

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 933**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 25/18** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/138** (2006.01)

**A61K 31/137** (2006.01)

**A61K 31/197** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07789958 .1**

96 Fecha de presentación: **17.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2051735**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.2009**

54 Título: **Conjugados que comprenden un fármaco psicotrópico o un agonista GABA y un ácido orgánico y su uso para el tratamiento del dolor y otros trastornos del SNC**

30 Prioridad:

**17.07.2006 US 831195 P**

**17.07.2006 US 831192 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**02.01.2013**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**02.01.2013**

73 Titular/es:

**RAMOT, AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)**

**P.O.B. 39296**

**61392 TEL AVIV, IL y**

**BAR-ILAN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NUDELMAN, ABRAHAM;**

**REPHAELI, ADA;**

**GIL-AD, IRIT y**

**WEIZMAN, ABRAHAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 393 933 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

Conjugados que comprenden un fármaco psicotrópico o un agonista GABA y un ácido orgánico y su uso para el tratamiento del dolor y otros trastornos del SNC

**Campo y antecedente de la presente invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la farmacología y, más particularmente, al tratamiento del dolor.

La gestión inadecuada del dolor está ampliamente extendida y es perjudicial para los pacientes. Numerosos estudios han demostrado un mal control de los dolores postoperatorios y por traumatismos, el dolor debido a cáncer y el dolor crónico no canceroso. De esta manera, existe una continua necesidad de medicaciones capaces de proporcionar una elevada eficacia en el alivio del dolor a la vez que tengan una posibilidad reducida de causar efectos indeseables.

10 El dolor se puede clasificar en dos principales categorías, agudo y crónico, que difieren en su etiología, patofisiología, diagnóstico y tratamiento. El dolor agudo es de naturaleza nociceptiva (es decir, resultante directamente de una lesión del tejido local). Es una respuesta fisiológica predecible normal a un estímulo químico, térmico, o mecánico adverso asociado con cirugía, traumatismos o enfermedad aguda. Es normalmente autolimitado, de tal manera que cuando la dolencia que produce el dolor se resuelve, el dolor desaparece. El dolor crónico se puede definir como un dolor que persiste durante más tiempo que el plazo esperado de cicatrización del tejido. Un proceso de lesión o patológico puede estimular el dolor crónico, pero otros factores además del acontecimiento de estimulación pueden perpetuar el dolor. El dolor crónico puede ser tanto neuropático (es decir, iniciarse por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso) o nociceptivo.

20 El dolor nociceptivo se trata normalmente con antiinflamatorios o medicaciones analgésicas mientras que el dolor neuropático se trata normalmente con medicaciones que afectan a los neurotransmisores. Estas incluyen, por ejemplo, fármacos antidepresivos, y antiepilépticos. Los pacientes con dolor neuropático refractario se tratan normalmente con opiáceos.

25 Un neurotransmisor que se sabe que está implicado en la compleja circuitería que subyace al dolor es el neurotransmisor inhibitor, ácido gamma-amino butírico (GABA). GABA no se transporta eficazmente al cerebro desde el torrente sanguíneo debido a las malas propiedades de transporte que evitan el paso a través de la barrera hematoencefálica. Por consiguiente, las células del cerebro sintetizan virtualmente todo el GABA que se encuentra en el cerebro (mediante descarboxilación del ácido glutámico con fosfato de piridoxal).

30 GABA regula la excitabilidad neuronal a través de la unión con proteínas de membrana específicas (es decir, receptores de GABA), lo que da como resultado la apertura de un canal de iones. El paso del ion cloruro a través del canal de iones conduce a la hiperpolarización de la célula receptora, lo que evita por consiguiente la transmisión de impulsos nerviosos a otras células.

35 Aunque más comúnmente usados para el tratamiento de la ansiedad, espasmos musculares y epilepsia, los agonistas GABA han demostrado aliviar los síntomas del dolor mediante numerosos mecanismos. Por ejemplo, se puede reducir el dolor potenciando la transmisión de GABA. Esto puede implicar el direccionamiento de los transportadores de GABA así como de las enzimas y receptores asociados a GABA, tal como los receptores de GABA B [Frediani F. Neuro Sci. 2004, Suppl 3: S161-6]. Además, los agonistas GABA pueden aliviar el dolor reduciendo la transmisión excitadora mediada por glutamato y/o bloqueando los canales de iones activados por tensión. Este último mecanismo de acción está ilustrado por la novedosa generación de antiepilépticos tales como lamotrigina y gabapentina en el tratamiento clínico de los síntomas del dolor neuropático [Blackburn-Munro G., y col., Curr Pharm Des. 2005; 11(23): 2961-76].

45 El uso de agonistas GABA se ve limitado debido a que estos incluyen normalmente grupos funcionales hidrófilos (por ejemplo, un grupo ácido carboxílico libre y un grupo amino libre) y por tanto no cruzan fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). De este modo, se requieren procedimientos invasivos de administración para que los agonistas GABA tengan un efecto terapéutico. Sin embargo se ha encontrado que la conjugación química de dichos compuestos con aminoácidos o péptidos podría facilitar en alguna medida su paso a través de la BHE [Toth I. J. Drug Target 1994, 2, 217-39].

50 A pesar del considerable progreso en el desarrollo de nuevos compuestos, el uso de agonistas GABA que actúan sistémicamente (por ejemplo, gabapentina, pregabalina y diversas benzodiazepinas) se ve limitado por efectos adversos tales como la sedación y las náuseas.

Los neurotransmisores norepinefrina y serotonina son inhibidores funcionales de la transmisión del dolor. De esta manera, tal como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, se utilizan también en la gestión clínica del dolor reguladores en exceso de la monoamina tales como antidepresivos y antiepilépticos.

55 Se piensa que los antidepresivos tricíclicos afectan a la transmisión del dolor en la médula espinal inhibiendo la recaptación de la norepinefrina y serotonina, ambas afectando a las rutas disminuidoras del dolor. Además, la

afinidad del receptor de la histamina H1 (asociado con la sedación) puede estar correlacionada con el efecto analgésico de los antidepresivos.

Los antidepresivos tricíclicos pueden clasificarse en aminas secundarias o terciarias. Las aminas secundarias tales como nortriptilina (Pamelor) y desipramina (Norpramin) muestran una inhibición relativamente selectiva de la recaptación de norepinefrina. Las aminas terciarias tales como amitriptilina e imipramina (Tofranil) presentan una inhibición más equilibrada de la norepinefrina y la serotonina, sin embargo, tienen mayores efectos secundarios anticolinérgicos. Los novedosos antidepresivos venlafaxina (Effexor) y duloxetina (Cymbalta) comprenden una inhibición equilibrada de la recaptación de la serotonina y la norepinefrina sin el bloqueo de otros neuroreceptores que son responsables de efectos secundarios tricíclicos típicos. El mecanismo de acción de bupropion (Wellbutrin) es inestable, pero implica el bloqueo de la captación de la dopamina.

La eficacia de los fármacos antidepresivos varía drásticamente en los síndromes dolorosos neuropáticos y no neuropáticos. Además, los agentes específicos en cada tipo de medicación pueden variar en su eficacia.

Por ejemplo, los antidepresivos con actividad noradrenérgica o para receptores mixtos parecen tener el mayor efecto terapéutico en pacientes con dolor neuropático. Los fármacos predominantemente serotoninérgicos, tales como los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) no son eficaces en el tratamiento del dolor crónico [McQuay HJ, y col., Pain 1996; 68: 217-27]. Amitriptilina y su metabolito nortriptilina tienen la eficacia más documentada en el tratamiento de los síndromes de dolor neuropático y no neuropático [Bryson HM, Wilde MI. Drugs Aging 1996; 8: 459-76]. Los novedosos antidepresivos bupropion, venlafaxina y duloxetina [Wernicke J, y col., J Pain 2004; 5(3 suppl 1): S48] han demostrado su eficacia en pacientes con dolor neuropático.

La eficacia de los antidepresivos tricíclicos en el tratamiento del dolor neuropático parece ser independiente de su efecto antidepresivo y los pacientes con dolor, pero sin depresión, responden a estos agentes [Max MB, y col., Neurology 1987; 37: 589-96]. Aunque la reducción del dolor se produce a dosis inferiores a aquellas típicamente requeridas para tratar la depresión, las dosis terapéuticas siguen estando asociadas con numerosos efectos secundarios entre los que se incluyen somnolencia, boca seca, visión borrosa, estreñimiento, ganancia de peso, presión sanguínea baja tras ponerse de pie, problemas urinarios, dolores de cabeza, impotencia, pérdida de libido, temblores, mareos, agitación e insomnio.

La Solicitud de Patente de los estados Unidos Nº 2004242570 y las Solicitudes de Patente PCT Internacionales WO 03/026563 y WO 2005/092392 enseñan conjugados de fármacos psicotrópicos y GABA para el tratamiento de trastornos psicotrópicos, trastornos proliferativos y para potenciar la quimiosensibilización.

### **Resumen de la presente invención**

Los presentes inventores han imaginado que conjugados de fármacos psicotrópicos tales como fármacos antidepresivos y ácidos orgánicos tales como agonistas GABA podrían ejercer una actividad terapéutica mejorada en comparación con el fármaco psicotrópico solo y por tanto, se podrían usar en el tratamiento del dolor.

Al llevar la presente invención a la práctica, se ha encontrado de esta manera que los fármacos antidepresivos conjugados de GABA mostraron efectos sinérgicos en comparación con sus compuestos progenitores tanto en lo que respecta a la percepción central del dolor como en segundo lugar, en lo relativo a la fase periférica del dolor. Además, estos conjugados mostraron un inicio acelerado de sus efectos protectores y una duración más prolongada de sus efectos protectores en comparación con sus compuestos progenitores.

De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para tratar el dolor, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que el primer resto químico es un fármaco psicotrópico y en el que además, el segundo resto químico es un ácido orgánico, el ácido orgánico se selecciona de tal manera que potencia el efecto terapéutico inducido por el fármaco psicotrópico cuando el fármaco psicotrópico se administra *per se*, tratando por tanto el dolor. El segundo resto químico es GABA.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente a un segundo resto químico, en el que el primer resto químico es un fármaco psicotrópico y en el que además, el segundo resto químico es un ácido orgánico, el ácido orgánico se selecciona de tal manera que potencie el efecto terapéutico inducido por el fármaco psicotrópico cuando el fármaco psicotrópico se administra *per se*, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor. El segundo resto químico es GABA.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un artículo de fabricación que comprende una composición farmacéutica que se envasa en un material de envase y se identifica mediante impresión, en o sobre el material de envase para uso en el tratamiento del dolor, incluyendo la composición farmacéutica un vehículo farmacéuticamente aceptable y un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente con un segundo resto químico, en el que el primer resto químico es un fármaco psicotrópico en el que además el segundo resto químico es un ácido orgánico, el ácido orgánico se selecciona de tal manera que

potencie el efecto terapéutico inducido por el fármaco psicotrópico cuando el fármaco psicotrópico se administra *per se*. El segundo resto químico es GABA

El segundo resto se selecciona de tal manera que reduce los efectos secundarios adversos inducidos por el fármaco psicotrópico cuando se administra *per se*.

- 5 De acuerdo con las características adicionales en las realizaciones descritas, el segundo resto químico está unido covalentemente con el primer resto químico mediante un enlace seleccionado entre el grupo que consiste en un enlace de éster carboxílico, un enlace de éster alquiloxi carboxílico, un enlace amida, un enlace imina y un enlace tioéster.

De acuerdo con las realizaciones descritas el fármaco psicotrópico es un antidepresivo.

- 10 De acuerdo con las realizaciones descritas el antidepresivo es un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina. O un antidepresivo tricíclico de amina secundaria.

De acuerdo con las realizaciones descritas, el antidepresivo tricíclico de amina secundaria es nortriptilina.

De acuerdo con las realizaciones descritas, el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina es fluoxetina.

- 15 Los conjugados de acuerdo con las presentes realizaciones son fluoxetina-GABA (denominado también en el presente documento como AN-227) y nortriptilina-GABA (denominado también en el presente documento como AN-228).

De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones descritas, el dolor es un dolor crónico.

De acuerdo con otras realizaciones adicionales en las realizaciones descritas, el dolor crónico es un dolor neuropático o un dolor nociceptivo.

- 20 De acuerdo con características más adicionales en las realizaciones descritas, el dolor es un dolor agudo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente con un segundo resto químico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 La presente invención proporciona de esta manera un procedimiento novedoso para tratar el dolor, y particularmente el dolor neuropático, que se caracteriza por una eficacia superior y unos efectos secundarios reducidos en comparación con las medicaciones actualmente conocidas. La presente invención proporciona además conjugados novedosos que se usan en el tratamiento del dolor.

- 30 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que pertenece entiendo comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, la forma singular “un”, “uno”, y “el” incluye las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo sus mezclas.

- 40 A lo largo de esta divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de esta invención en un formato de intervalo: Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe tomarse como limitación inflexible del alcance de la presente invención. De acuerdo con esto, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos así como los valores numéricos individuales comprendidos dentro de este intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe de considerarse que ha descrito específicamente los subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc, así como los números individuales comprendidos dentro de este intervalo, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica con sin tener en cuenta la amplitud del intervalo.

- 45 Cualquiera que sea el intervalo numérico que se indica en el presente documento, se entiende que incluye cualquier numeral enumerado (fracción o entero) comprendido dentro del intervalo indicado. Las frases “que varía/varía entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que varía/varía entre” un primer número indicado “y” un segundo número indicado se usan en el presente documento de forma indistinta y se entiende que incluyen el primer y el segundo números indicados y todos los números fraccionales y enteros entre medias.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a  $\pm 10\%$ .

- 50 El término “que comprende” significa que se pueden añadir otras etapas e ingredientes que no afecten el resultado final. Este término abarca los términos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

La frase “que consiste esencialmente en” significa que la composición o procedimiento puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o el procedimiento reivindicados.

5 El término “procedimiento” se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos tanto conocidos por, como fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos por los expertos de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

10 El término “principio activo” se refiere a un agente farmacéutico que incluye cualquier sustancia química natural o sintética que con posterioridad a su aplicación tiene, en definitiva, al menos un efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

### **Breve descripción de los dibujos**

15 La invención se describe en el presente documento únicamente por medio de ejemplos, con referencia a los dibujos que la acompañan. Con referencia ahora a los dibujos en detalle, se ha recalcado que las características mostradas son a modo de ejemplo y a fines únicamente de la discusión ilustrativa de las realizaciones de la presente invención y se presentan con el fin de suscitar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención. Con este fin, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la presente invención con más detalle de los necesarios para una comprensión fundamental de la presente invención, la descripción tomada junto con los dibujos evidenciarán para los expertos en la técnica como se pueden llevar a la práctica las diversas formas de la presente invención.

20 En los dibujos:

25 La FIG. 1 presenta gráficas comparativas dosis respuesta que ilustran la latencia de la reacción nociceptiva al calor de ratones tratados p.o. con nortriptilina y una dosis equimolar de conjugado de nortriptilina-GABA (AN-228). Ratones Balb-c macho (6/grupo) se trataron p.o. con las dosis indicadas de nortriptilina, las respectivas dosis equimolares del conjugado de nortriptilina-GABA o el vehículo. Dos horas después, los animales se colocaron sobre la superficie de la placa caliente ( $52 \pm 0,2^{\circ}$  C). La respuesta al calor, manifestada por agitación o lamido de las patas o saltos, se registró como el índice de latencia en respuesta.

30 Las FIGs. 2A-B presentan gráficas que ilustran el curso temporal de la latencia de la reacción nociceptiva al calor de los ratones tratados con nortriptilina y las respectivas dosis equimolares del conjugado de nortriptilina-GABA (AN-228). En la figura 2A, se trataron ratones Balb-c macho p.o. con 0,25 mg/kg de nortriptilina, una dosis equimolar de su conjugado de GABA (0,32 mg/kg) o el vehículo. En la figura 2B, se trataron ratones Balb-c machos p.o. con 0,5 mg/kg de nortriptilina, una dosis equimolar de su conjugado de GABA (0,64 mg/kg) o el vehículo. Se utilizaron seis ratones en todos los grupos experimentales. Se midió la latencia en la respuesta de los animales al calor (s), utilizando una placa caliente a  $52 \pm 0,2^{\circ}$  C, antes y después del tratamiento tal como se ha indicado.

35 Las FIGs. 3A-E presentan gráficas que ilustran el efecto de la administración crónica de nortriptilina (0,2 mg/kg) y una dosis equimolar de su conjugado de GABA (AN-228) sobre la latencia de la reacción nociceptiva al calor. Se midió la latencia de la reacción nociceptiva antes del tratamiento (Figura 3A); dos horas después del tratamiento (Figura 3B); tres horas después del tratamiento (Figura 3C), cuatro horas después del tratamiento (Figura 3D), y cinco horas después del tratamiento (Figura 3E).

40 La Figura 4 presenta una gráfica que ilustra el efecto sobre la latencia de la reacción nociceptiva al calor de la fluoxetina, GABA equimolar y un conjugado equimolar de fluoxetina-GABA (AN-227). Se colocaron ratones Balb-c machos sobre la superficie de la placa caliente y se registró el tiempo entre la colocación del animal y su respuesta como el índice de latencia en respuesta. Se registró la reacción a: -60, 0, 60, 120, 180, 240, 300 min tras la administración p.o. del vehículo (n=18), 10 mg/kg de fluoxetina (n=11); conjugado equimolar de fluoxetina-GABA (n=11); y GABA equimolar (n=8).

