

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 215**

51 Int. Cl.:

C07D 207/34	(2006.01)	A61K 31/24	(2006.01)
C07D 309/14	(2006.01)		
C07D 333/38	(2006.01)		
C07D 333/40	(2006.01)		
C07D 333/70	(2006.01)		
C07C 219/12	(2006.01)		
C07C 219/14	(2006.01)		
A61P 13/10	(2006.01)		
A61P 13/00	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2012 PCT/US2012/061703**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2016 WO2013063127**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2012 E 12781549 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2771320**

54 Título: **Ciclohexilaminas**

30 Prioridad:

24.10.2011 US 201161550489 P
15.08.2012 US 201261683519 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.01.2017

73 Titular/es:

ASANA BIOSCIENCES, LLC (100.0%)
1009 Lennox Drive, Suite 106, Princeton Pike
Corporate Center
Lawrenceville, NJ 08648, US

72 Inventor/es:

THOMPSON, SCOTT KEVIN;
SMITH, ROGER ASTBURY;
GUPTA, SANDEEP;
PRIESTLEY, TONY;
LAPING, NICHOLAS JAMES;
SAHA, ASHIS K. y
RUDRA, SONALI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 596 215 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

Ciclohexilaminas

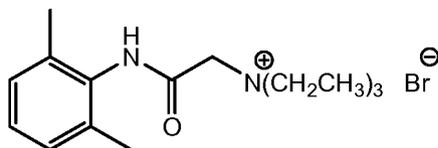
Antecedentes

5 Los bloqueantes de los canales de sodio desempeñan papeles claves en un gran número de funciones relacionadas con el cuerpo. Además de los bloqueantes de los canales de sodio producidos naturalmente en el cuerpo, se usa una diversidad de fármacos de origen no natural para bloquear los canales de sodio desde el lado intracelular del canal. Por ejemplo, los anestésicos locales son bloqueantes no selectivos de los canales de sodio que no discriminan entre la actividad del canal de sodio necesaria para la sensación de curso normal y la actividad similar implicada en la señalización de los nociceptores. Son, sin embargo, útiles en el alivio del dolor en numerosas aplicaciones, pero tienen el inconveniente del bloqueo no deseado de la función motora.

10 El canal de sodio también está implicado en las afecciones de la vejiga, por ejemplo, la cistitis intersticial (CI-dolor de vejiga junto con el aumento de la frecuencia urinaria, también conocida como síndrome de vejiga dolorosa) y la vejiga hiperactiva (VH-problemas de almacenamiento de la vejiga, tales como urgencia, frecuencia y nocturia). La VH se presenta como un aumento de la frecuencia miccional y puede ser el resultado de una infección o lesión en el propio tejido de la vejiga, por ejemplo, la cistitis intersticial o puede surgir como una asociación comórbida a afecciones tales como el estrés, el trastorno de ansiedad, la endometriosis, la vulvodinia, el síndrome de fatiga crónica o la fibromialgia, entre otras afecciones. Tanto en la CI como en la VH, las señales aferentes aumentadas son conducidas por fibras M mielinizadas y por las fibras C no mielinizadas. Normalmente, las fibras C median sensaciones dolorosas mecánicas, térmicas y químicas y esta señalización requiere potenciales de acción que se inician y mantienen por medio de canales de sodio activados. Por tanto, la dirección a la conducción de los potenciales de acción mediados por los canales de sodio en los nervios aferentes de fibra C de la vejiga puede ser un enfoque terapéutico para el tratamiento de la VH y la CI (Steers, 2002, *Rev. Urol.*, 4 Suppl 4:S7-S18). En un modelo animal de CI y VH, el bloqueo de la conducción de señales aferentes con el bloqueante de canales de sodio lidocaína, normaliza el patrón de micción según se determinó mediante cistometría (Juszczak, 2009, *J. Physiol. Pharmacol. December*, 60(4):85-91). De forma similar, la mexilitina evita la sensación dolorosa de la distensión de la vejiga urinaria nociva (Su, 2008, *NeuroUrol. Urodyn.*, 27(3):249-53). El documento WO 2008/063603 A desvela compuestos para la inhibición selectiva de las neuronas detectoras del dolor y el picor (nociceptores y prurirreceptores). Desafortunadamente, ni la lidocaína ni la mexilitina ofrecen opciones terapéuticamente manejables para los pacientes con estas afecciones de la vejiga debido al hecho de que sus efectos beneficiosos son de corta duración.

25 El bloqueante de los canales de sodio catiónico, QX-314, bloquea selectivamente la actividad del canal de sodio en las neuronas nociceptivas cuando se administra en presencia de capsaicina, un agonista para el canal catiónico del receptor de potenciales transitorios, subfamilia V, miembro 1 (TRPV 1, por sus siglas en inglés). TRPV1 se expresa preferentemente de forma periférica en nociceptores aferentes primarios de pequeño diámetro y se regula positivamente en estados de dolor crónico. Sin embargo, TRPV1 no está presente en las neuronas aferentes de diámetro grande que transmiten sensaciones táctiles, TRPV1 tampoco está presente en fibras eferentes de neuronas motoras.

35 QX-314 es el análogo N-metilado de la lidocaína y lleva una carga positiva permanente. Es incapaz de atravesar la membrana celular neuronal cuando se aplica por vía externa y no tiene ningún efecto sobre la actividad del canal de sodio neuronal, a menos que se le proporcionen el acceso, al citoplasma celular, a través de canales TRPV1 abiertos, en cuyo caso provoca un bloqueo prolongado de la actividad del canal de sodio. Los experimentos de electrofisiología de fijación de voltaje en una sola célula ilustraron que QX-314 penetra a través de los canales TRPV1 activados por capsaicina y bloquea la actividad de los canales de sodio. *In vivo*, la administración pericáptica de la combinación QX-314/capsaicina produjo un bloqueo nervioso selectivo de los nociceptores de larga duración.



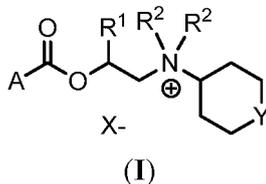
QX-314

45 La afinidad aparente *in vitro* (Cl₅₀) de QX-314 para bloquear la corriente de sodio en las neuronas del GRD (cuando se aplica conjuntamente con capsaicina 1°μM y medida usando el enfoque de fijación de voltaje de células enteras) es modesta a 30°μM.

50 Sigue existiendo una necesidad en la técnica de bloqueantes catiónicos de canales de sodio nuevos y novedosos con una actividad más potente que QX-314 *in vitro* y una mayor duración de acción *in vivo* cuando se utilicen solos o coadministrados con estímulos de TRPV1 apropiados.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre aquellos que se definen en la reivindicación 1, compuestos que pertenecen al ámbito de la fórmula (I), en la que R¹, R², A, X e Y se definen en el presente documento.



En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto.

En una realización, la composición farmacéutica también contiene un activador del receptor TRPV1. En otra realización, el activador del receptor TRPV1 es lidocaína.

10 En otro aspecto, se desvelan procedimientos para tratar el dolor o el picor e incluyen la administración de dicho compuesto a un paciente que lo necesite. En una realización, los procedimientos también incluyen la administración de un activador del receptor TRPV 1.

En un aspecto adicional, se desvelan procedimientos para tratar la vejiga hiperactiva e incluyen la administración de dicho compuesto a un paciente que lo necesite.

15 En aspecto más, se desvelan procedimientos para tratar la cistitis intersticial, es decir, el síndrome de vejiga dolorosa, e incluyen la administración de dicho compuesto a un paciente que lo necesite.

En un aspecto adicional más, cualquiera de los procedimientos que se describen en el presente documento también incluye la administración de un activador del receptor TRPV1.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes fácilmente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

20 Las Figuras 1-2 proporcionan datos comparativos que ilustran los efectos analgésicos de dos compuestos que se describen en el presente documento y que son abarcados por el compuesto de fórmula (I). Todas las figuras son gráficos de la fuerza de vocalización de la retirada de la pata (g) frente al tiempo (horas). Tres estrellas (***) indican una probabilidad de menos de 0,001. Dos estrellas (**) indican una probabilidad de menos de 0,01. Una estrella (*) designa una probabilidad de menos de 0,05. Las barras (|—|) contenidas en gráfico, si están presentes, representan la diferencia entre la duración de la antinocicepción con lidocaína.

25 La Fig. 1 ilustra el efecto antinociceptivo del compuesto del ejemplo 5, es decir, bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio usando el modelo de pellizco de rata. Se utilizaron dosis variables de soluciones de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio en presencia de una cantidad fija (2 %) de lidocaína. Los triángulos negros (▲) representan los resultados para una solución al 0,2 % de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Los círculos negros (●) representan los resultados para una solución al 0,3 % de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Los cuadrados negros (■) representan los resultados para una solución al 0,4 % de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Los triángulos invertidos (▼) representan los resultados para una solución al 0,45 % de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Por último, la flecha (→) en el eje y representa la fuerza máxima aplicada. Los animales tratados con bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio al 0,45 % se mantuvieron en el valor de corte durante la duración del experimento. La Fig. 2 ilustra el efecto del volumen de inyección sobre la duración de la analgesia para el compuesto del ejemplo 6, es decir, yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio usando el modelo de pellizco de rata. Los círculos negros (●) representan los resultados para 200 µl de una solución que contenía un 0,5 % de yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Los triángulos invertidos (▼) representan los resultados para 100 µl de una solución que contenía un 0,5 % de yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio.

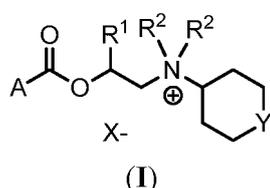
Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona compuestos novedosos que, cuando se utilizan opcionalmente en combinación con un agonista de TRPV1, son capaces de reducir o eliminar el dolor o el picor provocados por un daño, lesión o patología del tejido, o de tratar la vejiga hiperactiva y/o la cistitis intersticial.

Estos compuestos novedosos están cargados permanentemente por virtud del átomo de nitrógeno cuaternario contenido en el anillo que contiene nitrógeno, haciéndolos altamente solubles. Estos compuestos son sales de amonio cuaternario, en las que el contra-anión es un cloruro, bromuro, yoduro, trifluoroacetato, sulfato, fosfato, acetato, fumarato, maleato, citrato, piruvato, succinato, oxalato, sulfonato, bisulfato, malonato, xinafoato, ascorbato, oleato, nicotinato, sacarinato, adipato, formiato, glicolato, L-lactato, D-lactato, aspartato, malato, tartrato, L-tartrato, D-tartrato, estearato, 2-furoato, 3-furoato, napadisilato, edisilato, isetionato, D-mandelato, L-mandelato, propionato, ftalato, clorhidrato, bromhidrato, nitrato, metanosulfonato, naftalenosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, canforsulfonato o trifluorometanosulfonato.

Los compuestos cargados novedosos que se desvelan en el presente documento son incapaces de pasar a través de la membrana celular. Sin embargo, se cree que penetrarán en la célula, en cantidades terapéuticamente eficaces, cuando el acceso se proporcione a través de canales de TRPV1 abiertos. Esta es una ventaja de los compuestos cargados de la invención en comparación con sus correspondientes moléculas neutras que se cree que penetran libremente todas las membranas celulares.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre aquellos que se definen en la reivindicación 1, compuestos que pertenecen al ámbito de la fórmula (I).



En esta fórmula, R¹ es H o alquilo C₁ a C₆. En una realización, R¹ es H. En otra realización, R¹ es CH₃.

