

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 789**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/085** (2006.01)  
**A61K 31/165** (2006.01)  
**A61K 31/167** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2007 E 07862114 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2101819**

54 Título: **Métodos, composiciones y kits para tratar dolor y prurito**

30 Prioridad:

**20.11.2006 US 860124 P**  
**06.07.2007 US 958594 P**  
**03.10.2007 US 997510 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.05.2013**

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD  
COLLEGE (50.0%)**  
**17 QUINCY STREET**  
**CAMBRIDGE, MA 02138, US y**  
**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**  
**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEAN, BRUCE P. y**  
**WOOLF, CLIFFORD J.**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 402 789 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

Métodos, composiciones y kits para tratar dolor y prurito

5 **Antecedentes de la invención**

La solicitud da a conocer métodos, composiciones y kits para la inhibición selectiva de neuronas sensoras de dolor y picor (nociceptores y pruriceptores) por moléculas de fármaco de pequeño peso molecular, a la vez que se minimizan los efectos sobre neuronas no sensoras de dolor u otros tipos de células. Se da a conocer que pequeñas moléculas de fármaco, hidrófilas logran el acceso al compartimento intracelular de neuronas sensoras de dolor mediante la entrada a través de receptores que están presentes en neuronas sensoras de dolor y picor pero en menor grado o no lo hacen en absoluto en otros tipos de neuronas o en otros tipos de tejido.

Los anestésicos locales tales como lidocaína y articaína actúan inhibiendo canales de sodio dependientes de voltaje en neuronas. Estos anestésicos bloquean los canales de sodio y de ese modo la excitabilidad de todas las neuronas, no sólo las neuronas sensoras de dolor (nociceptores). Por tanto, aunque el objetivo de la anestesia tópica o regional es bloquear la transmisión de señales en nociceptores para prevenir el dolor, la administración de anestésicos locales también produce efectos perjudiciales o no deseados tales como entumecimiento general por el bloqueo de los receptores táctiles y de presión de umbral bajo, déficits motores por el bloqueo de axones motores y otras complicaciones por el bloqueo de fibras autónomas. Los anestésicos locales son moléculas relativamente hidrófobas que logran el acceso a su sitio de bloqueo en el canal de sodio mediante difusión al interior del mismo o a través de la membrana celular. Los derivados cargados permanentemente de estos compuestos (tales como QX-314, un derivado de nitrógeno cuaternario de lidocaína), que no permean la membrana, no tienen efecto sobre los canales de sodio neuronales cuando se aplican a la superficie externa de la membrana nerviosa pero pueden bloquear canales de sodio si se introducen de algún modo en el interior de la célula, por ejemplo mediante una micropipeta usada para el registro electrofisiológico de célula completa de neuronas aisladas. Las neuronas sensoras de dolor difieren de otros tipos de neuronas en la expresión (en la mayoría de los casos) del receptor/canal TRPV1, activado por calor que produce dolor o por capsaicina, el ingrediente picante en el pimiento chile. Otros tipos de receptores expresados selectivamente en diversos tipos de neuronas sensoras de dolor y sensoras de picor (pruriceptores) incluyen pero no se limitan a receptores TRPA 1, TRPM8 y P2X(2/3).

El dolor neuropático, inflamatorio y nociceptivo difieren en su etiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. El dolor nociceptivo se produce en respuesta a la activación de un subconjunto específico de neuronas sensitivas periféricas, los nociceptores por estímulos intensos o nocivos. Generalmente es agudo, autolimitante y sirve para una función biológica protectora actuando como una advertencia de daño tisular potencial o en curso. Normalmente está bien localizado. Los ejemplos de dolor nociceptivo incluyen pero no se limitan a dolor traumático o quirúrgico, dolor de parto, esguinces, fracturas óseas, quemaduras, golpes, hematomas, inyecciones, procedimientos dentales, biopsias de piel y obstrucciones.

El dolor inflamatorio es dolor que se produce en presencia de inflamación o daño tisular incluyendo dolor posoperatorio, postraumático, dolor artrítico (reumatoide o por osteoartritis) y dolor asociado con daño a las articulaciones, el músculo y los tendones, como en lumbalgia axial.

El dolor neuropático es un tipo común de dolor crónico, no relacionado con cáncer, que es el resultado de una lesión o disfunción en el sistema nervioso central o periférico y no sirve para ninguna función biológica protectora. Se estima que afecta a más de 1,6 millones de personas en la población de los EE.UU. El dolor neuropático tiene muchas etiologías diferentes, y puede producirse, por ejemplo, debido a traumatismo, cirugía, hernia de un disco intervertebral, lesión de la médula espinal, diabetes, infección con herpes zóster (culebrilla), VIH/SIDA, cáncer en estadio avanzado, amputación (incluyendo mastectomía), síndrome del túnel carpiano, alcoholismo crónico, exposición a radiación, y como efecto secundario imprevisto de agentes de tratamiento neurotóxicos, tales como determinados fármacos anti-VIH y quimioterápicos.

En contraposición al dolor nociceptivo, el dolor neuropático se describe frecuentemente como de naturaleza "urente", "eléctrica", "de hormigueo" o "fulgurante". A menudo se caracteriza por alodinia crónica (definida como el dolor resultante de un estímulo que no provoca habitualmente una respuesta dolorosa, tal como un toque ligero) e hiperalgesia (definida como un aumento de la sensibilidad a un estímulo normalmente doloroso), y puede persistir durante meses o años más allá de la curación aparente de los tejidos dañados.

El dolor puede producirse en pacientes con cáncer, que puede deberse a múltiples causas; inflamación, compresión, invasión, diseminación metastásica hacia hueso u otros tejidos.

Existen algunos estados en los que se produce dolor en ausencia de un estímulo nocivo, daño tisular o una lesión en el sistema nervioso, denominado dolor disfuncional y éstos incluyen pero no se limitan a fibromialgia, cefalea de tipo tensional, trastornos del intestino irritable y eritemalgia.

La migraña es una cefalea asociada con la activación de fibras sensitivas que inervan las meninges del cerebro.

El picor (prurito) es un estado dermatológico que puede ser localizado y generalizado y puede estar asociado con lesiones de la piel (exantema, eccema atópico, ronchas). El picor acompaña a muchos estados incluyendo pero sin limitarse a estrés, ansiedad, radiación UV del sol, trastornos metabólicos y endocrinos (por ejemplo, enfermedad hepática o renal, hipertiroidismo), cánceres (por ejemplo, linfoma), reacciones a fármacos o alimentos, infecciones parasitarias y fúngicas, reacciones alérgicas, enfermedades de la sangre (por ejemplo, policitemia vera) y estados dermatológicos. El picor está mediado por un subconjunto de neuronas sensitivas primarias de pequeño diámetro, el pruriceptor, que comparte muchas características de las neuronas nociceptoras, incluyendo pero sin limitarse a expresión de canales TRPV1. Determinados mediadores del picor, tales como eicosanoides, histamina, bradicinina, ATP y diversas neurotrofinas tienen funciones endovaniloideas. La capsaicina tópica suprime el picor inducido por histamina. Los pruriceptores, como los nociceptores, son por tanto una diana adecuada para este método de suministro de bloqueantes de canales iónicos.

A pesar del desarrollo de una variedad de terapias para el dolor y el picor, existe una necesidad de agentes adicionales.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a:

un primer compuesto que activa un receptor de formación de canales seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y TRPM8 que está presente en nociceptores y/o pruriceptores y

un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales para su uso en un método de tratamiento de dolor o picor en un paciente, en el que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa dicho receptor, en el que dicho segundo compuesto:

i) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en el que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metil-procaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en el interior de la célula; o

ii) es CERM 11888 (bepridilo cuaternario); o

iii) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramide, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.

El primer compuesto activa un receptor seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y TRPM8 a través del que puede pasar el segundo compuesto. El tratamiento de dolor o picor puede determinarse usando cualquier índice de dolor o picor convencional, tal como los descritos en el presente documento, o puede determinarse basándose en la valoración del dolor o picor subjetivo del paciente. Un paciente se considera "tratado" si existe una reducción notificada en el dolor o una reducción de la reacción a estímulos que deben causar dolor y una reducción en el picor. El primer compuesto se administra con el fin de garantizar que los receptores (es decir, los receptores TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y/o TRPM8) se activan, permitiendo la entrada del segundo compuesto.

Si se desea, pueden emplearse dos o más compuestos que activan receptores TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y/o TRPM8, como pueden dos o más compuestos que inhiben uno o más canales iónicos regulados por voltaje. De manera deseable, el/los primer(os) compuesto(s) y el/los segundo(s) compuesto(s) se administran al paciente en el plazo de 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o 15 minutos entre sí, o se administran de manera sustancialmente simultánea. De manera importante, puede administrarse en primer lugar cualquier compuesto. Por tanto, en una realización, se administran en primer lugar uno o más compuestos que activan receptores TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y/o TRPM8, mientras que en otra realización, se administran en primer lugar uno o más compuestos que inhiben uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplican a la cara interna de los canales pero que no inhiben sustancialmente los canales cuando se aplican a la cara externa de los canales. Los compuestos pueden coformularse en una única composición o pueden formularse por separado. Cada uno de los compuestos puede administrarse, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intratecal, epidural u ocular, o mediante inyección, inhalación o contacto directo con la mucosa nasal u oral.

Los activadores de receptores TRPV1 incluyen pero no se limitan a capsaicina, eugenol, Arvanil (N-araquidonoilvanilamina), anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2APB), AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato-13-acetato-20-homovanilato de forbol (PPAHV), Olvanil (NE 19550), OLDA (N-oleoildopamina), N-araquidonildopamina (NADA), 6'-yodo-resiniferatoxina (6'-IRTX), N-aciletanolaminas C18, derivados de lipoxigenasa

tales como ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico, péptidos con nudo de cisteínas inhibidor (ICK) (vanilotoxinas), piperina, MSK195 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida), JYL79 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea), hidroxi-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol y SU200 (N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea). Otros activadores de receptores TRPV1 se describen en O'Dell *et al.*, *Bioorg Med Chem* (2007) 15:6164-6149 y Sexton *et al.*, *FASEB J* (2007) 21:2695-2703.

Los activadores de receptores TRPA1 incluyen pero no se limitan a cinamaldehído, isotiocianato de alilo, disulfuro de dialilo, icilina, aceite de canela, aceite de gaulteria, aceite de clavo, acroleína, hidroxi-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 4-hidroxinonenal, p-hidroxibenzoato de metilo, aceite de mostaza y ciclohexilcarbamato de 3'-carbamoilbifenil-3-ilo (URB597). Otros activadores de receptores TRPA1 se describen en Taylor-Clark *et al.*, *Mol Pharmacol* (2007) PMID: 18000030; Macpherson *et al.*, *Nature* (2007) 445:541-545; y Hill *et al.*, *J Biol Chem* (2007) 282:7145-7153.

Los activadores de receptores P2X incluyen pero no se limitan a ATP, 2-metil-ATP, 2' y 3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP y ATP-5'-O-(3-tiotrifosfato).

Los activadores de receptores TRPM8 incluyen pero no se limitan a mentol, icilina, eucaliptol, linalool, geraniol e hidroxicitronelal.

En determinadas realizaciones, el segundo compuesto inhibe canales de sodio regulados por voltaje. Inhibidores a modo de ejemplo de esta clase son QX-314, N-metil-procaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina y pancuronio.

Aún en otras realizaciones, el segundo compuesto es CERM 11888 (bepiridilo cuaternario).

Todavía en otras realizaciones, el segundo compuesto es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, tocainida, prilocaína, diisopiramida, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno. Se describen derivados a modo de ejemplo en el presente documento. Se da a conocer un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, tocainida, prilocaína, diisopiramida, benciclano, quinidina, bretilio, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.

También se da a conocer una composición farmacéutica que incluye un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, tocainida, prilocaína, diisopiramida, benciclano, quinidina, bretilio, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a una composición que comprende:

i) un primer compuesto que activa un receptor de formación de canales que está presente en nociceptores y/o pruriceptores, en el que dicho primer compuesto activa un receptor seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPM8 y TRPA1; y

ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales, en el que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa dicho receptor, en el que dicho segundo compuesto:

a) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en el que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metilprocaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en el interior de la célula; o

b) es CERM 11888 (bepiridilo cuaternario); o

c) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramida, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.

En una realización, el segundo compuesto es de actividad reducida o parcialmente activo cuando se aplica a la cara externa, pero más activo cuando se aplica a la cara interna. La composición puede formularse, por ejemplo, para administración oral, intravenosa, intramuscular, rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intratecal, epidural u ocular, o mediante inyección, inhalación o contacto directo con la mucosa nasal u oral. Si se desea, la composición puede contener dos o más compuestos que activan receptores TRPV1, P2X(2/3),

TRPA1 y/o TRPM8, y/o dos o más compuestos que inhiben uno o más canales iónicos regulados por voltaje.

La invención también presenta un método *in vitro* para inhibir uno o más canales iónicos regulados por voltaje en una célula nociceptora o pruriceptora poniendo en contacto la célula con: (i) un primer compuesto que activa un receptor de formación de canales que está presente en nociceptores y/o pruriceptores, en el que dicho primer compuesto activa un receptor seleccionado de TRPV 1, P2X(2/3), TRPA1 y TRPM8; y (ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de los canales pero no inhibe sustancialmente los canales cuando se aplica a la cara externa de los canales, en el que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa el receptor. Se proporcionaron anteriormente compuestos adecuados.

La invención también presenta un método para identificar que un compuesto es útil para el tratamiento de dolor y picor. Este método incluye las etapas de: (a) poner en contacto la cara externa de neuronas que expresan TRPV1, TRPA1, TRPM8 y/o P2X(2/3) con: (i) un primer compuesto que activa receptores TRPV1 TRPA1, TRPM8 o P2X(2/3); y (ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de los canales pero no inhibe sustancialmente los canales cuando se aplica a la cara externa de los canales, y (b) determinar si el segundo compuesto inhibe los canales iónicos regulados por voltaje en las neuronas, en el que la inhibición de dichos canales iónicos regulados por voltaje por el segundo compuesto identifica el segundo compuesto como un compuesto que es útil para el tratamiento de dolor y/o picor, en el que dicho segundo compuesto:

1) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en el que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metil-procaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en el interior de la célula; o

2) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramida, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.

Se da a conocer que los métodos, las composiciones y los kits también pueden usarse para bloquear selectivamente la actividad neuronal en otros tipos de neuronas que expresan diferentes miembros de las familias de receptores TRPV, TRPA, TRPM y P2X, en los que el primer compuesto es un agonista de los receptores TRPV, TRPA, TRPM y P2X particulares presentes en esos tipos de neuronas, y el segundo compuesto es un bloqueante de los canales de sodio o calcio que normalmente no puede permear la membrana.

Se da a conocer que pueden existir otros receptores que permitirían la entrada de compuestos que de lo contrario no podrían entrar. También se da a conocer la coadministración de compuestos que activan uno o más de estos receptores en combinación con uno o más compuestos que inhiben uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplican a la cara interna de los canales pero no inhiben sustancialmente los canales cuando se aplican a la cara externa de los canales.

Los métodos, las composiciones y los usos de la invención permiten un bloqueo del dolor o picor sin alterar el toque ligero o control motor. Por ejemplo, los pacientes que reciben una epidural no tendrán una pérdida completa de estímulos sensoriales.

El término "dolor" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a todos los tipos de dolor, incluyendo dolor agudo y crónico, tal como dolor nociceptivo, por ejemplo dolor somático y dolor visceral; dolor inflamatorio, dolor disfuncional, dolor idiopático, dolor neuropático, por ejemplo, dolor generado por el sistema nervioso central y dolor generado por el sistema nervioso periférico, migraña y dolor debido a cáncer.

El término "dolor nociceptivo" se usa para que incluya cualquier dolor provocado por estímulos nocivos que amenazan a o lesionan realmente tejidos corporales, incluyendo, sin limitación, por un corte, hematoma, fractura ósea, lesión por aplastamiento, quemadura, y similares. Los receptores del dolor para una lesión tisular (nociceptores) están ubicados en su mayoría en la piel, el sistema musculoesquelético u órganos internos.

El término "dolor somático" se usa para referirse a dolor que surge de hueso, articulación, músculo, piel o tejido conjuntivo. Este tipo de dolor normalmente está bien localizado.

El término "dolor visceral" se usa en el presente documento para referirse a dolor que surge de órganos viscerales, tales como el sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal y el páncreas, las vías urinarias y los órganos reproductores. El dolor visceral incluye dolor producido por afectación tumoral de la cápsula de un órgano. Otro tipo de dolor visceral, que normalmente está producido por obstrucción de víscera hueca, se caracteriza por calambres intermitentes y dolor mal localizado. El dolor visceral puede estar asociado con inflamación como en cistitis o esofagitis por reflujo.

El término dolor inflamatorio incluye dolor asociado con inflamación activa que puede estar producida por traumatismo, cirugía, infección y enfermedades autoinmunitarias.

5 El término “dolor neuropático” se usa en el presente documento para referirse a dolor que se origina a partir de un procesamiento anómalo de estímulos sensoriales por el sistema nervioso central o periférico como resultado de una lesión en estos sistemas.

10 El término “dolor procedimental” se refiere a dolor que surge de un procedimiento médico, dental o quirúrgico en el que el procedimiento está habitualmente planificado o asociado con un traumatismo agudo.

15 El término “picor” se usa en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a todos los tipos de sensaciones de picor y escozor localizadas y generalizadas, agudas intermitentes y persistentes. El picor puede ser idiopático, alérgico, metabólico, infeccioso, inducido por fármacos, debido a enfermedad hepática, renal o cáncer. “Prurito” es picor intenso.

20 Por “paciente” quiere decirse cualquier animal. En una realización, el paciente es un ser humano. Otros animales que pueden tratarse usando los métodos, las composiciones y los kits de la invención incluyen pero no se limitan a primates no humanos (por ejemplo, monos, gorilas, chimpancés), animales domesticados (por ejemplo, caballos, cerdos, cabras, conejos, ovejas, ganado, llamas) y animales de compañía (por ejemplo, cobayas, ratas, ratones, lagartos, serpientes, perros, gatos, peces, hámsteres y aves).

25 Los compuestos útiles en la invención incluyen los descritos en el presente documento en cualquiera de sus formas farmacéuticamente aceptables, incluyendo isómeros tales como diastereómeros y enantiómeros, sales, ésteres, amidas, tioésteres, solvatos y polimorfos de los mismos, así como mezclas racémicas e isómeros puros de los compuestos descritos en el presente documento.

Por “bajo peso molecular” quiere decirse menos que aproximadamente 500 Daltons.

30 El término “sal farmacéuticamente aceptable” representa aquellas sales que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son acordes a una razón beneficio/riesgo razonable. Se conocen bien en la técnica sales farmacéuticamente aceptables. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos útiles en la invención, o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen pero  
35 no se limitan a sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canfosulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, isetionato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mesilato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o  
40 alcalinotérreos representativas incluyen pero no se limitan a de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como de cationes amonio, amonio cuaternario y de amina no tóxicos, incluyendo, pero sin limitarse a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares.