45 Las FIGs. 5A-E presentan gráficas que ilustran el efecto de la administración crónica (p.o.) de fluoxetina (10 mg/kg) y una dosis equimolar de su conjugado de GABA (AN-227) sobre la latencia de la reacción nociceptiva al calor. Se trataron ratones Balb-c machos (n=11 por grupos de tratamiento y n=10 del control) cinco veces una semana durante 2 semanas. Se midió la latencia de la reacción nociceptiva antes del tratamiento (Figura 5A); dos horas después del tratamiento (Figura 5B); tres horas después del tratamiento (Figura 5C); cuatro horas después del tratamiento (Figura 5D); y cinco horas después del tratamiento (Figura 5E).

50 La FIG. 6 presenta una gráfica que ilustra el efecto de 0,24 mg/kg de GABA-oximetilvalproato (AN-216) y una dosis equimolar de GABA (2,39 mg/kg) sobre el curso temporal de la sensación de calor. Se registro la latencia en respuesta al calor a: - 60, 0, 60, 120, 180, 240 y 300 min, tras el tratamiento.

55 Las FIGs. 7A-E presentan gráficas que ilustran el efecto de un tratamiento de cinco días de 0,2 mg/kg de GABA-oximetilGABA (AN-214) (n=11) y una dosis equimolar de GABA-oximetilvalproato (AN-2169) (n=8) sobre la latencia de la reacción nociceptiva al calor. Se midió la latencia de la reacción nociceptiva antes del tratamiento (Figura 7A); dos horas después del tratamiento (Figura 7B); tres horas después del tratamiento (Figura 7C); cuatro horas después del tratamiento (Figura 7D); y cinco horas después del tratamiento (Figura 7E) en los días 1, 3 y 5.

60 Las FIGs. 8A-E presentan gráficas que ilustran el efecto de un tratamiento de cinco días de GAB sobre la

latencia de la reacción nociceptiva al calor. Se trataron ratones Balb-c machos (n=8/grupo) con las dosis indicadas de GABA diariamente durante cinco días. Se midió la latencia de la reacción nociceptiva antes del tratamiento (Figura 8A); dos horas después del tratamiento (Figura 8B); tres horas después del tratamiento (Figura 8C); cuatro horas después del tratamiento (Figura 8D); y cinco horas después del tratamiento (Figura 8E).

Las FIGs. 9A-B presentan gráficas que ilustran el efecto de alivio del dolor de la fluoxetina y el conjugado de fluoxetina-GABA (AN-227) en la fase neurogénica temprana – y la fase periférica inflamatoria tardía del dolor según se midió mediante una prueba de la formalina. Se trataron ratones Balb/c (5 / grupo) con vehículo (DDW), 10 mg/kg de fluoxetina, 30 mg/kg de fluoxetina y sus dosis equimolares respectivas de conjugado de fluoxetina-GABA. Tres horas después se inyectó formalina al 1% (20 ml) en la zona intraplantar de la pata trasera derecha. Inmediatamente después de la inyección, se colocó al ratón en una cámara de plexiglás para la observación. Se registró la cantidad de tiempo que el animal pasa lamiéndose la pata inyectada como una indicación cuantitativa de la nocicepción. (A) Se midió la fase neurogénica temprana (respuesta nociceptiva) entre 0 - 5 min y (B) la fase tardía a partir de 20-30 min tras la inyección de la formalina (respuestas nociceptoras y nociceptivas inflamatorias).

Las FIGs. 10A-B presentan gráficas que ilustran el efecto de alivio del dolor de la nortriptilina y el conjugado de nortriptilina-GABA (AN-228) en la fase neurogénica temprana – y la fase periférica inflamatoria tardía del dolor según se midió mediante una prueba conformalina. Se trataron ratones Balb/c (5 / grupo) con: vehículo (DDW), 0,5 mg/kg de nortriptilina, 5 mg/kg de nortriptilina y sus dosis equimolares respectivas de conjugado de nortriptilina-GABA. Tres horas después se inyectó formalina al 1% (20 µl) en la zona intraplantar de la pata trasera derecha. Inmediatamente después de la inyección, se colocó al ratón en una cámara de plexiglás para la observación. Se registró la cantidad de tiempo que el animal pasa lamiéndose la pata inyectada como una indicación cuantitativa de la nocicepción. (A) Se midió la fase neurogénica temprana (respuesta nociceptiva) entre 0 - 5 min y (B) la fase tardía a partir de a partir de 10 min después de la inyección de formalina (respuestas nociceptoras y nociceptivas inflamatorias). Los resultados son un promedio de los dos experimentos.

La FIG. 11 presenta una gráfica que ilustra el efecto antiinflamatorio de la fluoxetina y del conjugado de fluoxetina-GABA (AN-227) según se midió mediante una prueba del edema en la pata inducido por carragenato. Se trataron ratas Wistar (250-350 g) p.p. con 40 mg/kg de fluoxetina (n=8), conjugado equimolar de fluoxetina-GABA (n=6) y el vehículo (n=8). Después de 3 h, se inyectaron a la superficie plantar de la pata trasera derecha 100 µl de solución al 1% de λ-carragenato. Se midió el edema desarrollado en la zona inyectada 2 y 4 h después con un calibre.

La FIG. 12 es una gráfica que ilustra el efecto del tratamiento con nortriptilina-GABA (AN-228) sobre la latencia de la reacción nociceptiva al calor en comparación con nortriptilina sola y gabapentina (ácido 1-(amino)ciclohexanoacético) 2-48 horas después de la inyección.

La FIG. 13A-B son gráficas de barras que ilustran el efecto del tratamiento con nortriptilina-GABA (AN-228) sobre la altura de la pata en comparación con nortriptilina sola y el control (Figura 13A) y en comparación con nortriptilina sola, el control y gabapentina (Figura 13B) en puntos temporales concretos tras la inyección.

Las FIGs. 14A-B son gráficas de barras que ilustran el efecto del tratamiento con nortriptilina-GABA (AN-228) en comparación con nortriptilina sola, el control, gabapentina y una mezcla de nortriptilina y GABA sobre la secreción de INF-γ (Figura 14A) y la secreción de TNF-α (Figura 14B).

### **Descripción de las realizaciones preferidas**

La presente invención es un uso novedoso de conjugados de fármacos psicotrópicos, a saber, GABA, para el tratamiento del dolor.

Los principios y el funcionamiento de los conjugados químicos de acuerdo con la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones que los acompañan.

Los fármacos psicotrópicos se encuentran a menudo obstaculizados por efectos secundarios a corto y a largo plazo. Su conjugación con agonistas GABA da como resultado su mejora de la actividad terapéutica y una sustancial reducción de los efectos secundarios adversos inducidos. De esta manera, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nº 2004242579 y las Solicitudes de Patente PCT Internacionales WO 03/026563 y WO 2005/092392, de los presentes inventores, enseñan fármacos psicotrópicos conjugados con GABA para el tratamiento de trastornos psicotrópicos, trastornos proliferativos y para potenciar la quimiosensibilización.

En el momento de concebir la presente invención, se había teorizado que los conjugados de ácidos orgánicos tales como GABA y antidepresivos pueden no solo potenciar las respectivas propiedades terapéuticas antidepresivas de estos fármacos, sino que también pueden mejorar el resto de sus características, tales como sus capacidades de alivio del dolor. De esta manera, tal como se ha demostrado en los Ejemplos 2 y 3, los fármacos antidepresivos conjugados de GABA mostraron de forma inesperada efectos sinérgicos en comparación con sus compuestos progenitores, ambos respecto de la percepción central del dolor y el segundo, respecto de la fase periférica del dolor. No solo los fármacos conjugados de GABA muestran efectos potenciados de alivio del dolor, sino que mostraron un comienzo acelerado de sus efectos protectores y una duración más larga de sus efectos protectores en comparación con sus homólogos conjugados no de GABA.

Sin pretender quedar vinculado a ninguna teoría concreta, se cree que la potenciación de las actividades paliativas de los conjugados se debe a la acción simultánea del fármaco psicotrópico y el ácido orgánico en el mismo sitio en el cerebro que da como resultado un alivio sinérgico del dolor. Además, se cree que la conjugación mejora la permeabilidad cerebral de ambos restos químicos.

5 De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para tratar el dolor, que se efectúa administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado químico. El conjugado químico incluye un primer resto químico que está unido covalentemente con un segundo resto químico. El primer resto químico es un fármaco psicotrópico mientras que el segundo resto químico es un ácido orgánico, seleccionado de tal manera que potencia la eficacia terapéutica del fármaco psicotrópico y/o reduce los efectos secundarios inducidos por el fármaco psicotrópico cuando se administra *per se*.

10 Por "administrado *per se*" se entiende que se utiliza un fármaco psicotrópico no conjugado, que corresponde al mismo fármaco psicotrópico que constituye el primer resto en el conjugado. De esta manera, los conjugados descritos en el presente documento son tales que su eficacia terapéutica se ve potenciada en comparación con la eficacia terapéutica del correspondiente fármaco psicotrópico no conjugado y/o los efectos secundarios inducidos se reducen por tanto en comparación con el fármaco psicotrópico no conjugado correspondiente.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "dolor" abarca dolor agudo y dolor crónico. Tal como se usa en el presente documento, el término "dolor agudo" significa dolor inmediato, con un umbral de dolor muy elevado, dolor provocado por lesión tal como corte, aplastamiento, quemadura, o por estimulación química tras como la experimentada tras la exposición a capsaicina, el principio activo de la cayena. El término "dolor crónico", tal como se usa en el presente documento, significa un dolor diferente del dolor agudo e incluye, sin limitación, dolor neuropático, dolor visceral, dolor por fibromialgia, dolor inflamatorio, dolor producido por dolor de cabeza y dolor derivado. Se entiende que el dolor crónico tiene a menudo una duración relativamente larga, por ejemplo, meses o años, y puede ser continuo o intermitente.

20 En una realización, los conjugados de la presente invención se usan para tratar el "dolor neuropático", que, tal como se usa en el presente documento, significa el dolor resultante de lesión a un nervio. Se puede distinguir el dolor neuropático del dolor nociceptivo, que es el dolor producido por la lesión aguda del tejido que implica pequeños nervios cutáneos o pequeños nervios en el músculo o el tejido conectivo. En contraste al dolor neuropático, el dolor nociceptivo su duración está usualmente limitada al periodo de reparación del tejido y normalmente se puede aliviar mediante los agentes analgésicos disponibles u opiáceos [Myers, Regional Anesthesia 20: 173-184 (1995)].

25 El dolor neuropático normalmente es de larga duración o crónico y se puede desarrollar durante días o meses tras una lesión inicial aguda del tejido. El dolor neuropático puede implicar dolor espontáneo persistente, así como alodinia, que es una respuesta dolorosa a un estímulo que normalmente no es doloroso, o hiperalgesia, una respuesta acentuada a un estímulo doloroso que normalmente es trivial, tal como un pinchazo. El dolor neuropático generalmente es resistente a la terapia con opiáceos [Myers, (1995) *más arriba*].

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "resto químico" se refiere a un resto derivado de un compuesto químico, que retiene su funcionalidad.

En todo el presente documento, cualquiera que sea el resto químico que se describa, debe entenderse que parte de este resto químico está unido al otro resto químico del conjugado, a no ser que se indique otra cosa.

35 De esta manera, la frase "fármaco psicotrópico" cualquiera que sea el uso con respecto al primer resto en el conjugado, se refiere a la porción principal de un fármaco psicotrópico que está unido covalentemente a otro resto químico, como se define este término anteriormente en el presente documento.

Como se describe anteriormente en el presente documento, la frase "fármaco psicotrópico" abarca cualquier agente o fármaco que ejerce una actividad en el sistema nervioso central y por tanto, se puede usar en el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos del sistema nervioso central.

40 Fármacos psicotrópicos, de acuerdo con la presente invención, se refiere a antidepresivos.

45 Los fármacos psicotrópicos preferidos, de acuerdo con la presente invención, son aquellos que tienen un grupo amino, un grupo tiol o un grupo hidroxilo, como se definen estos términos a continuación en el presente documento, que se pueden hacer reaccionar con el ácido orgánico o uno de sus derivados reactivos. Dichos grupos pueden estar presentes en el fármaco psicotrópico, antes de su incorporación en el conjugado, tanto como un grupo funcional libre o como parte de otro grupo funcional, por ejemplo, un grupo amida, un grupo de ácido carboxílico y similares, como se definen estos términos a continuación en el presente documento.

50 De acuerdo con la presente invención, el fármaco psicotrópico a partir del cual se deriva el primer resto químico se conoce por su efecto terapéutico sobre el dolor, es decir, fármacos antidepresivos. Los antidepresivos han demostrado ser eficaces en el tratamiento del dolor y más específicamente, el dolor neuropático.

55 Tal como se usa en el presente documentos, la frase "fármaco antidepresivo" se refiere a fluoxetina o nortriptilina.

Tal como se ilustra en la sección de Ejemplos que sigue, se han probado los conjugados de diversos fármacos psicotrópicos y han demostrado ejercer actividad terapéutica potenciada en comparación con los respectivos fármacos no conjugados, sin tener en cuenta la ruta afectada o el receptor que interactúa con ella. De esta manera, se ha demostrado que los conjugados de dos antidepresivos conocidos, fluoxetina y nortriptilina, que actúan sobre dos rutas enteramente separadas (inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina e inhibidor selectivo de la recaptación de norepinefrina, respectivamente) demostraron inducir un alivio del dolor en estudios *in vivo* en ratones. Fuera del alcance de la presente invención reivindicada, un fármaco antiepiléptico conocido (ácido valproico), que actúa sobre una ruta de GABA ha demostrado también ser eficaz en el alivio del dolor. Se ha sugerido que ya que el ácido valproico es un fármaco capaz de cruzar la BHE, un conjugado de valproato-GABA (por ejemplo, GABA-oximetilvalproato) puede transportar el GABA en el cerebro y el GABA a su vez podría potenciar la actividad del ácido valproico.

De esta manera, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, el fármaco antidepresivo es un antidepresivo tricíclico de amina secundaria o un inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina, a saber, nortriptilina o fluoxetina.

Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, el fármaco psicotrópico de acuerdo con la presente invención está acoplado covalentemente a un segundo resto químico, que es un ácido orgánico, a saber, GABA.

Un grupo "heteroarilo" se refiere a grupo de un anillo monocíclico o fusionado (es decir, anillos que comparten un par de átomos adyacentes) que tienen en el(los) anillo(s) uno o más átomos, tal como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. Los ejemplos, sin limitación, de grupos heteroarilo, incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o no sustituido. Cuando se sustituye, el grupo sustituyente puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ciano, halo, oxo, amido y amino.

Un grupo "heteroalíclico" se refiere a un grupo de anillo monocíclico o fusionado que tiene en el(los) anillo(s) uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos pueden tener también uno o más dobles enlaces. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugado. El grupo heteroalíclico puede estar sustituido o no sustituido. Cuando se sustituye, el grupo sustituido puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, halo, triahalometilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ciano, oxo, amido y amino.

Un grupo "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Un grupo "alcoxilo" se refiere a un grupo -O-alquilo y un grupo -O-cicloalquilo, tal como se define en el presente documento.

Un grupo "ariloxilo" se refiere a un grupo -O-arilo y un grupo -O-heteroarilo, tal como se define en el presente documento.

Un grupo "oxo" se refiere a un grupo -C(=O)-R', en el que R' puede ser, por ejemplo, alquilo, cicloalquilo o arilo.

Un grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

Un grupo "trihalometilo" se refiere a un grupo -CX<sub>3</sub>- en el que X es un grupo halo tal como se define en el presente documento.

Un grupo "amino" o "amina" se refiere a un grupo -NH<sub>2</sub>.

Un grupo "amido" o "amida" se refiere a un grupo -C(=O)-NRaRb, en el que Ra y Rb pueden ser, por ejemplo, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo y arilo.

De esta manera, el resto de ácido orgánico de acuerdo con la presente invención es ácido 4-aminobutírico (GABA).

El ácido orgánico, de acuerdo con la presente invención, se selecciona con el fin de potenciar el efecto terapéutico inducido por el fármaco psicotrópico. Además, se puede seleccionar el ácido orgánico para reducir los efectos secundarios que podrían inducirse por el fármaco psicotrópico si se administra solo.

La frase "para potenciar el efecto terapéutico" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la potenciación de la actividad de alivio de un dolor de los conjugados de la presente invención, que es mayor que la del agente psicotrópico y/o el ácido orgánico que forma el conjugado, cuando se administra per se. Tal como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue, dicha actividad terapéutica potenciada se caracteriza normalmente por las concentraciones eficaces reducidas del fármaco que se requieren para conseguir una determinada actividad terapéutica, en comparación con las concentraciones eficaces del agente psicotrópico no conjugado y/o el ácido orgánico.

La frase "efectos secundarios" tal como se usa en el presente documento se refiere a síntomas adversos que pueden desarrollarse como resultado de administrar a un sujeto un determinado fármaco y, particularmente, un fármaco psicotrópico.

De acuerdo con la presente invención, el segundo resto químico de los conjugados químicos de la presente invención está unido covalentemente con el primer resto químico mediante un enlace tal como, por ejemplo, un enlace de éster carboxílico, un enlace de éster oxialquilcarboxílico, un enlace amida o un enlace tioéster.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “enlace de éster carboxílico” incluye un enlace “-O-C(=O)-”.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la frase “enlace de éster oxialquilcarboxílico” incluye un enlace “O-R-O-C(=O)”, en el que R es un alquilo, tal como se ha definido anteriormente en el presente documento. Preferiblemente R es metilo.

La frase “enlace amida” incluye un enlace “-NH-C(=O)-”.

La frase “enlace tioéster” incluye un enlace “-S-C(=O)-”.