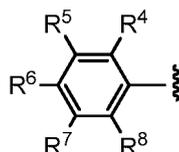
R² en la fórmula (I) es alquilo C₁ a C₆. En una realización, R² es CH₃. En una realización adicional, R² es CH₂CH₃. En otra realización más, los dos grupos R² se unen entre sí para formar un anillo de 5 o 6 miembros.

El sustituyente Y es O o CHR³. En una realización, Y es O. En otra realización, Y es CHR₃.

El resto R³ es H o alquilo C₁ a C₆. En una realización, R³ es H. En una realización adicional, R³ es CH₃.

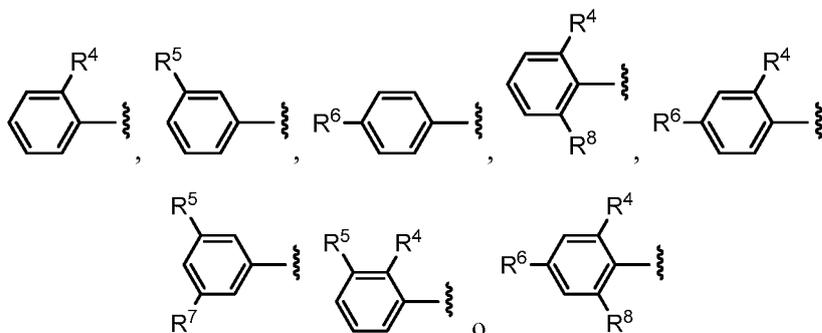
A de la fórmula (I) es fenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o cicloalquilo opcionalmente sustituido. Sin embargo, cuando A es fenilo sin sustituir, R¹ y R² no son metilo y R³ no es H.

i. En una realización, A es:



En esta estructura, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, independientemente, se seleccionan entre H, alquilo C₁ a C₆ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁ a C₆ opcionalmente sustituido, halógeno, perfluoroalquilo C₁ a C₃ y NO₂.

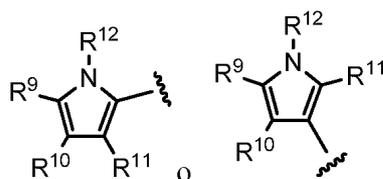
ii. En otra realización, A es:



iii. En una realización adicional, A es de las estructuras señaladas en las opciones i o ii y R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, independientemente, se seleccionan entre OCH₃, CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, Cl, F, CF₃, y NO₂.

iv. En otra realización más, A es un pirrol opcionalmente sustituido.

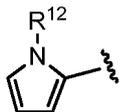
v. En una realización adicional más, A es:



En estas estructuras, R⁹, R¹⁰ y R¹¹ son, independientemente, H, alquilo C₁ a C₆ opcionalmente sustituido o halógeno; y R¹² es H o alquilo C₁ a C₆:

vi. En otra realización, A es el siguiente y R¹² se define como se ha señalado en la opción v:

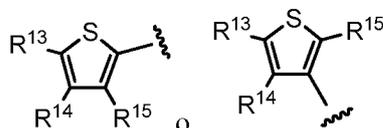
5



vii. En una realización adicional más, R¹² es CH₃ en las opciones v o vi señaladas anteriormente.

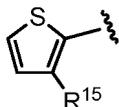
viii. En una realización adicional más, A es un tieno opcionalmente sustituido.

ix. En otra realización, A es:



10 En estas estructuras, R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, independientemente, H, alquilo C₁ a C₆ opcionalmente sustituido o halógeno.

x. En otra realización más, A es:

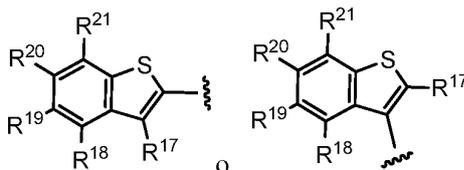


15

xi. En una realización adicional más, R¹⁵ en las opciones ix o x señaladas anteriormente es CH₃.

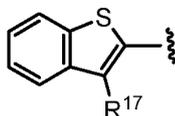
xii. En otra realización, A es un benzotieno opcionalmente sustituido.

xiii. En otra realización más, A es:



20 En estas estructuras, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰ y R²¹ son, independientemente, H, alquilo C₁ a C₆ opcionalmente sustituido o halógeno.

xiv. En una realización adicional, A tiene la siguiente estructura y R¹⁷ se define como en la opción xiii:



xv. En otra realización más, R¹⁷ como en las opciones xiii y xiv es halógeno.

25

En los compuestos de fórmula (I), X es cloruro, bromuro, yoduro, trifluoroacetato, sulfato, fosfato, acetato, fumarato, maleato, citrato, piruvato, succinato, oxalato, sulfonato, bisulfato, malonato, xinafoato, ascorbato, oleato, nicotinato, sacarinato, adipato, formiato, glicolato, L-lactato, D-lactato, aspartato, malato, tartrato, L-tartrato, D-tartrato, estearato, 2-furoato, 3-furoato, napadisilato, edisilato, isetionato, D-mandelato, L-mandelato, propionato, ftalato, clorhidrato, bromhidrato, nitrato, metanosulfonato, naftalenosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, canforsulfonato o trifluorometanosulfonato. Algunos compuestos en la presente invención poseen uno o más centros quirales, y la presente invención incluye cada enantiómero separado de dichos compuestos, así como mezclas de los enantiómeros. Cuando existen múltiples centros quirales en los compuestos de la presente invención, la invención incluye cada combinación posible de centros quirales en un compuesto, así como todas las mezclas enantioméricas y diastereoméricas posibles de los mismos. Se incluyen todas las formas quirales, diastereoméricas

30

y racémicas de una estructura, a menos que la estereoquímica específica o forma isomérica se indique específicamente. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. Las siguientes definiciones se usan en relación con los compuestos que se describen en el presente documento. En general, el número de átomos de carbono presentes en un grupo dado se indica "Cx a Cy", donde X e Y son los límites inferior y superior, respectivamente. El número de carbonos como se usa en las definiciones en el presente documento se refiere a cadena principal de carbonos y las ramificaciones de carbono, pero no incluye los átomos de carbono de los sustituyentes, tales como sustituciones alcoxi y similares. A menos que se indique lo contrario, la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen de forma explícita en el presente documento se determina nombrando de izquierda a derecha la porción terminal del grupo funcional seguido de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Como se usa en el presente documento, "opcionalmente sustituido" significa que se ha reemplazado al menos 1 átomo de hidrógeno del grupo opcionalmente sustituido.

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser lineal o ramificada. En una realización, un grupo alquilo contiene de 1 a 6 átomos de carbono (inclusive). En otra realización, un grupo alquilo contiene de 1 a 5 átomos de carbono (inclusive). En una realización adicional, un alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. En aún otra realización, un grupo alquilo contiene de 1 a 3 átomos de carbono (inclusive). En una realización adicional más, un alquilo contiene 1 o 2 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo que son cadenas de hidrocarburos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo, en los que se incluyen todos los isómeros de estos ejemplos. Los ejemplos de anillos carbocíclicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. En una realización, el anillo carbocíclico es de 3 a 6 miembros. En una realización adicional, el anillo carbocíclico es de 3 a 5 miembros. En una realización adicional más, el anillo carbocíclico es de 4 a 6 miembros. En otra realización, el anillo carbocíclico es 3 o 4 miembros, es decir, ciclopropilo o ciclobutilo. A menos que se señale específicamente, los grupos alquilo están sin sustituir, es decir, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, cuando el grupo alquilo o un anillo carbocíclico están sustituidos, estos van sucedidos por la expresión "opcionalmente sustituido" o "sustituido". Los sustituyentes opcionales de los grupos alquilo o anillos carbocíclicos incluyen, sin limitación, halógeno, CN, NO₂ alquilo C₁ a C₆, OH, alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alquil C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, heterociclioxi, alquiltio C₁ a C₆, arilo, heterociclo, heteroarilo, C(O)(alquilo C₁ a C₆), C(O)(heterociclo), C(O)O(alquilo C₁ a C₆), C(O)NH₂, C(O)NH(alquilo C₁ a C₆), C(O)N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquino C₂ a C₆), SO₂NH(alquilo C₁ a C₆), SO₂(heterociclo), NHC(O)(alquil C₁ a C₆), NH₂SO₂(alquilo C₁ a C₆), N(alquil C₁ a C₆)SO₂(alquilo C₁ a C₆), NH₂, NH(arilo), N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆) o NHC(O)NH₂.

"Alcoxi" se refiere a -O (alquilo), donde el alquilo está opcionalmente sustituido y se ha definido anteriormente. En una realización, un alcoxi contiene de 1 a 6 átomos de carbono (inclusive) o números enteros o intervalos entre ellos. En otra realización, un alcoxi contiene de 1 a 5 átomos de carbono (inclusive) o los intervalos entre ellos. En una realización adicional, un alcoxi contiene de 1 a 4 átomos de carbono (inclusive). En otra realización más, un alcoxi contiene de 1 a 3 átomos de carbono (inclusive). En una realización adicional más, un alcoxi contiene 1 o 2 átomos de carbono. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi y butoxi. El radical alquilo de un grupo alcoxi que puede estar sin sustituir o sustituido como se ha definido anteriormente para "alquilo".

"Arilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático que contiene átomos de carbono. En una realización, el arilo contiene de 6 a 10 átomos de carbono, es decir, tiene 6, 7, 8, 9 o 10 miembros. En otra realización, el arilo es un grupo bicíclico aromático o parcialmente aromático. En una realización adicional, el arilo es un grupo fenilo. En otra realización, el arilo es naftilo (tal como α -naftilo o β -naftilo), 1,2,3,4-tetrahidronaftilo o indanilo. Un grupo arilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, sin limitación, halógeno, NO₂, alquilo C₁ a C₆, OH, alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, heterociclioxi, alquiltio C₁ a C₆, arilo, heterociclo, heteroarilo, C(O)(alquilo C₁ a C₆), C(O)(heterociclo), C(O)O(alquilo C₁ a C₆), C(O)NH₂, C(O)NH(alquilo C₁ a C₆), C(O)N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquino C₂ a C₆), SO₂NH(alquilo C₁ a C₆), SO₂(heterociclo), NH₂SO₂(alquilo C₁ a C₆), N(alquil C₁ a C₆)SO₂(alquilo C₁ a C₆), NH₂, NH(arilo) o NHC(O)NH₂.

"Halógeno" se refiere a F, Cl, Br y I.

El término "heteroátomo" se refiere a un átomo de azufre, nitrógeno u oxígeno.