45 En las descripciones genéricas de compuestos dados a conocer, el número de átomos de un tipo particular en un grupo sustituyente se proporciona generalmente como un intervalo, por ejemplo, un grupo alquilo que contiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono o alquilo C<sub>1-4</sub>. La referencia a tal intervalo pretende incluir referencias específicas a grupos que tienen cada uno de los números enteros de átomos dentro del intervalo especificado. Por  
50 ejemplo, un grupo alquilo de desde 1 hasta 4 átomos de carbono incluye cada uno de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Un heteroalquilo C<sub>1-12</sub>, por ejemplo, incluye desde 1 hasta 12 átomos de carbono además de uno o más heteroátomos. Otros números de átomos y otros tipos de átomos pueden indicarse de manera similar.

55 Tal como se usa en el presente documento, los términos “alquilo” y el prefijo “alk-” incluyen tanto grupos de cadena lineal y cadena ramificada como grupos cíclicos, es decir, cicloalquilo. Los grupos cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos y tienen preferiblemente desde 3 hasta 6 átomos de carbono de anillo, inclusive. Los grupos cíclicos a modo de ejemplo incluyen grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

60 Por “alquilo C<sub>1-4</sub>” quiere decirse a un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado que tiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono. Un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, carboxialquilo y carboxilo. Los alquilos C<sub>1-4</sub> incluyen, sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclopropilmetilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo y ciclobutilo.

65 Por “alqueno C<sub>2-4</sub>” quiere decirse un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado que contiene uno o más

dobles enlaces y que tienen de 2 a 4 átomos de carbono. Un alqueno  $C_{2-4}$  puede incluir opcionalmente anillos monocíclicos o policíclicos, en los que cada anillo tiene de manera deseable de 3 a 6 miembros. El grupo alqueno  $C_{2-4}$  puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, carboxialquilo y carboxilo. Los alquenos  $C_{2-4}$  incluyen, sin limitación; vinilo, alilo, 2-ciclopropil-1-eteno, 1-propeno, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metil-1-propeno y 2-metil-2-propeno.

Por "alquino  $C_{2-4}$ " quiere decirse un grupo hidrocarbonado ramificado o no ramificado que contiene uno o más triples enlaces y que tienen desde 2 hasta 4 átomos de carbono. Un alquino  $C_{2-4}$  puede incluir opcionalmente anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, en que cada anillo tiene de manera deseable 5 o 6 miembros. El grupo alquino  $C_{2-4}$  puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, carboxialquilo y carboxilo. Los alquinos  $C_{2-4}$  incluyen, sin limitación, etino, 1-propino, 2-propino, 1-butino, 2-butino y 3-butino.

Por "heterociclilo  $C_{2-6}$ " quiere decirse un anillo estable monocíclico de 5 a 7 miembros o anillo heterocíclico bicíclico de 7 a 14 miembros que está saturado, parcialmente insaturado o insaturado (aromático) y que consiste en desde 2 hasta 6 átomos de carbono y 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O y S y que incluye cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos definidos anteriormente se condensa con un anillo de benceno. El grupo heterociclilo puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, carboxialquilo y carboxilo. Los heteroátomos nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente. El anillo heterocíclico puede unirse covalentemente a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable, por ejemplo, un anillo de imidazolinilo puede unirse en cualquiera de las posiciones de átomo de carbono de anillo o en el átomo de nitrógeno. Un átomo de nitrógeno en el heterociclo puede cuaternizarse opcionalmente. Preferiblemente, cuando el número total de átomos de S y O en el heterociclo supera 1, entonces estos heteroátomos no son adyacentes entre sí. Los heterociclos incluyen, sin limitación, 1H-indazol, 2-pirrolidinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, 2H-pirrolilo, 3H-indolilo, 4-piperidonilo, 4aH-carbazol, 4H-quinolizino, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, acridinilo, azocinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazonilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, b-carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahydrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizino, indolilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morpholinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo; 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilpirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenarsazinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatiinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, pteridinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizino, quinoxalinilo, quinuclidinilo, carbolinilo, tetrahydrofurano, tetrahydroisoquinolinilo, tetrahydroquinolinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo, triazinilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,5-triazolilo, 1,3,4-triazolilo, xantenilo. Heterociclos de 5 a 7 miembros preferidos incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirimidinilo, triazinilo, furanilo, tienilo, tiazolilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, indolilo, bencimidazolilo, 1H-indazolilo, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, quinolinilo e isoquinolinilo. Heterociclos de 5 a 6 miembros preferidos incluyen, sin limitación, piridinilo, pirimidinilo, triazinilo, furanilo, tienilo, tiazolilo, pirrolilo, piperazinilo, piperidinilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

Por "arilo  $C_{6-12}$ " quiere decirse un grupo aromático que tiene un sistema de anillos que se compone de átomos de carbono con electrones  $\pi$  conjugados (por ejemplo, fenilo). El grupo arilo tiene desde 6 hasta 12 átomos de carbono. Los grupos arilo pueden incluir opcionalmente anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, en los que cada anillo tiene de manera deseable 5 o 6 miembros. El grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, fluoroalquilo, carboxilo, hidroxialquilo, carboxialquilo, amino, aminoalquilo, amino monosustituido, amino disustituido y amino cuaternario.

Por "alcarilo  $C_{7-14}$ " quiere decirse un alquilo sustituido con un grupo arilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo o 3,4-diclorofenetilo) que tiene desde 7 hasta 14 átomos de carbono.

Por "alk-heterociclilo  $C_{3-10}$ " quiere decirse un grupo heterocíclico sustituido con alquilo que tiene desde 3 hasta 10 átomos de carbono además de uno o más heteroátomos (por ejemplo, 3-furanilmetilo, 2-furanilmetilo, 3-tetrahydrofuranilmetilo o 2-tetrahydrofuranilmetilo).

Por "heteroalquilo  $C_{1-7}$ " quiere decirse un grupo alquilo, alqueno o alquino, ramificado o no ramificado, que tiene desde 1 hasta 7 átomos de carbono además de 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados independientemente del

- grupo que consiste en N, O, S y P. Los heteroalquilos incluyen, sin limitación, aminas terciarias, aminas secundarias, éteres, tioéteres, amidas, tioamidas, carbamatos, tiocarbamatos, hidrazonas, iminas, fosfodiésteres, fosforamidados, sulfonamidas y disulfuros. Un heteroalquilo puede incluir opcionalmente anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, en los que cada anillo tiene de manera deseable de 3 a 6 miembros. El grupo heteroalquilo puede estar sustituido o no sustituido. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen grupos alcoxilo, ariloxilo, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, haluro, hidroxilo, fluoroalquilo, perfluoroalquilo, amino, aminoalquilo, amino disustituido, amino cuaternario, hidroxialquilo, hidroalquilo, carboxialquilo y carboxilo. Ejemplos de heteroalquilos C<sub>1-7</sub> incluyen, sin limitación, metoximetilo y etoxietilo.
- 5
- 10 Por "haluro" quiere decirse bromo, cloro, yodo o flúor.
- Por "fluoroalquilo" quiere decirse un grupo alquilo que está sustituido con un átomo de flúor.
- 15 Por "perfluoroalquilo" quiere decirse un grupo alquilo que consiste sólo en átomos de carbono y flúor.
- Por "carboxialquilo" quiere decirse un resto químico con la fórmula -(R)-COOH, en la que R se selecciona de alquilo C<sub>1-7</sub>, alquenilo C<sub>2-7</sub>, alquinilo C<sub>2-7</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-7</sub>.
- 20 Por "hidroxialquilo" quiere decirse un resto químico con la fórmula -(R)-OH, en la que R se selecciona de alquilo C<sub>1-7</sub>, alquenilo C<sub>2-7</sub>, alquinilo C<sub>2-7</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-7</sub>.
- Por "alcoxilo" quiere decirse un sustituyente químico de fórmula -OR, en la que R se selecciona de alquilo C<sub>1-7</sub>, alquenilo C<sub>2-7</sub>, alquinilo C<sub>2-7</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub>, o heteroalquilo C<sub>1-7</sub>.
- 25 Por "ariloxilo" quiere decirse un sustituyente químico de fórmula -OR, en la que R es un grupo arilo C<sub>6-12</sub>.
- Por "alquiltio" quiere decirse un sustituyente químico de fórmula -SR, en el que R se selecciona de alquilo C<sub>1-7</sub>, alquenilo C<sub>2-7</sub>, alquinilo C<sub>2-7</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-7</sub>.
- 30 Por "ariltio" quiere decirse un sustituyente químico de fórmula -SR, en la que R es un grupo arilo C<sub>6-12</sub>.
- Por "amino cuaternario" quiere decirse un sustituyente químico de fórmula -(R)-N(R')(R'')(R''')<sup>+</sup>, en la que R, R', R'' y R''' son cada uno independientemente un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo. R puede ser un grupo alquilo que une el átomo de nitrógeno de amino cuaternario, como sustituyente, a otro resto. El átomo de nitrógeno, N, se une covalentemente a 4 átomos de carbono de grupos alquilo, heteroalquilo, heteroarilo y/o arilo, dando como resultado una carga positiva en el átomo de nitrógeno.
- 35
- Por "resto cargado" quiere decirse un resto que gana un protón a pH fisiológico convirtiéndose de ese modo en cargado positivamente (por ejemplo, amonio, guanidinio o amidinio) o un resto que incluye una carga positiva formal neta sin protonación (por ejemplo, amonio cuaternario). El resto cargado puede estar o bien cargado permanentemente o bien cargado transitoriamente.
- 40
- Tal como se usa en el presente documento, el término "original" se refiere a un compuesto de bloqueo de canales que puede modificarse mediante cuaternización o guanilación de un átomo de nitrógeno de amina presente en el compuesto original. Los compuestos cuaternizados y guanilados son derivados del compuesto original. Los derivados de guanidilo descritos en el presente documento se presentan en su forma de base inalterada. Estos compuestos pueden administrarse o bien como una sal (es decir, una sal de adición de ácido) o bien en su forma de base inalterada, que experimenta protonación *in situ* para formar un resto cargado.
- 45
- 50 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

### Breve descripción del dibujo

- 55 Figura 1. La aplicación conjunta de QX-314 extracelular (5 mM) y capsaicina (1 μM) bloquea selectivamente las corrientes de sodio en neuronas sensitivas de ganglios de la raíz dorsal (GRD) que responden a capsaicina. (a) Paneles a la izquierda: efecto sobre la corriente de sodio (provocada mediante un escalón de -70 a -5 mV) de la aplicación durante 10 minutos de QX-314 5 mM solo, capsaicina 1 μM sola, y QX-314 5 mM y capsaicina 1 μM aplicados conjuntamente en una neurona de GRD cultivada adulta sensible a capsaicina pequeña (24 μm). Panel superior: la aplicación breve de capsaicina indujo una corriente de entrada prolongada (tensión de mantenimiento de -70 mV) en esta neurona. Paneles a la derecha: efecto sobre la corriente de sodio de la misma serie de aplicaciones de fármaco sobre una neurona insensible a capsaicina grande (52 μm). (b) Corriente de entrada máxima en función del pulso de prueba registrado en el control (■ cuadrados), en presencia de QX-314 5 mM solo (● círculos), capsaicina 1 μM sola (▲ triángulos superiores), y QX-314 5 mM y capsaicina 1 μM aplicados conjuntamente (▼ triángulos inferiores). Los símbolos muestran la media ± EEM para experimentos con 25 neuronas sensibles a
- 60
- 65



capsaicina pequeñas. Se provocaron las corrientes mediante escalones de despolarización de 20 ms desde un potencial de mantenimiento de -70 mV hasta un intervalo de potenciales de prueba en incrementos de 5 mV. (c) Transcurso temporal del efecto de la combinación de capsaicina y QX-314 sobre la corriente de sodio máxima. Las barras representan gráficamente la media  $\pm$  EEM para la corriente de sodio máxima normalizada con relación a la del control (n=25).

Figura 2. La aplicación conjunta de QX-314 y capsaicina bloquea la excitabilidad en neuronas de GRD de tipo nociceptivo. (a) Un escalón de corriente de despolarización (250 pA, 4 ms) aplicado a una corriente de GRD pequeña (23  $\mu$ m) provocó un potencial de acción amplio de tipo nociceptor con una desviación prominente en la fase de caída (flecha). Una aplicación de 2 minutos de QX-314 (5 mM) no tuvo ningún efecto (segundo panel). La capsaicina (1 mM) redujo la amplitud del potencial de acción (tercer panel), debido probablemente a una combinación de la reducción moderada de la corriente de sodio producida por capsaicina como en la figura 1 y la inactivación de la corriente de sodio secundaria a la despolarización producida por capsaicina. QX-314 y capsaicina aplicados conjuntamente suprimieron por completo la generación de potencial de acción incluso con una inyección de corriente de estimulación mucho mayor. (b) Media  $\pm$  EEM de las amplitudes del potencial de acción (n=25 para QX-314, n=15 para capsaicina y capsaicina + QX-314).

Figura 3. La inyección intraplantar de capsaicina (10  $\mu$ g/10  $\mu$ l) junto con QX-314 (al 2%, 10  $\mu$ l) conduce a una anestesia local prolongada frente a estímulos mecánicos (filamentos de von Frey) y térmicos nocivos. (a) Umbral de respuesta para la retirada de la pata en respuesta a pelos de von Frey de intensidad creciente tras la inyección interplantar de QX-314 solo (al 2%, 10  $\mu$ l; símbolos verdes), capsaicina sola (10  $\mu$ g/10  $\mu$ l; símbolos negros) o QX-314 y capsaicina aplicados juntos (símbolos rojos). Se indica el número de animales que no respondieron en absoluto al mayor valor (57 g, flecha) para los puntos de tiempo con los mayores efectos. (\* = p<0,05, n=6 para cada grupo). (b) Lo mismo para el umbral térmico (calor radiante) para la retirada de la pata. La flecha indica el punto de corte y se indican los números de animales que no respondieron a los estímulos más intensos para los puntos de tiempo con los mayores efectos. (\* = p<0,05, n=6 para cada grupo).

Figura 4. La inyección de QX-314 seguida por capsaicina adyacente al nervio ciático anestesió las extremidades traseras de los animales frente a estímulos mecánicos y térmicos nocivos sin producir ningún déficit motor. (a) Umbral mecánico para la retirada de la pata en respuesta a filamentos de von Frey de intensidad creciente tras inyección ciática de QX-314 solo (al 2%, 10  $\mu$ l), capsaicina sola (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 100  $\mu$ l), o QX-314 inyectado 10 minutos antes que capsaicina. Se indica el número de animales que no respondió en absoluto al mayor valor (57 g, flecha) para los puntos de tiempo con los mayores efectos. (\* = p<0,05, \*\* = p< 0,01, n=6 para cada grupo). (b) Lo mismo para el umbral térmico (calor radiante) para la retirada de la pata. (c). Se evaluó el cambio en la función motora (puntuación: 2 = parálisis total; 1 = parálisis parcial; 0 = sin afectación) tras la inyección ciática de lidocaína (al 2%; al 0,2%), QX-314 (al 0,2%), capsaicina (5  $\mu$ g/10  $\mu$ l) y QX-314 seguida por la inyección de capsaicina. Se indican los números de animales afectados por las inyecciones encima de cada columna.

Figura 5. Registros con fijación de voltaje de la corriente de canal de sodio en neuronas de ganglio de la raíz dorsal pequeñas. Los datos muestran que eugenol solo tiene un efecto inhibitor moderado sobre la corriente de sodio (inhibición del 10-20%). La aplicación conjunta de eugenol y QX-314 produce un bloqueo progresivo que puede ser completo después de 7 minutos. Se representan dos ejemplos, que son representativos de 10 experimentos con resultados similares.

Figura 6. La aplicación conjunta del agonista de TRPA aceite de mostaza (MO) (50  $\mu$ M) y QX-314 (5 mM). MO solo reduce la corriente de sodio en el 20-30% y alcanza una meseta después de aproximadamente 3 minutos. La aplicación conjunta de MO y QX-314 redujo la corriente de sodio drásticamente.

### Descripción detallada de la invención

Los canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas sensoras de dolor son actualmente de gran interés en el desarrollo de fármacos para tratar el dolor. El bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje en neuronas sensoras de dolor puede bloquear las señales de dolor interrumpiendo la iniciación y transmisión del potencial de acción y el bloqueo de los canales de calcio puede impedir la neurotransmisión de la señal de dolor a la neurona de segundo orden en la médula espinal. Hasta la fecha, una limitación en el diseño de moléculas orgánicas pequeñas que bloqueen los canales de sodio o canales de calcio es que deben ser activas cuando se aplican externamente a la célula diana. La gran mayoría de moléculas aplicadas externamente son hidrófobas y pueden pasar a través de membranas. Debido a esto, entrarán en todas las células y por tanto no tienen selectividad para afectar sólo a las neuronas sensoras de dolor. Sin embargo, se conocen algunos bloqueantes, tales como QX-314, que sólo son eficaces cuando están presentes en el interior de la célula. Hasta la fecha, se han estudiado tales bloqueantes principalmente con técnicas de registro electrofisiológico tales como el registro electrofisiológico con fijación de voltaje de célula completa que permiten la diálisis al interior de una célula mediante ruptura mecánica de la membrana. La dificultad para la ruptura mecánica sin destruir la célula, y la dificultad para aplicar de manera reversible bloqueantes en el interior de la célula posteriormente, ha excluido el desarrollo de ensayos de selección de alto rendimiento para moléculas de fármaco que podrían actuar desde el interior de las células.

Se han descubierto medios para suministrar inhibidores de canales iónicos regulados por voltaje a neuronas nociceptivas. Proporcionando una manera para que estos inhibidores entren en neuronas nociceptivas, esto permite el uso, tanto en selección como en terapia, de clases enteras de moléculas que son activas como bloqueantes de fármacos desde el interior de la célula pero no es necesario que permeen la membrana. Además, la restricción de la entrada de tales bloqueantes a neuronas sensoras de dolor en condiciones terapéuticas permite el uso de fármacos que no tienen necesariamente selectividad intrínseca por canales iónicos en neuronas sensoras de dolor en comparación con otros tipos de células, sino que más bien lograr su acción selectiva sobre neuronas sensoras de dolor permitiéndoles entrar en neuronas sensoras de dolor con preferencia a otras células en el sistema nervioso y cardiovascular. Adicionalmente, puesto que los receptores TRPV1 en particular a menudo son más activos en estados tisulares asociados con dolor (tales como inflamación), se favorece la entrada a neuronas sensitivas particulares más asociadas con tejidos que están generando dolor. Las neuronas sensitivas primarias sensibles al picor también expresan canales TRP, particularmente TRPV1, y son también propicias para este enfoque.