- 10 Se sabe que dichos enlaces se pueden hidrolizar por las enzimas derivadas del cerebro, tales como esterasas y amidasas, y se supone por tanto que los conjugados químicos de las presentes invenciones actúan como profármacos que se metabolizan en el cerebro y por tanto, liberan simultáneamente el fármaco psicotrópico y el ácido orgánico, proporcionando, de esta manera una ventajosa farmacocinética simultánea del fármaco psicotrópico y el ácido orgánico.

- 15 De forma alternativa, el segundo resto químico en los conjugados químicos de la presente invención está unido covalentemente con su primer resto química mediante un enlace imina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “enlace imina” describe un enlace  $-C=NH-$ . Se conoce también en la técnica un enlace imina como una “base de Schiff”.

- 20 En el presente documento, el término “tratar” incluye abrogar, inhibir sustancialmente, retrasar o invertir la progresión de un dolor o evitar sustancialmente el comienzo del un dolor.

El término “administrar” tal como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento para aportar un conjugado químico de la presente invención a una zona o un sitio en el cerebro que tiene un efecto sobre el dolor.

El conjugado químico de la presente invención se puede administrar por vía intraperitoneal. Más preferiblemente, se administra por vía oral.

- 25 El término “sujeto” se refiere a animales, normalmente mamíferos que tienen una barrera hematoencefálica, incluyendo seres humanos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de conjugado químico que se administra que aliviará en alguna extensión la sensación de dolor.

- 30 De esta manera, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de nortriptilina-GABA varía entre 0,05 mg/kg de peso corporal y 20 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre 0,1 mg/kg de peso corporal y 4 mg/kg de peso corporal y lo más preferible entre 0,2 mg/kg de peso corporal y 1,0 mg/kg de peso corporal. Una cantidad terapéuticamente eficaz de fluoxetina-GABA varía entre 1 mg/kg de peso corporal y 40 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre 5 mg/kg de peso corporal y 40 mg/kg de peso corporal y lo mas preferible entre 10 mg/kg de peso corporal y 30 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de los conjugados de la presente invención es menor que la usada por el compuesto progenitor para ejercer un efecto similar.

- 35 Estos conjugados químicos se pueden sintetizar siguiendo el procedimiento general descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 20040242570 y el documento WO2005/092392. La síntesis de los conjugados de acuerdo con este aspecto de la presente invención se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación en el presente documento.

- 40 En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el conjugado químico se puede administrar bien tal como está, o preferiblemente como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, una “composición farmacéutica” se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

- 50 A partir de ahora en el presente documento, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo o un diluyente que no produce irritación significativa a un sujeto y no abroga la actividad y las propiedades biológicas del compuesto administrado. Los ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de solventes orgánicos con agua.

En el presente documento, el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición

farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidones, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de ácido láctico.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

10 Las rutas de administración adecuadas pueden, por ejemplo, incluir la administración oral, rectal, transmucosal, transdérmica, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezcla convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, pulverización, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

15 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular por tanto de una manera convencional utilizando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada es dependiente de la ruta de administración escogida.

20 Para inyección, los conjugados químicos de la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico con o sin solventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol. Para la administración transmucosal, se usan agentes penetrantes en la formulación. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

25 Para la administración oral, los conjugados químicos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten a los conjugados de la presente invención formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Se pueden preparar preparaciones farmacológicas para uso oral utilizando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona, agar, o ácido alginico o una de sus sales tales como alginato de sodio.

35 Los núcleos de grageas van provistos de revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de lacas y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a con revestimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

40 Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar oralmente, incluyen cápsulas duras preparadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas preparadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en premezcla con un relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la ruta de administración escogida.

45 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o comprimidos masticables formulados de manera convencional.

50 Para la administración por inhalación, los conjugados químicos para uso de acuerdo con la presente invención se administran de forma conveniente en la forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, se puede determinar la unidad de dosificación proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los conjugados químicos descritos en el presente documento se pueden formular para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas del compuesto activo en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de tilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los conjugados para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, pirógeno estéril exento de agua, antes del uso.

Los conjugados químicos de la presente invención pueden formularse también en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden comprender también vehículos sólidos en fase gel o excipientes. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de conjugado químico eficaz para evitar, aliviar o mejorar el dolor.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien comprendida dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier conjugado químico usado en los procedimientos de la presente invención, se puede estimar la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos de actividad en cultivos celulares y/o animales. Por ejemplo, se puede evaluar la eficacia de los conjugados sobre ratas que se han sometido a un procedimiento quirúrgico de ligadura de los nervios espinales L5/L6. Específicamente, se diseccionaron los músculos paraespinales izquierdos de las apófisis espinosas a los niveles de L4 a S2 de ratas sometidas a anestesia y se aislaron sus nervios espinales L5 y L6. Se ligó cada nervio espinal estrechamente con, por ejemplo, una sutura de seda 4-0 distal al ganglio de la raíz dorsal. Tras la ligadura del nervio espinal, se suturó la herida, y se cerró la piel. De diez a 14 días después de la ligadura del nervio espinal, las ratas se colocaron normalmente en cámaras de plexiglás individuales sobre una malla de alambre elevada en la que se las permitió aclimatarse. Tras el período de aclimatación, se ensayaron las ratas para la alodinia táctil aplicando una serie de filamentos de von Frey calibrados a los puntos reflejos de la parte trasera izquierda ipsilateral en el sitio de la lesión del nervio. Se determinó el valor promedio del 50 % de retirada (g) [Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, Belzberg AJ. Pain. 2000; 85(3): 493-502]. Las ratas que muestran un umbral de retirada del fármaco > 4 g no se consideran generalmente alodínicas y se excluyen del estudio. Tras la determinación de los umbrales de retirada del fármaco, se pueden tratar las ratas con cualquiera de los conjugados de la presente invención o el vehículo, y se determinan los efectos sobre la alodinia táctil en el tiempo midiendo los umbrales de retirada de la pata trasera durante intervalos de tiempo tales como 30, 60, 90, y 120 min después de la inyección.

Los conjugados de la presente invención se probaron también en ratas o ratones utilizando el ensayo de la placa caliente o la prueba de la formalina tal como se describe a continuación en los Ejemplos 2, 3 y 5 respectivamente.

Se probaron también los conjugados de la presente invención analizando su capacidad para evitar la secreción de citoquinas inflamatorias tal como se describe en el Ejemplo 6 a continuación en el presente documento.

Se puede formular, por ejemplo, una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI50 tal como se determinó mediante los ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración del compuesto de ensayo, que alcanza una inhibición semimáxima de la actividad de proliferación). Dicha información se puede usar para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos.

Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los conjugados químicos descritos en el presente documento mediante procedimientos farmacéuticos normalizados en animales experimentales, por ejemplo, determinando la CI50 y la DL50 (dosis letal que produce la muerte en el 50 % de los animales ensayados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de actividad y estudios animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificaciones para uso en el ser humano.

- Se pueden evaluar los efectos secundarios de los conjugados de la presente invención a dosis que sean eficaces para el alivio del dolor utilizando ensayos normalizados conocidos en la técnica. Por ejemplo, con el fin de investigar los posibles efectos relajantes o sedantes musculares no específicos de la presente invención, ratas o ratones se pueden tratar con los conjugados de la presente invención, y posteriormente probar su motilidad en un rota-rod. Este equipo consiste en una barra con un diámetro de 3,5 cm para ratones y de 7 cm para ratas, subdividida en cuatro compartimentos. La barra rota a una velocidad constante de 0,5-22 revoluciones por minuto y se evalúa el tiempo que tardan en caer los animales desde la barra. Se pueden seleccionar los animales 24 horas antes eliminando aquellos que no permanecen sobre la barra durante 60 segundos. Los resultados se expresan normalmente como el lapso de tiempo que permanecen los animales sobre la barra del rota-rod.
- La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación se pueden escoger por cada médico a cargo del tratamiento a la vista de la dolencia del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1).
- La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos de alivio del dolor, denominados la concentración eficaz mínima (CEM) La CEM variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de datos *in vitro* y/o *in vivo*, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. Se pueden utilizar ensayos o bioensayos de HPLC para determinar las concentraciones en plasma.
- Se pueden determinar también los intervalos de dosificación utilizando el valor de la CEM. Las preparaciones deberían administrarse, lo que mantiene los niveles en plasma por encima de la CEM durante un 10-90 % del tiempo, de manera preferible entre un 30-90 % y lo más preferible un 50-90 %.
- Dependiendo de la gravedad y de la sensibilidad del dolor que se va a tratar, la dosificación puede ser también una única administración de una composición de liberación retardada descrita anteriormente en el presente documento, con un curso de tratamiento que dura de algunos días a algunas semanas o hasta que se efectúa la cura o se consigue la disminución del estado de la enfermedad.
- La cantidad de una composición que se va a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, de la gravedad del dolor, de la manera de administración, el juicio del médico a cargo del tratamiento, etc.
- Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit homologado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede por ejemplo, comprender una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de unas instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede ir acompañado también por un etiquetado asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, dicho etiquetado reflejaría la homologación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración para seres humanos o en veterinaria. Dicho etiquetado, por ejemplo, puede ser un etiquetado homologado por la Oficina federal estadounidense de fármacos y alimentos para los fármacos que se expiden con receta o de un prospecto de producto homologado. Se pueden preparar también composiciones que comprendan los conjugados químicos de la invención formulados en un vehículo farmacéutico compatible, colocados en un recipiente adecuado, y etiquetados para el tratamiento del dolor.
- Por tanto, de acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se envasan en un material de envase y se identifican por una impresión, sobre o en el material de envase, para el alivio del dolor.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación, que comprende una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que se envasa en un material de envase y se identifica por un impreso, en o sobre el material de envase para uso en el tratamiento del dolor, tal como se describe en el presente documento. La composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en el presente documento y cualquiera de los conjugados químicos descritos en el presente documento.
- Cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención que se detallan anteriormente en el presente documento y que se reivindican a continuación en la sección de reivindicaciones encuentra apoyo en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

- Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones, ilustran la invención. En referencia a la síntesis y/o a las pruebas experimentales de conjugados diferentes de GABA con fluoxetina (AN-227) o GABA con nortriptilina (AN-228), no son parte de la invención reivindicada y deberían considerarse como de naturaleza comparativa.

**Ejemplo 1****Preparación de conjugados de GABA de fármacos antidepresivos y antiepilépticos**

**Síntesis del clorhidrato del 4-aminobutiriloximetil éster del ácido 2-propil-pentanoico (ácido valproico) (AN-216):** A una solución del -4-amino-butiriloximetil éster N-t-boc del ácido 2-propil-pentanoico (AN-217, preparada tal como se describe en el documento WO 2005/092392, 1,7 gramos, 4,7 mmol) en acetato de etilo, se añadió una solución de HCl 4 N en acetato de etilo. La mezcla obtenida se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente, se evaporó el solvente a continuación y se secó el residuo adicionalmente a vacío elevado. Se disolvió el residuo en éter, y la adición de hexano condujo a la precipitación del producto deseado AN-216 (0,75 gramos, 62 %) como un sólido amorfo que tiene un punto de ebullición de 35-37° C.

5  
10 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD): δ = 0,9 (t, J= 7,1 Hz, 6H, dos CH<sub>3</sub>), 1,2-1,64 (m, 8H, dos CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Me), 1,95 (q, J= 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,4-2,5 (m, 1H, CHCO), 2,53 (t, J= 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2,99 (t, J= 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5,77 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O).

RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD): δ = 14,2, (dos CH<sub>3</sub>), 21,5 (dos MeCH<sub>2</sub>), 23,5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31,3 (COCH<sub>2</sub>), 35,5 (dos CH<sub>2</sub>CH), 39,9 (NCH<sub>2</sub>), 46,2 (CH), 80,6 (OCH<sub>2</sub>O), 172,5 (CH<sub>2</sub>CO), 176,4 (CHCO<sub>2</sub>).

15 MS (Cl/NH<sub>3</sub>): m/z (%) = 260 (MH<sup>+</sup>, 100).

**Síntesis del clorhidrato de N-(3-(4-(trifluorometil)fenoxi)-3-fenilpropil)-4-amino-N-metilbutanamida (AN-227):**

Se preparó 3-(N-(3-(4-(trifluorometil)fenoxi)-3-fenilpropil)-N-metil carbamoil)propilcarbamoato de terc-butilo (AN-229) tal como se describe en el documento WO 2005/092392. Se añadió AN-229 (0,5 mmol) a una solución de HCl en EtOAc (35 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 3 horas. Se evaporó el solvente a continuación y se obtuvo el producto, AN-227, con un rendimiento cuantitativo.

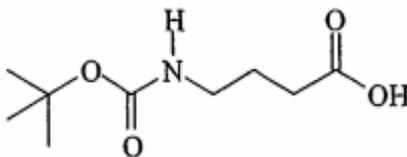
20 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,9 (quint, J= 7,25 Hz, 2H), 2,52 (t, J= 6,9 Hz, 2H), 2,87 (m, t J = 7,38 Hz, 2H, menor), 2,93 (s, 3H, NMe menor), 2,97 (t, J = 7,13 Hz, 3H, NMe, mayor), 3,03 (s, 3H, mayor), 3,59-3,67 (m, 2H), 5,37 (dd, J= 8,6, 4,18 Hz, 1H, mayor), 5,42 (dd, J= 8,57, 4,12 Hz, 1H, menor), 6,99-7,05 (m, 2H), 7,24-7,49 (m, 7H) ppm.

25 RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 23,7 (mayor), 23,9 (menor), 30,9 (menor), 31,5 (mayor), 33,8 (menor), 36,1 (mayor), 37,1 (mayor), 37,9 (menor), 40,42, 46,3 (mayor), 47,5 (menor), 78,5 (menor), 79,4 (mayor), 117,2, 124,1, 127,3, 127,8, 129,0 (mayor), 129,2 (menor), 129,7, 129,9 ppm.

**Síntesis del clorhidrato de 10,11-dihidro-5-(3-metilaminopropilideno)-5H-dibenzo[a,d][1,4]ciclohepteno 4-Amino-N-butanamida (AN-228):**

30 Se preparó 3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] cicloheptano-5-ilideno-N-metil-1-propanamina-3-(metilcarbamoil) propil carbamoato de terc-butilo (AN-230) tal como se describe en el documento WO 2005/092392. Se añadió AN-230 (0,5 mmol) a una solución de HCl en EtOAc (35 ml) y se agitó la mezcla resultantes durante 3 horas. Se evaporó el solvente a continuación y se obtuvo el producto con un rendimiento cuantitativo en la forma de dos rotámeros.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,67 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 1,8 (t, J = 7,07 Hz, 1H), 2,1-2,35 (m, 2H), 2,4 (q, J=6,7 Hz, 2H), 2,6-2,9 (m, 5H), 3,3-3,4 (m, 2H), 5,76 (dt, J= 7,86, 7,76 Hz, 1H), 6,7-7,3 (m, 8H) ppm.

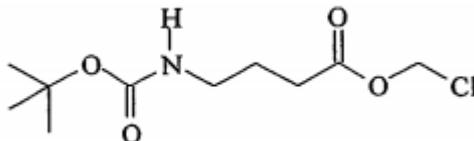
**Síntesis de GABA oximetilGABA (AN-214): Preparación de ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-butírico:**

40 A una solución de ácido γ-aminobutírico (1 equivalente) en t-BuOH (4 ml/gramo) y H<sub>2</sub>O (3 ml/gramo) se añadió NaOH (1 equivalente), BOC<sub>2</sub>O (1 equivalente), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporó el solvente a continuación y el residuo se repartió entre hexano y agua. La capa acuosa se acidificó con KHSO<sub>4</sub> 1 N hasta alcanzar pH = 2 y se extrajo a continuación con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se el solvente evaporó para dar el producto deseado como un sólido de color blanco (rendimiento del 85 %).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) CDCl<sub>3</sub>: δ = 1,44 (s, 9H, t-Bu), 1,81 (quint, J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,37 (t, J= 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 3,17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4,71 (bs, 1H, NH) ppm.

45 RMN <sup>13</sup>C (200 MHz) CDCl<sub>3</sub>: δ = 25,3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28,4 (Me<sub>3</sub>C), 31,1 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 39,7 (CH<sub>2</sub>NH), 79,65 (CMe<sub>3</sub>), 156,2 (NCO<sub>2</sub>), 176,9 (CO<sub>2</sub>H) ppm.

MS (Cl/NH<sub>3</sub>): m/z (%) = 204 (MH<sup>+</sup>, 24,3), 148 (MH<sup>+</sup>- C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>, 100), 130 (MH<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O).

**Preparación del éster clorometílico del ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-butírico**

5 A una mezcla de clorosulfato de clorometilo (1,1 equivalente) y ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-butírico (1 equivalente) se añadió  $\text{NaHCO}_3$  (3,6 equivalentes) y  $\text{Bu}_4\text{NH}_2\text{SO}_4$  (cantidad catalítica) en agua/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se separó la fase orgánica a continuación y la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (tres veces). La capa orgánica combinada se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (x 3), salmuera (x 3), se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó.

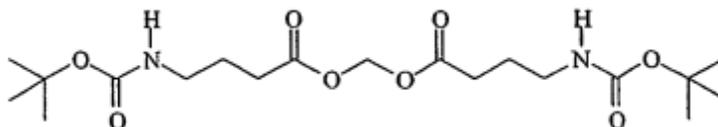
El producto se purificó mediante cromatografía instantánea, utilizando una mezcla 5:1 de hexano:EtOAc como eluyente, y se aisló como un aceite de color amarillo (rendimiento del 64 %).

10 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  = 1,44 (s, 9H, t-Bu), 1,86 (quint,  $J$  = 6,3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,44 (t,  $J$  = 6,93 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 3,18 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4,75 (bs, 1H, NH), 5,69 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ) ppm.

RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz)  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  = 24,9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 28,3 ( $\text{Me}_3\text{C}$ ), 31,1 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 39,4 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 68,6 ( $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 79,2 ( $\text{CMe}_3$ ), 155,9 ( $\text{NCO}_2$ ), 171,3 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) ppm.

MS (ES+):  $m/z$  (%) = 274 ( $\text{MNa}^+$ , 40,6), 252 ( $\text{MH}^+$ , 40,2), 196 ( $\text{MH}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$ , 25,9).

15 **Preparación del 4-terc-butoxicarbonilamino-butiroloximetil éster del ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-butírico:**



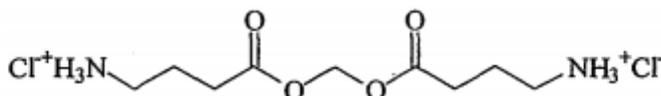
20 Una mezcla de ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-butírico (1,2 equivalentes) y del éster clorometílico descrito anteriormente (1 equivalente) en etilmetilcetona seca (EMK) se agitó en atmósfera de nitrógeno a la vez que se añadía trietilamina (1,2 equivalentes) gota a gota, y la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante la noche. El precipitado de color blanco formado se filtró a continuación, se lavó con EtOAc y se evaporó el filtrado. Se disolvió el residuo en EtOAc y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  (x 3) y salmuera (x 3), se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó. El producto bruto (aceite de color marrón) se purificó mediante cromatografía instantánea, utilizado una mezcla 8:1 de hexano:EtOAc como eluyente, para dar el producto deseado como un aceite de color amarillo (rendimiento del 38%).

25 RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,44 (s, 18H, dos t-Bu), 1,83 (quint,  $J$  = 7,1 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,41 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 3,16 (t,  $J$  = 6,8 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4,67 (bs, 2H, dos NH), 5,75 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ppm.

RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 25,0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 28,4 ( $\text{Me}_3\text{C}$ ), 31,1 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 39,7 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 79,3 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 155,9 ( $\text{NCO}_2$ ), 172,9 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ) ppm.

MS (ES+):  $m/z$  (%) = 441 ( $\text{MNa}^+$ , 17,3), 319 ( $\text{MH}^+ - \text{BOC}$ , 19), 196 ( $\text{MH}^+ - \text{BOC} - \text{C}_4\text{H}_8$ , 25,9).

30 **Preparación del diclorhidrato del 4-amino-butiroloximetiléster del ácido 4-amino-butírico**



35 A una solución del compuesto protegido con N-terc-Boc en EtOAc, se añadió una solución de HCl 4 N en EtOAc. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente y el solvente se evaporó a continuación para dar el producto bruto. El producto bruto se recrystalizó a partir de una mezcla de MeOH-éter, se filtró y se secó en  $\text{P}_2\text{O}_5$  a vacío para dar el producto bruto como un sólido de color blanco (rendimiento del 90 %).

pf: 155-158° C.

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1,96 (quint,  $J$  = 7,37 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2,55 (t,  $J$  = 7,15 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 2,99 (t,  $J$  = 7,6 Hz, 4H, dos  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 5,76 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) ppm.

40 RMN  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 23,4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 31,3 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ), 39,9 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 80,8 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 172,7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_2$ ).

MS (ES+): m/z (%) = 219 (MH<sup>+</sup>, 100), 242 (MNa<sup>+</sup>, 90), 104 (MH<sup>+</sup>-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N, 85) ppm.

La Tabla 1 siguiente presenta los conjugados químicos sintetizados mediante los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento.

Tabla 1

<b>AN-214</b> GABA oximetilGABA	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 291,17	
<b>AN-216</b> GABA-oximetilvalproato	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>4</sub> 295,80	
<b>AN-227</b> Fluoxetina-GABA	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 430,16 C, 58,54; 6,08; Cl, 8,23; F, 13,23; N, 6,50; O, 7,43	
<b>AN-228</b> Nortriptilina-GABA	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>2</sub> O 384,2 C, 71,76; H, 7,59; Cl, 9,21; N, 7,28; O, 4,16	

## 5 Ejemplo 2

### **Efectos del fármaco antidepresivo de GABA y de los conjugados del fármaco antiepiléptico de GABA según se determinaron mediante la prueba de la placa caliente**

Se evaluó la percepción central del dolor mediante la respuesta analgésica en una placa caliente. La prueba de la placa caliente utilizada para medir la latencia en respuesta al calor se llevó a cabo esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito por Eddy y Leimbach (1953), con los

#### **Materiales y procedimientos**

**Animales:** Se obtuvieron ratones Balb-c macho (8-14 semanas de edad) de Harlan, Israel. Los ratones se alojaron en condiciones de temperatura ( $23 \pm 3^\circ \text{C}$ ) y humedad ( $55 \pm 15\%$ ) controladas con un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices éticas de la International Association for the Study of Pain, y del Committee on the Care and Use of Laboratory Animals de la Universidad de Tel Aviv.

**Procedimiento experimental:** Nortriptilina (Sigma, Aldrich), fluoxetina, GABA (Sigma, Israel), el conjugado de Nortriptilina-GABA (AN-228), el conjugado de fluoxetina-GABA (AN-227) y el conjugado de valproiloximetil-GABA (AN-216) se solubilizaron en solución salina y se administró a los ratones mediante sonda gástrica. Tras los periodos de tiempo indicados, los animales se colocaron sobre una placa caliente, (MRC, modelo-MH-4, 230 V / 50 Hz, 750 W) que se mantuvo a  $52 \pm 1^\circ \text{C}$ . Se detectó el tiempo de respuesta a la sensación térmica mediante una o más de las siguientes reacciones: levantamiento de la pata, lamido de la pata, saltar o correr. Se midió la reacción de antinocicepción o analgesia como la latencia de retirada evocada por la exposición de las patas de los ratones al estímulo térmico. Se recogieron los datos en los siguientes puntos temporales: -60, 0, 120, 180, 240, y 300 minutos tras la administración de los fármacos.

**Análisis estadístico:** Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  SD. Los datos se analizaron mediante el test de la t de Student. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### **Resultados experimentales**

Se trataron ratones Balb-c macho (6/grupo) p.o. con las dosis indicadas de nortriptilina, las respectivas dosis equimolares de conjugado de nortriptilina-GABA o el vehículo. Dos horas después, los animales se colocaron sobre la superficie de la placa caliente ( $52 \pm 1^\circ \text{C}$ ). Se registró la respuesta al calor, manifestada por la agitación o el lamido de las patas, o el salto, como el índice de latencia en respuesta.

Tal como se ilustra en la Figura 1, 1,05 mg/kg de nortriptilina fueron significativamente menos eficaces dos horas después de la administración que una dosis equimolar de su conjugado de GABA. A esta dosis, nortriptilina no difiere significativamente ( $p > 0,05$ ) de los ratones del control tratados únicamente con el vehículo. A la dosis de 4,5 mg/kg, nortriptilina y una dosis equimolar de su conjugado de GABA mostraron un significativo retraso en la respuesta en comparación con los ratones del control tratados con el vehículo ( $p < 0,05$ ). Estos resultados demuestran que el conjugado de GABA-nortriptilina impartió actividad antinociceptiva a una concentración más baja que la nortriptilina, demostrando su ventaja. Se observó saturación en respuesta a la nortriptilina GABA ya que una dosis equimolar de 0,5 mg/kg no difiere significativamente de una dosis equimolar de 4,5 mg/kg.

En las Figuras 2A-B se muestra el curso temporal de la respuesta al calor de los ratones tratados con nortriptilina (0,25 mg/kg y 0,5 mg/kg) y una dosis equimolar de nortriptilina-GABA (0,32 mg/kg y 0,64 mg/kg, respectivamente). A una dosis de 0,25 mg/kg, 4 horas después del tratamiento, el efecto analgésico de nortriptilina y su conjugado de GABA aumentó significativamente la latencia de la respuesta en comparación con ratones no tratados (Figura 2A). Los conjugados presentaron un retraso significativamente mayor en la respuesta con respecto a los ratones no tratados a las 4 y 6 horas después del tratamiento, y a las 4 horas su efecto antinociceptivo fue significativamente mayor que el de nortriptilina. Esto indica que nortriptilina-GABA, en comparación con nortriptilina es un fármaco analgésico más potente y su efecto es más duradero. Dos horas después de un tratamiento de 0,5 mg/kg, el conjugado produjo un efecto antinociceptivo significativo (en comparación con nortriptilina y los ratones tratados con el vehículo) tal como se ilustra en la Figura 2B. Por otra parte, nortriptilina no conjugada impartió una latencia significativa (en comparación con los animales tratados con el vehículo) después solo de 4 horas. Esto indica que el resto de GABA adicional no solo aumenta la actividad antinociceptiva, sino que también acelera el comienzo del efecto protector.

El efecto del tratamiento oral repetido con los fármacos en respuesta al calor se ensayó en ratones (6/grupo) para nortriptilina (0,2 mg/kg) y su conjugado de GABA (AN-228) en dosis equimolares. Se administraron los fármacos diariamente durante 15 días y se midió el efecto del tratamiento sobre la sensación del calor tres veces a la semana. Tal como se ilustra en la Figura 3A, durante la primera semana, la respuesta de los animales a la sensación de calor antes del tratamiento (tiempo 0), no difiere y no se vio afectada por el tratamiento. A partir del octavo día, se señaló una latencia sostenida en la respuesta antes del tratamiento y principalmente para el conjugado de nortriptilina-GABA y en una menor extensión en los ratones tratados con nortriptilina. A partir del tercer día de tratamiento y durante las cinco horas de la prueba (Figuras 3B-R), normalmente, el conjugado impartió un efecto antinociceptivo significativamente mejor en comparación con los animales no tratados o los animales tratados con nortriptilina. Se observó un efecto antinociceptivo significativamente mejorado en comparación con los animales no tratados y los tratados con nortriptilina 4 y 5 h después del tratamiento con la dosis diaria a partir del primer día de tratamiento. Los resultados indican que el conjugado de nortriptilina-GABA produjo una respuesta analgésica sostenida y más eficaz que nortriptilina. La administración repetida acortó el comienzo del efecto antinociceptivo así como aumento la latencia de la respuesta.

Se probaron los efectos antinociceptivos de la SSRI fluoxetina y su conjugado de GABA (AN-227) y se compararon con la prueba de la placa caliente. En la Figura 4 se muestra el curso temporal de la respuesta al calor en ratones tratados con fluoxetina (10 mg/kg) y una dosis equimolar de fluoxetina-GABA. A las 2, 3 y 4 horas después del tratamiento, el efecto analgésico del conjugado de fluoxetina-GABA sobre ratones fue significativamente mayor que en los ratones no tratados o los ratones tratados con una dosis equimolar de GABA o fluoxetina. La observación indica que fluoxetina-GABA, en comparación con fluoxetina es un analgésico más potente y su efecto es más duradero.

Se probó el efecto del tratamiento repetido con fluoxetina y su conjugado de GABA en la respuesta al calor. Los resultados se indican en las Figuras 5A-E. La fluoxetina (10 mg/kg) y su conjugado en una dosis equimolar se proporcionaron por vía oral a los ratones diariamente durante 11 días y se probó el efecto del tratamiento sobre la sensación de calor en los días 3, 7, 9 y 11. Se señaló una respuesta retrasada a la sensación de calor en ratones que recibían fluoxetina-GABA en los días 3, 9 y 11 antes del tratamiento (Figura 5A). Se señaló un retraso únicamente en el día 11 en ratones tratados con fluoxetina en comparación con los animales tratados con el vehículo. Normalmente durante los 11 días de tratamiento, el conjugado de GABA-fluoxetina ejerció un efecto antinociceptivo significativamente mejorado en comparación con fluoxetina o los animales no tratados. Los ratones tratados con fluoxetina mostraron también un efecto antinociceptivo significativamente mejor en comparación con los animales no tratados. Los resultados indican que el conjugado de fluoxetina-GABA produjo una respuesta analgésica duradera y más eficaz que la fluoxetina.

Los fármacos antiepilépticos, que abarcan valproato y GABA y sus análogos, han demostrado ser analgésicos eficaces. Como el ácido valproico cruza la BHE, un conjugado de valproato-GABA podría transportar el GABA al cerebro y el GABA a su vez podría potenciar la actividad del ácido valproico. 3, 4 y 5 horas después de la administración oral de 0,2 mg de valproiloximeetil GABA, se observó una latencia significativa en respuesta a la sensación de calor en comparación con los ratones del control no tratados, tal como se ilustra en la Figura 6. En paralelo, GABA administrado a una dosis mayor de > 10 veces (2,39 mg/kg), no tuvo actividad.

Se evaluó también un conjugado que comprendía dos GABA independientes (AN-214) respecto de sus actividades de alivio del dolor. Se trataron por vía oral ratones Balb/c macho durante 5 días consecutivos con uno de

GABAoximetilGABA (n=11), una dosis molar equivalente de valproiloxietil GABA (n=11) o el vehículo (n=8). Tal como se ilustra en la Figura 7, no se detectó actividad antinociceptiva durante el periodo completo.

La administración crónica de GABA no tuvo nunca un efecto acumulativo sobre la analgesia ni contribuyó al efecto antinociceptivo tal como se ilustra en la Figura 8. Se trataron los ratones por vía oral durante 5 días consecutivos con tres diferentes dosis de GABA. No se detectó actividad antinociceptiva durante el periodo completo.

### **Ejemplo 3**

#### **Efectos del fármaco antidepressivo de GABA y de los conjugados del fármaco antiepiléptico de GABA según se determinaron mediante la prueba de la formalina**

Se utilizó la inyección intraplantar de formalina para evaluar la segunda fase periférica del dolor.

#### **10 Materiales y procedimientos**

**Animales:** Se obtuvieron ratones Balb-c de 10 y 12 semanas de edad procedentes de Harlan, Israel. Los ratones se alojaron en condiciones de temperatura ( $23 \pm 3^\circ \text{C}$ ) y humedad ( $55 \pm 15\%$ ) controladas con un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad. Se llevaron a cabo todos los experimentos de acuerdo con las directrices éticas de la Association for the Study of Pain, y del Committee on the Care and Use of Laboratory Animals de la Universidad de Tel Aviv

#### **15 Procedimiento experimental**

**(A) Fluoxetina:** Se utilizaron cinco ratones en cada grupo y tres horas después de la administración oral de cualquiera de fluoxetina (10 o 30 mg/kg) o dosis equimolares del conjugado de fluoxetina (AN-227), se inyectó una solución de formalina al 1% por vía subcutánea en la superficie dorsal de la pata trasera derecha.

**(B) Nortriptilina:** Se utilizaron ocho ratones en cada grupo y tres horas después de la administración oral de cualquiera de nortriptilina (0,5 o 5 mg/kg) o dosis equimolares del conjugado de nortriptilina (AN-228), se inyectó por vía subcutánea una solución de formalina al 1% en la superficie dorsal de la pata trasera derecha.

La formalina indujo un comportamiento típico de estremecimientos bifásicos de la pata inyectada. Se devolvieron los animales a la cámara de vidrio y se contó el tiempo total que el animal pasó lamiendo o mordiendo la pata inyectada. Se registró la frecuencia de los comportamientos relacionados con el dolor durante la fase temprana (0-5 min después de la inyección) y la fase tardía (25-35 min después de la inyección)

#### **25 Resultados experimentales**

Tal como se ilustra en las Figuras 9A-B, ambas dosis de los conjugados de fluoxetina de la presente invención disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la respuesta neurogénica temprana al dolor en comparación con la fluoxetina sola, y la dosis mayor del conjugado de fluoxetina (equivalente a 30 mg/kg) redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la respuesta periférica inflamatoria tardía. Tal como se ilustra adicionalmente en las Figuras 10A-B, ambas dosis de conjugados de nortriptilina (equivalente de 0,5 y 5 mg/kg) de la presente invención disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la respuesta neurogénica temprana y la respuesta periférica inflamatoria tardía al dolor en comparación con la nortriptilina sola.

### **35 Ejemplo 4**

#### **Efectos del conjugado de GABA-fluoxetina según se determinaron mediante la prueba del edema de la pata inducido por carragenato**

Se utilizó la inyección intraplantar de carragenato para evaluar los efectos antiinflamatorios del conjugado de GABA-fluoxetina (AN-227).

#### **40 Materiales y procedimientos**

**Procedimiento experimental:** Se marcaron ratas Wistar (340-400 g) con un marcador permanente en el tobillo de su pata trasera izquierda para definir el área de la pata que se iba a vigilar. Se trataron las ratas p.o. con 40 mg/kg de fluoxetina (n=8) y una concentración equimolar de fluoxetina GABA (n=6) y vehículo del control (b=8). Después de tres horas, se indujo el edema de la pata inyectando 100  $\mu\text{l}$  de una solución al 1 % de  $\lambda$ -carragenato (Sigma, EE.UU.) en solución salina normal en la superficie plantar de la pata trasera izquierda de las ratas. Se midió el área del edema inducido 2 y 4 horas después usando un calibre. La actividad antiinflamatoria se expresó como el área del edema calculado por la medida de su longitud y anchura ( $\text{área} = \text{LXW}$ ).

**Resultados experimentales**

El conjugado de fluoxetina-GABA de la presente invención redujo el edema a las dos horas y a las cuatro horas en comparación con el control y la fluoxetina sola (Figura 11). Mientras que 40 mg/kg de fluoxetina no tuvieron efecto sobre la reducción del área de la inflamación, el conjugado de fluoxetina GABA redujo significativamente el área de la inflamación. Aunque en este modelo animal elevadas dosis de fluoxetina demostraron anteriormente reducir la respuesta de edema en ratas (Omar y col. Pharmacol. Res. 49 (2004) 119-131), el presente ejemplo enseña que en una comparación en paralelo, el conjugado de fluoxetina GABA actúa a una dosis más baja.