"Heteroarilo" se refiere a un anillo aromático de 5 o 6 miembros monocíclico que contiene al menos un heteroátomo en el anillo. En una realización, el heteroarilo contiene de 1 a 5 átomos de carbono (inclusive) o números enteros o intervalos entre ellos. En una realización adicional, el heteroarilo contiene de 2 a 5 átomos de carbono (inclusive). En otra realización, el heteroarilo contiene de 3 a 5 átomos de carbono (inclusive). En una realización adicional más, el heteroarilo contiene 4 o 5 átomos de carbono. "Heteroarilo" también se refiere a sistemas de anillos aromáticos bicíclicos en los que un grupo heteroarilo como se acaba de describir está condensado con al menos otro resto cíclico. En una realización, un radical fenilo está condensado con un heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros para formar el heteroarilo bicíclico. En otra realización, un alquilo cíclico está condensado con un heteroarilo monocíclico para formar el heteroarilo bicíclico. En una realización adicional más, el heteroarilo bicíclico es una piridina condensada con un heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros. En otra realización más, el anillo de heteroarilo tiene 1 o 2 átomos de nitrógeno en el anillo. En una realización adicional, el anillo de heteroarilo tiene 1 átomo de

nitrógeno y 1 átomo de oxígeno. En otra realización más, el anillo de heteroarilo tiene 1 átomo de nitrógeno y 1 átomo de azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, furano, tiofeno, indol, azaindol, oxazol, tiazol, isoxazol, isotiazol, imidazol, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, pirrol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-triazol, tetrazol, benzoxazol, benzotiazol, benzofurano, bencisoxazol, bencimidazol, azabencimidazol, indazol, quinazolina, quinolina, e isoquinolina. Un heteroarilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, sin limitación, halógeno, CN, NO₂, alquilo C₁ a C₆, OH, alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, heterociclioxi, alquiltio C₁ a C₆, arilo, heterociclo, heteroarilo, C(O)(alquilo C₁ a C₆), C(O)(heterociclo), C(O)O(alquilo C₁ a C₆), C(O)NH₂, C(O)NH(alquilo C₁ a C₆), C(O)N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquino C₂ a C₆), SO₂NH(alquilo C₁ a C₆), SO₂(heterociclo), NHC(O)(alquil C₁ a C₆), NHSO₂(alquilo C₁ a C₆), N(alquil C₁ a C₆)SO₂(alquilo C₁ a C₆), NH₂, NH(arilo), N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆) o NHC(O)NH₂.

"Heterociclo" se refiere a un grupo monocíclico o bicíclico en el que al menos 1 átomo del anillo es un heteroátomo. Un heterociclo puede estar saturado o parcialmente saturado. En una realización, el heterociclo contiene de 3 a 7 átomos de carbono (inclusive) o números enteros o intervalos entre ellos. En una realización adicional, el heterociclo contiene de 4 a 7 átomos de carbono (inclusive). En otra realización, el heterociclo contiene de 4 a 6 átomos de carbono (inclusive). En una realización adicional más, el heterociclo contiene 5 o 6 átomos de carbono (inclusive). Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, aziridina, oxirano, tiirano, morfolina, tiomorfolina, pirrolina, pirrolidina, azepano, dihidrofurano, tetrahidrofurano, dihidrotiofeno, tetrahidrotiofeno, ditiolano, piperidina, 1,2,3,6-tetrahidropiridin-1-ilo, tetrahidropirano, pirano, tiano, tiino, piperazina, homopiperazina, oxazina, azecano, tetrahidroquinolina, perhidroisoquinolina, 5,6-dihidro-4H-1,3-oxazin-2-ilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, 2,5-diazabicyclo[2.2.2]octano, 3,6-diazabicyclo[3.1.1]heptano, 3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano, 6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano, 7-oxa-2,5-diazabicyclo[2.2.2]octano, 2,7-dioxa-5-azabicyclo[2.2.2]octano, 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano-5-ilo, 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.2]octano, 3,6-dioxa-8-azabicyclo[3.2.1]octano, 3-oxa-6-azabicyclo[3.1.1]heptano, 3-oxa-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ilo, 5,7-dioxa-2-azabicyclo[2.2.2]octano, 6,8-dioxa-3-azabicyclo[3.2.1]octano, 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptano, 8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-5-ilo, 6-azabicyclo[3.2.1]oct-6-ilo, 8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ilo, 3-oxa-7,9-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-ilo, 9-oxa-3-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-ilo, 3-oxa-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-ilo, 3,7-dioxa-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-ilo, 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-7-ilo, tiazina, ditiano y dioxano. En otra realización, el heterociclo contiene 1 o 2 átomos de nitrógeno. En una realización adicional, el heterociclo contiene 1 o 2 átomos de nitrógeno y 3 a 6 átomos de carbono. En otra realización más, el heterociclo contiene 1 o 2 átomos de nitrógeno, de 3 a 6 átomos de carbono y 1 átomo de oxígeno. En una realización adicional, el heterociclo es de 5 a 8 miembros. En otra realización, el heterociclo es de 5 miembros. En aún una realización adicional, el heterociclo es de 6 miembros. En otra realización más, el heterociclo es de 8 miembros. Un heterociclo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, sin limitación, halógeno, CN, NO₂, alquilo C₁ a C₆, OH, alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, alcoxi C₁ a C₆-alcoxi C₁ a C₆, heterociclioxi, alquiltio C₁ a C₆, arilo, heterociclo, heteroarilo, C(O)(alquilo C₁ a C₆), C(O)(heterociclo), C(O)O(alquilo C₁ a C₆), C(O)NH₂, C(O)NH(alquilo C₁ a C₆), C(O)N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquilo C₁ a C₆), SO₂(alquino C₂ a C₆), SO₂NH(alquilo C₁ a C₆), SO₂(heterociclo), NHC(O)(alquil C₁ a C₆), NHSO₂(alquilo C₁ a C₆), N(alquil C₁ a C₆)SO₂(alquilo C₁ a C₆), NH₂, NH(arilo), N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆) o NHC(O)NH₂.

"Alquilamino" se refiere a un grupo NH o N, el átomo de nitrógeno del grupo está unido a 1 o 2 sustituyentes alquilo, respectivamente, en el que el alquilo está opcionalmente sustituido y se ha definido anteriormente. El alquilamino está unido a través del átomo de nitrógeno del grupo. En una realización, alquilamino se refiere a ~NH(alquilo). En otra realización, alquilamino se refiere a ~N(alquil)(alquilo), es decir, un "dialquilamino". En una realización adicional, alquilamino se refiere a ~N(alquil C₁ a C₆)(alquilo C₁ a C₆). En otra realización más, alquilamino se refiere a ~N(alquil)(heterociclo). En una realización adicional más, alquilamino se refiere a ~N(alquil)(arilo). En otra realización, alquilamino se refiere a ~N(alquil)(heteroarilo). En realización adicional más, alquilamino se refiere a ~N(alquilo)(alqueno). Cuando el átomo de nitrógeno está unido a dos grupos alquilo, cada grupo alquilo puede seleccionarse de forma independiente. En otra realización, dos grupos alquilo en el átomo de nitrógeno pueden tomarse junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo que contiene nitrógeno de 3 a 4 miembros en el que hasta dos de los átomos de carbono del heterociclo pueden estar reemplazados por N(H), N(alquilo C₁ a C₆), N(arilo), N(heteroarilo), O, S(O) o S(O)₂. Los ejemplos de alquilamino incluyen, pero no se limitan a N(CH₃)₂, N(CH₂CH₃)(CH₃), N(CH₂CH₃)₂, N(CH₂CH₂CH₃)₂, N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂, N(CH(CH₃)₂)(CH₃) y similares.

"Arlamino" se refiere a un grupo NH o N, estando el átomo de nitrógeno del grupo unido a 1 o 2 sustituyentes arilo, respectivamente, en el que el arilo está opcionalmente sustituido y se ha definido anteriormente. El arlamino está unido a través del átomo de nitrógeno del grupo. En una realización, arlamino se refiere a ~NH(arilo). En otra realización, arlamino se refiere a ~N(aril)(arilo), es decir, un "diarlamino". Cuando el átomo de nitrógeno está unido a dos grupos arilo, cada arilo puede seleccionarse independientemente.

"Alquilcarbonilamino" se refiere a ~NHC(O)(alquilo) o ~N(alquil)C(O)(alquilo) en los que los grupos alquilo se definen independientemente y están opcionalmente sustituidos independientemente como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de alquilcarbonilamino incluyen, pero no se limitan a, CH₃CONH, CH₃CH₂CONH,

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}$ y similares.

"Éster" se refiere a $\text{---C}(\text{O})\text{O}(\text{alquilo})$, que está unido a través del átomo de carbono. El grupo alquilo se define y está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de éster incluyen, sin limitación, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ y similares.

5 "Urea" se refiere a un grupo que tiene a $\text{---NHC}(\text{O})\text{NH---}$ en el que uno de los átomos de nitrógeno está unido a un grupo alquilo o heteroarilo. Los grupos alquilo o heteroarilo se definen y están opcionalmente sustituidos como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de urea incluyen, sin limitación, $\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}_3$, $\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, $\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{NHC}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ y similares.

10 "Alquilaminocarbonilo" se refiere a $\text{---C}(\text{O})\text{NH}(\text{alquilo})$ o $\text{---C}(\text{O})\text{N}(\text{alquil})(\text{alquilo})$ en los que los grupos alquilo se definen independientemente y están opcionalmente sustituidos independientemente como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de alquilaminocarbonilo incluyen, pero no se limitan a, CH_3NHCO , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCO}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NHCO}$ y similares.

15 Un "paciente" o "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un paciente o sujeto veterinario, por ejemplo, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o primate no humano, tal como un mono, chimpancé, babuino o gorila .

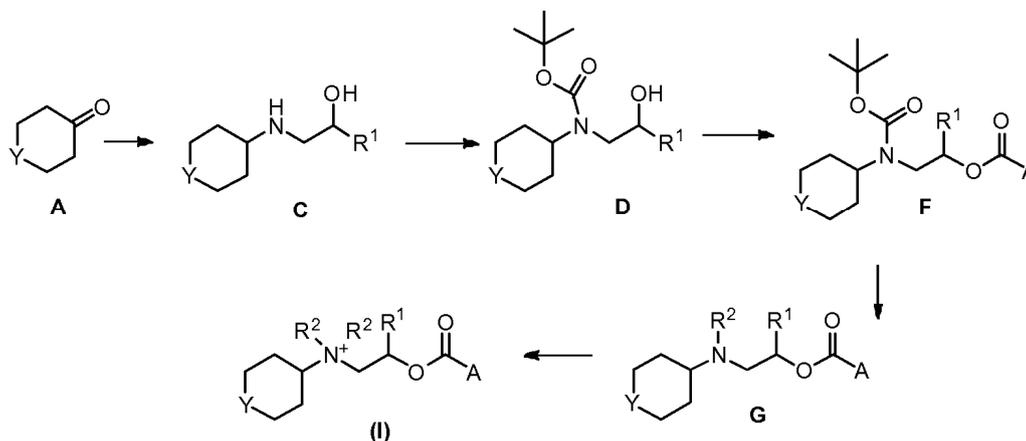
Los términos "comprende", "comprenden" y "que comprende" se han de interpretar inclusivamente en lugar de exclusivamente. Los términos "consiste", "que consiste en" y sus variantes, se han de interpretar exclusivamente, en lugar de inclusivamente.

20 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa una variabilidad del 10 % de la referencia dada, a menos que se especifique lo contrario.

Los procedimientos útiles para la fabricación de los compuestos de fórmula (I) se exponen en los Ejemplos siguientes y se generalizan en los Esquemas 1-14. Un experto en la materia reconocerá que los Esquemas 1-14 pueden adaptarse para producir los otros compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención.

25 Los siguientes procedimientos describen la síntesis de los compuestos de fórmula (I). Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar ciertas realizaciones de la presente invención, pero no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la presente invención.