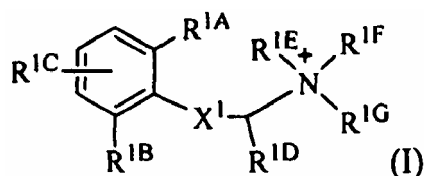
15 La invención se describe en más detalle a continuación.

Inhibidores de canales iónicos regulados por voltaje

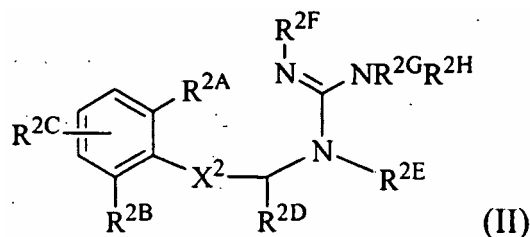
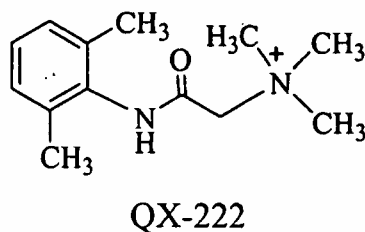
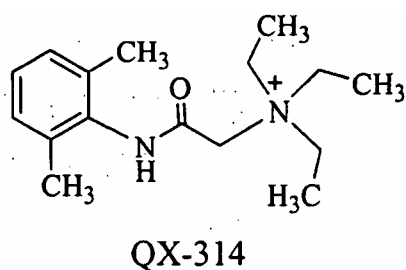
Los inhibidores de canales iónicos regulados por voltaje que son adecuados para su uso en los métodos, las composiciones y los usos de la invención son compuestos hidrófilos, cargados positivamente de manera deseable. En una realización, los compuestos están cargados permanentemente (es decir, tienen una carga que no es transitoria). En otra realización, los compuestos están cargados transitoriamente. Los inhibidores de canales de sodio regulados por voltaje adecuados incluyen pero no se limitan a QX-314, N-metil-procaína (QX-222), N-octil-guanidina, 9-aminoacridina y pancuronio. Un inhibidor adecuado es también CERM 11888 (bepiridilo cuaternario).

Adicionalmente, se da a conocer que existen muchos inhibidores de canales iónicos regulados por voltaje conocidos que serían de un tamaño adecuado para ser útiles en los métodos (por ejemplo, desde aproximadamente 100 hasta 4,000 Da, de 100 a 3,000 Da, de 100 a 2,000 Da, de 150 a 1,500 Da, o incluso de 200 a 1.200 Da) y que tienen grupos amina, o pueden modificarse para contener grupos amina, que pueden modificarse fácilmente para estar cargados (por ejemplo, como aminas cuaternarias cargadas positivamente, o como compuestos guanilados cargados transitoriamente). Los Inhibidores usados según la invención son riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, diisopiramide, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina, articaína, bupivacaína, mepivacaína y fluspirileno.

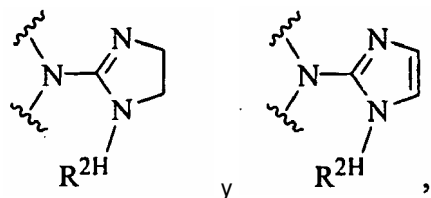
35 Los compuestos dados a conocer incluyen compuestos de fórmulas I-X, a continuación.



En la fórmula I, cada uno de  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$  y  $R^{1C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{1H}$ ,  $NR^{1I}R^{1J}$ ,  $NR^{1K}C(O)R^{1L}$ ,  $S(O)R^{1M}$ ,  $SO_2R^{1N}R^{1O}$ ,  $SO_2NR^{1P}R^{1Q}$ ,  $SO_3R^{1R}$ ,  $CO_2R^{1S}$ ,  $C(O)R^{1T}$  y  $C(O)NR^{1U}R^{1V}$ ; y cada uno de  $R^{1H}$ ,  $R^{1I}$ ,  $R^{1J}$ ,  $R^{1K}$ ,  $R^{1L}$ ,  $R^{1M}$ ,  $R^{1N}$ ,  $R^{1O}$ ,  $R^{1P}$ ,  $R^{1Q}$ ,  $R^{1R}$ ,  $R^{1S}$ ,  $R^{1T}$ ,  $R^{1U}$  y  $R^{1V}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $X^1$  se selecciona de  $-CR^{1W}R^{1X}$ ,  $-NR^{1Y}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{1Z}-$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{1W}$ ,  $R^{1X}$ ,  $R^{1Y}$  y  $R^{1Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $R^{1D}$  se selecciona de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; y cada uno de  $R^{1E}$ ,  $R^{1F}$  y  $R^{1G}$  se selecciona independientemente de alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; o  $R^{1D}$  y  $R^{1G}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene al menos un átomo de nitrógeno. Se da a conocer que  $X^1$  es  $-NHC(O)-$ . Los compuestos de fórmula I a modo de ejemplo incluyen derivados de amonio cuaternario metilados de fármacos anestésicos, tales como N-metil-lidocaína, N,N-dimetil-prilocaína, N,N,N-trimetil-tocainida, N-metil-etidocaína, N-metil-ropivacaína, N-metil-bupivacaína, N-metil-levobupivacaína, N-metil-mepivacaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en el esquema 1. Los compuestos de fórmula I incluyen QX-314 (CAS 21306-56-9) y QX-222 (CAS 21236-55-5) (a continuación).



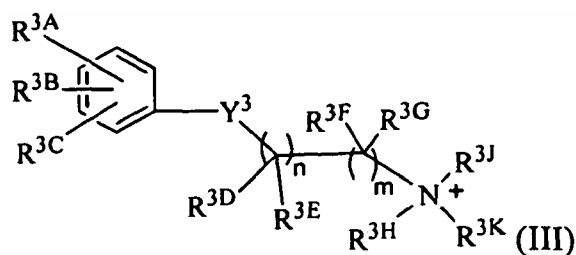
- 5 En la fórmula II, cada uno de  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$  y  $R^{2C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquiniilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{2I}$ ,  $NR^{2J}R^{2K}$ ,  $NR^{2L}C(O)R^{2M}$ ,  $S(O)R^{2N}$ ,  $SO_2R^{2O}R^{2P}$ ,  $SO_2NR^{2Q}R^{2R}$ ,  $SO_3R^{2S}$ ,  $CO_2R^{2T}$ ,  $C(O)R^{2U}$  y  $C(O)NR^{2V}R^{2W}$ ; y cada uno de  $R^{2I}$ ,  $R^{2J}$ ,  $R^{2K}$ ,  $R^{2L}$ ,  $R^{2M}$ ,  $R^{2N}$ ,  $R^{2O}$ ,  $R^{2P}$ ,  $R^{2Q}$ ,  $R^{2R}$ ,  $R^{2S}$ ,  $R^{2T}$ ,  $R^{2U}$ ,  $R^{2V}$ ,  $R^{2W}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquiniilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $X^2$  se selecciona de  $-CR^{2X}R^{2Y}$ ,  $-NR^{2Z}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{2AA}$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{2X}$ ,  $R^{2Y}$ ,  $R^{2Z}$  y  $R^{2AA}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquiniilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $R^{2D}$  se selecciona de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquiniilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $R^{2E}$  es H o alquilo  $C_{1-4}$ ; y cada uno de  $R^{2F}$ ,  $R^{2G}$  y  $R^{2H}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquiniilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; o  $R^{2F}$  y  $R^{2G}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $R^{2F}$  y  $R^{2G}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, el grupo guanidina resultante se selecciona de manera deseable de



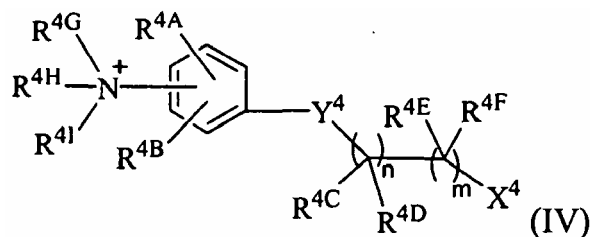
- en las que  $R^{2H}$  es H o  $CH_3$ . De manera deseable,  $R^{2F}$  y  $R^{2G}$  se combinan para formar un alqueno o alqueniilo de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de 5, 6 y 7 miembros. Se da a conocer que  $X^2$  es  $-NHC(O)-$ . Los compuestos de fórmula II a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $-C(NH)NH_2$ ) de fármacos anestésicos, tales como desetil-N-guanidil-lidocaína, N-guanidil-prilocaina, N-guanidil-tocainida, desetil-N-guanidil-etidocaína, desbutil-N-guanidil-ropivacaína, desbutil-N-guanidil-bupivacaína, desbutil-N-guanidil-levobupivacaína, desmetil-N-guanidil-mepivacaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 2-5.

- Los derivados de guanidilo descritos en el presente documento (por ejemplo, los compuestos de fórmula II) se presentan en su forma de base inalterada. Estos compuestos pueden administrarse o bien como una sal (es decir, una sal de adición de ácido) o bien en su forma de base inalterada, que experimenta protonación *in situ* para formar un resto cargado.

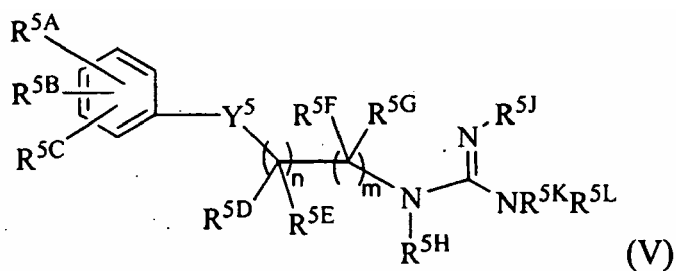
- La síntesis de fármacos originales de fórmulas I y II se describe en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 2.441.498 (síntesis de lidocaína), la patente estadounidense n.º 3.160.662 (síntesis de prilocaína), la patente alemana n.º 2235745 (síntesis de tocainida), la patente alemana n.º 2162744 (síntesis de etidocaína), la publicación PCT n.º WO85/00599 (síntesis de ropivacaína), la patente estadounidense n.º 2.955.111 (síntesis de bupivacaína y levobupivacaína) y la patente estadounidense n.º 2.799.679 (síntesis de mepivacaína).



En la fórmula III,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$  y  $R^{3C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{3L}$ ,  $NR^{3M}R^{3N}$ ,  $NR^{3O}C(O)R^{3P}$ ,  $S(O)R^{3Q}$ ,  $SO_2R^{3R}R^{3S}$ ,  $SO_2NR^{3T}R^{3U}$ ,  $SO_3R^{3V}$ ,  $CO_2R^{3W}$ ,  $C(O)R^{3X}$  y  $C(O)NR^{3Y}R^{3Z}$ ; y cada uno de  $R^{3L}$ ,  $R^{3M}$ ,  $R^{3N}$ ,  $R^{3O}$ ,  $R^{3P}$ ,  $R^{3Q}$ ,  $R^{3R}$ ,  $R^{3S}$ ,  $R^{3T}$ ,  $R^{3U}$ ,  $R^{3V}$ ,  $R^{3W}$ ,  $R^{3X}$ ,  $R^{3Y}$ ,  $R^{3Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $Y^3$  se selecciona de  $-CR^{3AA}R^{3AB}-$ ,  $-NR^{3AC}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{3AD}-$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{3AA}$ ,  $R^{3AB}$ ,  $R^{3AC}$  y  $R^{3AD}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; cada uno de  $R^{3D}$ ,  $R^{3E}$ ,  $R^{3F}$  y  $R^{3G}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ , heterociclilo  $C_{2-6}$ , arilo  $C_{6-12}$ , alcarilo  $C_{7-14}$  y alk-heterociclilo  $C_{3-10}$ ; cada uno de  $R^{3H}$ ,  $R^{3J}$  y  $R^{3K}$  se selecciona independientemente de alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ . El nitrógeno cuaternario en la fórmula III se identifica en el presente documento como N'. Los compuestos de fórmula III a modo de ejemplo incluyen derivados de amonio cuaternario metilados de fármacos anestésicos, tales como N'-metil-procaína, N'-metil-proparacaína, N'-metil-aloacaína, N'-metil-encainida, N'-metil-procainamida, N'-metil-metoclopramida, N'-metil-estovaina, N'-metil-propoxicaína, N'-metil-clorprocaína, N',N'-dimetil-flecainida y N'-metil-tetracaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en el esquema 1.

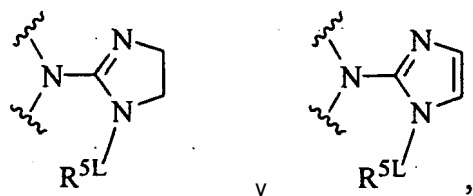


En la fórmula IV,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $R^{4A}$  y  $R^{4B}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{4L}$ ,  $NR^{4M}R^{4N}$ ,  $NR^{4O}C(O)R^{4P}$ ,  $S(O)R^{4Q}$ ,  $SO_2R^{4R}R^{4S}$ ,  $SO_2NR^{4T}R^{4U}$ ,  $SO_3R^{4V}$ ,  $CO_2R^{4W}$ ,  $C(O)R^{4X}$  y  $C(O)NR^{4Y}R^{4Z}$ ; y cada uno de  $R^{4L}$ ,  $R^{4M}$ ,  $R^{4N}$ ,  $R^{4O}$ ,  $R^{4P}$ ,  $R^{4Q}$ ,  $R^{4R}$ ,  $R^{4S}$ ,  $R^{4T}$ ,  $R^{4U}$ ,  $R^{4V}$ ,  $R^{4W}$ ,  $R^{4X}$ ,  $R^{4Y}$ ,  $R^{4Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $Y^4$  se selecciona de  $-CR^{4AA}R^{4AB}-$ ,  $-NR^{4AC}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{4AD}-$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{4AA}$ ,  $R^{4AB}$ ,  $R^{4AC}$  y  $R^{4AD}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; cada uno de  $R^{4C}$ ,  $R^{4D}$ ,  $R^{4E}$  y  $R^{4F}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ , heterociclilo  $C_{2-6}$ , arilo  $C_{6-12}$ , alcarilo  $C_{7-14}$  y alk-heterociclilo  $C_{3-10}$ ;  $X^4$  se selecciona de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y  $NR^{4J}R^{4K}$ ; cada uno de  $R^{4J}$  y  $R^{4K}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; y cada uno de  $R^{4G}$ ,  $R^{4H}$  y  $R^{4I}$  se selecciona independientemente de alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ . El nitrógeno cuaternario en la fórmula IV se identifica en el presente documento como N". Los compuestos de fórmula III a modo de ejemplo incluyen derivados de amonio cuaternario metilados de fármacos anestésicos, tales como N",N",N"-trimetil-procaína, N",N",N"-trimetil-proparacaína, N",N",N"-trimetil-procainamida, N",N",N"-trimetil-metoclopramida, N",N",N"-trimetil-propoxicaína, N",N",N"-trimetil-clorprocaína, N",N",N"-trimetil-tetracaína, N",N",N"-trimetil-benzocaína y N",N",N"-trimetil-butambeno. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en el esquema 1.

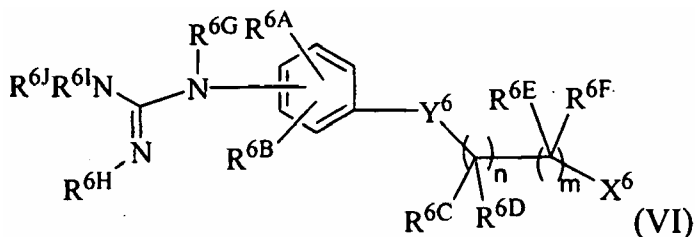


En la fórmula V,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$  y  $R^{5C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueniilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{5M}$ ,  $NR^{5N}R^{5O}$ ,  $NR^{5P}C(O)R^{5Q}$ ,  $S(O)R^{5R}$ ,

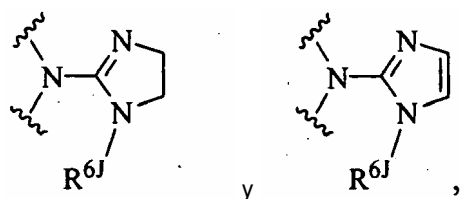
5  $\text{SO}_2\text{R}^{5\text{S}}\text{R}^{5\text{T}}$ ,  $\text{SO}_2\text{NR}^{5\text{U}}\text{R}^{5\text{V}}$ ,  $\text{SO}_3\text{R}^{5\text{W}}$ ,  $\text{CO}_2\text{R}^{5\text{X}}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{R}^{5\text{Y}}$  y  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{5\text{Z}}\text{R}^{5\text{AA}}$ ; y cada uno de  $\text{R}^{5\text{M}}$ ,  $\text{R}^{5\text{N}}$ ,  $\text{R}^{5\text{O}}$ ,  $\text{R}^{5\text{P}}$ ,  $\text{R}^{5\text{Q}}$ ,  $\text{R}^{5\text{R}}$ ,  $\text{R}^{5\text{S}}$ ,  $\text{R}^{5\text{T}}$ ,  $\text{R}^{5\text{U}}$ ,  $\text{R}^{5\text{V}}$ ,  $\text{R}^{5\text{W}}$ ,  $\text{R}^{5\text{X}}$ ,  $\text{R}^{5\text{Y}}$ ,  $\text{R}^{5\text{Z}}$  y  $\text{R}^{5\text{AA}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ;  $\text{Y}^5$  se selecciona de  $-\text{CR}^{5\text{AB}}\text{R}^{5\text{AC}}$ ,  $-\text{NR}^{5\text{AD}}\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{5\text{AE}}$ ,  $-\text{CO}_2-$  y  $-\text{OC}(\text{S})-$ ; y cada uno de  $\text{R}^{5\text{AB}}$ ,  $\text{R}^{5\text{AC}}$ ,  $\text{R}^{5\text{AD}}$  y  $\text{R}^{5\text{AE}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ; cada uno de  $\text{R}^{5\text{D}}$ ,  $\text{R}^{5\text{E}}$ ,  $\text{R}^{5\text{F}}$  y  $\text{R}^{5\text{G}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$ , heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ , heterociclilo  $\text{C}_{2-6}$ , arilo  $\text{C}_{6-12}$ , alcarilo  $\text{C}_{7-14}$  y alkheterociclilo  $\text{C}_{3-10}$ ;  $\text{R}^{5\text{H}}$  es H o alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ; y cada uno de  $\text{R}^{5\text{J}}$ ,  $\text{R}^{5\text{K}}$  y  $\text{R}^{5\text{L}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ; o  $\text{R}^{5\text{J}}$  y  $\text{R}^{5\text{K}}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $\text{R}^{5\text{J}}$  y  $\text{R}^{5\text{K}}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, el grupo guanidina resultante se selecciona de manera deseable de



15 en las que  $\text{R}^{5\text{L}}$  es H o  $\text{CH}_3$ . De manera deseable,  $\text{R}^{5\text{J}}$  y  $\text{R}^{5\text{K}}$  se combinan para formar un alquileno o alquenileno de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de anillos de 5, 6 y 7 miembros. El nitrógeno guanilado en la fórmula V se identifica en el presente documento como  $\text{N}^{\prime}$ . Los compuestos de fórmula V a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ ) de fármacos anestésicos, tales como tales como desetil-N'-guanidil-procaína, desetil-N'-guanidil-proparacaína, desetil-N'-guanidil-alocaína, desmetil-N'-guanidil-encainida, desetil-N'-guanidil-procainamida, desetil-N'-guanidil-metoclopramida, desmetil-N'-guanidil-estovaina, desetil-N'-guanidil-propoxicaína, desetil-N'-guanidil-cloroprocaína, N'-guanidil-flecainida y desetil-N'-guanidil-tetracaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 2-5.