**Ejemplo 5**

**Efectos del conjugado del fármaco GABA-nortriptilina en comparación con gabapentina y nortriptilina según se midieron mediante la prueba del edema de la pata inducido por carragenato y la prueba de la placa caliente**

Se utilizaron la inyección intraplantar de carragenato y la prueba de la placa caliente para evaluar los efectos antiinflamatorios de GABA-nortriptilina en comparación con nortriptilina sola y con gabapentina (ácido 1-(aminometil)ciclohexanoacético).

**Materiales y procedimientos**

**Procedimiento experimental:** Se dividieron ratas Wistar de 12 semanas de edad (250-300 g; Harlan, Israel) en cuatro grupos (n=8-10) y se trataron de la siguiente forma:

1. Control – vehículo
2. 5 mg/kg de nortriptilina, po. (14 mg + 2,8 ml de DDW)
3. Nortriptilina-GABA (AN-228) equivalente molar para 5 mg/kg, po, ((14,4 mg \* 1,28) 18,432 mg + 2,8 ml DDW).
4. 100 mg/kg de gabapentina, po.

Se marcaron ratas Wistar (250-300 g) con un marcador permanente en el tobillo de la pata trasera izquierda para definir el área de la pata que se iba a vigilar. Se trataron las ratas tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Después de tres horas, se indujo el edema de la pata inyectando 100 µl de una solución al 1 % de λ-carragenato (Sigma, EE.UU.) en solución salina normal en la superficie plantar de la pata trasera izquierda de las ratas. Se midió el área del edema inducido utilizando un calibre en los puntos temporales especificados. Se midió la actividad antiinflamatoria analizando el aumento en altura.

Se ensayaron también los animales sobre la placa caliente a -60, 0, 120, 240 min, 24 h y 48 horas.

**Resultados experimentales**

Tal como se ilustra en la Figura 12, se señaló una respuesta significativamente retrasada a la sensación de calor en las ratas que recibían nortriptilina-GABA en comparación con nortriptilina sola y gabapentina 4 horas después de la inyección.

Tal como se ilustra en la Figura 13A, la altura de la pata fue significativamente menor en ratas que habían recibido nortriptilina-GABA en comparación con nortriptilina sola y el control a las 4 horas, 24 horas y 48 horas después de la inducción del edema. Tal como se ilustra en la Figura 13B, la altura de la pata fue significativamente menor en ratas que habían recibido nortriptilina-GABA en comparación con nortriptilina sola, gabapentina y el control a las 24 horas y 48 horas después de la inducción del edema.

**Ejemplo 6**

**Efectos del conjugado de GABA-nortriptilina en comparación con gabapentina y nortriptilina según se determinó mediante la secreción de la citoquina inflamatoria**

Se utilizó la secreción de citoquina para evaluar los efectos antiinflamatorios de GABA-nortriptilina (AN-228) en comparación con nortriptilina sola o gabapentina (ácido 1-(aminometil)ciclohexanoacético).

**Materiales y procedimientos**

**Medida de TNF-α e INF-γ en la piel de la pata de ratones:** - Se dividieron ratones Balb-c en cuatro grupo (n=8). Dos horas antes de la inyección de formalina se trataron por vía oral con 0,5 mg/kg de nortriptilina, una dosis equimolar de AN-228 nortriptilina-GABA, una mezcla de 0,5 mg/kg de nortriptilina y una dosis equimolar de GABA, y 50 mg/kg de gabapentina. Después de 4 horas los ratones se sacrificaron y los tejidos procedentes del sitio de la inyección se recogieron y se analizaron para determinar su contenido en TNF-α o INF-γ. Los tejidos recogidos se homogeneizaron en 300 µl de PBS frío en hielo que contenía NaCl 0,4 mM, Tween 20 al 0,05 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM (PMSF) y un cóctel inhibidor de la proteasa 0,1 mM (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). El homogenado se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4º C. Se retiró el sobrenadante, que se evaluó mediante el kit ELISA de TNF-α de ratón (BD OptEIA, CA, EE.UU.) y el inmunoensayo INF-γ de ratón (R&D Systems,

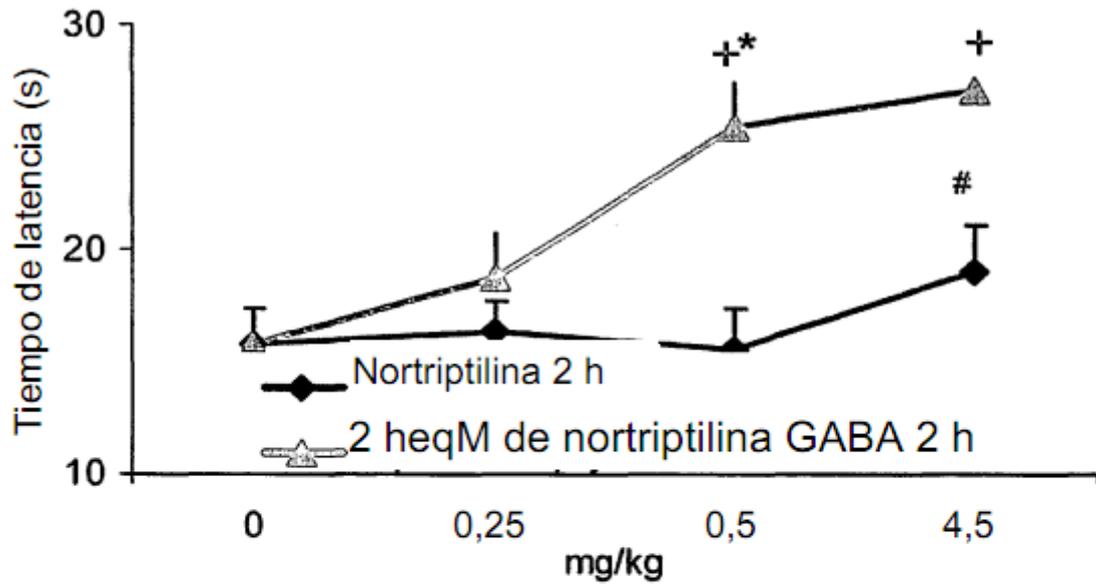
Minneapolis, MN, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresan como ng de TNF- $\alpha$  o INF- $\gamma$  por mg de proteína).

**Resultados experimentales**

5 La cantidad de INF- $\gamma$  (Figura 14A) y TNF- $\alpha$  (Figura 14B) fue significativamente menor en ratones tratados con AN-228 nortriptilina-GABA que en ratones tratados con una dosis equimolar de nortriptilina o una dosis equimolar de nortriptilina + GABA.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente con un segundo resto químico, en el que dicho primer resto químico se selecciona entre el grupo que consiste en nortriptilina y fluoxetina y además en el que el segundo resto químico es GABA, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un dolor.
- 10 2. Un artículo de fabricación que comprende una composición farmacéutica que está envasada en un material de envase e identificada con una impresión en o sobre dicho material de envase para uso en el tratamiento del dolor, incluyendo dicha composición farmacéutica un vehículo farmacéuticamente aceptable y, como principio activo, un conjugado químico que comprende un primer resto químico unido covalentemente con un segundo resto químico, en el que dicho primer resto químico se selecciona entre el grupo que consiste en nortriptilina, y fluoxetina y además en el que dicho segundo resto químico es GABA.
3. Uso de un conjugado químico de nortriptilina-GABA para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un dolor.



\* Nortriptylina frente a nortriptylina-GABA  $p < 0,05$

# Nortriptylina frente al control  $p < 0,05$

+ Nortriptylina GABA frente al control  $p < 0,05$

**Fig. 1**

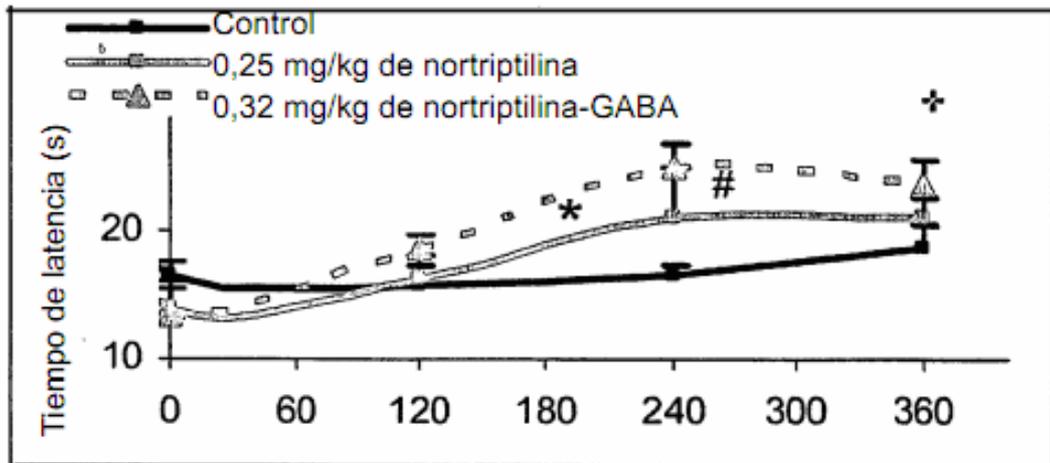
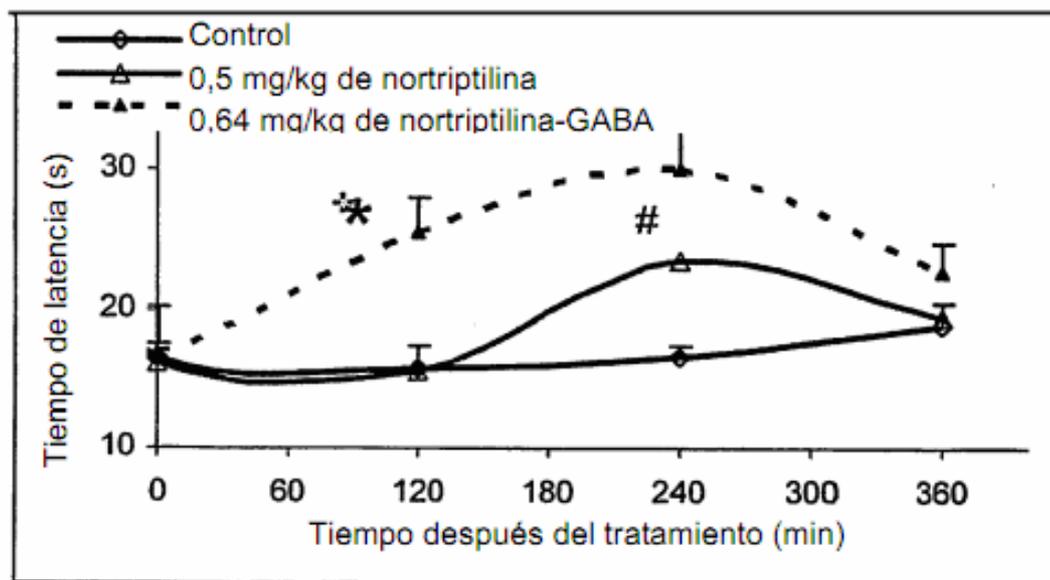