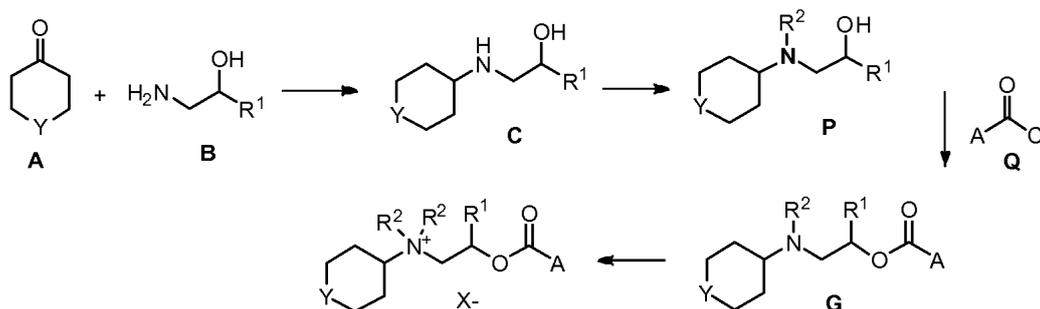
Esquema A



El Esquema A describe un procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula (I). En este procedimiento, se hizo reaccionar la cetona cíclica **A** con un amino alcohol sustituido con R^1 y borohidruro de sodio para proporcionar el compuesto **C**. En una realización, el amino alcohol sustituido con R^1 era $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{R}^1$ (**B**). En otra realización, el amino alcohol sustituido con R^1 era 1-amino-2-propanol. El átomo de nitrógeno del compuesto **C** se protegió después con un grupo protector para proporcionar el compuesto **D**. En una realización, el compuesto **C** se hizo reaccionar con un Boc-anhídrido. Después, el compuesto **D** se convirtió en el compuesto de éster **F**. En una realización, el compuesto **D** se hizo reaccionar con un cloruro de acilo. En una realización adicional, el compuesto **D** se hizo reaccionar con $\text{A-C}(\text{O})\text{Cl}$ (**E**). En una realización, la acilación puede realizarse en presencia de una base tal como hidruro de sodio. En otra realización, el compuesto **D** se hizo reaccionar con cloruro de 2,4,6-trimetil-benzoilo. Después, el átomo de nitrógeno se desprotegió por tratamiento con una solución ácida. Después, el nitrógeno se sustituyó con R^2 para proporcionar el compuesto **G**. En una realización, el átomo de nitrógeno se desprotegió con ácido clorhídrico en dioxano y la sustitución con R^2 se realizó por reacción de la amina con un compuesto de carbonilo y triacetoxiborohidruro de sodio. En otra realización, la sustitución con R^2 se realizó por

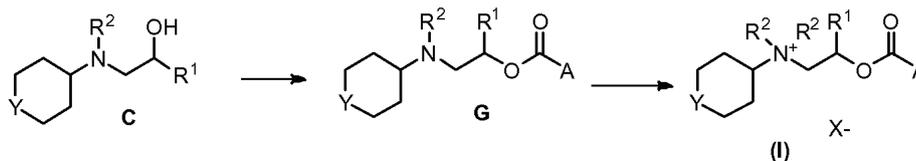
reacción de la amina con un haluro, mesilato, naftalenosulfonato, bencenosulfonato, tosilato, canforsulfonato o trifluorometanosulfonato de alquilo. En una realización adicional, la sustitución con R^2 se realizó usando yoduro de etilo, bromuro de etilo o trifluorometanosulfonato de etilo. Por último, el compuesto de fórmula (I) se formó sustituyendo con R^2 de nuevo el átomo de nitrógeno del compuesto **G**. En una realización, la sustitución con R^2 se realizó usando un haluro, mesilato, naftalenosulfonato, bencenosulfonato, tosilato, canforsulfonato o trifluorometanosulfonato de alquilo. En otra realización, la sustitución con R^2 se realizó usando yoduro de metilo, bromuro de metilo, trifluorometanosulfonato de metilo, yoduro de etilo, bromuro de etilo o trifluorometanosulfonato de etilo. En otra realización más, una sal de trifluorometanosulfonato se convirtió en una sal de cloruro por tratamiento con una resina de intercambio de cloruro tal como la resina de cloruro Amberlite® IRA-400. En una realización adicional, la amina generada por la desprotección del compuesto **F** se trató con un 1,4-dihaloalcano o 1,5-dihaloalcano, tal como 1,4-dibromobutano o 1,5-dibromopentano, para generar el compuesto de fórmula (I) en el que los dos grupos R^2 se unieron entre sí para formar un anillo de 5 o 6 miembros.

Esquema B



El Esquema B proporciona otra vía para el compuesto de fórmula (I). En esta vía, el compuesto **C** se preparó usando los materiales de partida **A** y **B** como se ha mostrado y se ha descrito en el Esquema A. Después, el compuesto **C** puede sustituirse con R^2 en el átomo de nitrógeno para proporcionar el compuesto **P**. Esta sustitución con R^2 puede realizarse usando formaldehído u otro compuesto de aldehído, $Na(OAc)_3BH$ y ácido acético. Después, el compuesto **P** puede acilarse. En una realización, la acilación puede realizarse usando el agente de acilación $A-C(O)Cl$ para proporcionar el compuesto **G**. En otra realización, la acilación se realizó en presencia de una base tal como hidruro de sodio. En otra realización más, la acilación se realizó usando cloruro de 2-isopropil-benzoílo. Por último, el compuesto **G** se convirtió en el compuesto de fórmula (I) usando los reactivos y el procedimiento descritos y mostrados en el Esquema A.

Esquema C



El compuesto **G**, un compuesto intermedio analizado en los Esquemas A y B, puede prepararse a partir del compuesto **C** como se muestra en el Esquema C. En una realización, el compuesto **C** se hizo reaccionar con un anhídrido mixto formado por tratamiento de un ácido carboxílico con un cloroformiato. En otra realización, el anhídrido mixto se preparó usando ácido 4-isopropilbenzoico y cloroformiato de isobutilo. Después, la sucesiva sustitución con R^2 del compuesto **G** puede realizarse como se ha descrito anteriormente en los Esquemas A y B.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden dicho compuesto opcionalmente con otros ingredientes farmacéuticamente inertes o inactivos. En una realización, el ingrediente farmacéuticamente inerte o inactivo es uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también incluye la combinación de dicho compuesto con uno o más agentes terapéuticos, es decir, ingredientes activos, como se describe a continuación. En una realización adicional, dicho compuesto se combina con uno o más ingredientes inertes/inactivos y uno o más agentes terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad de dicho compuesto que es eficaz para tratar el dolor, el picor, la cistitis intersticial o la vejiga hiperactiva en un sujeto. Específicamente, la dosificación del compuesto de fórmula (I) para conseguir un efecto terapéutico dependerá de factores tales como la formulación, la potencia farmacológica del fármaco, la edad, el peso y el sexo del paciente, la afección que se está tratando, la gravedad de los síntomas del paciente, el compuesto específico de fórmula (I), la vía de administración y el patrón de respuesta del paciente. También se considera que el tratamiento y la dosificación del compuesto de fórmula (I) pueden administrarse en una forma de dosificación unitaria y que un experto en la materia ajustará la forma de

dosificación unitaria en consecuencia para reflejar el nivel relativo de actividad. La decisión en cuanto a la dosificación particular que se emplea (y el número de veces que se administra por día) pertenece al criterio del médico experto habitual y puede variarse ajustando la dosis a las circunstancias particulares para producir el deseado efecto terapéutico. Además, un experto en la materia sería capaz de calcular cualquier cambio en las cantidades eficaces de uno cualquiera de los compuestos de las composiciones debido a los cambios en los componentes o las diluciones de la composición. En una realización, las composiciones pueden diluirse 2 veces. En otra realización, las composiciones pueden diluirse 4 veces. En una realización adicional, las composiciones pueden diluirse 8 veces.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 25 % w/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es menos de aproximadamente el 20 % w/v, aproximadamente el 15 % p/v, aproximadamente el 10 % p/v, aproximadamente el 5 % p/v o aproximadamente el 1 % p/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 10 % p/v. En una realización adicional, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,005 a aproximadamente el 5 % p/v. En otra realización más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 5 % p/v. En una realización adicional más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,01 % p/v, aproximadamente el 0,05 % p/v, aproximadamente el 0,1 % p/v, aproximadamente el 0,2 % p/v, aproximadamente el 0,3 % p/v, aproximadamente el 0,4 % p/v, aproximadamente el 0,5 % p/v, aproximadamente el 0,6 % p/v, aproximadamente el 0,7 % p/v, aproximadamente el 0,8 % p/v, aproximadamente el 0,9 % p/v, aproximadamente el 1 % p/v, aproximadamente el 2 % p/v, aproximadamente el 3 % p/v, aproximadamente el 4 % p/v o aproximadamente el 5 % p/v. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) es de aproximadamente el 0,2 % p/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,5 % p/v.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) puede, por tanto, ser de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por dosis basándose en un sujeto mamífero de 70 kg. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 250 mg por dosis. En una realización adicional, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg. En una realización adicional más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 25 mg a 50 mg, de aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 0,1 mg, de aproximadamente 0,01 mg, de aproximadamente 0,001 mg.

Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden proporcionarse en una pauta regular, es decir, a diario, semanalmente, mensualmente o anualmente o en una pauta irregular con diferentes días, semanas, meses, etc. de administración. Como alternativa, la cantidad terapéuticamente eficaz que se administra puede variar. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz para la primera dosis es mayor que la cantidad terapéuticamente eficaz para una o más de las dosis posteriores. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz para la primera dosis es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz para una o más de las dosis posteriores. Pueden administrarse dosis equivalentes durante diversos períodos de tiempo incluyendo, pero no limitados a, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 8 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, aproximadamente cada mes, aproximadamente cada 2 meses, aproximadamente cada 3 meses y aproximadamente cada 6 meses. El número y la frecuencia de las dosis correspondientes a un ciclo de terapia completo se determinarán de acuerdo con el criterio de un profesional de la salud. Las cantidades terapéuticamente eficaces que se describen en el presente documento se refieren a cantidades totales administradas durante un período de tiempo dado; es decir, si se administra más de un compuesto de fórmula (I), las cantidades terapéuticamente eficaces se corresponden con la cantidad total administrada.

El compuesto de fórmula (I) puede administrarse por cualquier vía, teniendo en cuenta la afección específica para la que se ha seleccionado. Los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse por vía oral, por inyección, por inhalación (incluyendo por vía oral, intranasal e intratraqueal), por vía ocular, por vía transdérmica (a través de formulaciones de difusión pasiva simple o por medio de la entrega facilitada usando, por ejemplo, la iontoforesis, la microporación con microagujas, la ablación por radiofrecuencia o similares), por vía intravascular, por vía cutánea, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía sublingual, por vía intracraneal, por vía epidural, por vía rectal, por vía intravesical y por vía vaginal, entre otros.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse por inyección, incluyendo la microinyección, por vía transdérmica o por vía tópica. En una realización, la cantidad del compuesto de fórmula (I) es de aproximadamente el 0,05 % p/p a aproximadamente el 10 % p/p de la preparación, dependiendo de la vía de administración. En una realización, el compuesto de fórmula (I) está presente en una concentración de aproximadamente el 0,1 % p/p a aproximadamente el 3 % p/p. Estas composiciones también pueden contener agentes estabilizantes, agentes antibacterianos, tampones y pueden fabricarse en diferentes ampollas o frascos de dosificación unitaria. Cuando es para su uso ocular, la cantidad del compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente 0,05 % p/p a aproximadamente el 2,5 % p/p. Las composiciones para inyección o infusión pueden

prepararse como una suspensión o solución acuosa.

5 Cuando se usa para la anestesia dérmica, la cantidad del compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente el 0,1 % p/p a aproximadamente el 10 % p/p. Cuando se usa para la administración tópica no ocular (por ejemplo, la administración oral, nasal, rectal, uretral, vaginal) la cantidad del compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente el 0,5 % p/p a aproximadamente el 5 % p/p. Cuando se usa como en una inyección, la cantidad del compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente el 0,25 % p/p a aproximadamente el 3 % p/p para inyecciones. Cuando se usa para infusiones (por ejemplo, para la anestesia epidural, espinal o local), la cantidad del compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente el 0,1 % p/p a aproximadamente el 3 % p/p.

