicate statistically significant difference compared with the control group that received saline (i.p.). Symbols: * $P<0.05$; *** $P<0.001$, Dunnett's multiple comparison test. Bottom panel: DOV 21,947 and MK-801 were administered to male Wistar rats as described in Materials and methods. MK-801 was selected as a positive control because it produces a reliable increase in motor activity in rodents. Values represent the $X \pm$ S.E.M. of 7–9 rats/group. Data is expressed as the AUC between 0 and 30 min as described in Materials and methods. ANOVA: $F(3,32)=6.11$, $P<0.01$. Symbol: *** $P<0.001$, Dunnett's multiple comparison test compared with saline-treated (intraperitoneal) rats.

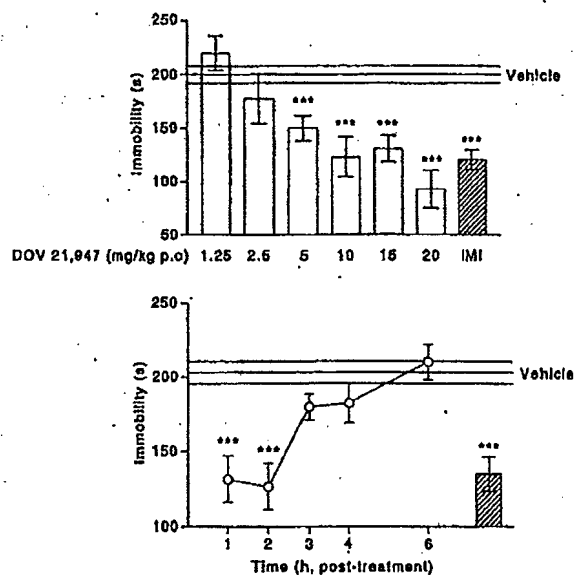


Fig. 3. Effects of DOV 21,947 on immobility in the tail suspension test. (Upper panel) C57Bl/6J mice were orally administered DOV 21,947 1 h prior to testing. Values represent the $X \pm$ S.E.M. of 6–22 mice/group. The solid horizontal line flanked by two dotted lines represents immobility times ($X \pm$ S.E.M.) of saline-treated mice. The hatched bar represents immobility times of imipramine-treated mice. ANOVA demonstrates significant effects among treatments: $F(7,82)=9.74$, $P<0.001$. Asterisks indicate a statistically significant difference toward control group that received saline i.p. *** $P<0.001$, Dunnett's multiple comparison test. (Bottom panel) Groups of mice were administered DOV 21,947 (20 mg/kg, p.o.) 1–6 h prior to testing. Imipramine (20 mg/kg, i.p., administered 30 min prior to testing) was included as a positive control (hatched bar). Values represent the $X \pm$ S.E.M. of 8–28 mice/group. The solid horizontal lines flanked by two dotted lines represent immobility times ($X \pm$ S.E.M.) of saline-treated mice. ANOVA demonstrates significant effects among groups: $F(6,121)=9.61$, $P<0.001$. Symbols: *** $P<0.001$, Dunnett's multiple comparison test compared to mice that received saline (i.p.) or water (p.o.).

p.o. (Fig. 3, top panel). The maximum reductions in immobility produced by 10–20 mg/kg of DOV 21,947 were comparable to that produced by the positive control, an intraperitoneal dose of imipramine (20 mg/kg) administered 30 min prior to testing. DOV 21,947 (20 mg/kg, p.o.) significantly reduced immobility in the tail suspension test for at least 2 h, with immobility times returning to control values within 6 h (Fig. 3, bottom panel).

4. Discussion

Anhedonia is a core symptom of depression, and both preclinical and clinical studies have demonstrated that dopaminergic pathways are integral to reward, or hedonic, processes (reviewed in D'Aquila et al., 2000; Naranjo et al., 2001; Willner, 2000). These data have led to the proposal that hypofunction of the mesocorticolimbic dopaminergic system may mediate both the anhedonia and loss of motivation typically associated with major depressive disorder (reviewed in Willner, 2000; Zacharko and Anisman, 1991). A compound capable of increasing synaptic dopamine concentrations could have an immediate effect to reduce symptoms of anhedonia, and when combined with an increased synaptic availability of norepinephrine and serotonin, result in a greater efficacy and/or more rapid onset than conventional antidepressants. While this hypothesis has not been fully explored in the clinic, several studies have demonstrated that the adjunctive use of dopamine agonists (e.g., pergolide, pramipexole) produces an improvement in ~40–50% of depressed individuals refractory to monotherapy with conventional agents (Boukoms and Mangini, 1993; Izumi et al., 2000; Sporn et al., 2000). Further, as monotherapies, dopamine agonists (e.g., pramipexole, bromocriptine) are antidepressant (Corrigan et al., 2000; Sitland-Marken et al., 1990; Willner, 2000), but do not appear to be dramatically different from “traditional” antidepressants with respect to either efficacy or onset of action.