Fig. 2a



\* Nortriptylina frente a nortriptylina GABA  $p < 0,05$

# Nortriptylina frente al control  $p < 0,05$

+ Nortriptylina GABA frente al control  $p < 0,05$

Fig. 2b

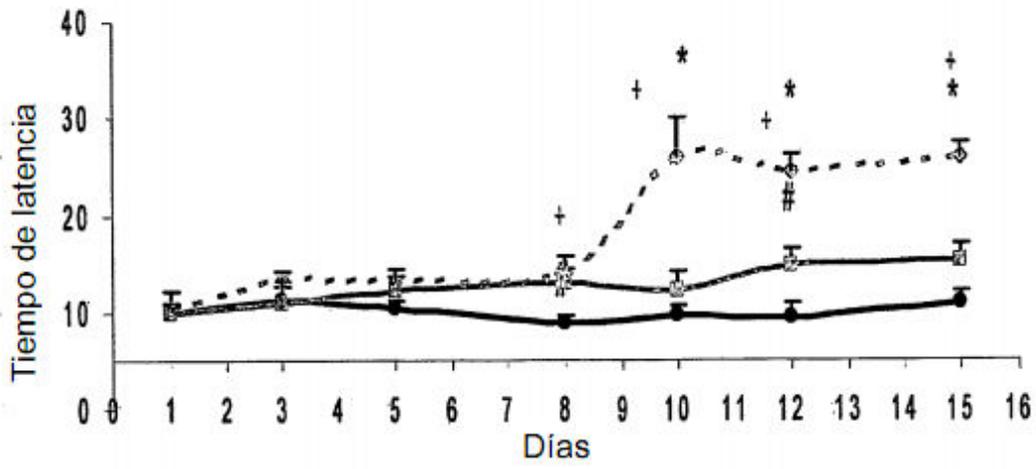


Fig. 3a

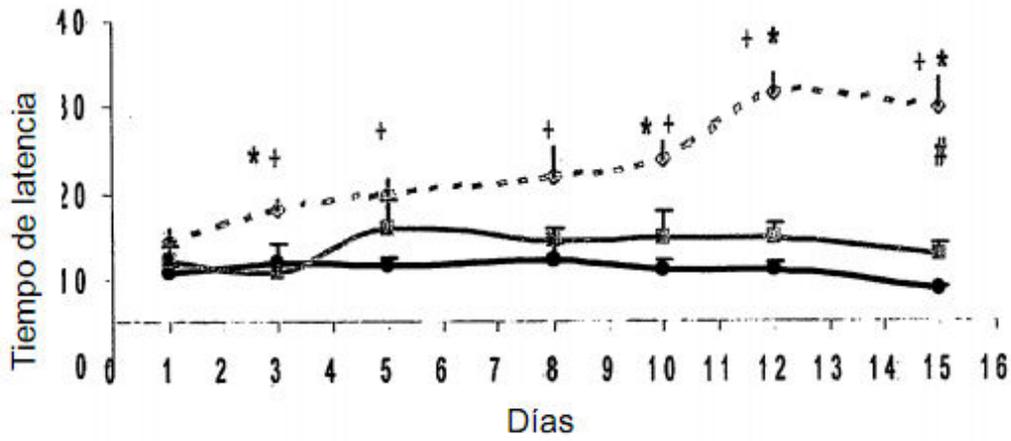


Fig. 3b

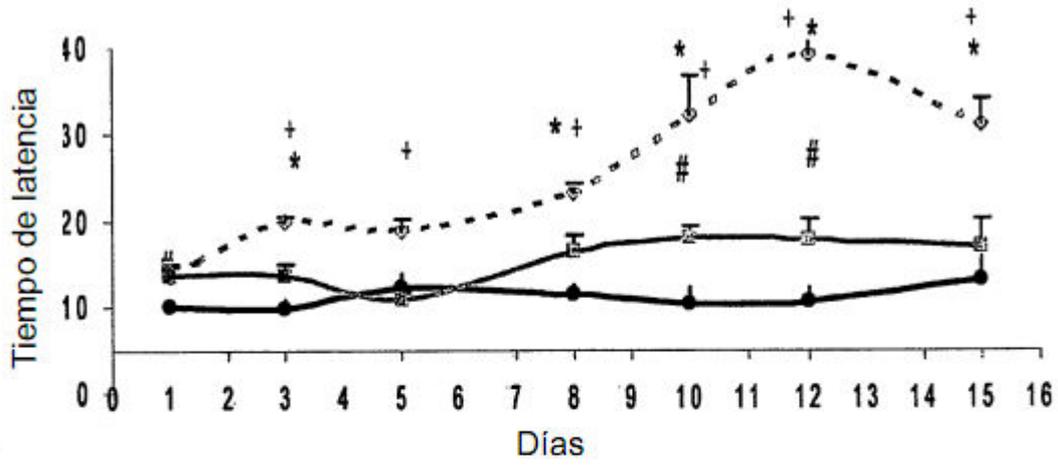


Fig. 3c

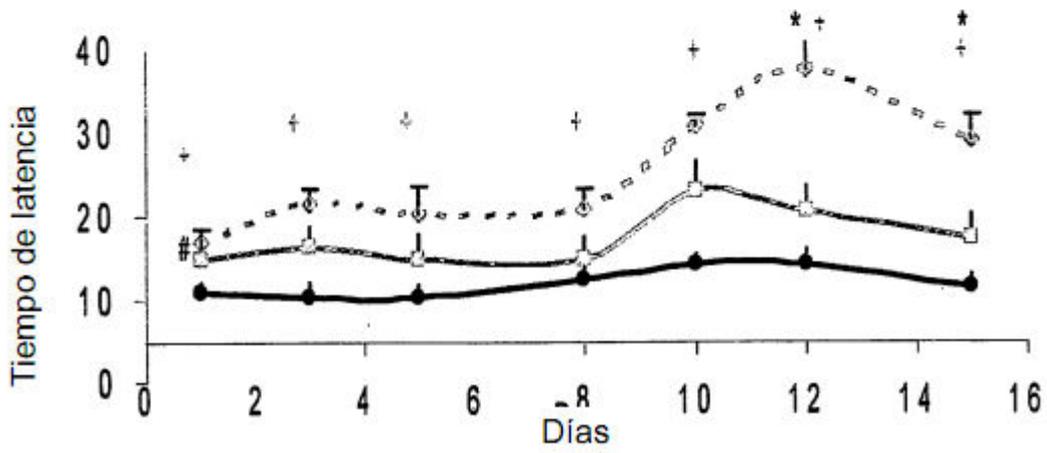


Fig. 3d

Tiempo

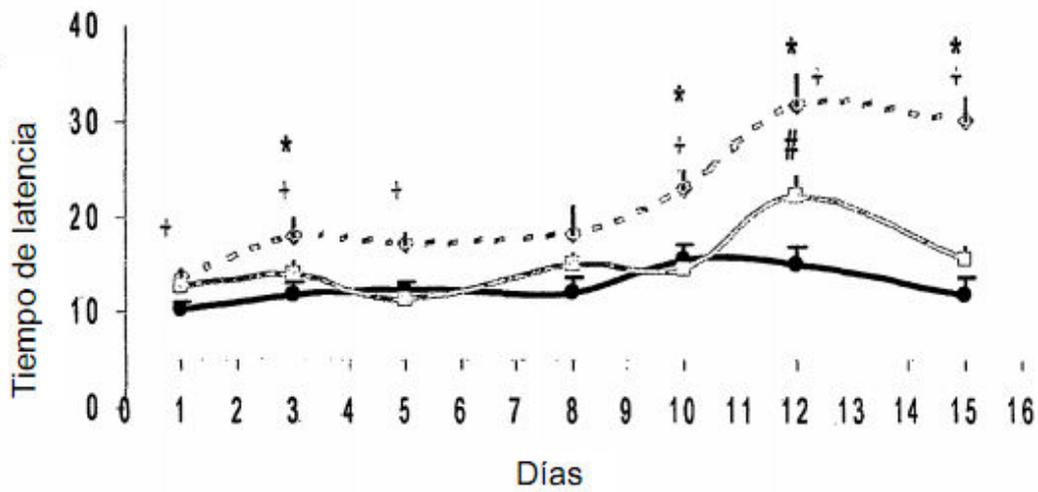


Fig. 3e

—●— **Control**

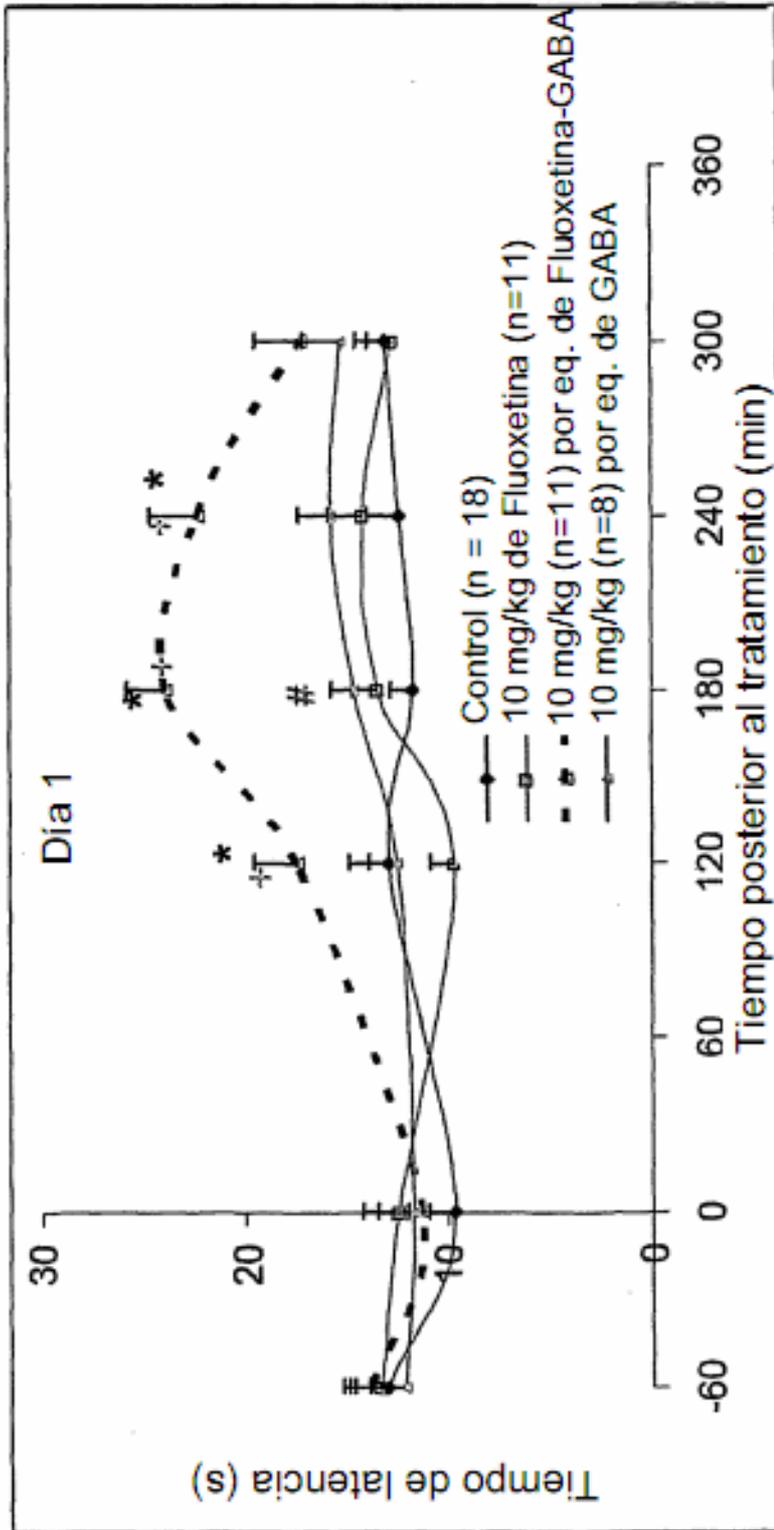
—■— 0,2 mg/kg de nortriptilina

- × - 0,2 mg/kg por eq de nortriptilina-GABA

\* Nortriptilina frente a nortriptilina-GABA  $p < 0,05$

# Nortriptilina frente al control  $p < 0,05$

+ Nortriptilina GABA frente al control  $p < 0,05$



\* Fluoxetina frente a Fluoxetina GABA  $p < 0,05$   
 # Fluoxetina frente al control  $p < 0,05$   
 + Fluoxetina GABA frente al control  $p < 0,05$