10 En una realización, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse tópicamente en el ojo, por ejemplo, como soluciones, suspensiones o pomadas. Los ejemplos de vehículos oftálmicamente compatibles que pueden usarse incluyen, sin limitación, una solución acuosa, tal como solución salina, una solución oleosa o pomadas que contienen los conservantes, tensioactivos, tampones y reguladores de la viscosidad oftálmicamente compatibles. Estas composiciones también pueden contener agentes estabilizantes, agentes antibacterianos y pueden fabricarse en diferentes unidades de dosificación, adecuadas para la administración ocular. También pueden usarse insertos de fármacos ya sean solubles o insolubles.

15 En otra realización, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse por inyección. Las soluciones para inyección o infusión pueden prepararse como soluciones acuosas. De forma deseable, el compuesto de fórmula (I) está presente en una concentración de aproximadamente el 0,1 % p/p a aproximadamente el 3 % p/p. Estas soluciones pueden contener también agentes estabilizantes, agentes antibacterianos, tampones y pueden fabricarse en diferentes ampollas o frascos de dosificación unitaria.

20 En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse por vía rectal. Las unidades de dosificación para la administración rectal pueden prepararse en forma de pomadas o supositorios, que contienen el compuesto de fórmula (I) en una mezcla con una base grasa neutra, o pueden prepararse en forma de cápsulas rectales de gelatina que contienen el compuesto de fórmula (I) en una mezcla, por ejemplo, con un aceite vegetal o aceite de parafina. Las pomadas, los supositorios o las cremas que contienen al menos un compuesto de fórmula (I) son útiles para el tratamiento de las hemorroides.

25 En otra realización, el compuesto de fórmula (I) puede administrarse por vía transdérmica. Se conoce una diversidad de sistemas de administración transdérmica. Para su uso en estos sistemas, un compuesto de fórmula (I) puede mezclarse con una diversidad de excipientes que pueden incluir, por ejemplo, ajustadores del pH, conservantes y/o potenciadores de la penetración con el fin de formar una solución, pomada, crema, loción o gel. Dicha composición puede formar un componente de un sistema de administración transdérmica ("parches", etc.).

30 Puede seleccionarse un sistema de entrega transdérmica, que permita o ayude a un compuesto de la invención a pasar a través de la capa dérmica y hacia la zona objetivo, tal como tejidos musculares o un espacio perineural. Dichos sistemas pueden incluir la formulación con potenciadores de la penetración de la piel. Los ejemplos de potenciadores de la penetración de la piel incluyen los potenciadores físicos (ultrasonidos, iontoforesis, electroporación, magnetoforesis, microagujas), las vesículas, los sistemas de partículas (liposoma, niosoma, transferosoma, microemulsión, nanopartículas lipídicas sólidas) y potenciadores químicos (sulfóxidos, azonas, glicoles, alcanoles, terpenos, etc.). Los ejemplos adicionales de potenciadores químicos incluyen, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, N-metilpirrolidona, que aumentan la permeabilidad de la piel a los compuestos y permiten que los compuestos penetren a través de la piel hacia los tejidos más profundos. Véase, Sagie y Kohane, "*Prolonged Sensory Selective Nerve Blockade*", *PNAS*, 2010 (8): 3740-3745, 2010.

35 Como una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) puede instilarse a través de la instilación directa en la vejiga y/o el urotelio. En un ejemplo, una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) y uno o más vehículos o excipientes se formula para la instilación. Por ejemplo, el compuesto de fórmula (I) puede instilarse en forma de una solución. En un ejemplo adicional, el compuesto infundido puede colocarse dentro de dicha vejiga o urotelio en forma de una formulación de liberación prolongada. Puede utilizarse una diversidad de formulaciones de liberación prolongada para este fin e incluyen, sin limitación, una solución, suspensión, gel u otros depósitos que contengan formas de dosificación sólidas, un material revestido con un fármaco, un material impregnado con un fármaco, una formulación liposomal de fármacos, entre otros.

40 Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de fórmula (I) pueden formularse puras o con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos para la administración. La cantidad de vehículo o vehículos farmacéuticos se determina por la solubilidad y la naturaleza química del compuesto de fórmula (I), la vía de administración elegida y la práctica farmacológica convencional. El vehículo o vehículos farmacéuticos pueden ser sólidos o líquidos y puede incorporarse vehículos/matrices tanto sólidos como líquidos. Se conoce una diversidad de vehículos líquidos adecuados y pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia. Dichos vehículos pueden incluir, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), solución salina, solución salina tamponada, ciclodextrina, hidroxipropilciclodextrina (HP β CD), n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) y mezclas de los mismos. De forma similar, una diversidad de vehículos y excipientes sólidos (rígidos o flexibles) son conocidos por los expertos en la materia. Dichos vehículos también pueden diseñarse con el fin de someterse a una transición de estado cuando se inyectan

en la vejiga (por ejemplo, de líquido a gel, de líquido a sólido, de gel a sólido); dichos materiales son conocidos por los expertos en la materia. Dichos vehículos pueden comprender también una membrana, por ejemplo que comprenda un polímero termoelástico, que defina un depósito que contenga una composición sólida o líquida. Dichos vehículos pueden comprender también una matriz de polímero termoelástico, en el que está se incrusta una composición que contiene un compuesto de fórmula (I).

Los compuestos de fórmula (I) también pueden administrarse junto con otros estabilizantes de membrana (anestésicos locales), por ejemplo para formar mezclas eutécticas.

Aunque el compuesto de fórmula (I) puede administrarse solo, también puede administrarse en presencia de uno o más vehículos farmacéuticos que sean fisiológicamente compatibles. Los vehículos pueden estar en forma seca o líquida y deben ser farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas líquidas son normalmente soluciones o suspensiones estériles. Cuando se utilizan vehículos líquidos, deseablemente son líquidos estériles. Los vehículos líquidos se utilizan normalmente en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. En una realización, el compuesto de fórmula (I) se disuelve un vehículo líquido. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) se suspende en un vehículo líquido. Un experto en la técnica de las formulaciones sería capaz de seleccionar un vehículo líquido adecuado, dependiendo de la vía de administración. El compuesto de fórmula (I) puede como alternativa formularse en un vehículo sólido. En una realización, la composición puede compactarse en una forma de dosis unitaria, es decir, un comprimido o comprimido encapsulado. En otra realización, la composición puede añadirse a una forma de dosificación unitaria, es decir, una cápsula. En una realización adicional, la composición puede formularse para la administración en forma de un polvo. El vehículo sólido puede realizar una diversidad de funciones, es decir, puede realizar las funciones de dos o más de los excipientes que se describen a continuación. Por ejemplo, un vehículo sólido también puede actuar como un agente aromatizante, lubricante, solubilizante, agente de suspensión, carga, deslizante, adyuvante de la compresión, aglutinante, disgregante o material de encapsulación. En una realización, un vehículo sólido actúa como un lubricante, solubilizante, agente de suspensión, aglutinante, disgregante o material de encapsulación. En otra realización, el vehículo comprende un polímero termoelástico que define un depósito que contiene como mínimo, al menos un compuesto de fórmula (I) en forma de una composición sólida o líquida. En una realización adicional, dichos vehículos comprenden una matriz de polímero termoelástico, en el que está incrustada una composición que se describe en el presente documento.

La composición también puede subdividirse para contener cantidades apropiadas del compuesto de fórmula (I). Por ejemplo, las dosis unitarias pueden ser composiciones envasadas, por ejemplo, polvos envasados, viales, ampollas, jeringuillas precargadas o sobres que contienen líquidos

En una realización, las composiciones que se describen en el presente documento contienen opcionalmente uno o más vehículos y/o excipientes y uno o más compuestos de fórmula (I), opcionalmente con un activador del receptor TRPV1. Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, sin limitación, tensioactivos, adyuvantes, antioxidantes, aglutinantes, tampones, revestimientos, agentes colorantes, adyuvantes de la compresión, diluyentes, disgregantes, emulsionantes (por ejemplo, ésteres de ácido graso polioxietileno), emolientes, materiales de encapsulación, cargas, agentes aromatizantes, deslizantes, agentes de granulación, lubricantes, quelantes de metales, osmorreguladores, ajustadores del pH (por ejemplo, hidróxido de sodio), conservantes, solubilizantes, absorbentes, agentes estabilizantes, edulcorantes (tales como la sacarina), tensioactivos, agentes de suspensión, jarabes, agentes espesantes (por ejemplo, carboxipolimetileno o hidroxipropilmetilcelulosa), potenciadores de la penetración (por ejemplo, hidroxipolietoxidodecano, DMSO, DMAC, DDM, etc.) o reguladores de la viscosidad (tales como polímeros para aumentar la viscosidad). Véase, por ejemplo, los excipientes que se describen en el "*Handbook of Pharmaceutical Excipients*", 5ª Edición, Eds.: Rowe, Sheskey y Owen, APhA Publicaciones (Washington, DC), 14 de diciembre de 2005.

En una realización, las composiciones pueden utilizarse como inhalantes. Para esta vía de administración, las composiciones pueden prepararse en forma de dosis unitarias fluidas utilizando un compuesto de fórmula (I) y un vehículo para la entrega mediante una bomba de pulverización de atomización o mediante polvo seco para insuflación.

En otra realización, las composiciones pueden utilizarse en forma de aerosoles, es decir, orales o intranasales. Para esta vía de administración, las composiciones se formulan para su uso en un recipiente de aerosol presurizado junto con un propulsor gaseoso o licuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, dióxido de carbono, nitrógeno, propano y similares. También se proporciona la entrega de una dosis medida en una o más descargas.

En otra realización, las composiciones pueden administrarse mediante un dispositivo de entrega de liberación modificada. "Liberación modificada" como se usa en el presente documento se refiere a la entrega de un compuesto de fórmula (I) que es controlada, por ejemplo durante un período de al menos aproximadamente 8 horas (por ejemplo, entrega prolongada) a al menos aproximadamente 12 horas (por ejemplo, entrega sostenida). Dichos dispositivos también pueden permitir la liberación inmediata (por ejemplo, niveles terapéuticos conseguidos en menos de aproximadamente 1 hora o en menos de aproximadamente 2 horas). Los expertos en la materia conocen los dispositivos de entrega de liberación modificada adecuados. Para su uso en dichos dispositivos de entrega de liberación modificada, el compuesto de fórmula (I) se formula como se describe en el presente documento.

Los dispositivos de entrega de liberación modificada adecuados incluyen implantes liberadores de fármacos. Dichos implantes pueden comprender una matriz de polímero termoelástico, tal como una matriz de silicio o de vinilo de etileno y acetato, en la que uno o más compuestos de fórmula (I), opcionalmente con uno o más excipientes, está incrustado. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.736.665 y la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US-2011/0280922. Otros implantes liberadores de fármacos pueden comprender una "bomba osmótica" u otro mecanismo por el cual una solución que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) (opcionalmente con uno o más excipientes) contenida dentro del dispositivo es forzada a salir, por ejemplo a través de las paredes del implante o a través de una o más aberturas, por la presión osmótica que produce en el dispositivo una vez que se implanta en un sujeto. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.035.891 y 6.464.688. Otros implantes liberadores de fármacos pueden comprender un hidrogel tal como un polímero a base de polimetacrilato (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.292.515 y 5.266.325,) o un polímero termoelástico, tal como un poliuretano (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 7.858.110 y 7.842.303), que definen un depósito que contiene una composición sólida o líquida que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) opcionalmente con uno o más excipientes. Otros implantes liberadores de fármacos pueden comprender un polímero biodegradable o bioerosionable y al menos uno o más compuestos de fórmula (I), opcionalmente con uno o más excipientes. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.906.474 y 5.633.002.