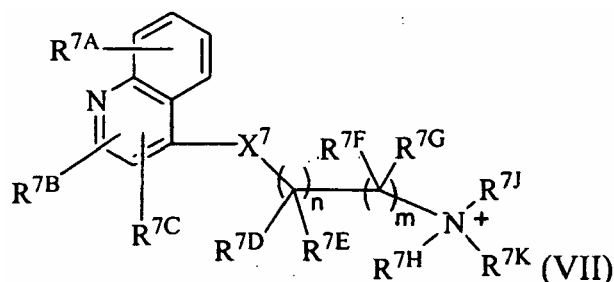
25 En la fórmula VI,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $\text{R}^{6\text{A}}$  y  $\text{R}^{6\text{B}}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$ , heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ,  $\text{OR}^{6\text{K}}$ ,  $\text{NR}^{6\text{L}}\text{R}^{6\text{M}}$ ,  $\text{NR}^{6\text{N}}\text{C}(\text{O})\text{R}^{6\text{O}}$ ,  $\text{S}(\text{O})\text{R}^{6\text{P}}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}^{6\text{Q}}\text{R}^{6\text{R}}$ ,  $\text{SO}_2\text{NR}^{6\text{S}}\text{R}^{6\text{T}}$ ,  $\text{SO}_3\text{R}^{6\text{U}}$ ,  $\text{CO}_2\text{R}^{6\text{V}}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{R}^{6\text{W}}$  y  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{6\text{X}}\text{R}^{6\text{Y}}$ ; y cada uno de  $\text{R}^{6\text{K}}$ ,  $\text{R}^{6\text{L}}$ ,  $\text{R}^{6\text{M}}$ ,  $\text{R}^{6\text{N}}$ ,  $\text{R}^{6\text{O}}$ ,  $\text{R}^{6\text{P}}$ ,  $\text{R}^{6\text{Q}}$ ,  $\text{R}^{6\text{R}}$ ,  $\text{R}^{6\text{S}}$ ,  $\text{R}^{6\text{T}}$ ,  $\text{R}^{6\text{U}}$ ,  $\text{R}^{6\text{V}}$ ,  $\text{R}^{6\text{W}}$ ,  $\text{R}^{6\text{X}}$  y  $\text{R}^{6\text{Y}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$ ; y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ;  $\text{Y}^6$  se selecciona de  $-\text{CR}^{6\text{Z}}\text{R}^{6\text{AA}}$ ,  $-\text{NR}^{6\text{AB}}\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{6\text{AC}}$ ,  $-\text{CO}_2-$  y  $-\text{OC}(\text{S})-$ ; y cada uno de  $\text{R}^{6\text{Z}}$ ,  $\text{R}^{6\text{AA}}$ ,  $\text{R}^{6\text{AB}}$  y  $\text{R}^{6\text{AC}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ; cada uno de  $\text{R}^{6\text{C}}$ ,  $\text{R}^{6\text{D}}$ ,  $\text{R}^{6\text{E}}$  y  $\text{R}^{6\text{F}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$ , heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ , heterociclilo  $\text{C}_{2-6}$ , arilo  $\text{C}_{6-12}$ , alcarilo  $\text{C}_{7-14}$  y alkheterociclilo  $\text{C}_{3-10}$ ;  $\text{X}^6$  se selecciona de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y  $\text{NR}^{6\text{AD}}\text{R}^{6\text{AE}}$ ; cada uno de  $\text{R}^{6\text{AD}}$  y  $\text{R}^{6\text{AE}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ;  $\text{R}^{6\text{G}}$  es H o alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ; y cada uno de  $\text{R}^{6\text{H}}$ ,  $\text{R}^{6\text{I}}$  y  $\text{R}^{6\text{J}}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-4}$  y heteroalquilo  $\text{C}_{2-4}$ ; o  $\text{R}^{6\text{H}}$  y  $\text{R}^{6\text{I}}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $\text{R}^{6\text{H}}$  y  $\text{R}^{6\text{I}}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, el grupo guanidina resultante se selecciona de manera deseable de



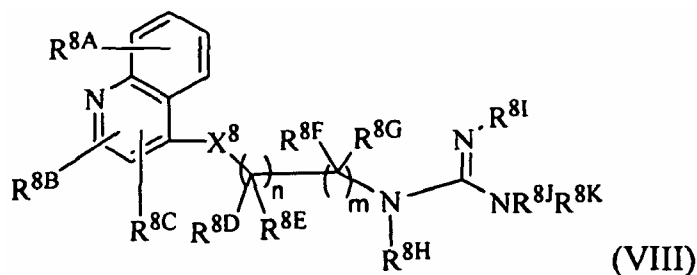
45 en las que  $\text{R}^{6\text{J}}$  es H o  $\text{CH}_3$ . De manera deseable,  $\text{R}^{6\text{H}}$  y  $\text{R}^{6\text{I}}$  se combinan para formar un alquileno o alquenileno de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de anillos de 5, 6 y 7 miembros. El nitrógeno guanilado en la fórmula V se identifica en el presente documento como  $\text{N}^{\prime\prime}$ . Los compuestos de fórmula VI a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ ) de fármacos anestésicos, tales

como tales como N"-guanidil-procaína, N"-guanidil-proparacaína, N"-guanidil-procainamida, N"-guanidil-metoclopramida, N"-guanidil-propoxicaína, N"-guanidil-cloroprocaína, N"-guanidil-tetracaína, N"-guanidil-benzocaína y N"-guanidil-butambeno. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 2-5.

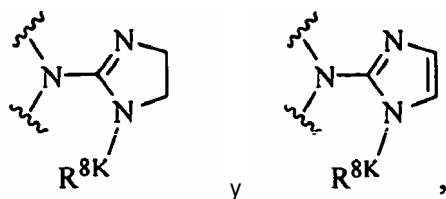
5 La síntesis de fármacos originales de fórmulas III-VI se describe en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 812,554 (síntesis de procaína), Clinton *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 74:592 (1952) (síntesis de proparacaína), la patente estadounidense n.º 2.689.248 (síntesis de propoxicaína), Hadicke *et al.*, Pharm. Zentralh. 94:384 (1955) (síntesis de cloroprocaína), la patente estadounidense n.º 1.889.645 (síntesis de tetracaína), Salcowski *et al.*, Ber. 28:1921 (1895) (síntesis de benzocaína), Brill *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 43:1322 (1921) (síntesis de butambeno), la patente estadounidense n.º 3.931.195 (síntesis de encainida), Yamazaki *et al.*, J. Pharm. Soc. Japan 73:294 (1953) (síntesis de procainamida), la patente estadounidense n.º 3.177.252 (síntesis de metoclopramida), la patente estadounidense n.º 3.900.481 (síntesis de flecainida) y Fourneau *et al.*, Bull. Sci. Pharmacol. 35:273 (1928) (síntesis de estovaína).



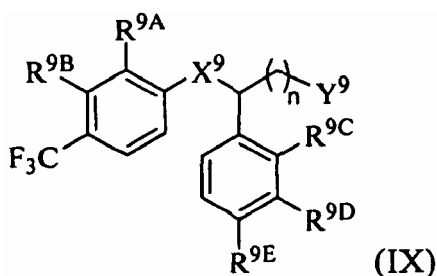
En la fórmula VII,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $R^{7A}$ ,  $R^{7B}$  y  $R^{7C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{7L}$ ,  $NR^{7M}R^{7N}$ ,  $NR^{7O}C(O)R^{7P}$ ,  $S(O)R^{7Q}$ ,  $SO_2R^{7R}R^{7S}$ ,  $SO_2NR^{7T}R^{7U}$ ,  $SO_3R^{7V}$ ,  $CO_2R^{7W}$ ,  $C(O)R^{7X}$  y  $C(O)NR^{7Y}R^{7Z}$ ; y cada uno de  $R^{7L}$ ,  $R^{7M}$ ,  $R^{7N}$ ,  $R^{7O}$ ,  $R^{7P}$ ,  $R^{7Q}$ ,  $R^{7R}$ ,  $R^{7S}$ ,  $R^{7T}$ ,  $R^{7U}$ ,  $R^{7V}$ ,  $R^{7W}$ ,  $R^{7X}$ ,  $R^{7Y}$  y  $R^{7Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $X^7$  se selecciona de  $-CR^{7AA}R^{7AB}$ ,  $NR^{7AC}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{7AD}$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{7AA}$ ,  $R^{7AB}$ ,  $R^{7AC}$  y  $R^{7AD}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; cada uno de  $R^{7D}$ ,  $R^{7E}$ ,  $R^{7F}$  y  $R^{7G}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ , heterociclilo  $C_{2-6}$ , arilo  $C_{6-12}$ , alcarilo  $C_{7-14}$  y alk-heterociclilo  $C_{3-10}$ ; y cada uno de  $R^{7H}$ ,  $R^{7J}$  y  $R^{7K}$  se selecciona independientemente de alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ . Se da a conocer que  $X^7$  es  $-C(O)NH-$ . Los compuestos de fórmula VII a modo de ejemplo incluyen derivados de amonio cuaternario metilados de fármacos anestésicos, tales como N'-metil-dibucaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en el esquema 1.



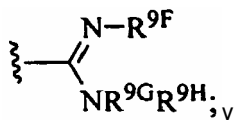
En la fórmula VIII,  $n = 0-3$  y  $m = 0-3$ , con  $(n+m) = 0-6$ ; cada uno de  $R^{8A}$ ,  $R^{8B}$  y  $R^{8C}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{8L}$ ,  $NR^{8M}R^{8N}$ ,  $NR^{8O}C(O)R^{8P}$ ,  $S(O)R^{8Q}$ ,  $SO_2R^{8R}R^{8S}$ ,  $SO_2NR^{8T}R^{8U}$ ,  $SO_3R^{8V}$ ,  $CO_2R^{8W}$ ,  $C(O)R^{8X}$  y  $C(O)NR^{8Y}R^{8Z}$ ; y cada uno de  $R^{8L}$ ,  $R^{8M}$ ,  $R^{8N}$ ,  $R^{8O}$ ,  $R^{8P}$ ,  $R^{8Q}$ ,  $R^{8R}$ ,  $R^{8S}$ ,  $R^{8T}$ ,  $R^{8U}$ ,  $R^{8V}$ ,  $R^{8W}$ ,  $R^{8X}$ ,  $R^{8Y}$  y  $R^{8Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $X^8$  se selecciona de  $-CR^{8AA}R^{8AB}$ ,  $-NR^{8AC}C(O)-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(O)NR^{8AD}$ ,  $-CO_2-$  y  $-OC(S)-$ ; y cada uno de  $R^{8AA}$ ,  $R^{8AB}$ ,  $R^{8AC}$  y  $R^{8AD}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; cada uno de  $R^{8D}$ ,  $R^{8E}$ ,  $R^{8F}$  y  $R^{8G}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ , heteroalquilo  $C_{2-4}$ , heterociclilo  $C_{2-6}$ , arilo  $C_{6-12}$ , alcarilo  $C_{7-14}$  y alk-heterociclilo  $C_{3-10}$ ;  $R^{8H}$  es H o alquilo  $C_{1-4}$ ; y cada uno de  $R^{8I}$ ,  $R^{8J}$  y  $R^{8K}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ; o  $R^{8I}$  y  $R^{8J}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $R^{8I}$  y  $R^{8J}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, se da a conocer que el grupo guanidina resultante se selecciona de



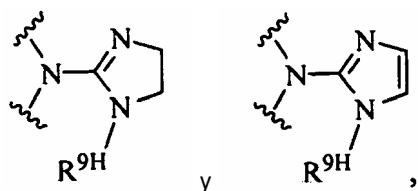
5 en las que  $R^{8K}$  es H o  $CH_3$ . De manera deseable,  $R^{8I}$  y  $R^{8J}$  se combinan para formar un alquileo o alquenileno de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de anillos de 5, 6 y 7 miembros. El nitrógeno guanilado en la fórmula V se identifica en el presente documento como N'. Se da a conocer que  $X^8$  es  $-C(O)NH-$ . Los compuestos de fórmula VIII a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $-C(NH)NH_2$ ) de fármacos anestésicos, tales como tales como desetil-N-guanidil-dibucaína. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 2-5.



10 En la fórmula IX,  $n = 0-6$ ; cada uno de  $R^{9A}$ ,  $R^{9B}$ ,  $R^{9C}$ ,  $R^{9D}$  y  $R^{9E}$  se selecciona independientemente de H, halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$ ,  $OR^{9I}$ ,  $NR^{9J}R^{9K}$ ,  $NR^{9L}C(O)R^{9M}$ ,  $S(O)R^{9N}$ ,  $SO_2R^{9O}R^{9P}$ ,  $SO_2NR^{9Q}R^{9R}$ ,  $SO_3R^{9S}$ ,  $CO_2R^{9T}$ ,  $C(O)R^{9U}$  y  $C(O)NR^{9V}R^{9W}$ ; y cada uno de  $R^{9I}$ ,  $R^{9J}$ ,  $R^{9K}$ ,  $R^{9L}$ ,  $R^{9M}$ ,  $R^{9N}$ ,  $R^{9O}$ ,  $R^{9P}$ ,  $R^{9Q}$ ,  $R^{9R}$ ,  $R^{9S}$ ,  $R^{9T}$ ,  $R^{9U}$ ,  $R^{9V}$  y  $R^{9W}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $X^9$  se selecciona de  $-CR^{9X}R^{9Y}$ ,  $-O-$ ,  $-S-$  y  $-NR^{9Z}$ ; y cada uno de  $R^{9X}$ ,  $R^{9Y}$  y  $R^{9Z}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$ , alquinilo  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $Y^9$  es  $NR^{9AA}NR^{9AB}NR^{9AC}$  o  $NR^{9AD}Z^9$ ; cada uno de  $R^{9AA}$ ,  $R^{9AB}$  y  $R^{9AC}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$  y alquinilo  $C_{2-4}$ ;  $R^{9AD}$  es H o alquilo  $C_{1-4}$ ;  $Z^9$  es

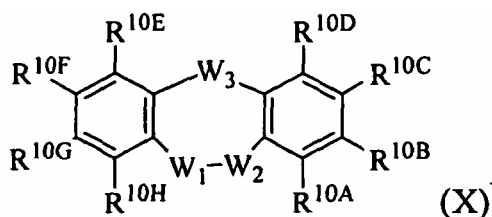


20 cada uno de  $R^{9F}$ ,  $R^{9G}$  y  $R^{9H}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alquenilo  $C_{2-4}$  y alquinilo  $C_{2-4}$ , o  $R^{9F}$  y  $R^{9G}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $R^{9F}$  y  $R^{9G}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, se da a conocer que el grupo guanidina resultante se selecciona de

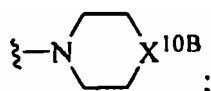


30 en las que  $R^{9H}$  es H o  $CH_3$ . Se da a conocer que  $R^{9F}$  y  $R^{9G}$  pueden combinarse para formar un alquileo o alquenileno de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de anillos de 5, 6 y 7 miembros. Se da a conocer que  $X^9 = -O-$ . Los compuestos de fórmula IX a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $-C(NH)NH_2$ ), tales como N-guanidil-fluoxetina y derivados de amonio cuaternario metilados, tales como N,N-dimetil-fluoxetina. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 1-5.

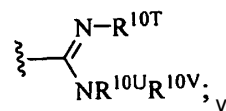
35



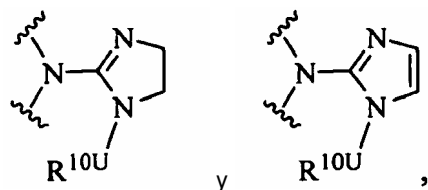
En la fórmula X,  $W_3$  es O, NH,  $NCH_2R^{10J}$ ,  $NC(O)CH_2R^{10J}$ ,  $CHCH_2R^{10J}$ ,  $C=CHR^{10J}$  o  $C=CHR^{10K}$ ;  $W_1-W_2$  es S, O,  $OCHR^{10K}$ ,  $SCHR^{10K}$ ,  $N=CR^{10K}$ ,  $CHR^{10L}-CHR^{10K}$  o  $CR^{10L}=CR^{10K}$ ; cada uno de  $R^{10A}$ ,  $R^{10B}$ ,  $R^{10C}$ ,  $R^{10D}$ ,  $R^{10E}$ ,  $R^{10F}$ ,  $R^{10G}$  y  $R^{10H}$  se selecciona independientemente de H, OH, haluro, alquilo  $C_{1-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ ;  $R^{10J}$  es  $CH_2CH_2X^{10A}$  o  $CH(CH_3)CH_2X^{10A}$ ;  $R^{10L}$  es H o OH;  $R^{10K}$  es H, OH o el grupo:



$X^{10A}$  es  $NR^{10M}R^{10N}R^{10P}$  o  $NR^{10Q}X^{10C}$ ;  $X^{10B}$  es  $NR^{10R}R^{10S}$  o  $NX^{10C}$ ; cada uno de  $R^{10M}$ ,  $R^{10N}$ ,  $R^{10P}$ ,  $R^{10R}$  y  $R^{10S}$  se selecciona independientemente de alquilo  $C_{1-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$ , alquino  $C_{2-4}$  y heteroalquilo  $C_{2-4}$ , o  $R^{10R}$  y  $R^{10S}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene al menos un átomo de nitrógeno;  $R^{10Q}$  es H o alquilo  $C_{1-4}$ ;  $X^{10C}$  es



y cada uno de  $R^{10T}$ ,  $R^{10U}$  y  $R^{10V}$  se selecciona independientemente de H, alquilo  $C_{1-4}$ , alqueno  $C_{2-4}$  y alquino  $C_{2-4}$ , o  $R^{10T}$  y  $R^{10V}$  juntos completan un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno. Cuando  $R^{10T}$  y  $R^{10V}$  forman un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno, se da a conocer que el grupo guanidina resultante se selecciona de



en las que  $R^{10U}$  es H o  $CH_3$ . Se da a conocer que  $R^{10T}$  y  $R^{10V}$  pueden combinarse para formar un alqueno o alqueno de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de 5, 6 y 7 miembros. Los compuestos de fórmula X a modo de ejemplo incluyen derivados de N-guanidilo (por ejemplo, derivados de  $C(NH)NH_2$ ) y derivados de amonio cuaternario metilados. Los derivados de N-guanidilo de fórmula X incluyen, sin limitación, N-guanidil-amoxapina, desmetil-N-guanidil-trimipramina, desmetil-N-guanidil-dotiepina, desmetil-N-guanidil-doxepina, desmetil-N-guanidil-amitriptilina, N-guanidil-protriptilina, N-guanidil-desipramina, desmetil-N-guanidil-clomipramina, desmetil-N-guanidil-clozapina, desmetil-N-guanidil-loxapina, N-guanidil-nortriptilina, desmetil-N-guanidil-ciclobenzaprina, desmetil-N-guanidil-ciproheptadina, desmetil-N-guanidil-olopatadina, desmetil-N-guanidil-prometazina, desmetil-N-guanidil-trimeprazina, desmetil-N-guanidil-clorprotixeno, desmetil-N-guanidil-clorpromazina, desmetil-N-guanidil-propiomazina, desmetil-N-guanidil-proclorperazina, desmetil-N-guanidil-tietilperazina, desmetil-N-guanidil-trifluoperazina, desmetil-N-guanidil-etacizina y desmetil-N-guanidil-imipramina. Los derivados de amonio cuaternario metilados de fórmula X incluyen, sin limitación, N,N-dimetil-amoxapina, N-metil-trimipramina, N-metil-dotiepina, N-metil-doxepina, N-metil-amitriptilina, N,N-dimetil-protriptilina, N,N-dimetil-desipramina, N-metil-clomipramina, N-metil-clozapina, N-metil-loxapina, N,N-dimetil-nortriptilina, N-metil-ciclobenzaprina, N-metil-ciproheptadina, N-metil-olopatadina, N-metil-prometazina, N-metil-trimeprazina, N-metil-clorprotixeno, N-metil-clorpromazina, N-metil-propiomazina, N-metil-moricizina, N-metil-proclorperazina, N-metil-tietilperazina, N-metil-flufenazina, N-metil-perfenazina, N-metil-flupentixol, N-metil-acetofenazina, N-metil-trifluoperazina, N-metil-etacizina y N-metil-imipramina. Estos derivados pueden prepararse usando métodos análogos a los descritos en los esquemas 1-5.