Fig. 4

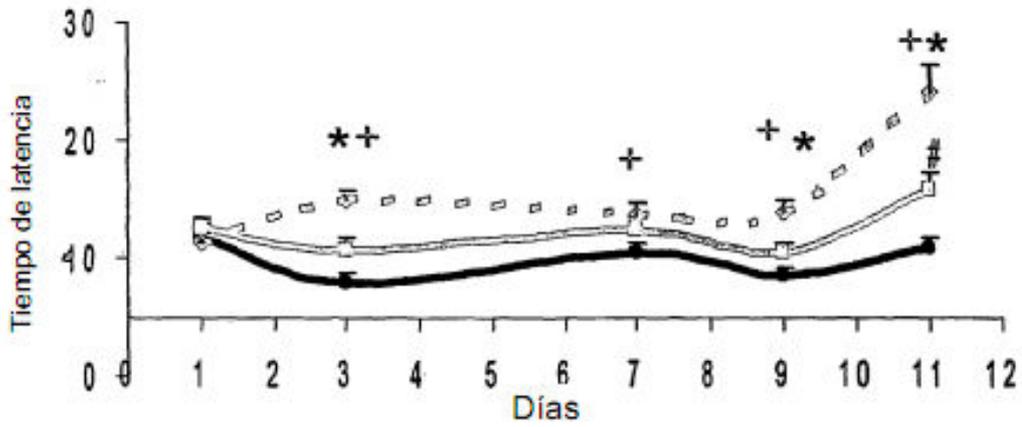


Fig. 5a

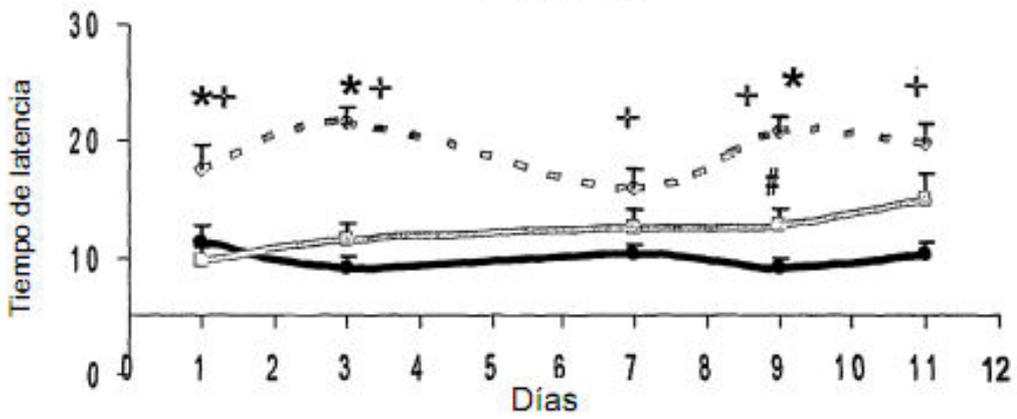


Fig. 5b

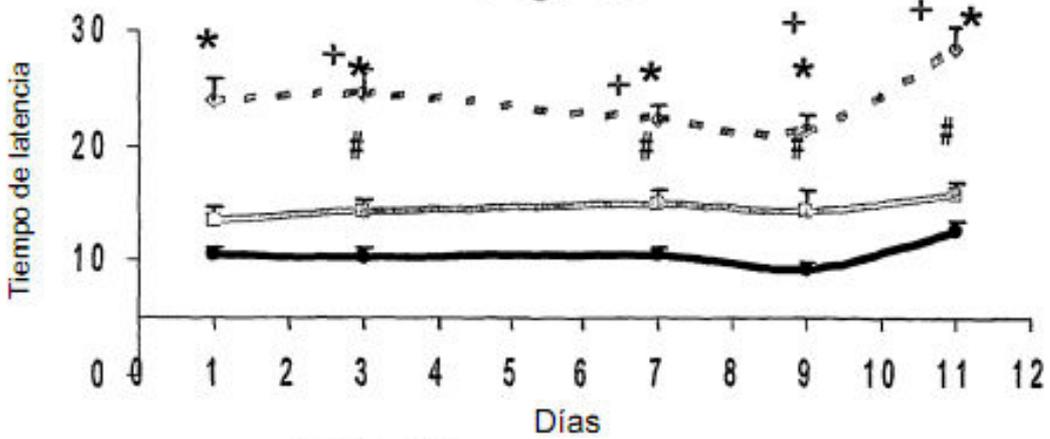


Fig. 5c

Días

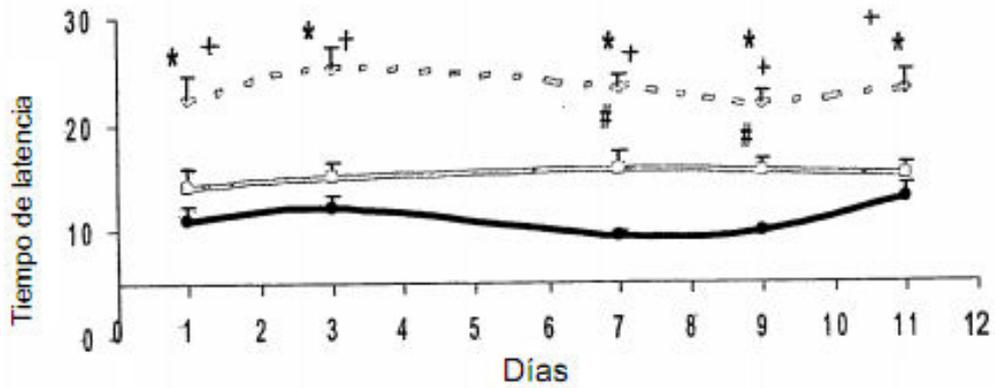


Fig. 5d

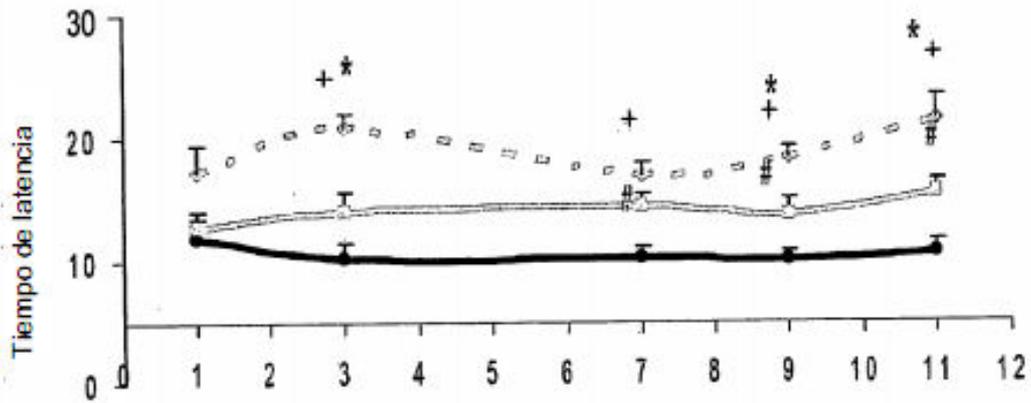


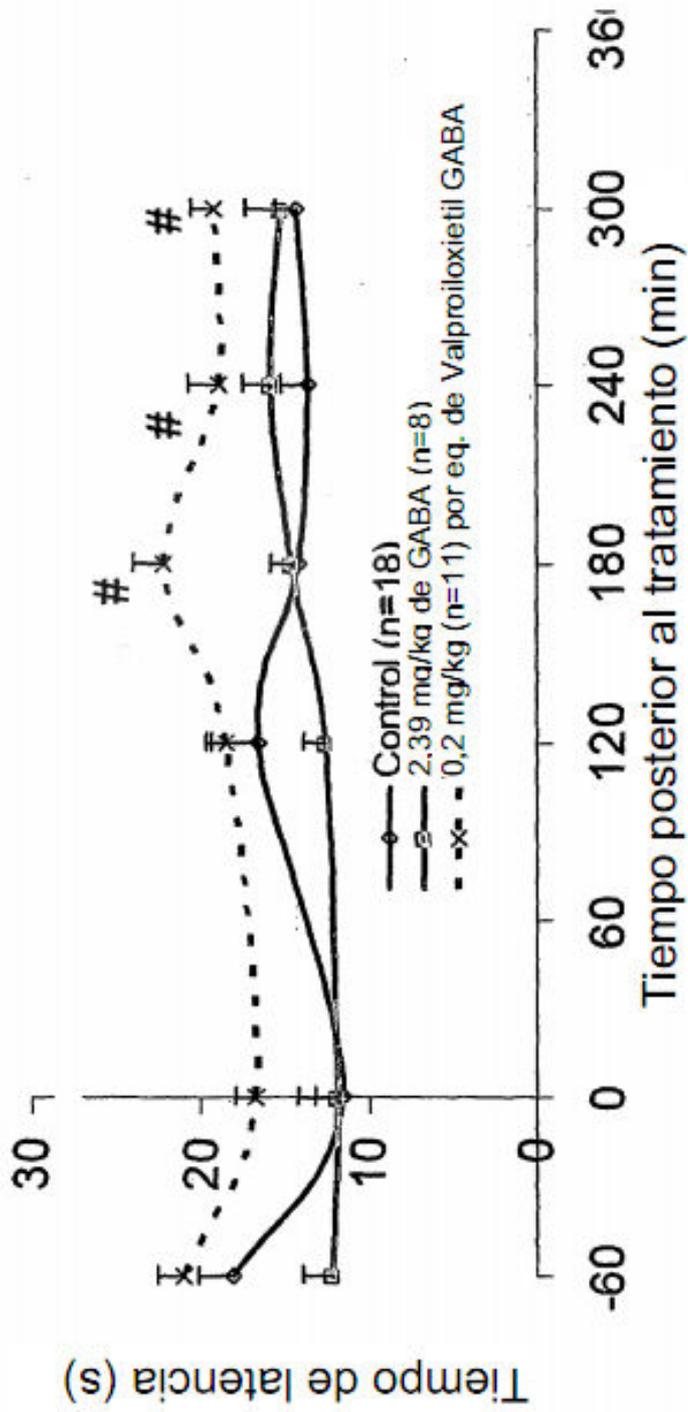
Fig. 5e

- Control
- 10 mg/kg de fluoxetina
- ▲- 10 mg/kg por eq. de Fluoxetina-GABA

\* Fluoxetina frente a Fluoxetina GABA  $p < 0,05$

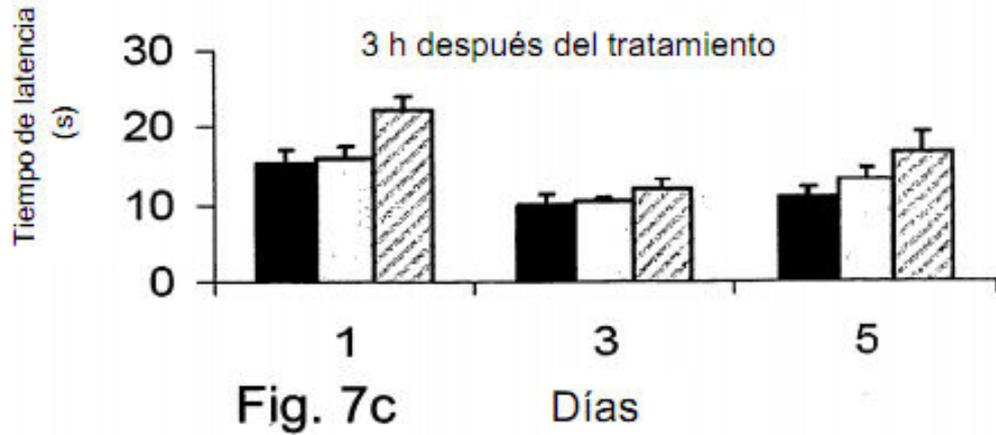
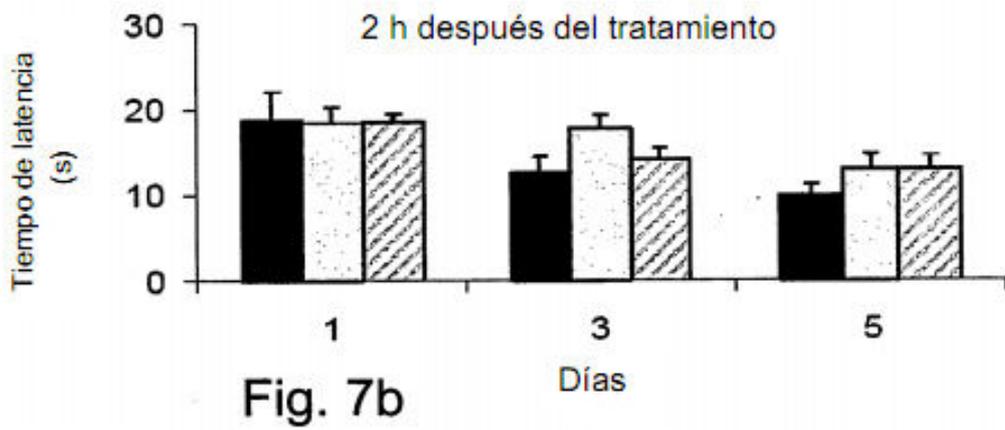
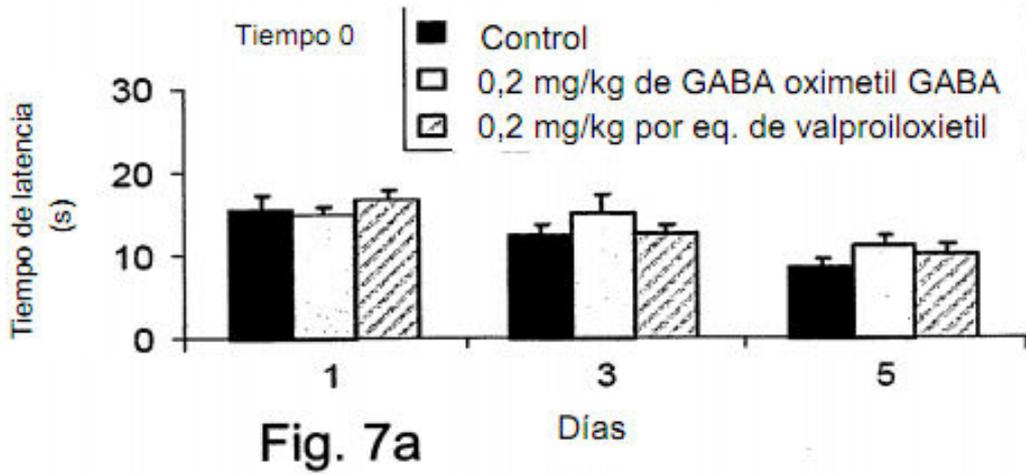
# Fluoxetina frente al control  $p < 0,05$