La liberación modificada de los compuestos de fórmula (I) también puede conseguirse mediante la inyección de una composición que comprende uno o más de estos compuestos en el tejido de la vejiga (por ejemplo, en el urotelio o muscularis propia) con un dispositivo que puede emplearse a través de un endoscopio insertado en la vejiga o de forma percutánea. Por ejemplo, uno o más compuestos de fórmula (I) pueden inyectarse en el tejido de la vejiga a través de una aguja o un dispositivo sin aguja como se describe en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US-2011/0046600, un dispositivo de inyección sin aguja incluye la plataforma JetTouch™ (American Medical Systems; Minnetonka, Minnesota). Los compuestos inyectados pueden formar un depósito y en ciertas realizaciones, el uno o más compuestos de fórmula (I) pueden encapsularse en un polímero biodegradable o bioerosionable, por ejemplo como se describe en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.480.656 y 6.036.976.

La liberación modificada de los compuestos de fórmula (I) puede también lograrse mediante la instilación de una composición que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) y un material que se solidifica o gelifica, por ejemplo una vez instilada en la vejiga o al entrar en contacto con el urotelio de la vejiga, para revestir al menos una parte de la pared de la vejiga. El uno o más compuestos de fórmula (I) puede liberarse entonces del material solidificado o gelificado. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.894.071.; 5.575.815 y 6.039.967.

En otra realización más, las composiciones pueden administrarse por vía transdérmica, es decir, a través del uso de un parche de liberación de fármacos. En una realización, el parche es un parche transdérmico "iontoforético" en el que uno o más medicamentos se entregan usando una corriente eléctrica simple o más sofisticada (por ejemplo, controlada por un microprocesador) usando, por ejemplo, una batería de a bordo. En una realización adicional más, el parche es un parche transdérmico de "microagujas", que contiene micro agujas revestidas con o que contienen (en forma soluble o insoluble) una composición farmacéutica de la invención. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 7.798.987 y 7.537.795. Las microagujas pueden ser solubles o insolubles ellas mismas; Véase, por ejemplo, la tecnología de "microagujas" descrita en Sullivan y col., "*Dissolving Polymer Microneedle Patches for Influenza Vaccination*", *Nature Medicine*, 16:915-920 (18 de julio de 2010, Publicación en línea) y Lee y col., "*Dissolving Microneedle Patch for Transdermal Delivery of Human Growth Hormone*", *Small*, 4 de enero de 2011, publicación en línea. Otros sistemas de administración transdérmica adecuados incluyen los sistemas de ablaciones por radiofrecuencia descritos en Sintov y col., "*Radiofrequency-Driven Skin Microchanneling as a New Way for Electrically Assisted Transdermal Delivery of Hydrophilic Drugs*", *Controlled Release* 89:311-320 (2003) y la Patente de los EE.UU. N.º 7.558.625.

Los ejemplos adicionales de parches transdérmicos útiles para la administración de los compuestos de fórmula (I) incluyen los descritos en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.411.738 y 5.827.528 y Prausnitz y Langer, "*Transdermal drug delivery*", *Nature Biotechnology*, 26(11):1261-1268, noviembre de 2006. De forma deseable, un parche se aplica a través de un adhesivo adecuado sobre la piel, donde permanece en el lugar durante al menos una hora. En una realización, el parche permanece en el lugar durante aproximadamente 1 hora y se sustituye semanalmente, para un total de aproximadamente 2 o aproximadamente 3 horas de tiempo de uso. En otra realización, el parche permanece en el lugar durante aproximadamente 2 horas. En una realización adicional, el parche permanece en el lugar durante aproximadamente 3 horas. En otra realización, el parche permanece en el lugar durante aproximadamente 4 horas. En otra realización más, el parche permanece en el lugar durante períodos de tiempo más largos o más cortos.

También se incluye la administración de los compuestos de fórmula (I) con otro u otros medicamentos o agente o agentes terapéuticos. En una realización, los compuestos de fórmula (I) se combinan con otros medicamentos o agentes terapéuticos en una composición única. Sin embargo, la presente invención no está tan limitada. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse en una o más formulaciones separadas de otros compuestos de fórmula (I), u otros medicamentos o agentes terapéuticos como se describen a continuación.

En una realización, los compuestos de la invención pueden utilizarse para tratar el dolor o el picor cuando se combinan con un activador del receptor TRPV1. La expresión "activador del receptor TRPV1" como se usa en el

presente documento se refiere a cualquier agente o estímulo que activa los receptores TRPV1 en nociceptores o pruriceptores y permite la entrada de al menos un inhibidor de canales iónicos abiertos por voltaje (por ejemplo, de sodio o de calcio). En una realización, el activador del receptor TRPV1 incluye, pero no se limita a, la capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina, lidocaína, articaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, bupivacaína, eugenol, alcanfor, clotrimazol, arvanil (N-araquidonoilvainillamina), anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2APB), AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato 13-acetato 20-homovainillato de forbol (PPAHV), olvanil (NE 19550), OLDA (N-oleoildopamina), N-araquidonildopamina (NADA), 6'-yodoresiniferatoxina (6'-IRTX), Cl 8 N-aciletanolaminas, derivados de la lipoxigenasa (tales como ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico), inhibidor de péptidos de nudo de cisteína (ICK) (vainillotoxinas), MSK1 95 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida), JIL79 (N-[2-(3,4-dimetilbencil)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea), hidroxí- α -sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol, SU200 (N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea)nonivamida y acil amidas grasas de tetrahidroisoquinolinas. En otra realización, el activador del receptor TRPV1 es lidocaína, aprindina, benzocaína, butacaína, cocaína, dibucaína, encainida, mexiletina, oxetacaína (oxetazaína), prilocaína, proparacaína, procainamida, n-acetilprocainamida, cloroprocaína (nesacaína, nescaína), dilonina, etidocaína, levobupivacaína, ropivacaína, ciclometacaína, dimetocaína (larocaína), propoxicaína, trimecaína y simpocaína. En una realización adicional, el activador del receptor TRPV1 es lidocaína. En otra realización, el activador TRPV1 puede ser un detergente o un tensioactivo, ejemplos de los cuales pueden encontrarse en los productos de higiene empleados habitualmente, tales como jabones y champús (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Véase, Lilja y col. "Surfactant-Induced TRPV1 activity - A Novel Mechanism for Eye Irritation?" *Technological Sciences*, 99(1):174-180, 2007. En otra realización, el activador del receptor TRPV1 es el calor o la inflamación.

En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 10 % p/v. Un experto en la materia entenderá fácilmente que la cantidad terapéuticamente eficaz mencionada se basa en la base libre del activador del receptor TRPV1. Mediante el uso de esta información y la experiencia en la materia, se podría ser capaz de determinar la cantidad de la sal del activador del receptor TRPV1 correspondiente para su uso en las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es menos de aproximadamente el 10 % p/v, aproximadamente el 9 % p/v, aproximadamente el 8 % p/v, aproximadamente el 7 % p/v, aproximadamente 6 % p/v, aproximadamente 5 % p/v, aproximadamente 4 % p/v, aproximadamente 3 % p/v, aproximadamente el 2 % p/v o aproximadamente el 1 % p/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 % p/v. En otra realización más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3 % p/v. En otra realización más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2 % p/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de un activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente el 2 % p/v. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 1 % p/v. En una realización adicional, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente el 0,5 % p/v.

La cantidad terapéuticamente eficaz del activador del receptor TRPV1 puede, por tanto, ser de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por dosis basándose en un sujeto mamífero de 70 kg. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 25 mg por dosis. En una realización adicional, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg. En una realización adicional más, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 mg, de aproximadamente 0,5 mg, de aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 3 mg, de aproximadamente 4 mg, de aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 6 mg, de aproximadamente 7 mg o de aproximadamente 8 mg.

La presente invención, por tanto, proporciona una composición que contiene dicho compuesto y lidocaína. En una realización, la composición contiene de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 1 % p/v de dicho compuesto y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 % p/v de lidocaína. En otra realización, la composición contiene de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,7 % p/v de dicho compuesto y de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 % p/v de lidocaína. En una realización adicional, la composición contiene de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,5 % p/v de dicho compuesto y de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 % p/v de lidocaína. En otra realización más, la composición contiene de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 5 % p/v de dicho compuesto y de aproximadamente el 2 % p/v de lidocaína. En otra realización más, la composición contiene aproximadamente el 2 % p/v de dicho compuesto y aproximadamente el 2 % p/v de lidocaína. En otra realización, la composición contiene aproximadamente el 5 % p/v de dicho compuesto y aproximadamente el 2 % p/v de lidocaína. Como se ha analizado anteriormente, estas composiciones pueden diluirse. En una realización, estas composiciones pueden diluirse 2 veces. En otra realización, estas composiciones pueden diluirse 4 veces.

También se incluyen para su uso en las combinaciones farmacéuticas y procedimientos que se describen a continuación los inhibidores de los canales iónicos abiertos por voltaje. En una realización, los canales iónicos abiertos por voltaje son los canales iónicos de sodio o de calcio. En una realización adicional, el inhibidor del canal de sodio abierto por voltaje incluye, sin limitación, QX-314, N-metil-procaína (QX-222), N-octil-guanidina, 9-aminoacridina y pancuronio. En otra realización, el inhibidor de los canales de calcio abiertos por voltaje incluye, pero no se limita a, D-890 (metoxiverapamilo cuaternario) y CERM 1 1888 (bepirdilo cuaternario). En una realización

adicional, los inhibidores de los canales iónicos abiertos por voltaje, tales como el riluzol, mexilitina, fenitoína, carbamazepina, procaína, tocainida, prilocaína, diisopiramida, benciclano, quinidina, bretilio, lifarizina, lamotrigina, flunarizina, articaína, bupivacaína, mepivacaína, fluspirileno, orfenadrina, fenbenzamina, bepridilo, pimozida, penfluridol, fluspirileno, propiverina, disopiramida, metadona, tolterodina, sales de tridihexetilo, tripelennamina, mepiramina, bromfeniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina, carbinoxamina, acetato de levometadilo, galopamilo, verapamilo, devapamilo, tiapamilo, emopamilo, diclonina, pramoxina, lamotrigina, mibefradilo, gabapentina, amilorida, diltiazem, nifedipino, nimodipino, nitrendipino, cocaína, mexiletina, propafenona, quinidina, oxetazaína, articaína, riluzol, benciclano, lifarizina y estircnina, pueden combinarse con el compuesto de fórmula (I).

También pueden utilizarse inhibidores de los canales iónicos abiertos por voltaje que atraviesan la membrana en combinación con el compuesto de fórmula (I) en las composiciones, combinaciones o los procedimientos que se describen en el presente documento. En una realización, el inhibidor de los canales iónicos abiertos por voltaje que atraviesa la membrana incluye, pero no se limita a, la cocaína, carbamazepina, disopiramida, lamotrigina, procainamida, fenitoína, oxcarbazepina, topiramato, zonisamida, tetracaína, aminobenzoato de etilo, prilocaína, fosfato de disopiramida, acetato de flecainida, mexiletina, propafenona, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, cloroprocaína, dibucaína, diclonina, mepivacaína, pramoxina, procaína, tetracaína, oxetazaína, propitocaína, levobupivacaína, bupivacaína, lidocaína, moricizina, tocainida, proparacaína, ropivacaína, sulfato de quinidina, encainida, ropivacaína, etidocaína, moricizina, quinidina, encainida, flecainida, tocainida, fosfenitoína, cloroprocaína, diclonine, L-(-)-1-butil-2',6'-pipecoloxilidida y pramoxina.