Otros bloqueantes de canales iónicos que pueden contener un nitrógeno de amina que puede guanilarse o cuaternizarse tal como se describe en el presente documento incluyen orfenadrina, fenbenzamina, bepridil, pimozida, penfluridol, flunarizina, fluspirileno, propiverina, disopiramida, metadona, tolterodina, sales de tridihexilo, tripelennamina, mepiramina, bromfeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, carbinoxamina, acetato de levometadilo, galopamilo, verapamilo, devapamilo, tiapamilo, emopamilo, diclonina, pramoxina, lamotrigina,

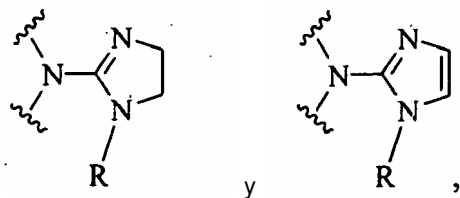


mibefradil, gabapentina, amilorida, diltiazem, nifedipino, nimodipino, nitrendipino, cocaína, mexiletina, propafenona, quinidina, oxetazaína, articaína, riluzol, benciclano, lifarizina y estircnina. Todavía otros bloqueantes de canales iónicos pueden modificarse para incorporar un átomo de nitrógeno adecuado para cuaternización o guanilación. Estos bloqueantes de canales iónicos incluyen, sin limitación, fosfenitoína, etotoína, fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, topiramato, zonisamida y sales de ácido valproico.

### Síntesis

La síntesis de bloqueantes de canales iónicos de carga modificada puede suponer la protección y desprotección selectivas de alcoholes, aminas, cetonas, sulfhidrilos o grupos funcionales carboxilo del bloqueante de canales iónicos original, el grupo de unión, el grupo voluminoso y/o el grupo cargado. Por ejemplo, los grupos protectores usados comúnmente para aminas incluyen carbamatos, tales como de terc-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9-fluorenilmetilo, alilo y m-nitrofenilo. Otros grupos protectores usados comúnmente para aminas incluyen amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil-amidas, trimetilsililetanosulfonamidas y terc-butilsulfonil-amidas. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para carboxilos incluyen ésteres, tales como metílico, etílico, terc-butílico, 9-fluorenilmetílico, 2-(trimetilsilil)etoxi-metílico, bencilico, difenilmetílico, O-nitrobencilico, ortoésteres y haloésteres. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para alcoholes incluyen éteres, tales como metil, metoximetil, metoxietoximetil, metiltiometil, benciloximetil, tetrahidropiranyl, etoxietil, bencil, 2-naftilmetil, O-nitrobencil, P-nitrobencil, P-metoxibencil, 9-fenilxantil, tritil (incluyendo metoxi-tritilos) y silil éteres. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para sulfhidrilos incluyen muchos de los mismos grupos protectores usados para los hidroxilos. Además, pueden protegerse los sulfhidrilos en una forma reducida (por ejemplo, como disulfuros) o una forma oxidada (por ejemplo, como ácidos sulfónicos, ésteres sulfónicos o amidas sulfónicas). Pueden elegirse los grupos protectores de manera que se requieran condiciones selectivas (por ejemplo, condiciones ácidas, condiciones básicas, catálisis por un nucleófilo, catálisis por un ácido de Lewis o hidrogenación) para la eliminación de cada uno, excluyendo otros grupos protectores en una molécula. Las condiciones requeridas para la adición de grupos protectores a funcionalidades amina, alcohol, sulfhidrilo y carboxilo y las condiciones requeridas para su eliminación se proporcionan en detalle en T.W. Green y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (2ª Ed.), John Wiley & Sons, 1991 y P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Georg Thieme Verlag, 1994.

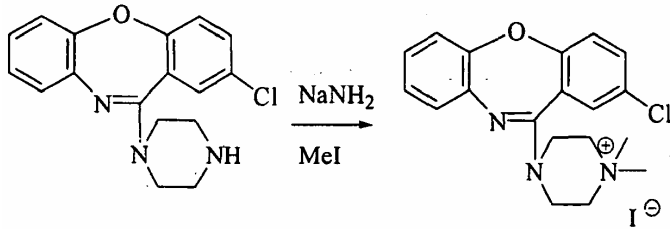
Pueden prepararse bloqueantes de canales iónicos de carga modificada usando técnicas con las que están familiarizados los expertos en la técnica. Las modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, mediante alquilación del bloqueante de canales iónicos original usando las técnicas descritas por J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons, Inc., 1992, página 617. La conversión de grupos amino en grupo guanidina puede lograrse usando protocolos de síntesis convencionales. Por ejemplo, Mosher ha descrito un método general para preparar guanidinas monosustituidas mediante reacción de ácido aminoiminometanosulfónico con aminas (Kim *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 29:3183 (1988)). Se desarrolló un método más conveniente para la guanilación de aminas primarias y secundarias por Bernatowicz empleando clorhidrato de 1H-pirazol-1-carboxamidina; 1-H-pirazol-1-(N,N'-bis(terc-butoxicarbonil)carboxamidina; o 1-H-pirazol-1-(N,N'-bis(benciloxicarbonil)carboxamidina. Estos reactivos reaccionan con aminas para proporcionar guanidinas monosustituidas (véanse Bernatowicz *et al.*, *J. Org. Chem.* 57:2497 (1992); y Bernatowicz *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34:3389 (1993)). Además, las tioureas y S-alkil-isotioureas han mostrado ser productos intermedios útiles en las síntesis de guanidinas sustituidas (Poss *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 33:5933 (1992)). En determinadas realizaciones, la guanidina es parte de un anillo heterocíclico que tiene dos átomos de nitrógeno (véanse, por ejemplo, las estructuras a continuación). El sistema de anillos puede incluir un alquileo o



alquilenilo de desde 2 hasta 4 átomos de carbono, por ejemplo, sistemas de anillos de anillos de 5, 6 y 7 miembros. Tales sistemas de anillos pueden prepararse, por ejemplo, usando los métodos dados a conocer por Schlama *et al.*, *J. Org. Chem.*, 62:4200 (1997).

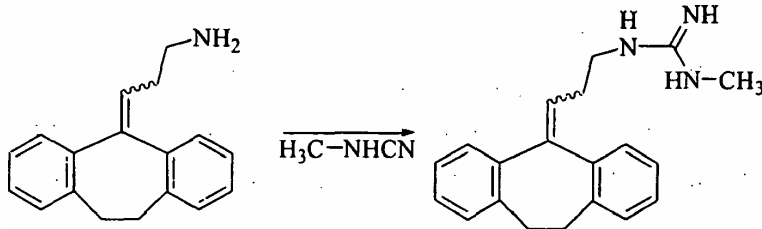
Pueden prepararse bloqueantes de canales iónicos de carga modificada mediante alquilación de un nitrógeno de amina en el compuesto original tal como se muestra en el esquema 1.

Esquema 1

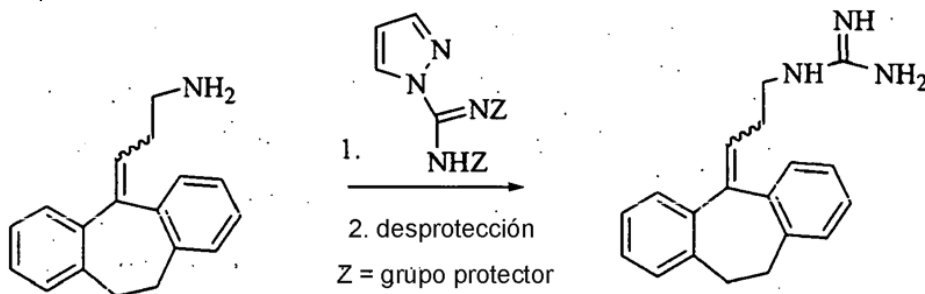


Alternativamente, pueden prepararse bloqueantes de canales iónicos de carga modificada mediante la introducción de un grupo guanidina. El compuesto original puede hacerse reaccionar con una cianamida, por ejemplo, metilcianamida, tal como se muestra en el esquema 2 o derivados de pirazol-1-carboxamida tal como se muestra en el esquema 3 cuando Z es H o un grupo protector adecuado. Alternativamente, el compuesto original puede hacerse reaccionar con bromuro de cianógeno seguido por reacción con amiduro de metilcloroaluminio tal como se muestra en el esquema 4. También pueden usarse reactivos tales como 2-(metilitio)-2-imidazolina para preparar derivados funcionalizados de manera adecuada (esquema 5).

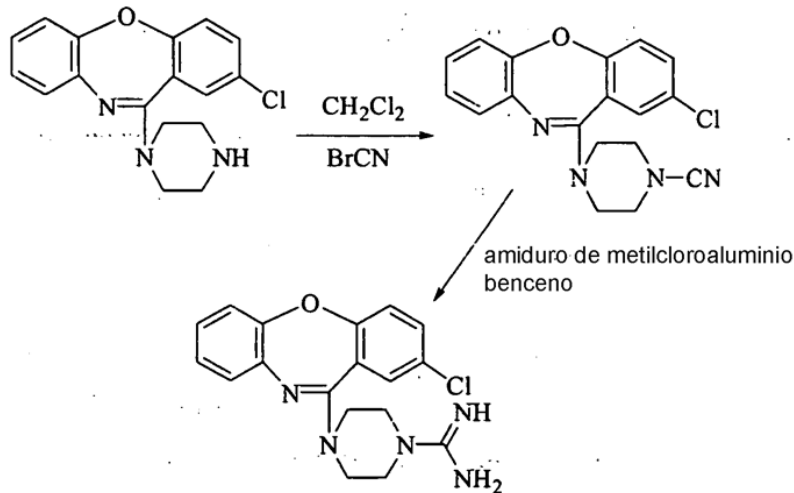
Esquema 2



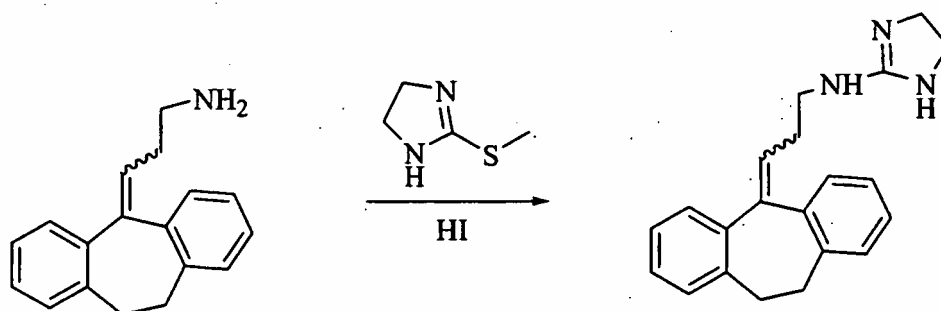
Esquema 3



Esquema 4



Esquema 5



Puede modificarse cualquier bloqueante de canales iónicos que contenga un átomo de nitrógeno de amina tal como se muestra en los esquemas 1-5.

5

#### Agonistas de TRPV1

Los agonistas de TRPV1 que pueden emplearse en los métodos, las composiciones y los usos de la invención incluyen pero no se limitan a cualquiera que active los receptores TRPV1 en nociceptores y permita la entrada de al menos un inhibidor de canales iónicos regulados por voltaje. Los agonistas de TRPV1 adecuados incluyen pero no se limitan a capsaicina, eugenol, Arvanil (N-araquidonoilvanilamina), anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2APB), AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato-13-acetato-20-homovanilato de forbol (PPAHV), Olvanil (NE 19550), OLDA (N-oleoildopamina), N-araquidonildopamina (NADA), 6'-yodo-resiniferatoxina (6'-IRTX), N-aciletanolaminas C18, derivados de lipoxigenasa tales como ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico, péptidos con nudo de cisteínas inhibidor (ICK) (vanilotoxinas), piperina, MSK195 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida), JYL79 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea), hidroxí-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol y SU200 (N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea).

#### Agonistas de TRP1A

Los agonistas de TRP1A que pueden emplearse en los métodos, las composiciones y los usos de la invención incluyen cualquiera que active los receptores TRP1A en nociceptores o pruriceptores y permita la entrada de al menos un inhibidor de canales iónicos regulados por voltaje. Los agonistas de TRP1A adecuados incluyen pero no se limitan a cinamaldehído, isotiocianato de alilo, disulfuro de dialilo, icilina, aceite de canela, aceite de gaulteria, aceite de clavo, acroleína, hidroxí-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 4-hidroxinonenal, p-hidroxibenzoato de metilo, aceite de mostaza y ciclohexilcarbamato de 3'-carbamoilbencil-3-ilo (URB597).

#### Agonistas de P2X

Los agonistas de P2X que pueden emplearse en los métodos, las composiciones y los usos de la invención incluyen cualquiera que active los receptores P2X en nociceptores o pruriceptores y permita la entrada de al menos un inhibidor de canales iónicos regulados por voltaje. Los agonistas de P2X adecuados incluyen pero no se limitan a 2-metiltilio-ATP, 2' y 3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP y ATP-5'-O-(3-tiotrifosfato).

#### Agonistas de TRPM8

Los agonistas de TRPM8 que pueden emplearse en los métodos, las composiciones y los usos de la invención incluyen cualquiera que active los receptores TRPM8 en nociceptores o pruriceptores y permita la entrada de al menos un inhibidor de canales iónicos regulados por voltaje. Los agonistas de TRPM8 adecuados incluyen pero no se limitan a mentol, iciclina, eucaliptol, linalool, geraniol e hidroxicitronelal.

#### Agentes adicionales

Las composiciones y los usos de la invención pueden usarse para el tratamiento de dolor (por ejemplo, dolor neuropático, dolor nociceptivo, dolor idiopático, dolor inflamatorio, dolor disfuncional, migraña o dolor procedimental) y picor (por ejemplo estados dermatológicos como eccema atópico o psoriasis, prurito en infecciones parasitarias y fúngicas, inducido por fármacos, alérgico, metabólico, en cáncer o insuficiencia hepática o renal). Si se desea, pueden usarse uno o más agentes adicionales usados normalmente para tratar el dolor junto con una combinación de la invención en los métodos, las composiciones y los usos descritos en el presente documento. Tales agentes incluyen pero no se limitan a AINE, opioides, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de transportadores de amina, anticonvulsivos. Si se desea, pueden usarse uno o más agentes adicionales usados normalmente para tratar el picor junto con una combinación de la invención en los métodos, las composiciones y los usos descritos en el presente documento. Tales agentes incluyen esteroides tópicos u orales y antihistamínicos.

55

Formulación de composiciones

La administración de una combinación de la invención puede ser mediante cualquier medio adecuado que dé como resultado la reducción de la sensación de dolor en la región diana. El/los inhibidor(es) de canales iónicos regulados por voltaje y el/los agonista(s) de receptores TRPV1/TRPA1/P2X/TRPM8 pueden estar contenidos en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia portadora adecuada y están presentes generalmente en cantidades que ascienden al 1-95% en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma farmacéutica que sea adecuada para administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intratecal, epidural u ocular, o mediante inyección, inhalación o contacto directo con la mucosa nasal u oral.

Por tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, pastillas, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, disoluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, soluciones orales, dispositivos de suministro osmótico, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles. Las composiciones pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional (véanse, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> edición, 2000, ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boilan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Cada compuesto de la combinación puede formularse de una variedad de maneras que se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden formularse los agentes primero y segundo juntos o por separado. De manera deseable, los agentes primero y segundo se formulan juntos para la administración simultánea o casi simultánea de los agentes.

Los agentes formulados individualmente o por separado pueden envasarse juntos como un kit. Los ejemplos no limitativos incluyen pero no se limitan a kits que contienen, por ejemplo, dos pastillas, una pastilla y un polvo, un supositorio y un líquido en un vial, dos cremas tópicas, etc. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a pacientes, tales como viales para reconstituir formas de polvo, jeringas para inyección, sistemas de suministro i.v. hechos a medida, inhaladores, etc. Adicionalmente, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones.

El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de un solo uso para un paciente, múltiples usos para un paciente particular (a una dosis constante o en el que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza la terapia); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("envasado a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cajas de cartón, envases de tipo blíster, botellas, tubos, y similares.

Formas farmacéuticas sólidas para uso oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el/los principio(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco).

Pueden mezclarse dos o más compuestos juntos en un comprimido, una cápsula u otro vehículo, o pueden dividirse. En un ejemplo, el primer compuesto está contenido en el interior del comprimido, y el segundo compuesto está en el exterior; de manera que una parte sustancial del segundo compuesto se libera antes de la liberación del primer compuesto.

También pueden proporcionarse formulaciones para uso oral como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que se mezcla el principio activo con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blandas en las que se mezcla el principio activo con agua o un medio de aceite.