There is also a body of preclinical evidence consistent with the hypothesis that the therapeutic profile of an antidepressant concurrently increasing the synaptic availability of dopamine, norepinephrine, and serotonin will differ from a compound selectively affecting norepinephrine and/or serotonin reuptake. Thus, it has been known for more than 20 years (Serra et al., 1979) that chronic antidepressant treatments enhance dopamine receptor function in the mesolimbic system (reviewed in D'Aquila et al., 2000). This phenomenon has been independently observed by many laboratories, and across a wide range of antidepressants (reviewed in D'Aquila et al., 2000). The apparent requirement for chronic antidepressant treatment indicates this enhanced sensitivity to dopamine receptor stimulation is an adaptive phenomenon. This adaptation may occur via projections into the nucleus accumbens from other limbic areas more traditionally associated with antidepressant action (Willner, 1997). While the molecular mechanism(s)

responsible for this increased sensitivity to dopamine are unknown, several laboratories have reported that chronic antidepressant administration increases the expression of mRNA encoding dopamine D2 and D3 receptors in the mesolimbic system (Ainsworth et al., 1998; Dziedzicka Wasylewska et al., 1997; Lammers et al., 2000). If these antidepressant-induced changes in dopamine receptor sensitivity are required for a therapeutic effect, then increasing the synaptic availability of dopamine (together with norepinephrine and serotonin) may initiate this process, resulting in a rapid onset of action and/or high efficacy.

DOV 21,947 inhibits both [¹²⁵I]RTI-55 binding to the serotonin, norepinephrine, and dopamine transporters and reuptake of the respective biogenic amines (Table 1). The optimum potency ratio for inhibiting these three biogenic amines is unknown, but there is a wide variation in potency ratios among clinically active dual reuptake inhibitors (Table 1 and Briley and Moret, 1997). While DOV 21,947 has not yet entered clinical trials, plasma levels of the racemic form of this molecule are sufficient to saturate each of the transporters at doses that are well tolerated by normal volunteers (unpublished observations). Further, DOV 21,947 is orally active in both the forced swim and tail suspension tests, procedures that are predictive of antidepressant activity in humans (Borsini and Meli, 1988; Porsolt and Lenegre, 1992). Since these preclinical procedures do not yield useful information about either onset of action or efficacy, the antidepressant properties of such a broad-spectrum agent merits study in the clinic.

Acknowledgements

This work was supported in part by VA and NIH grants and interagency agreements to A.J.

References

- Ainsworth, K., Smith, S.E., Zetterstrom, T.S., Pei, Q., Franklin, M., Sharp, T., 1998. Effect of antidepressant drugs on dopamine D1 and D2 receptor expression and dopamine release in the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology* 140, 470–477.
- Borsini, F., Meli, A., 1988. Is the forced swim test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94, 147–160.
- Boukoms, A., Mangini, L., 1993. Pergolide: an antidepressant adjuvant for mood disorders? *Psychopharmacol. Bull.* 29, 207–211.
- Briley, M., Moret, C., 1997. Antidepressant properties of specific serotonin–noradrenaline reuptake inhibitors. In: Skolnick, P. (Ed.), *Antidepressants: New Pharmacological Strategies*. Humana Press, Totowa, pp. 35–52.
- Corrigan, M.H., Denahan, A.Q., Wright, C.E., Ragual, R.J., Evans, D.L., 2000. Comparison of pramipexole, fluoxetine, and placebo in patients with major depression. *Depress. Anxiety* 11, 58–65.
- D'Aquila, P.S., Collu, M., Gessa, G.L., Serra, G., 2000. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 365–373.
- Dziedzicka Wasylewska, M., Rogoz, R., Klimek, V., Maj, J., 1997. Repeated administration of antidepressant drugs affects the levels of