Adicionalmente, pueden usarse uno o más agentes normalmente utilizados para tratar el dolor, es decir, analgésicos, junto con una combinación de la invención en los procedimientos, composiciones y kits que se describen en el presente documento. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), opiáceos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores del transportador de amina y anticonvulsivos (tales como gabapentinoides).

El compuesto de fórmula (I) puede administrarse junto con un vasoconstrictor (por ejemplo, epinefrina o vasopresina vaso) cuando se utiliza en soluciones inyectables.

El compuesto de fórmula (I) puede combinarse con glucosa o dextrosa cuando se utiliza para la infusión o como un analgésico o antipruriginoso local.

Además, el compuesto de fórmula (I) puede combinarse con agentes espesantes para formar una gelatina o también pueden contener potenciadores de la penetración, para su uso en aplicaciones tópicas o dérmicas tales como procedimientos tópicos urogenitales.

Las pulverizaciones para la anestesia tópica de la boca y la orofaringe pueden contener el compuesto de fórmula (I), sacarina y/o alcohol.

Por último, el compuesto de fórmula (I) puede formularse en forma de una pomada para la administración a las membranas mucosas accesibles.

Pueden usarse uno o más agentes adicionales utilizados normalmente para tratar el picor junto con una combinación de la invención en los procedimientos, composiciones y kits que se describen en el presente documento. Dichos agentes incluyen esteroides y antihistamínicos tópicos u orales.

Adicionalmente, pueden usarse uno o más agentes utilizados normalmente para tratar la cistitis intersticial o la vejiga hiperactiva, junto con una combinación de la invención en los procedimientos, composiciones y kits que se describen en el presente documento. En una realización, el agente adicional utilizado para tratar la vejiga hiperactiva puede ser un anticolinérgico, por ejemplo, darifenacina (fármaco Enablex®), fesoterodina (fármaco Toviaz®), oxibutinina (fármacos Ditropan®, Ditropan XL®, Oxytrol®, Gelnique®), solifenacina (fármaco Vesicare®), tolterodina (fármacos Detrol® y Detrol® IA) y/o Trospium (fármaco Sanctura®); un antidepresivo, por ejemplo, el antidepresivo tricíclico clorhidrato de imipramina (fármaco Tofranil®); la toxina botulínica, más habitualmente conocida por eliminar las arrugas; estrógeno; un bloqueante de OC, capsaicina y/o resinerferatoxina.

En otra realización, el agente adicional utilizado para tratar la cistitis intersticial puede ser un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, por ejemplo, ibuprofeno (fármacos Advil® o Motrin®), naproxeno (fármacos Aleve® o Anaprox®), un antidepresivo tal como un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, amitriptilina o imipramina (fármaco Tofranil®), un antihistamínico, por ejemplo, difenhidramina (fármaco Benadril®) y loratadina (fármaco Claritin®), pentosano (fármaco Elmiron®), entre otros. El agente adicional puede, como alternativa, seleccionarse entre DMSO (fármaco Rimso-50®), lidocaína, bicarbonato de sodio, pentosano, heparina, ácido hialurónico, sulfato de condroitina y oxibutinina o combinaciones de los mismos.

También se proporcionan en el presente documento regímenes, kits o paquetes de formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de fórmula (I) o las composiciones que se describen en el presente documento. Los kits pueden organizarse para indicar que se tome una única formulación o combinación de formulaciones en cada tiempo deseado.

Convenientemente, el kit contiene envases o un recipiente con el compuesto de fórmula (I) formulado para la vía de entrega deseada. Convenientemente, el kit contiene instrucciones sobre la dosificación y un prospecto con respecto al compuesto de fórmula (I). Opcionalmente, el kit puede contener además instrucciones para controlar los niveles locales o circulantes de producto y materiales para realizar dichos ensayos, incluyendo, por ejemplo, reactivos, placas de pocillos, recipientes, marcadores o etiquetas y similares. Dichos kits se envasan fácilmente de manera adecuada para el tratamiento de una indicación deseada. Por ejemplo, el kit puede contener también instrucciones para el uso de un parche, una bomba de pulverización u otro dispositivo de entrega. Otros componentes adecuados para incluir en dichos kits serán fácilmente evidentes para un experto en la materia, teniendo en cuenta la indicación deseada y la vía de entrega y pueden contener lubricantes, soluciones antisépticas y agentes anestésicos locales para facilitar la colocación del dispositivo de entrega.

Los compuestos de fórmula (I) o composiciones que se describen en el presente documento pueden ser de una sola dosis o para la administración discontinua continua o periódica. Para la administración continua, un paquete o kit pueden incluir el compuesto de fórmula (I) en cada unidad de dosificación (por ejemplo, solución, loción, comprimido, píldora, unidad/parche liberador de fármaco u otra unidad descrita anteriormente o utilizada en la entrega de fármacos) y opcionalmente instrucciones para la administración de las dosis menos de una vez al día, a diario, semanalmente o mensualmente, durante un período de tiempo predeterminado o según lo prescrito. Cuando se va a entregar periódicamente el compuesto de fórmula (I) de un modo discontinuo, un paquete o kit puede incluir placebos durante los períodos en que no se entrega el compuesto de fórmula (I). Cuando son deseables concentraciones variables de una composición, de los componentes de la composición o de las proporciones relativas de los compuestos de fórmula (I) o agentes de una composición con el tiempo, un paquete o kit puede contener una secuencia de unidades de dosificación que proporcionan la variabilidad deseada.

Se conoce un número de envases o kits en la técnica para la dispensación de agentes farmacéuticos para su uso oral periódico. En una realización, el envase tiene indicadores para cada período. En otra realización, el paquete es un envase de lámina de aluminio o blíster, una ampolla etiquetada, un vial o un frasco.

Los medios de envasado de un kit pueden en sí mismos estar orientados para la administración, tales como un inhalador, jeringuilla, pipeta, cuentagotas, catéter, cistoscopio, trocar, cánula, dispositivo de eyección a presión u otros aparato de este tipo, desde los que la formulación puede aplicarse a una zona afectada del cuerpo, tal como los pulmones, inyectarse en un sujeto, entregarse al tejido de la vejiga o incluso aplicarse a y mezclarse con los otros componentes del kit.

Uno o más componentes de estos kits también pueden proporcionarse en formas secadas o liofilizadas. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan en forma secada, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro paquete.

Los kits de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener los viales u otros medios de envasado adecuados en confinamiento cerrado para la venta comercial tal como, por ejemplo, recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que los viales deseados quedan retenidos. Independientemente del número o tipo de paquetes y como se ha analizado anteriormente, los kits también pueden incluir o estar envasados con un instrumento separado para ayudar a la inyección/administración o colocación de la composición dentro del cuerpo de un animal. Dicho instrumento puede ser un inhalador, jeringuilla, pipeta, pinzas, cuchara medidora, cuentagotas, catéter, cistoscopio, trocar, cánula, dispositivo de entrega a presión o cualquier medio de entrega médicamente aprobado de este tipo.

En una realización, se proporciona un kit y contiene un compuesto de fórmula (I). El compuesto de fórmula (I) puede estar en presencia o ausencia de uno o más de los vehículos o excipientes descritos anteriormente. El kit puede contener, opcionalmente, instrucciones para la administración del compuesto de fórmula (I) a un sujeto que tiene dolor, picor, cistitis intersticial o vejiga hiperactiva.

En una realización adicional, se proporciona un kit y contiene un compuesto de fórmula (I) en una segunda unidad de dosificación, y uno o más de los vehículos o excipientes descritos anteriormente en una tercera unidad de dosificación. El kit puede contener, opcionalmente, instrucciones para la administración del compuesto de fórmula (I) a un sujeto que tiene dolor, picor, cistitis intersticial o vejiga hiperactiva.

Cuando se utiliza como se describe en el presente documento, el activador del receptor TRPV1 puede utilizarse en cantidades mayores o menores que el compuesto de fórmula (I). En una realización, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 puede determinarse por el médico especialista. En una realización, se utiliza una relación de aproximadamente 1:1 del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1. En otra realización, se utiliza una relación mayor que o al menos aproximadamente 1:1 del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1. En una realización adicional, se utiliza una relación menor a 1:1 del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1. En una realización adicional más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:0,5. En otra realización más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de al menos aproximadamente 1:2. En otra realización más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:2. En una realización adicional más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de

- aproximadamente 1:3. En otra realización, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:4. En otra realización más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:5. En una realización adicional, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:7. En otra realización más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:10. En otra realización, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:25 o inferior. En una realización adicional más, la relación del compuesto de fórmula (I) al activador del receptor TRPV1 es de aproximadamente 1:0,5 a aproximadamente 1:25.
- El compuesto de fórmula (I) también pueden administrarse en antes, simultáneamente o con posterioridad a terapias relacionadas no medicamentosas. En una realización, los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse junto con la estimulación del nervio, por ejemplo, la estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS, del inglés *transcutaneous electrical nerve stimulation*) o la estimulación del nervio sacro.
- En una realización adicional, los compuestos que se describen en el presente documento pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar la vejiga hiperactiva y/o la cistitis intersticial.
- Como se ha analizado anteriormente, los procedimientos, composiciones y kits de la invención pueden utilizarse para tratar el dolor, el picor, la cistitis intersticial o la vejiga hiperactiva resultantes de un número de afecciones. El término "dolor" como se usa en el presente documento incluye todos los tipos de dolor. En una realización, el dolor puede ser agudo o crónico. En otra realización, el dolor puede ser nociceptivo, disfuncional, idiopático, neuropático, somático, visceral, inflamatorio y/o operatorio. Por ejemplo, el dolor puede provenir de una migraña, del dolor de espalda, del dolor de cuello, del dolor ginecológico, del dolor de parto o de parto, del dolor ortopédico, del dolor posterior al ictus, del dolor postquirúrgico u procedimental, de la neuralgia post herpética, de la crisis de células falciformes, de la cistitis intersticial, del dolor urológico (tal como uretritis), del dolor dental, del dolor de cabeza, del dolor de una herida o de un procedimiento médico, tal como una cirugía (tales como la corrección de juanetes o la sustitución de cadera, rodilla u otra articulación), de la sutura, del establecimiento de una fractura, de la biopsia y similares. También puede aparecer dolor en pacientes con cáncer, que puede ser debido a varias causas, tales como la inflamación, la compresión de los nervios y las fuerzas mecánicas que son resultado de la distensión del tejido como consecuencia de la invasión por un tumor o una metástasis tumoral en el hueso u otros tejidos.
- En una realización, el dolor es dolor neuropático, tal como la neuralgia postherpética. En otra realización, el dolor es dolor inflamatorio. En una realización adicional, el dolor es dolor nociceptivo. En otra forma de realización más, el dolor es dolor procedimental. En otra realización más, el dolor es causado por el cáncer esofágico, la colitis, la cistitis, el síndrome del intestino irritable, la colitis o la neuropatía idiopática.
- El "dolor somático" incluye el dolor de los huesos, las articulaciones, los músculos, la piel o el tejido conectivo.
- El "dolor central" incluye el dolor que surge como consecuencia de un traumatismo cerebral, el ictus o la lesión de la médula espinal.
- El "dolor visceral" incluye el dolor de los órganos viscerales, tales como el tracto respiratorio o gastrointestinal y el páncreas, el tracto urinario y los órganos reproductores. En una realización, el dolor visceral es resultado de la afectación tumoral de la cápsula de los órganos. En otra realización, el dolor visceral es resultado de la obstrucción de una víscera hueca. En una realización adicional, el dolor visceral es resultado de la inflamación como en la cistitis o la esofagitis por reflujo.
- El "dolor idiopático" se refiere a dolor que no tiene causa subyacente o se refiere a dolor provocado por una afección que permanece sin diagnosticar.
- El "dolor disfuncional" se refiere al dolor que se produce en ausencia de un estímulo nocivo, un daño tisular o una lesión en el sistema nervioso. En una realización, el dolor disfuncional es resultado de afecciones reumatológicas tales como la artritis y la fibromialgia, el dolor de cabeza de tipo tensional, los trastornos del intestino irritable y la eritemalgia.
- El "dolor nociceptivo" incluye el dolor provocado por estímulos nocivos que amenazan o realmente lesionan los tejidos del cuerpo. En una realización, el dolor nociceptivo es resultado de un corte, hematoma, fractura ósea, lesión por aplastamiento, quemaduras, traumatismo, cirugía, parto, esguince, golpe, inyección, procedimiento dental, biopsia de la piel u obstrucción. En otra realización, el dolor nociceptivo se localiza en la piel, el sistema músculo-esquelético o en los órganos internos.
- El "dolor neuropático" es el dolor debido al procesamiento anormal de la entrada sensorial por el sistema nervioso periférico o central posterior a una lesión de estos sistemas. En una realización, el dolor neuropático es crónico y no maligno. En una realización, el dolor neuropático es debido a traumatismo, cirugía, hernia de un disco intervertebral, lesión de la médula espinal, diabetes, infección por herpes zóster (culebrilla), VIH/SIDA, cáncer en etapa tardía, amputación (tal como la mastectomía), síndrome del túnel carpiano, alcoholismo crónico, exposición a radiación y es un efecto secundario no intencionado de agentes neurotóxicos de tratamiento, tales como ciertos fármacos contra el VIH y quimioterápicos. En otra realización, el dolor neuropático puede describirse como "urente", "eléctrico",