Generalmente, cuando se administra a un ser humano, la dosificación oral de cualquiera de los compuestos de la combinación de la invención dependerá de la naturaleza del compuesto, y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Normalmente, tal dosificación es normalmente de aproximadamente 0,001 mg a 2000 mg al día, de manera deseable de aproximadamente 1 mg a 1000 mg al día, y de manera más deseable de aproximadamente 5 mg a 500 mg al día. Pueden ser necesarias dosificaciones de hasta 200 mg al día. Puede ser útil administrar la dosis terapéutica mínima requerida para activar el receptor TRPV1/TRPA1/P2X/TRPM8, que puede determinarse usando técnicas convencionales.

La administración de cada fármaco en la combinación puede ser, independientemente, de una a cuatro veces al día durante de un día a un año, y puede ser incluso durante toda la vida del paciente. La administración de múltiples dosis, a largo plazo estará indicada en muchos casos.

Formulaciones tópicas

Las composiciones también pueden adaptarse para uso tópico con un vehículo tópico que contiene desde entre el 0,0001% y el 25% (p/p) o más de principio(s) activo(s).

5 En una combinación preferida, los principios activos están preferiblemente cada uno en desde entre el 0,0001% y el 10% (p/p), más preferiblemente desde entre el 0,0005% y el 4% (p/p) de principio activo. La crema puede aplicarse de una a cuatro veces al día, o según se necesite. Por ejemplo, para prednisolona adaptada para administración tópica, un vehículo tópico contendrá desde entre el 0,01% y el 5% (p/p), preferiblemente desde entre el 0,01% y el 2% (p/p), más preferiblemente desde entre el 0,01 % y el 1% (p/p).

10 Al llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, se aplica preferiblemente el vehículo tópico que contiene la combinación de la invención al sitio de incomodidad en el sujeto. Por ejemplo, puede aplicarse una crema a las manos de un sujeto que padece artritis en los dedos.

### 15 Conjugados

Se da a conocer que los fármacos usados en cualquiera de las combinaciones descritas en el presente documento pueden unirse covalentemente entre sí para formar un conjugado de fórmula (XI).

20 (A)-(L)-(B) (XI)

En la fórmula (XI), (A) es un compuesto que activa un receptor de formación de canales que está presente en nociceptores y/o pruriceptores; (L) es un grupo de unión; y (B) es un compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de los canales pero no inhibe sustancialmente los canales cuando se aplica a la cara externa de los canales, y puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través del receptor de formación de canales cuando se activa el receptor.

30 Los conjugados pueden ser profármacos, que liberan el fármaco (A) y el fármaco (B) con la escisión, por ejemplo, del conjugado por enzimas intracelulares y extracelulares (por ejemplo, amidasas, esterases y fosfatasas). Los conjugados dados a conocer también pueden diseñarse para permanecer intactos en gran medida *in vivo*, resistir la escisión por enzimas intracelulares y extracelulares, siempre que el conjugado pueda entrar en nociceptores o pruriceptores a través del receptor de formación de canales cuando se activa el receptor. La degradación del conjugado *in vivo* puede controlarse mediante el diseño del grupo de unión (L) y los enlaces covalentes formados con el compuesto (A) y el compuesto (B) durante la síntesis del conjugado.

35 Pueden prepararse conjugados usando técnicas con las que están familiarizados los expertos en la técnica. Por ejemplo, los conjugados pueden prepararse usando los métodos dados a conocer en G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., 1996. La síntesis de conjugados puede suponer la protección y desprotección selectivas de alcoholes, aminas, cetonas, sulfhidrilos o grupos funcionales carboxilo del fármaco (A), el grupo de unión y/o el fármaco (B). Por ejemplo, los grupos protectores usados comúnmente para aminas incluyen carbamatos, tales como de terc-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9-fluorenilmetilo, alilo y m-nitrofenilo. Otros grupos protectores usados comúnmente para aminas incluyen amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil-amidas, trimetilsililetanosulfonamidas y terc-butilsulfonil-amidas. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para carboxilos incluyen ésteres, tales como ésteres, metílico, etílico, terc-butílico, 9-fluorenilmetílico, 2-(trimetilsilil)etoxi-etílico, bencílico, difenilmetílico, O-nitrobencílico, ortoésteres y haloésteres. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para alcoholes incluyen éteres, tales como metil, metoximetil, metoxietoximetil, metiltiometil, benciloximetil, tetrahidropiranil, etoxietil, bencil, 2-naftilmetil, O-nitrobencil, P-nitrobencil, P-metoxibencil, 9-fenilxantil, tritil (incluyendo metoxi-tritilos) y silil éteres. Los ejemplos de grupos protectores usados comúnmente para los sulfhidrilos incluyen muchos de los mismos grupos protectores usados para los hidroxilos. Además, pueden protegerse los sulfhidrilos en una forma reducida (por ejemplo, como disulfuros) o una forma oxidada (por ejemplo, como ácidos sulfónicos, ésteres sulfónicos o amidas sulfónicas). Pueden elegirse los grupos protectores de manera que se requieran condiciones selectivas (por ejemplo, condiciones ácidas, condiciones básicas, catálisis por un nucleófilo, catálisis por un ácido de Lewis o hidrogenación) para la eliminación de cada uno, excluyendo otros grupos protectores en una molécula. Las condiciones requeridas para la adición de grupos protectores a funcionalidades amina, alcohol, sulfhidrilo y carboxilo y las condiciones requeridas para su eliminación se proporcionan en detalle en T.W. Green y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis* (2ª Ed.), John Wiley & Sons, 1991 y P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Georg Thieme Verlag, 1994. Se proporcionan a continuación detalles adicionales sobre la síntesis.

### 60 Grupos de unión

El componente de grupo de unión dado a conocer es, en su forma más sencilla, un enlace entre el compuesto (A) y el compuesto (B), pero normalmente proporciona un esqueleto molecular lineal, cíclico o ramificado que tiene grupos colgantes que unen covalentemente el compuesto (A) al compuesto (B). Por tanto, la unión del compuesto (A) al compuesto (B) se logra mediante medios covalentes, que suponen la formación de enlaces con uno o más grupos funcionales ubicados en el compuesto (A) y el compuesto (B). Los ejemplos de grupos funcionales químicamente reactivos que pueden emplearse para este fin incluyen, sin limitación, grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo,

carbonilo, hidrato de carbono, dioles vecinales, tioéteres, 2-aminoalcoholes, 2-aminotioles, guanidinilo, imidazolilo y fenólico.

5 La unión covalente del compuesto (A) y el compuesto (B) puede efectuarse usando un grupo de unión que contiene restos reactivos que pueden dar reacción con tales grupos funcionales presentes en el compuesto (A) y el compuesto (B). Por ejemplo, un grupo de amina del compuesto (A) puede reaccionar con un grupo carboxilo del grupo de unión, o un derivado activado del mismo, dando como resultado la formación de una amida que une los dos.

10 Los ejemplos de restos que pueden dar reacción con grupos sulfhidrilo incluyen compuestos de  $\alpha$ -haloacetilo del tipo  $XCH_2CO-$  (cuando  $X=Br, Cl$  o  $I$ ), que muestran una reactividad particular para grupos sulfhidrilo, pero que también pueden usarse para modificar grupos imidazolilo, tioéter, fenol y amino tal como se describe por Gurd, *Methods Enzymol.* 11:532 (1967). Los derivados de N-maleimida también se consideran selectivos frente a los grupos sulfhidrilo, pero pueden ser útiles adicionalmente en el acoplamiento a grupos amino en determinadas condiciones.

15 Reactivos tales como 2-iminotiolano (Traut *et al.*, *Biochemistry* 12:3266 (1973)); que introducen un grupo tiol a través de la conversión de un grupo amino, pueden considerarse reactivos con sulfhidrilo si la unión se produce a través de la formación de puentes disulfuro.

20 Los ejemplos de restos reactivos que pueden dar reacción con grupos amino incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes y acilantes. Los agentes alquilantes representativos incluyen:

(i) compuestos de  $\alpha$ -haloacetilo, que muestran especificidad frente a grupos amino en ausencia de grupos tiol reactivos y son del tipo  $XCH_2CO-$  (cuando  $X=Cl, Br$  o  $I$ ), por ejemplo, tal como se describe por Wong *Biochemistry* 24:5337 (1979);

25 (ii) derivados de N-maleimida, que pueden reaccionar con grupos amino o bien a través de una reacción de tipo Michael o bien a través de acilación mediante adición al grupo carbonilo de anillo, por ejemplo, tal como se describe por Smyth *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 82: 4600 (1960) y *Biochem. J.* 91:589 (1964);

30 (iii) haluros de arilo tales como compuestos nitrohaloaromáticos reactivos;

(iv) haluros de alquilo, tal como se describe, por ejemplo, por McKenzie *et al.*, *J. Protein Chem.* 7:581 (1988);

35 (v) aldehídos y cetonas que pueden formar bases de Schiff con grupos amino, estabilizándose habitualmente los aductos formados a través de reducción para dar una amina estable;

(vi) derivados de epóxido tales como epiclorohidrina y bisoxiranos, que pueden reaccionar con grupos amino, sulfhidrilo o hidroxilo fenólico;

40 (vii) derivados que contienen cloro de s-triazinas, que son muy reactivos frente a nucleófilos tales como grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo;

45 (viii) aziridinas basadas en los compuestos de s-triazina detallados anteriormente, por ejemplo, tal como se describe por Ross, *J. Adv. Cancer Res.* 2: 1 (1954), que reaccionan con nucleófilos tales como grupos amino mediante apertura de anillo;

(ix) ésteres dietílicos del ácido escuárico tal como se describe por Tietze, *Chem. Ber.* 124:1215 (1991); y

50 (x)  $\alpha$ -haloalquil éteres, que son agentes alquilantes más reactivos que los haluros de alquilo normales debido a la activación producida por el átomo de oxígeno del éter, tal como se describe por Benneche *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* 28:463 (1993).

Los agentes acilantes reactivos con amino representativos incluyen:

55 (i) isocianatos e isotiocianatos, particularmente derivados aromáticos, que forman derivados de urea y tiourea estables, respectivamente;

(ii) cloruros de sulfonilo, que se han descrito por Herzig *et al.*, *Biopolymers* 2:349 (1964);

60 (iii) cloruros de ácido;

(iv) ésteres activos tales como ésteres nitrofenílicos o ésteres N-hidroxisuccinimidílicos;

(v) anhídridos de ácido tales como mixtos, simétricos o N-carboxianhídridos;

65 (vi) otros reactivos útiles para la formación de enlaces amida, por ejemplo, tal como se describe por M. Bodansky,

Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984;

(vii) acilazidas, por ejemplo en las que el grupo azida se genera a partir de un derivado de hidrazida formado previamente usando nitrito de sodio, tal como se describe por Wetz *et al.*, Anal. Biochem. 58:347 (1974); e

5 (viii) imidoésteres, que forman amidinas estables en la reacción con grupos amino, por ejemplo, tal como se describe por Hunter y Ludwig, J. Am. Chem. Soc. 84:3491 (1962).

10 Pueden hacerse reaccionar aldehídos y cetonas con aminas para formar bases de Schiff, que pueden estabilizarse ventajosamente a través de aminación reductora. Los restos alcoxilamino reaccionan rápidamente con cetonas y aldehídos para producir alcoxaminas estables, por ejemplo, tal como se describe por Webb *et al.*, en Bioconjugate Chem: 1:96 (1990).

15 Los ejemplos de restos reactivos que pueden dar reacción con grupos carboxilo incluyen diazocompuestos tales como ésteres de diazoacetato y diazoacetamidas, que reaccionan con alta especificidad para generar grupos éster, por ejemplo, tal como se describe por Herriot, Adv. Protein Chem. 3:169 (1947). También pueden emplearse reactivos de modificación de carboxilo tales como carbodiimidas, que reaccionan a través de la formación de O-acilurea seguida por la formación de enlaces amida.

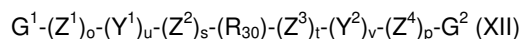
20 Se apreciará que pueden convertirse los grupos funcionales en el compuesto (A) y/o el compuesto (B), si se desea, en otros grupos funcionales antes de la reacción, por ejemplo, para conferir reactividad o selectividad adicional. Los ejemplos de métodos útiles para este fin incluyen conversión de aminas en carboxilos usando reactivos tales como anhídridos dicarboxílicos; conversión de aminas en tioles usando reactivos tales como tiolactona de N-acetilhomocisteína, anhídrido S-acetilmercaptosuccínico, 2-iminotiolano, o derivados de succinimidilo que contienen tiol; conversión de tioles en carboxilos usando reactivos tales como  $\alpha$ -haloacetatos; conversión de tioles en aminas usando reactivos tales como etilenimina o 2-bromoetilamina; conversión de carboxilos en aminas usando reactivos tales como carbodiimidas seguido por diaminas; y conversión de alcoholes en tioles usando reactivos tales como cloruro de tosilo seguido por transesterificación con tioacetato e hidrólisis para dar el tiol con acetato de sodio.

30 Pueden usarse, si se desea, los denominados grupos de unión de longitud cero, que suponen la unión por contacto directo de un grupo químico reactivo del compuesto (A) con un grupo químico reactivo del compuesto (B) sin introducir material de unión adicional.

35 De la manera más común, sin embargo, el grupo de unión incluirá dos o más restos reactivos, tal como se describió anteriormente, conectados por un elemento espaciador. La presencia de un espaciador de este tipo permite que grupos de unión bifuncionales reaccionen con grupos funcionales específicos dentro del compuesto (A) y el compuesto (B), dando como resultado a una unión covalente entre los dos. Los restos reactivos en un grupo de unión pueden ser iguales (grupo de unión homobifuncional) o diferentes (grupo de unión heterobifuncional, o, cuando están presentes varios restos reactivos distintos, grupo de unión heteromultifuncional), proporcionando una diversidad de posibles reactivos que pueden producir la unión covalente entre el compuesto (A) y el compuesto (B).

45 Los elementos espaciadores en el grupo de unión consisten normalmente en cadenas lineales o ramificadas y pueden incluir un alquilo C<sub>1-10</sub>, alquenilo C<sub>2-10</sub>, alquinilo C<sub>2-10</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-10</sub>.

En algunos casos, el grupo de unión se describe mediante la fórmula (XII):



50 En la fórmula (XII), G<sup>1</sup> es un enlace entre el compuesto (A) y el grupo de unión; G<sup>2</sup> es un enlace entre el grupo de unión y el compuesto (B); Z<sup>1</sup>, Z<sup>2</sup>, Z<sup>3</sup> y Z<sup>4</sup> se selecciona cada uno, independientemente, de O, S y NR<sub>31</sub>; R<sub>31</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>, alquenilo C<sub>2-4</sub>, alquinilo C<sub>2-4</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-7</sub>; Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> se seleccionan cada uno, independientemente, de carbonilo, tiocarbonilo, sulfonilo o fosforilo; o, p, s, t, u y v son cada uno, independientemente, 0 ó 1; y R<sub>30</sub> es un alquilo C<sub>1-10</sub>, alquenilo C<sub>2-10</sub>, alquinilo C<sub>2-10</sub>, heterociclilo C<sub>2-6</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, alcarilo C<sub>7-14</sub>, alk-heterociclilo C<sub>3-10</sub> o heteroalquilo C<sub>1-10</sub>, o un enlace químico que une G<sup>1</sup>-(Z<sup>1</sup>)<sub>o</sub>-(Y<sup>1</sup>)<sub>u</sub>-(Z<sup>2</sup>)<sub>s</sub>- a -(Z<sup>3</sup>)<sub>t</sub>-(Y<sup>2</sup>)<sub>v</sub>-(Z<sup>4</sup>)<sub>p</sub>-G<sup>2</sup>.

60 Los ejemplos de grupos de unión homobifuncionales útiles en la preparación de conjugados incluyen, sin limitación, diaminas y dioles seleccionados de etilendiamina, propilendiamina y hexametilendiamina, etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, ciclohexanodiol y policaprolactona-diol.

### Usos a modo de ejemplo

65 Las composiciones y los usos de la invención pueden usarse para tratar dolor asociado con cualquiera de varios estados, incluyendo dolor de espalda y cuello, dolor debido a cáncer, dolor ginecológico y de parto, fibromialgia, artritis y otros dolores reumatológicos, dolores ortopédicos, neuralgia postherpética y otros dolores neuropáticos,

crisis drepanocíticas, cistitis intersticial, uretritis y otros dolores urológicos, dolor dental, cefaleas, dolor posoperatorio y dolor procedimental (es decir, dolor asociado con inyecciones, drenaje de un absceso, cirugía, procedimientos dentales, procedimientos oftálmicos, artroscopias y uso de otro instrumental médico, procedimientos de cirugía plástica, procedimientos dermatológicos, reducción de fracturas, biopsias, y similares).

5 Puesto que una subclase de nociceptores median la sensación de picor, también pueden usarse las composiciones y los usos de la invención para tratar picor en pacientes con estados como dermatitis, infecciones, parásitos, picaduras de insectos, embarazo, trastornos metabólicos, insuficiencia hepática o renal, reacciones a fármacos, reacciones alérgicas, eccema y cáncer.

10 Índices de dolor y función

Con el fin de medir la eficacia de cualquiera de los métodos, composiciones o usos de la invención, puede usarse un índice de medición. Los índices que son útiles en los métodos, las composiciones y los usos de la invención para la medición de dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos, inmunoinflamatorios y neuropáticos incluyen una escala analógica visual (VAS), una escala Likert, escalas categóricas de dolor, descriptores, el índice de Lequesne, el índice WOMAC y el índice AUSCAN, conociéndose bien cada uno de ellos en la técnica. Tales índices pueden usarse para medir dolor, picor, función, rigidez, u otras variables.

20 Una escala analógica visual (VAS) proporciona una medida de una cantidad monodimensional. Una VAS utiliza generalmente una representación de la distancia, tal como un dibujo de una línea con marcas trazadas a intervalos de distancia regulares, por ejemplo, diez intervalos de 1 cm. Por ejemplo, puede pedirse a un paciente que clasifique una sensación de dolor o picor eligiendo el punto en la línea que se corresponde de la mejor manera con la sensación de dolor o picor, cuando un extremo de la línea corresponde a “sin dolor” (puntuación de 0 cm) o “sin picor” y el otro extremo de la línea corresponde a “dolor insoportable” o “picor insoportable” (puntuación de 10 cm). Este procedimiento proporciona un enfoque sencillo y rápido para obtener información cuantitativa sobre cómo experimenta el paciente el dolor o picor. Las escalas VAS y su uso se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.709.406 y 6.432.937.

30 Una escala Likert proporciona de manera similar una medida de una cantidad monodimensional. Generalmente, una escala Likert tiene valores enteros diferenciados que oscilan entre un valor bajo (por ejemplo, 0, que significa sin dolor) y un valor alto (por ejemplo, 7, que significa dolor extremo). Se le pide a un paciente que experimenta dolor que elija un número entre el valor bajo y el valor alto para representar el grado de dolor experimentado. Las escalas de Likert y su uso se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.623.040 y 6.766.319.