+ Fluoxetina GABA frente al control  $p < 0,05$



# Valproiloxietil GABA frente al control p < 0,05

Fig. 6



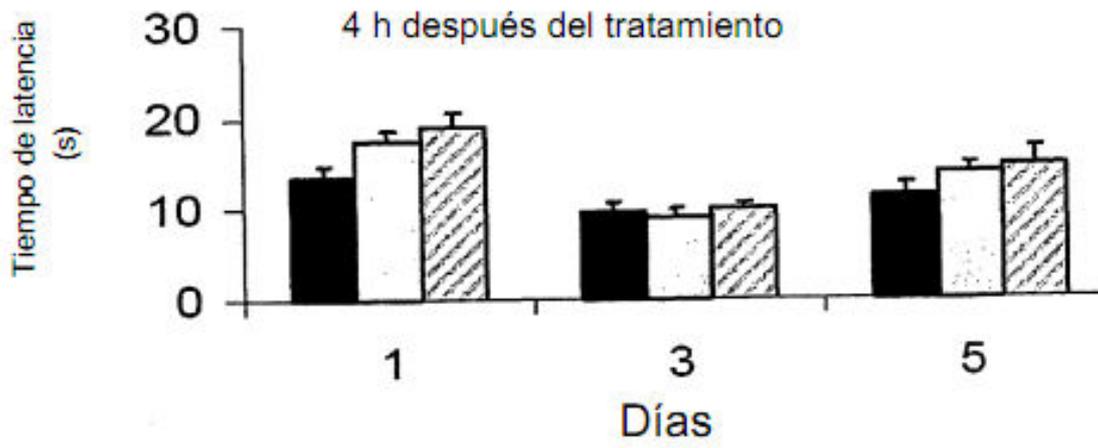


Fig. 7d

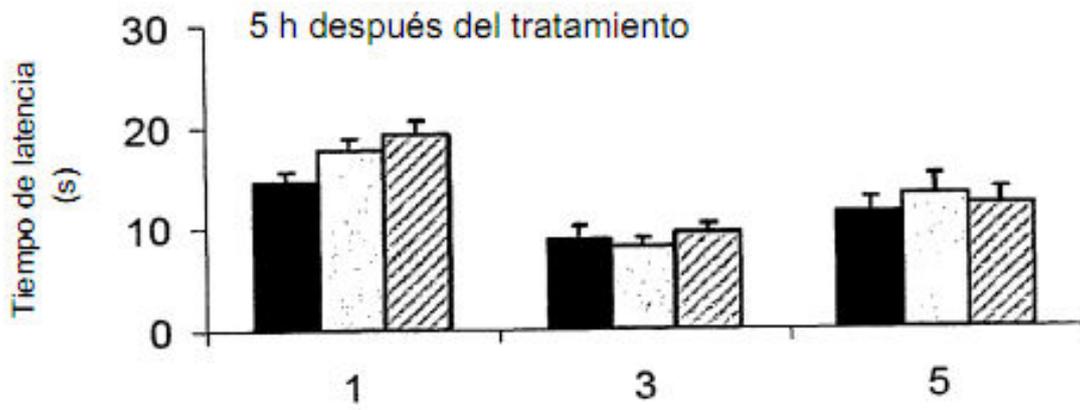


Fig. 7e

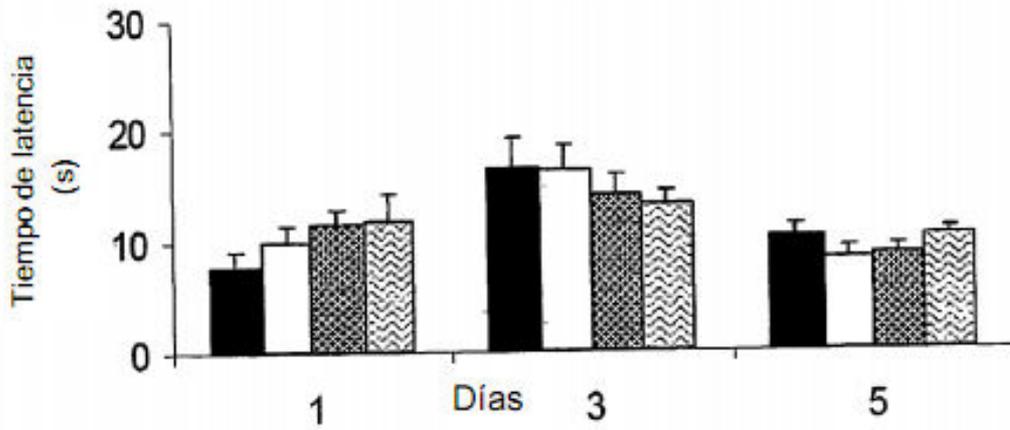


Fig. 8a

2 h

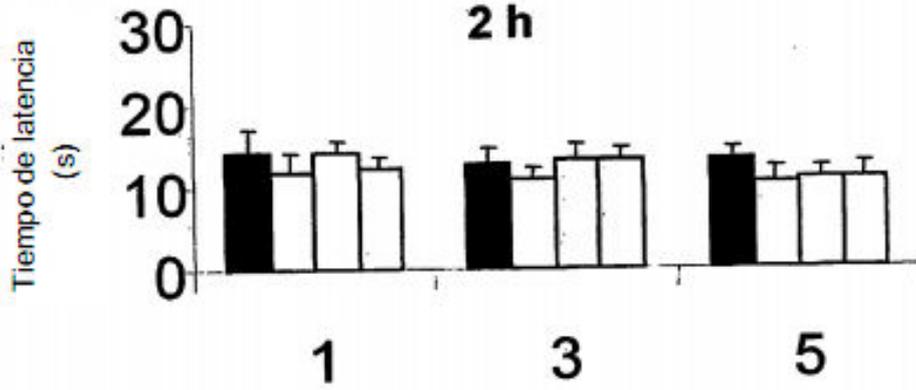


Fig. 8b

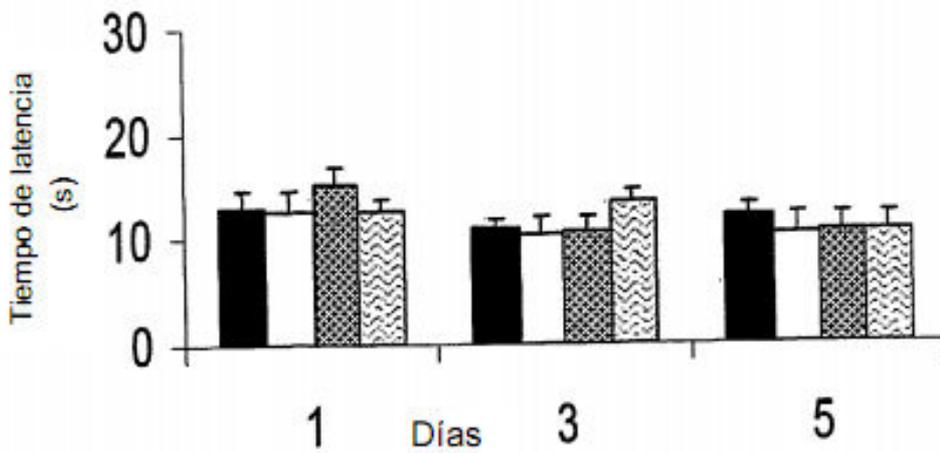


Fig. 8c

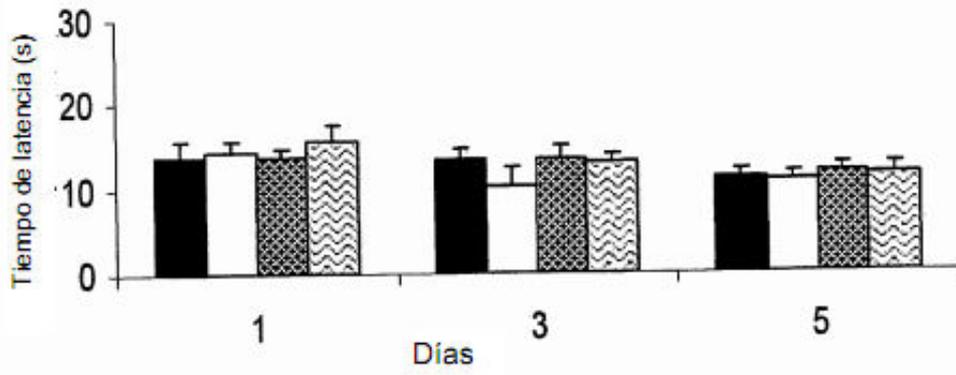


Fig. 8d

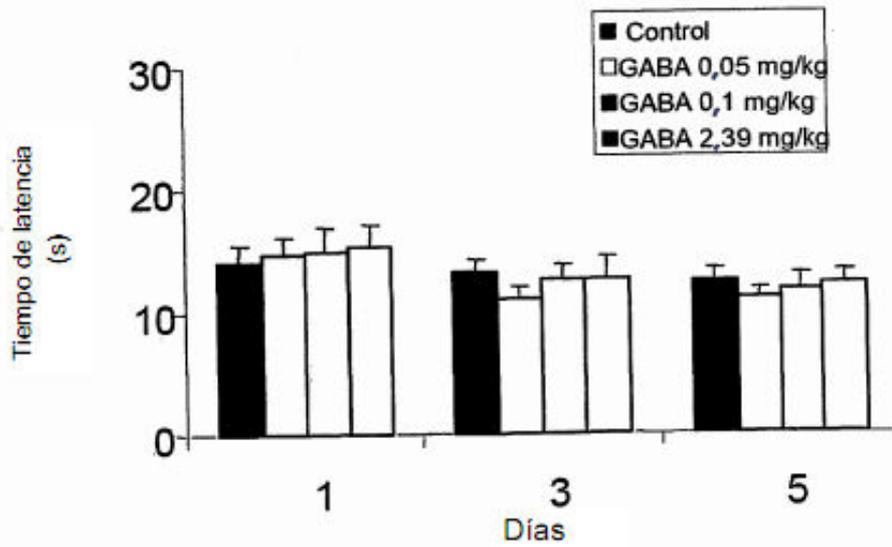


Fig. 8e

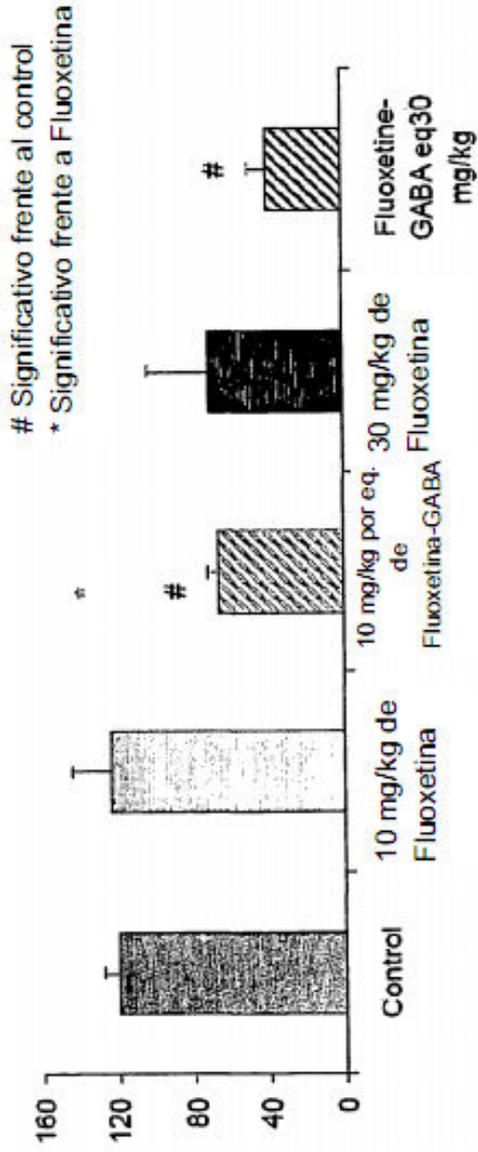


Fig. 9a

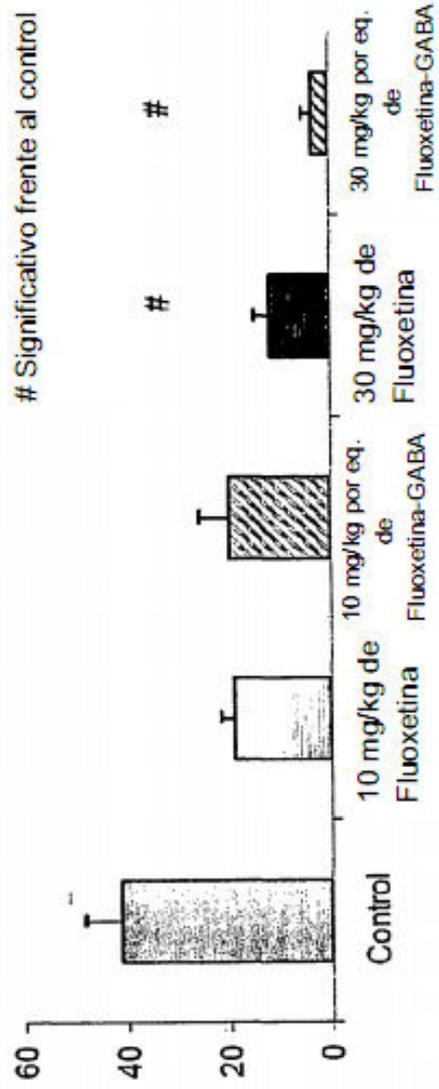
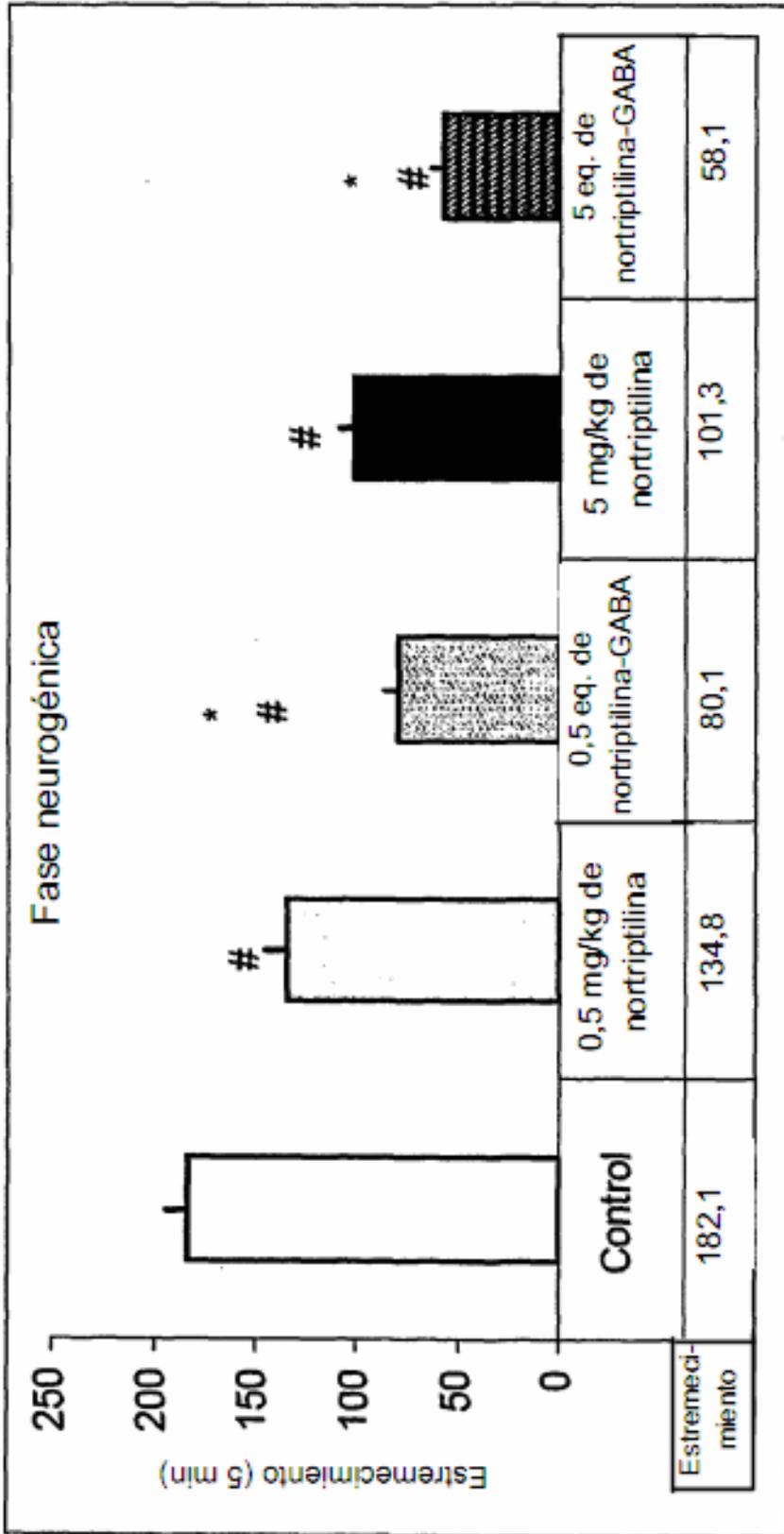
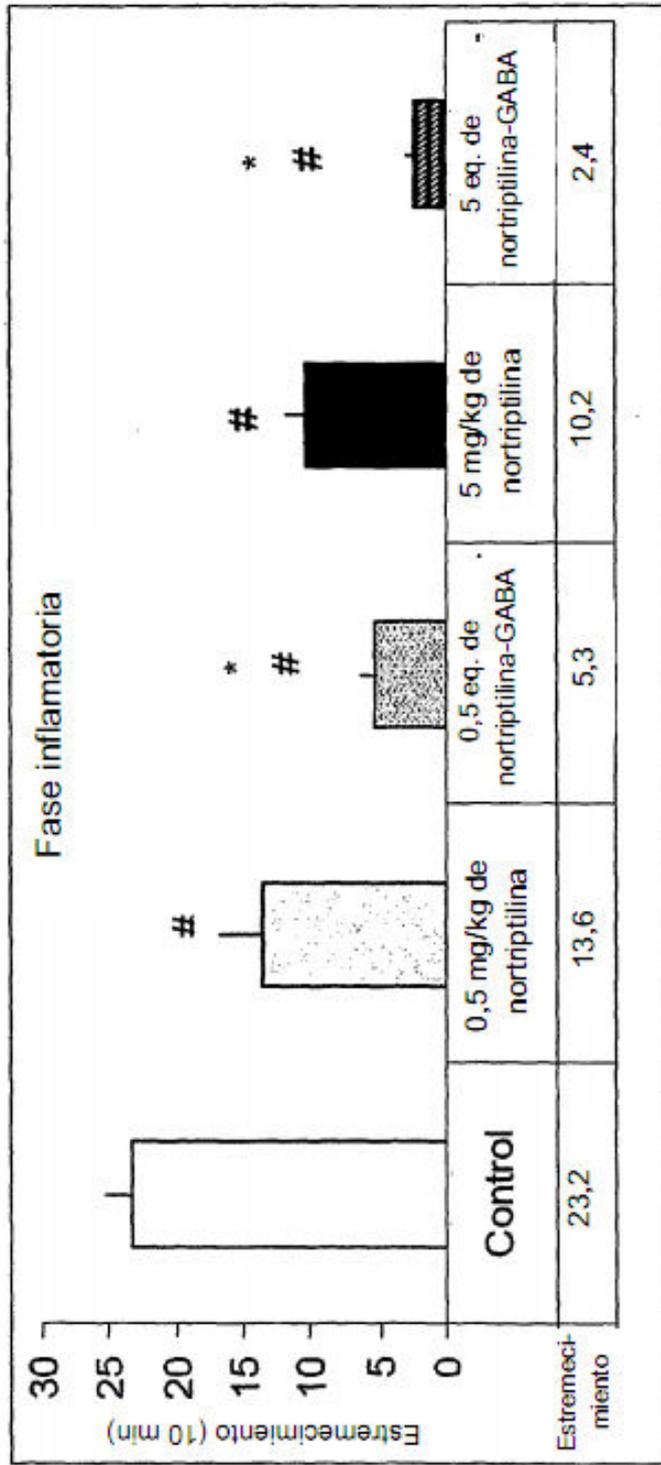


Fig. 9b



# significativo frente al control \* frente a nortriptilina

Fig. 10a



# significativo frente al control \* frente a nortriptilina

**Fig. 10b**

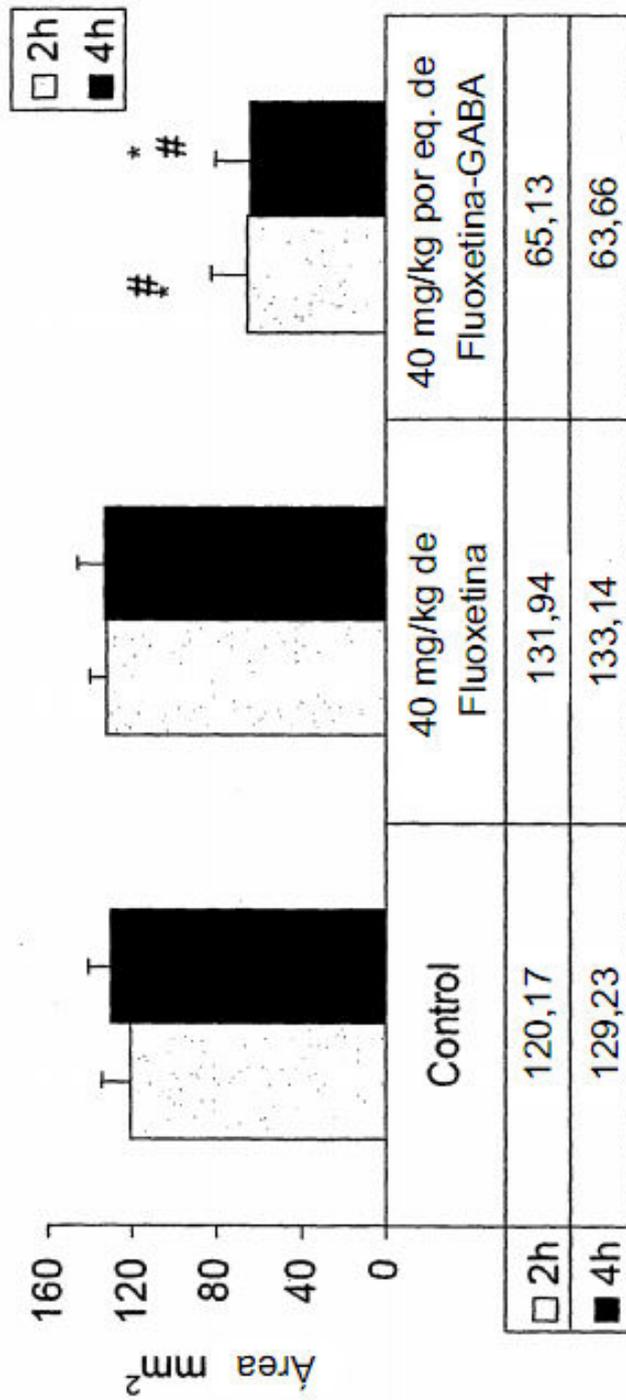


Fig. 11

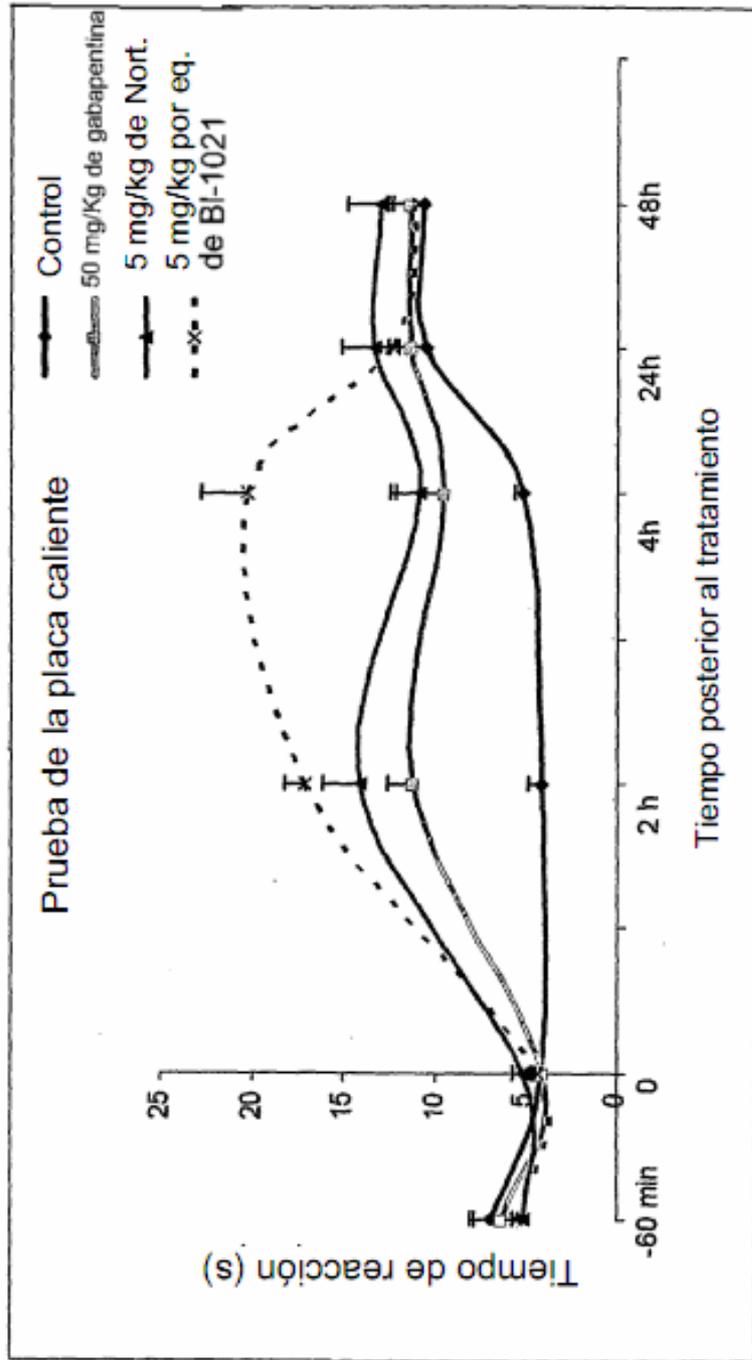


Fig. 12

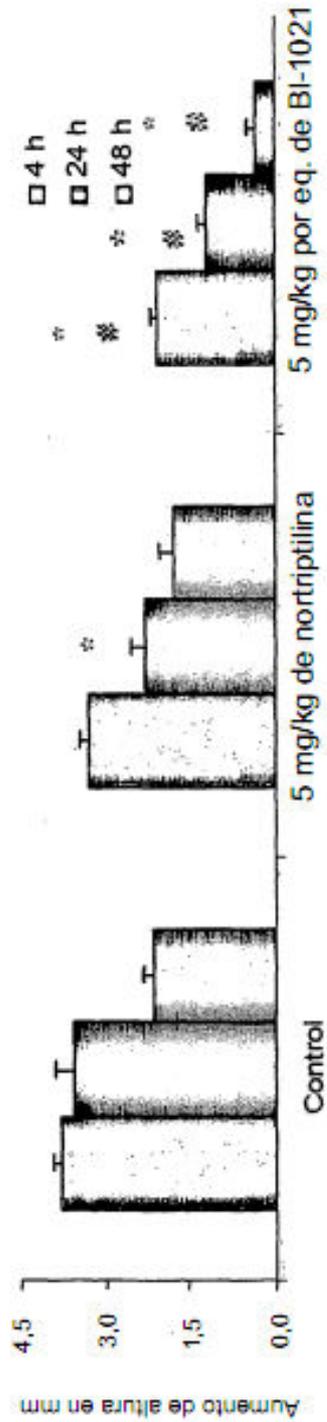


Fig. 13a

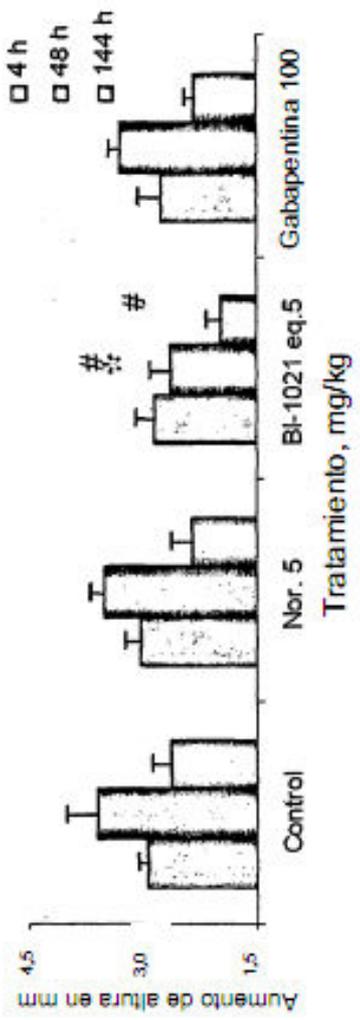


Fig. 13b

Fig. 14a

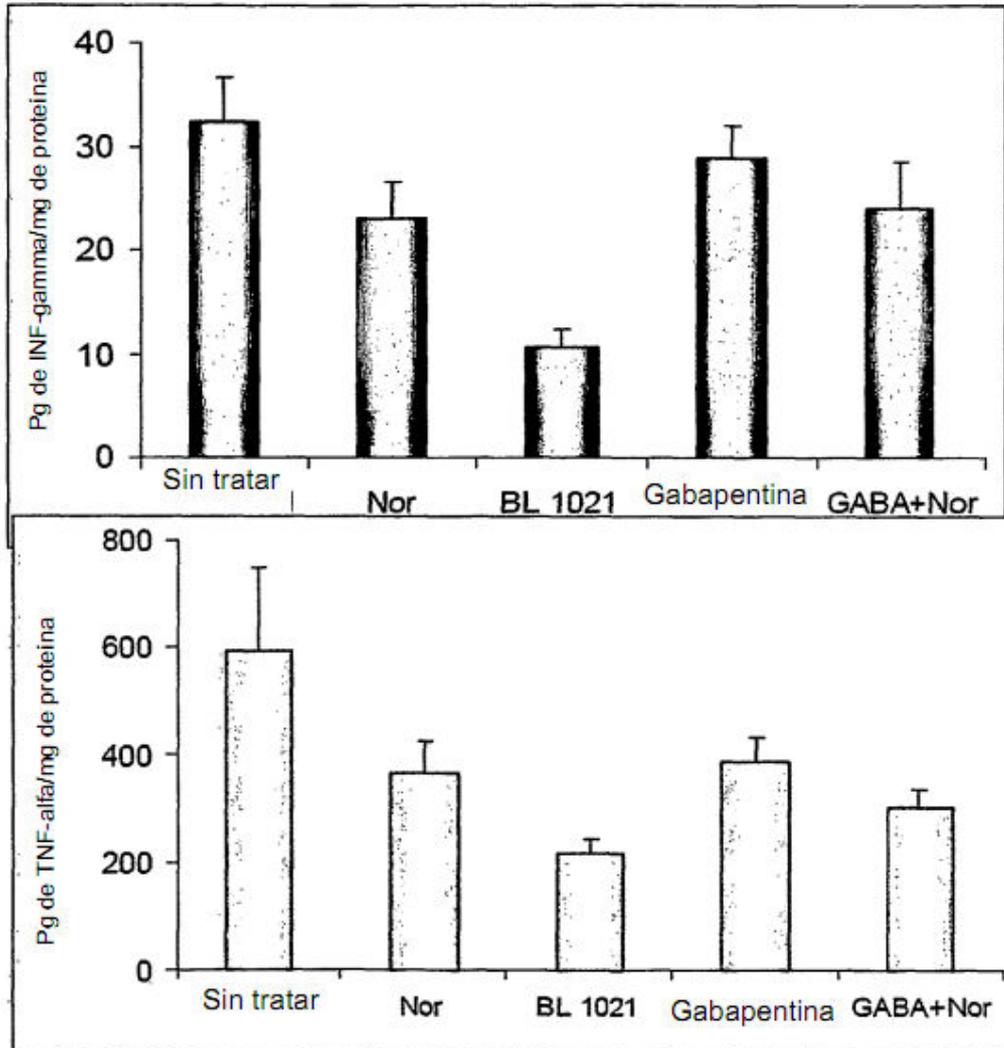


Fig. 14b