- mRNA coding for D1 and D2 dopamine receptors in the rat brain. *J. Neural Transm.* 104, 515–524.
- Eshleman, A.J., Henningsen, R.A., Neve, K.A., Janowsky, A., 1994. Release of dopamine via the human transporter. *Mol. Pharmacol.* 45, 312–316.
- Eshleman, A.J., Neve, R.L., Janowsky, A., Neve, K.A., 1995. Characterization of a recombinant human dopamine transporter in multiple cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 276–283.
- Eshleman, A.J., Carmolli, M., Cumbay, M., Martens, C.R., Neve, K.A., Janowsky, A., 1999. Characteristics of drug interactions with recombinant biogenic amine transporters expressed in the same cell type. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 877–885.
- Galli, A., DeFelice, L.J., Duke, B.D., Moore, K.R., Blakely, R.D., 1995. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J. Exp. Biol.* 198, 2197–2212.
- Huthmann, E., Juza, M., 2000. Modification of a commercial chiral stationary phase: influences on enantiomer separation using simulated moving bed chromatography. *J. Chromatogr. A* 908, 185–200.
- Izumi, T., Inoue, T., Kitagawa, N., Nishi, N., Shimanaka, S., Takahashi, Y., Kusumi, I., Odagaki, Y., Denda, K., Ohmori, T., Koyama, T., 2000. Open pergolide treatment of tricyclic and heterocyclic antidepressant-resistant depression. *J. Affect. Disord.* 61, 127–132.
- Kent, J.M., 2000. SNRIs, NASSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet* 355, 911–918.
- Lammers, C.H., Diaz, J., Schwartz, J.C., Sokoloff, P., 2000. Selective increase of dopamine D3 receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol. Psychiatry* 5, 378–388.
- Layer, R.T., Popik, P., Olds, T., Skolnick, P., 1995. Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 621–627.
- Naranjo, C., Tremblay, L.K., Busto, U.E., 2001. The role of the brain reward system in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25, 781–823.
- Paul, I.A., 2001. Excitatory amino acid signalling, major depression and the actions of antidepressants. *Pharm. News* 8, 33–44.
- Porsolt, R.D., Lenegre, A., 1992. Behavioral models of depression. In: Elliott, J.M., Heal, D.J., Marsden, C.A. (Eds.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Wiley, London, pp. 73–85.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379–391.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A.L., Moore, K.B., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A.S., Ganapathy, V., Blakely, R.D., 1993. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2542–2546.
- Serra, G., Argiolas, A., Klimek, V., Fadda, F., Gessa, G.L., 1979. Chronic treatment with antidepressant prevents the inhibitory effect of small doses of apomorphine on dopamine synthesis and motor activity. *Life Sci.* 25, 414–424.
- Sitland-Marken, P.A., Wells, B.G., Frommning, J.H., Chu, C.C., Brown, C.S., 1990. Psychiatric applications of bromocriptine. *J. Clin. Psychiatry* 51, 68–82.
- Skolnick, P. (Ed.), 1997. *Antidepressants: New Pharmacological Strategies*. Humana Press, Totowa.
- Skolnick, P., 2002. Antidepressants beyond monoamine-based therapies: clues to new approaches. *J. Clin. Psychiatry* 63, 19–23.
- Skolnick, P., Krystal, J.H., 2002. Depression. In: Lodge, D., Danysz, W., Parsons, C.G. (Eds.), *Therapeutic Potential of Ionotropic Glutamate Receptor Antagonists and Modulators*. F.P. Graham Publishing, Johnson City, pp. 71–90.
- Skolnick, P., Legutko, B., Li, X., Bymaster, F.P., 2001. Current perspectives on the development of non-biogenic amine based antidepressants. *Pharmacol. Res.* 43, 411–423.
- Sporn, J., Ghazmi, S.N., Sambur, M.R., Rankin, M.A., Recht, J., Sachs, G.S., Rosenbaum, J.F., Fava, M., 2000. Pramipexole augmentation in the treatment of unipolar and bipolar depression: a retrospective chart review. *Ann. Clin. Psychiatry* 12, 137–140.
- Stern, L., Chermat, R., Theiry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367–370.
- Vetulani, J., Nalepa, I., 2000. Antidepressants: past, present and future. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 351–363.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134, 319–329.
- Willner, P., 2000. Dopaminergic mechanisms in depression and mania. In: Watson, S. (Ed.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Lippincott Williams & Wilkins, New York. On-line edition.
- Zacharko, R.M., Anisman, H., 1991. Stressor-induced anhedonia in the mesocorticolimbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 391–405.