35 El índice de Lequesne y el índice de osteoartritis de las Universidades Western Ontario y McMaster (WOMAC) evalúan el dolor, la función y la rigidez en la rodilla y cadera de pacientes con OA que usan cuestionarios autoadministrados. Tanto la rodilla como la cadera están englobadas por el WOMAC, mientras que existe un cuestionario de Lequesne para la rodilla y uno independiente para la cadera. Estos cuestionarios son útiles porque contienen más contenido de información en comparación con VAS o Likert. Tanto los cuestionarios del índice WOMAC como del índice de Lequesne se han validado extensamente en OA, incluyendo en prácticas quirúrgicas (por ejemplo, artroplastia de rodilla y cadera). Sus características métricas no difieren significativamente.

45 El índice AUSCAN (de artritis de manos australiano-canadiense) emplea un cuestionario notificado por el propio paciente válido, fiable y sensible. En un caso, este cuestionario contiene 15 preguntas dentro de tres dimensiones (dolor, 5 preguntas; rigidez, 1 pregunta; y función física, 9 preguntas). Un índice AUSCAN puede utilizar, por ejemplo, una escala Likert o una VAS.

50 Los índices que son útiles en los métodos, las composiciones y los usos de la invención para la medición de dolor incluyen la escala descriptiva de dolor (PDS), la escala analógica visual (VAS), las escalas descriptivas verbales (VDS), la escala numérica de intensidad de dolor (NPIS), la escala de dolor neuropático (NPS), el inventario de síntomas de dolor neuropático (NPSI), el inventario de dolor actual (PPI), la medición de dolor en pacientes geriátricos (GPM), el cuestionario de dolor de McGill (MPQ), intensidad media del dolor (escala descriptiva diferencial), puntuación de evaluación global (GES) de la escala numérica de dolor (NPS), la forma abreviada del cuestionario de dolor de McGill, el inventario multifásico de la personalidad de Minnesota, el perfil de dolor y el inventario multidimensional de dolor, el cuestionario Heath para niños y el cuestionario de evaluación en niños.

60 Puede medirse el picor mediante medidas subjetivas (VAS, Lickert, descriptores). Otro enfoque es medir el rascado que es un correlato objetivo de picor usando un transductor de vibración o medidores sensibles al movimiento.

Selección

65 Este descubrimiento de que determinados canales expresados por y presentes en nociceptores y pruriceptores permiten la entrada de compuestos que inhiben canales iónicos regulados por voltaje en las células diana proporciona un método para identificar compuestos que son útiles para el tratamiento de dolor y picor. En un ejemplo, se pone en contacto un nociceptor o pruriceptor con a uno, dos, o más compuestos que activan receptores



TRPV1, TRPA1, TRPM8 y/o P2X(2/3). El mismo nociceptor o pruriceptor también se pone en contacto con un segundo compuesto que inhibe uno o más canales de sodio regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna del nociceptor (por ejemplo, mediante aplicación intracelular a través de micropipeta en la técnica de registro electrofisiológico con fijación de voltaje de célula completa) pero no cuando se aplica a la cara externa de la célula (debido a la incapacidad del compuesto para atravesar la membrana celular). La inhibición de los canales iónicos en el nociceptor o pruriceptor inhibirá la propagación por la célula de un potencial de acción y/o la señalización a la neurona de segundo orden, bloqueando en cualquier caso la transmisión de la señal de dolor, por tanto, la capacidad del segundo compuesto para inhibir canales de sodio regulados por voltaje en el nociceptor identifica ese compuesto como uno que puede usarse en combinación con compuestos que activan receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y/o P2X(2/3) para tratar dolor o picor.

### Ejemplo 1

Se registró la corriente a través de canales de sodio dependientes de voltaje usando registros con fijación de voltaje de célula completa de neuronas GRD de rata adulta. Para seleccionar los nociceptores, se hizo un registro de neuronas pequeñas ( $24 \pm 5 \mu\text{m}$ ;  $n=25$ ) y se sometieron a prueba las neuronas para determinar la expresión de receptores TRPV1 mediante una aplicación corta (1 s) de capsaicina  $1 \mu\text{M}$ . En 25/25 de las neuronas pequeñas sometidas a prueba, la capsaicina produjo una corriente de entrada prolongada ( $10 \pm 3 \text{ s}$ ) (figura 1A, panel superior), que concuerda con que las neuronas sean nociceptores. Se provocaron corriente de sodio mediante escalones de despolarización desde un potencial de mantenimiento de  $-70 \text{ mV}$ . La aplicación en baño de QX-314  $5 \text{ mM}$  solo tuvo un mínimo efecto sobre la corriente de sodio (disminución en un  $3 \pm 0,5\%$  tras una aplicación de 5 minutos,  $n=25$ ) (figura 1A, izquierda; b). La aplicación de capsaicina sola ( $1 \text{ mM}$  durante 1-10 minutos) redujo la corriente de sodio moderadamente (inhibición del  $31 \pm 9\%$  ( $n=25$ )). Sin embargo, cuando se aplicó QX-314 junto con capsaicina, la corriente de sodio se suprimió casi totalmente (inhibición en un  $98 \pm 0,4\%$ ,  $n=25$ ) (figura 1A, izquierda; b). Tal como se esperaba si resultaba el bloqueo de la corriente de sodio de la entrada gradual de QX-314 a través de receptores TRPV1, se desarrolló inhibición a lo largo de varios minutos y fue casi completa después de 15 minutos (figura 1C).

Para someter a prueba si la capacidad de la capsaicina y QX-314 aplicados conjuntamente para inhibir la corriente de sodio es selectiva para células que expresan receptores TRPV1, también se hizo un registro de neuronas GRD grandes (diámetro de soma  $> 40 \mu\text{m}$ ) (figura 1A, derecha). En estas neuronas, la capsaicina no provocó una corriente de entrada ( $10$  de  $10$ ). Como para las neuronas de diámetro pequeño, QX-314 aplicado solo tuvo poco o ningún efecto sobre la corriente de sodio (la corriente aumentó en un  $8 \pm 4\%$  después de una aplicación de 10 minutos,  $n=10$ ). A diferencia de las neuronas de diámetro pequeño, la capsaicina no tuvo ningún efecto sobre la corriente de sodio en neuronas de diámetro grande (aumento promedio en un  $3 \pm 2\%$  después de una aplicación de 10 minutos,  $n=10$ ). De la manera más notable, la aplicación conjunta de QX-314 y capsaicina tuvo poco o ningún efecto sobre la corriente de sodio en las neuronas de diámetro grande (disminución en un  $9 \pm 5\%$  después de una aplicación de 10 minutos,  $n=10$ ). Por tanto, la capacidad de QX-314 y capsaicina aplicados conjuntamente para inhibir la corriente de sodio es altamente selectiva para neuronas que expresan receptores TRPV1, tal como se esperaba si QX-314 entra en las neuronas a través de receptores TRPV1.

También se examinó el efecto de QX-314 y capsaicina aplicados conjuntamente en fijación de corriente usando disoluciones fisiológicas interna y externa. Tal como se esperaba a partir de los resultados de fijación de voltaje, la aplicación conjunta de QX-314 y capsaicina inhibió la excitabilidad de neuronas de pequeño diámetro, bloqueó por completo la generación del potencial de acción (figura 2, 15 de 15 neuronas).

A continuación se examinó si la combinación de capsaicina y QX-314 puede reducir la conducta de dolor *in vivo*. La inyección de QX-314 solo ( $10 \mu\text{l}$  de una disolución al  $2\%$ ) en la pata trasera de ratas adultas no tuvo un efecto significativo en el umbral mecánico para provocar una respuesta de retirada, tal como se determinó mediante pelos de von Frey ( $p=0,33$ ) (figura 3A). La capsaicina sola ( $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ) provocó contracción espontánea ( $40 \pm 6$  contracciones en 5 min.), lo que refleja la acción irritante directa de la capsaicina sobre nociceptores y después de 15 y 30 minutos redujo significativamente el umbral mecánico ( $p<0,05$ ) (figura 3a), tal como se esperaba. La inyección de capsaicina y QX-314 juntos no cambió significativamente el número de contracciones durante los primeros 5 minutos después de la inyección ( $30 \pm 7$ ,  $p = 0,24$ ). Sin embargo, la combinación suprimió por completo la posterior reducción en el umbral mecánico producida normalmente por la capsaicina sola ( $p = 0,14$ , medido a los 15 minutos). Además, 60 minutos después de la inyección combinada de capsaicina y QX-314, el umbral mecánico aumentó realmente hasta alcanzar el doble del valor inicial, dos horas después de la inyección ( $46 \pm 5 \text{ g}$  frente a  $24 \pm 3 \text{ g}$ ,  $p<0,05$ ). En tres animales, la pata era insensible incluso al filamento de von Frey de mayor valor ( $57 \text{ g}$ ). El elevado umbral duró aproximadamente 3 horas y luego volvió gradualmente a los niveles basales en 4 horas (figura 3A).

Se observaron efectos similares examinando la sensibilidad a un estímulo de calor radiante nocivo normalizado. Inesperadamente, QX-314 solo redujo transitoriamente la latencia de respuesta térmica a los 30 min. después de la inyección ( $p<0,01$  a los 30 min.;  $p> 0,05$  para todos los demás puntos de tiempo) (figura 3B). La capsaicina ( $10 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ) sola también redujo tal como se esperaba la latencia de respuesta térmica ( $p<0,01$ , 15 y 30 min) (figura 3B). Sin embargo, aunque tanto QX-314 como capsaicina solos aumentaron la sensibilidad al calor, la aplicación

conjunta de QX-314 y capsaicina juntos anestesió progresivamente a los animales frente al calor nocivo, de manera que 2 horas después de la inyección ningún animal reaccionó al calor nocivo radiante aplicado durante 25 segundos. Este efecto permaneció durante 4 horas después de la inyección (figura 3B).

5 A continuación se sometió a prueba si la coadministración de capsaicina y QX-314 pueden usarse para producir bloqueo nervioso regional sin los efectos motores observados cuando se produce anestesia local por lidocaína. Se puntuaron los efectos motores según una escala de 0 (sin efecto; marcha normal y colocación de extremidades), 1 (movimiento de extremidades pero con movimiento y colocación de extremidades anómalos) o 2 (pérdida completa de movimiento de las extremidades). La inyección de lidocaína al 2% (una concentración convencional para el

10 bloqueo nervioso local) en estrecha proximidad al nervio ciático provocó parálisis completa de la extremidad inferior cuando se sometió a ensayo a los 15 minutos (6 de 6 animales) y todavía estaba presente parálisis completa o parcial a los 30 minutos (puntuación motora media de  $1,67 \pm 0,2$ ,  $p < 0,01$ ; figura 4C). Hubo una pérdida completa del reflejo de colocación provocado por estímulo táctil que duró al menos 30 minutos en todos los animales con recuperación completa de estos déficits sensoriales y motores en 45 minutos (figura 4). Durante el periodo de

15 parálisis, no fue posible someter a ensayo la sensibilidad sensorial. En experimentos piloto con QX-314, quedó claro que podían usarse concentraciones muchos menores de QX-314 que de lidocaína para producir anestesia local eficaz cuando se aplican con capsaicina. La inyección de QX-314 (0,2%, 100  $\mu$ l) solo no tuvo ningún efecto sobre la función motora (6 de 6 animales; figura 4C) y tampoco tuvo ningún efecto ni sobre el umbral mecánico ( $p=0,7$ ) ni sobre la latencia de respuesta térmica ( $p=0,66$ ) (figuras 4A, 4B). La capsaicina sola (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l, 100  $\mu$ l) inyectada

20 cerca del nervio redujo tanto el umbral mecánico ( $p < 0,05$ ) como la latencia térmica ( $p < 0,05$ ) durante 30 min. después de la inyección (figura 4A, 4B). Durante este periodo, 4 de los 6 animales demostraron una flexión sostenida de la pata de la inyección que condujo a una ligera afectación de la locomoción (puntuación motora media de  $0,7 \pm 0,2$ ,  $p < 0,01$ ) pero el movimiento de la rodilla y cadera así como el reflejo de colocación permanecieron inalterados. Se interpreta que la sensibilidad y los cambios motores reflejan la activación de axones nociceptores

25 que producen un reflejo de flexión sostenida. Para la aplicación conjunta de QX-314 y capsaicina en la región del nervio para-ciático, se inyectó QX-314 en primer lugar, seguido 10 minutos después por capsaicina, con la idea de que QX-314 estuviera presente de manera extracelular y listo para entrar en canales TRPV1 tan pronto como se activaron. En efecto, hubo poca o ninguna respuesta conductual a la inyección de capsaicina cuando estuvo precedida por la inyección de QX-314 y las respuestas conductuales indicaron que había una anestesia eficaz frente

30 a los estímulos nocivos. Hubo un aumento muy marcado en el umbral mecánico de manera que ninguno de los animales mostró una respuesta al pelo de von Frey más rígido (57 g; frente a la retirada antes de la inyección frente a estímulos que promedió  $15,2 \pm 3,4$ ;  $p < 0,01$ ,  $n=6$ ) y también en la latencia de respuesta térmica ( $22,3 \pm 2,3$  s frente a  $14,9 \pm 0,4$  s,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). Estos cambios fueron evidentes a los 15 min. después de la inyección de capsaicina para los estímulos mecánicos y a los 30 min. para los estímulos térmicos y duraron 90 minutos (figura 4A, 4B). Cinco

35 de seis animales no tuvieron déficit motor en absoluto (puntuación motora media de  $0,17 \pm 0,17$ ,  $p=0,34$ ) (figura 4C) y ni cambio en el reflejo de colocación. Un animal demostró flexión sostenida similar a la observada cuando se inyectó capsaicina sola, pero más transitoria

#### Métodos

##### 40 *Electrofisiología*

Se extirparon los ganglios de la raíz dorsal de ratas Sprague-Dawley de 6-8 semanas de edad y se pusieron en medio esencial mínimo de Dulbecco que contenía el 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma), luego se trataron

45 durante 90 minutos con colagenasa 5 mg/ml, Dispase II 1 mg/ml (Roche, Indianapolis, IN) y durante 7 minutos con tripsina al 0,25%, seguido por la adición de inhibidor de tripsina al 2,5%. Se trituraron las células en presencia de inhibidor de ADNasa I (50 U), se centrifugaron a través de BSA al 15% (Sigma), se resuspendieron en 1 ml de medio neurobasal (Sigma), AraC 10 mM, NGF (50 ng/ml) y GDNF (2 ng/ml) y se sembraron sobre placas de cultivo tisular de 35 mm recubiertas con poli-lisina (500  $\mu$ g/ml) y laminina (5 mg/ml) (Becton Dickinson) a 8000-9000 por pocillo. Se

50 incubaron los cultivos a 37°C, el 5% de dióxido de carbono. Se hicieron registros en el plazo de 48 horas después de la siembra en placa. El tamaño promedio de las neuronas pequeñas elegidas posiblemente como nociceptores era de  $23 \pm 6$   $\mu$ m ( $n=50$ ) y el de las neuronas grandes era de  $48 \pm 8$   $\mu$ m ( $n=10$ ).

Se hicieron registros con fijación de voltaje o fijación de corriente de célula completa usando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA) y pipetas de parche con resistencias de 1-2 M $\Omega$ . Para los registros con fijación de voltaje, redujo la capacitancia de la pipeta envolviendo el vástago mediante Parafilm o recubriendo el vástago con Silgard (Dow Corning, Midland, MI). Se compensó la capacitancia celular para el uso del conjunto de circuitos de amplificador, y se restaron las corrientes de fuga lineales usando un procedimiento P/4. Se

compensó la resistencia en serie (habitualmente de 3-7 M $\Omega$  y siempre inferior a 10 M $\Omega$ ) en ~80%. Los registros con

60 fijación de voltaje usaron disoluciones diseñadas para aislar la corriente de sodio bloqueando las corrientes de potasio y calcio y con sodio externo reducido para mejorar la fijación de voltaje. La disolución de pipeta era CsCl 110

mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, EGTA 11 mM y HEPES 10 mM, pH ajustado 7,4 con  $\sim$  CsOH 25 mM. La disolución

externa era NaCl 60 mM, cloruro de colina 60 mM, KCl 4 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{CdCl}_2$  0,1 mM, cloruro de tetraetilamonio 15 mM, 4-aminopiridina 5 mM, glucosa 10 mM; y HEPES 10 mM, pH ajustado a 7,4 con NaOH. No se realizó corrección para el pequeño potencial de unión líquida (-2,2 mV).

5 Se hicieron registros con fijación de corriente usando el modo de fijación de corriente rápida del amplificador Axopatch 200A. La disolución de pipeta era gluconato de K 135 mM;  $\text{MgCl}_2$  2 mM; KCl 6 mM; HEPES 10 mM; Mg-ATP 5 mM;  $\text{Li}_2\text{GTP}$  0,5 mM; (pH = 7,4 con KOH). La disolución externa era NaCl 145 mM; KCl 5 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM;  $\text{CaCl}_2$  2 mM - HEPES 10 mM; glucosa 10 mM; (pH ajustado a 7,4 con NaOH). El potencial de membrana se corrigió para un potencial de unión líquida de -15 mV.

15 Se generaron protocolos de órdenes y se digitalizaron los datos usando una interfaz Digidata 1200 A/D con software pCLAMP 8.2 (Axon Instruments, Union City, CA). Se filtraron con filtro paso bajo los registros de corriente con fijación de tensión a 2 kHz y los registros con fijación de corriente a 10 kHz (-3 dB, filtro de Bessel de 4 polos).

Se aplicó QX-314 (5 mM), capsaicina (1 mM o 500 nM) o su combinación usando un sistema de suministro de fármacos rápido de múltiples cilindros diseñado a medida colocado aproximadamente a 200-250 mm de la neurona. El intercambio de disolución se completó en menos de un segundo.

## 20 *Conducta*

Para las inyecciones intraplantares, en primer lugar se habituaron ratas a la manipulación y las pruebas realizadas con el experimentador ciego con respecto al tratamiento. Se realizaron inyecciones intraplantares de vehículo (etanol al 20%, Tween 20 al 5% en solución salina, 10  $\mu\text{l}$ ) capsaicina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), QX-314 (al 2%) o mezcla de capsaicina y QX-314 en la pata trasera izquierda y se determinaron las sensibilidades mecánica y térmica usando pelos de von Frey y calor radiante, respectivamente.

30 Para las inyecciones en el nervio ciático, en primer lugar se habituaron ratas a la manipulación durante 10 días. Se inyectaron lidocaína (al 0,2% o al 2%, 100  $\mu\text{l}$ ); QX-314 (al 0,2%, 100  $\mu\text{l}$ ) sola; capsaicina (50  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$ ) sola, o QX-314 seguido por capsaicina (intervalo de 10 minutos) en la zona del nervio ciático por debajo de la articulación de la cadera. Se determinaron los umbrales mecánico y térmico usando filamentos de von Frey y calor radiante. Se evaluó la función motora de la pata en que se inyectó cada 15 minutos usando la siguiente puntuación de graduación: 0 = ninguna; 1 = parcialmente bloqueada; y 2 = totalmente bloqueada. Se evaluaron cómo caminaba, trepaba, caminaba en la varilla y el reflejo de colocación. Se graduó el bloqueo motor como ninguno cuando la marcha era normal y no había debilidad visible de la extremidad; como parcialmente bloqueado cuando podía moverse la extremidad pero los movimientos eran anómalos y no podía soportar la postura normal; y como completamente bloqueado cuando la extremidad estaba flácida y sin resistencia a la extensión de la extremidad. Se realizaron todos los experimentos con el experimentador ciego.

## 40 *Análisis estadístico*

Se analizó la estadística usando la prueba de la t de Student o ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Dunnett según fuese apropiado. Para la puntuación motora, los datos obtenidos después de la inyección de lidocaína al 0,2% se usaron como control para la prueba de Dunnett. Se representaron los datos como la media  $\pm$  EEM.

## 45 **Ejemplo 2**

50 También se ha mostrado que eugenol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ ), un guayacol sustituido con cadena de alilo, 2-metoxi-4-(2-propenil)fenol (principio activo en aceite de clavo y un agonista no picante de receptores TRPV1) promueven la entrada de QX-314 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal activando canales TRPV 1. La figura 5 representa registros con fijación de voltaje de corriente de canal de sodio en neuronas pequeñas del ganglio de la raíz dorsal. Los datos muestran que eugenol solo tiene un efecto inhibitorio moderado sobre la corriente de sodio (inhibición del 10-20%). La aplicación conjunta de eugenol y QX-314 produce un bloqueo progresivo que puede completarse después de 7 minutos. Se representan dos ejemplos, que son representativos de 10 experimentos con resultados similares. Tal como se demostró anteriormente, QX-314 externo solo no tiene ningún efecto mientras que QX-314 interno bloquea los canales de sodio. Por tanto, estos experimentos indican que eugenol promueve la entrada de QX-314 en neuronas del ganglio dorsal activando canales TRPV.

## 60 **Ejemplo 3**

La figura 6 muestra los resultados de la aplicación conjunta del agonista de TRPA aceite de mostaza (MO) (50  $\mu\text{M}$ ) y QX-314 (5 mM). MO solo reduce la corriente de sodio en un 20-30% y alcanza una meseta después de

aproximadamente 3 minutos. La aplicación conjunta de MO y QX-314 redujo la corriente de sodio drásticamente.

## REIVINDICACIONES

1. Primer compuesto que activa un receptor de formación de canales seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPA1 y TRPM8 que está presente en nociceptores y/o pruriceptores, y un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales para su uso en un método de tratamiento de dolor o picor en un paciente, en el que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa dicho receptor, en el que dicho segundo compuesto:
- 5
- 10 i) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en el que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metilprocaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en el interior de la célula; o
- 15 ii) es CERM 11888 (bepridilo cuaternario); o
- iii) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramide, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.
- 20
2. Compuestos primero y segundo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho dolor es:
- 25 i) dolor neuropático; o
- ii) dolor inflamatorio, o
- iii) dolor nociceptivo; o
- 30 iv) dolor procedimental.
3. Compuestos primero y segundo para su uso según la reivindicación 1, en los que dicho primer compuesto es un activador de receptores TRPV1, seleccionándose dicho activador de capsaicina, eugenol, Arvanil (N-araquidonoilvanilamina), anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2APB), AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato-13-acetato-20-homovanilato de forbol (PPAHV), Olvanil (NE 19550), OLDA (N-oleoildopamina), N-araquidonoildopamina (NADA), 6'-yodo-resiniferatoxina (6'-IRTX), N-aciletanolaminas C18, derivados de lipoxigenasa tales como ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico, péptidos con nudo de cisteínas inhibidor (ICK) (vanilotoxinas), piperina, MSK195 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida), JYL79 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea), hidroxil-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol y SU200 (N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea).
- 35
- 40
4. Compuestos primero y segundo para su uso según la reivindicación 1, en los que dicho primer compuesto es un activador de receptores TRPA1, seleccionándose dicho activador de cinamaldehído, isotiocianato de alilo, disulfuro de dialilo, icilina, aceite de canela, aceite de gaulteria, aceite de clavo, acroleína, hidroxil-alfa-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 4-hidroxinonenal, p-hidroxibenzoato de metilo, aceite de mostaza y ciclohexilcarbamato de 3'-carbamoilbifenil-3-ilo (URB597).
- 45
5. Compuestos primero y segundo para su uso según la reivindicación 1, en los que dicho primer compuesto es un activador de receptores P2X, seleccionándose dicho activador de ATP, 2-metiltio-ATP, 2' y 3'-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP y ATP-5'-O-(3-tiotrifosfato).
- 50
6. Composición que comprende:
- 55 i) un primer compuesto que activa un receptor de formación de canales que está presente en nociceptores y/o pruriceptores, en la que dicho primer compuesto activa un receptor seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPM8 y TRPA1; y
- 60 ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales, en la que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa dicho receptor, en la que dicho segundo compuesto:
- a) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en la que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metil-procaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en
- 65

el interior de la célula; o

b) es CERM 11888 (bepridilo cuaternario); o

5 c) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramida, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno.

10 7. Composición según la reivindicación 6, formulándose dicha composición para administración oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intratecal, epidural u ocular, o mediante inyección, inhalación o contacto directo con la mucosa nasal u oral.

15 8. Método in vitro para inhibir uno o más canales iónicos regulados por voltaje en una célula nociceptora o pruriceptora, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con:

i) un primer compuesto que activa un receptor de formación de canales que está presente en nociceptores y/o pruriceptores, en el que dicho primer compuesto activa un receptor seleccionado de TRPV1, P2X(2/3), TRPM8 y TRPA1; y

20 ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales, en el que dicho segundo compuesto puede entrar en nociceptores o pruriceptores a través de dicho receptor de formación de canales cuando se activa dicho receptor.

25 9. Método para identificar que un compuesto es útil para el tratamiento de dolor o picor, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto la cara externa de neuronas que expresan TRPV1, TRPA1, TRPM8 o P2X(2/3) con:

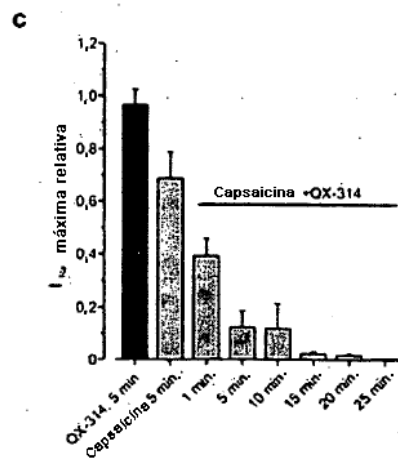
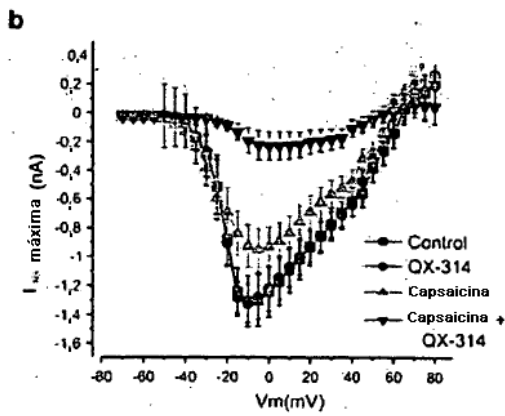
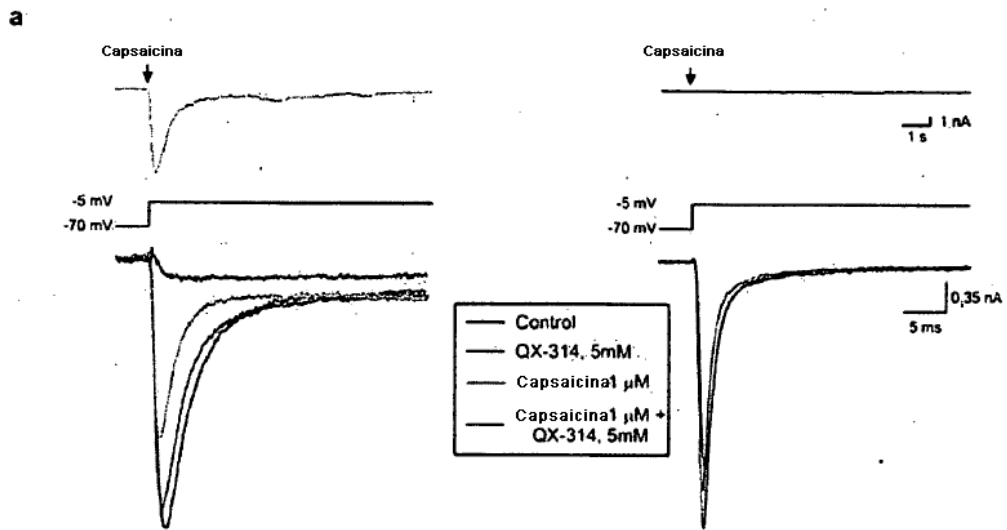
30 i) un primer compuesto que activa receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 o P2X(2/3); y

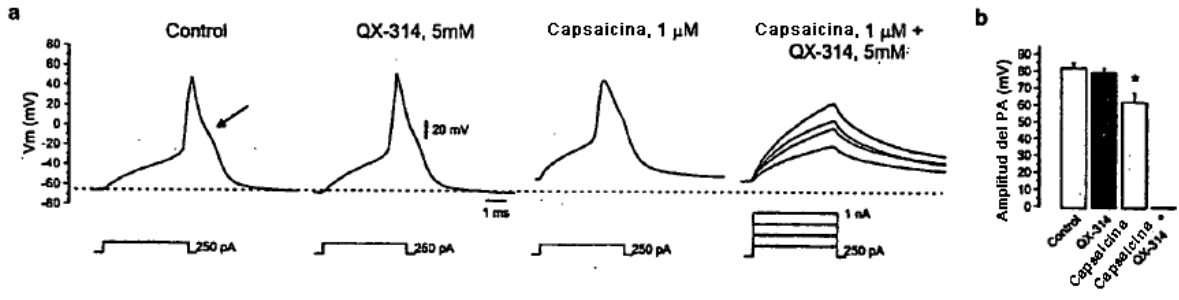
ii) un segundo compuesto que inhibe uno o más canales iónicos regulados por voltaje cuando se aplica a la cara interna de dichos canales pero no inhibe sustancialmente dichos canales cuando se aplica a la cara externa de dichos canales, en el que dicho segundo compuesto

35 1) inhibe canales de sodio regulados por voltaje, en particular en el que dicho segundo compuesto es QX-314, N-metil-procaína, QX-222, N-octil-guanidina, 9-aminoacridina, pancuronio, u otra molécula de peso molecular menor que 500 Dalton, cargada positivamente que inhibe canales de sodio regulados por voltaje cuando está presente en el interior de la célula; o

40 2) es un derivado de amina cuaternaria u otro derivado cargado positivamente de un compuesto seleccionado de riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, articaína, bupivacaína, mepivacaína, diisopiramida, quinidina, lifarizina, lamotrigina, flunarizina y fluspirileno; y

45 (b) determinar si dicho segundo compuesto inhibe dichos canales iónicos regulados por voltaje en dichas neuronas, en el que la inhibición de dichos canales iónicos regulados por voltaje por dicho segundo compuesto identifica dicho segundo compuesto como un compuesto que es útil para el tratamiento de dolor o picor.

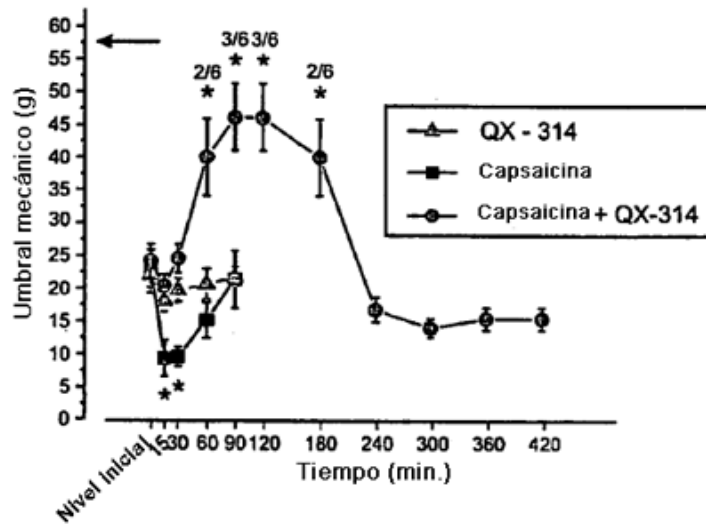




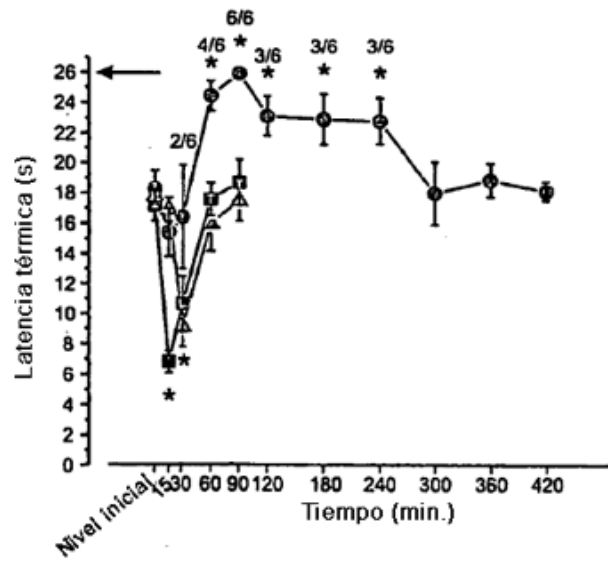


Inyección intraplantar

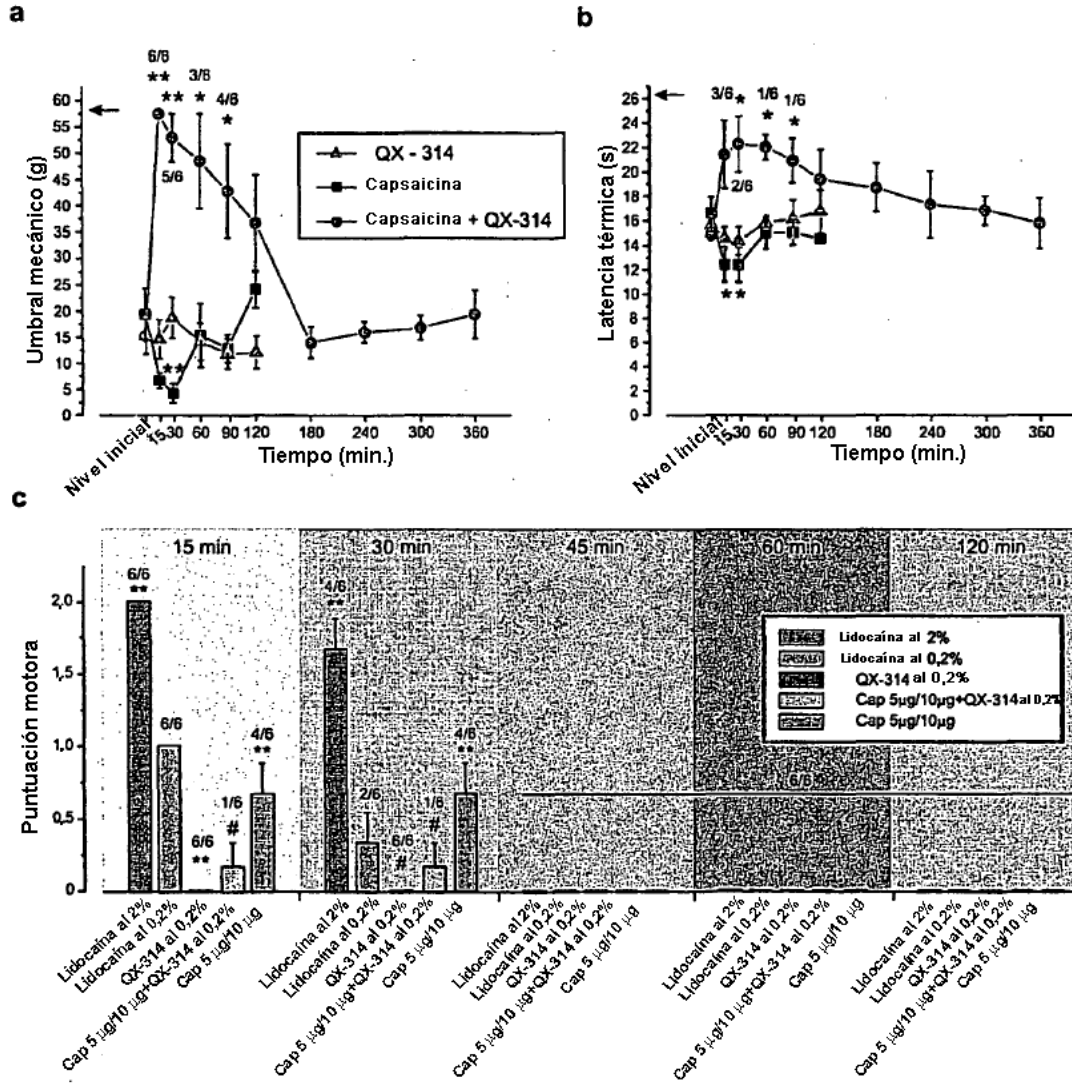
a

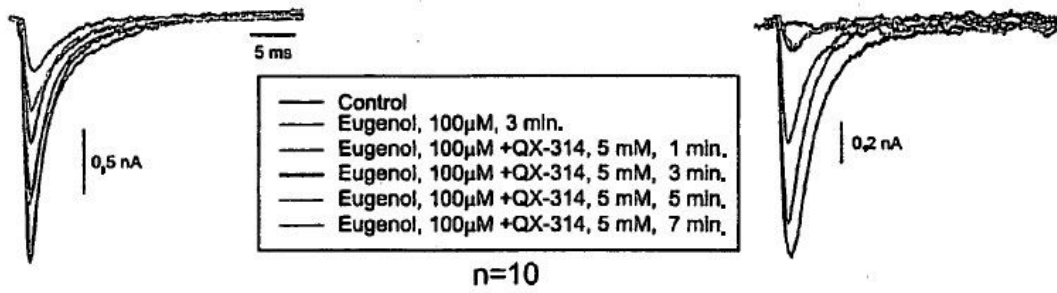


b



Inyección ciática





**Fig. 5**