"hormigueo" o "fulgurante".

La frase "dolor inflamatorio" incluye el dolor que es resultado de la inflamación provocada por cualquier número de factores. En una realización, el dolor inflamatorio se produce debido al daño tisular o la inflamación. En otra realización, el dolor inflamatorio es debido a una lesión (incluyendo las lesiones de articulaciones, músculos, y tendones), a procedimientos quirúrgicos, a la infección y/o a la artritis.

El "dolor procedimental" se refiere al dolor que surge de un procedimiento médico. El procedimiento médico puede incluir cualquier tipo de procedimiento médico, dental o quirúrgico. En una realización, el dolor procedimental es postoperatorio. En otra realización, el dolor se asocia a una inyección, al drenaje de un absceso, a la cirugía, a procedimientos dermatológicos, dentales y oftálmicos, a la artroscopia y al uso de otros instrumentos médicos y/o a la cirugía estética.

Una "migraña" es un dolor de cabeza debido a la activación de fibras sensoriales que inervan las meninges del cerebro.

El término "picor" se refiere a todos los tipos de sensaciones de picor y de escozor que pueden ser localizadas o generalizadas y pueden ser agudas, intermitentes o persistentes. El picor puede ser idiopático, alérgico, metabólico, infeccioso, inducido por fármacos o debido a patologías específicas debidas a enfermedades hepáticas o renales, o al cáncer. El "prurito" es el picor grave, pero como se usa en el presente documento puede incluir el "picor" como se ha definido anteriormente. En una realización, el picor puede ser resultado del estrés, la ansiedad, la radiación UV, trastornos metabólicos y endocrinos (por ejemplo, enfermedad hepática o renal, hipertiroidismo), cáncer, reacciones a fármacos, reacciones a alimentos, infecciones parasitarias, infecciones por hongos, reacciones alérgicas, enfermedades hemáticas (por ejemplo, policitemia vera), picaduras de insectos, embarazo, trastornos metabólicos, insuficiencia hepática o renal, eczema y afecciones dermatológicas tales como la dermatitis, el eczema o la psoriasis.

El término "tratar", "tratamiento" o cualquier variación de los mismos tiene por objeto incluir la terapia utilizada para remediar un problema de salud o afección en un paciente o sujeto. En una realización, el problema de salud o afección pueden eliminarse de forma permanente o durante un corto período de tiempo. En otra realización, la gravedad del problema de salud o afección o de uno o más síntomas característicos del problema de salud o afección, pueden reducirse de forma permanente o durante un corto período de tiempo. La eficacia de un tratamiento del dolor, picor, CI o VH puede determinarse usando cualquier índice convencional de dolor o picor, tales como los que se describen en el presente documento o puede determinarse basándose en el dolor subjetivo del paciente, la evaluación del picor o los síntomas sensoriales asociados a con la CI o la VH, incluyendo la sensación de urgencia asociada a las mismas. Un paciente se considera "tratado" si existe una reducción notificada en el dolor, el picor, una reducción de los síntomas nerviosos sensoriales asociados a la VH o CI o una reacción reducida a los estímulos que deberían causar dolor o picor. En una realización, los compuestos de fórmula (I) son útiles para el tratamiento de la cistitis intersticial o la vejiga hiperactiva, ya que estos compuestos pueden modular de forma selectiva los aspectos sensoriales de la VH y la CI que afectan al sistema nervioso sin afectar o causar un impacto negativo en la función de las neuronas motoras asociadas a la vejiga y el control del esfínter.

Con el fin de medir la eficacia de cualquiera de los procedimientos, composiciones o kits que se describen en el presente documento, puede usarse un índice de medición. Los índices que son útiles para la medición del dolor asociado a trastornos musculoesqueléticos, inmunoinflamatorios y neuropáticos incluyen una escala visual analógica (EVA), una escala de Likert, escalas categóricas del dolor, descriptores, el índice de Lequesne, el índice WOMAC y el índice AUSCAN, cada uno de los cuales es bien conocido en la técnica. Dichos índices pueden usarse para medir el dolor, el picor, la función, la rigidez u otras variables. Se conocen en la técnica índices que son útiles para la medición de la vejiga hiperactiva e incluyen dispositivos o cuadernos de resultados comunicados por el paciente y mediciones urodinámicas de incontinencia urinaria, tales como la medición del volumen de micción utilizando catéteres de preservativo y otros dispositivos físicos de recolección.

Los índices que son útiles para la medición del dolor asociado a la cistitis intersticial incluyen el índice de síntomas de la cistitis intersticial (ISCI), el índice de problemas de la cistitis intersticial (IPIC), la puntuación de dolor-urgencia-frecuencia (DUF), el instrumento de síntomas de Wisconsin (*Wisconsin Symptom Instrument*, UWI) y una escala analógica visual (EVA), tal como la escala de Likert y otras escalas de dolor categóricas.

Una escala visual analógica (EVA) proporciona una medición de una cantidad unidimensional. Una EVA generalmente utiliza una representación de distancia, tal como una imagen de una línea con marcas de números dibujadas a intervalos de distancia regulares, por ejemplo, diez intervalos de 1°cm. Por ejemplo, se le puede pedir a un paciente que clasifique una sensación de dolor o picor mediante la elección del punto de la línea que mejor corresponde a la sensación de dolor o picor, donde 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 acerca de cómo el paciente está experimentando el dolor o el picor. Las escalas EVA y su uso se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.709.406 y 6.432.937, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan en el presente documento por referencia.

- Una escala de Likert proporciona de manera similar una medición de una cantidad unidimensional. Generalmente, una escala de Likert tiene valores enteros discretos que van desde un valor bajo (por ejemplo, 0, que significa sin dolor) a un valor alto (por ejemplo, 7, que significa un dolor extremo). Se pide a un paciente que experimenta dolor que elija un número entre el valor bajo y el alto valor para representar el grado de dolor experimentado. Las escalas de Likert y su uso se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.623.040 y 6.766.319, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan en el presente documento por referencia.
- El índice de Lequesne y el índice de osteoartritis (OA) de las Universidades Western Ontario y McMaster (WOMAC) evalúan el dolor, la función y la rigidez en la rodilla y la cadera de los pacientes con OA usando cuestionarios auto-administrados. El WOMAC abarca tanto la rodilla como la cadera, mientras que hay un cuestionario de Lequesne para la rodilla y otro para la cadera. Estos cuestionarios son útiles ya que contienen más de contenido de información en comparación con la escala EVA o de Likert. Los cuestionarios tanto del índice WOMAC como del índice de Lequesne han sido ampliamente validados en la OA, incluso en los escenarios quirúrgicos (por ejemplo, artroplastia de rodilla y cadera). Sus características métricas no difieren significativamente.
- El índice AUSCAN (artritis de la mano de Australia y Canadá) emplea un cuestionario válido, fiable y sensible auto-notificado por el paciente. 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 de Likert o EVA.
- La puntuación de O'Leary-Sant y el índice de problemas de la CI son índices auto-administrados para medir los síntomas del tracto urinario inferior.
- La escala de los síntomas del dolor-urgencia-frecuencia es una evaluación equilibrada de la disfunción urinaria, el dolor pélvico y los síntomas asociados al acto sexual y se usa con frecuencia junto con la administración intravesical de cloruro de potasio.
- La UWI utiliza siete preguntas relacionadas con la CI acerca de la frecuencia, la urgencia, la nocturia y el dolor.
- Otros índices adecuados que son útiles para la medición del dolor incluyen la escala descriptora del dolor (EDD), la escala descriptora verbal (EDV), la escala numérica de intensidad del dolor (ENID), la escala del dolor neuropático (EDN), el inventario de síntomas del dolor neuropático (ISDN), el inventario del dolor presente (IDP), la medición geriátrica del dolor (MGD), el cuestionario del dolor de McGill (CDM), la intensidad media del dolor (escala de diferencial descriptora), la escala numérica del dolor (END), puntuación de evaluación global (PEG), el cuestionario corto del dolor de McGill, el inventario de personalidad multifásico de Minnesota, el Perfil de Dolor y el Inventario de Dolor Multidimensional, el Cuestionario de Salud Infantil y el Cuestionario de Evaluación Infantil.
- El picor también puede medirse mediante mediciones subjetivas conocidas por los expertos en la materia (EVA, Likert, descriptores y similares). Otro enfoque es medir el rascado que es un objetivo correlativo al picor usando un transductor de vibración o medidores sensibles al movimiento.
- En una realización, los procedimientos de tratamiento que se describen en el presente documento incluyen la administración de un compuesto de fórmula (I) a un paciente. Pueden administrarse al paciente agentes opcionales adicionales, tales como los que se han descrito anteriormente para su uso en la combinación, antes, simultáneamente o después del compuesto de fórmula (I).
- En otra realización, los procedimientos que se describen en el presente documento incluyen de este modo la administración de un compuesto de fórmula (I) y un activador del receptor TRPV1 a un paciente. En una realización, el compuesto de fórmula (I) se administra al paciente antes del activador del receptor TRPV1. En otra realización, el activador del receptor TRPV 1 se administra al paciente antes del compuesto de fórmula (I). En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) y el activador del receptor TRPV 1 se administran al paciente simultáneamente.
- También se incluye en la presente invención la administración de un compuesto de fórmula (I) después de que el receptor TRPV 1 se ha activado. Específicamente, este procedimiento se realiza después de que se activa el receptor TRPV1. Dicha activación puede ser resultado de la administración de un compuesto o estímulo activador exógeno, o puede surgir como resultado de la activación endógena inducida por un estado fisiopatológico, tal como la inflamación, que activa los receptores TRPV1.
- Una diversidad de ensayos *in vivo* y modelos animales son útiles para evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir el dolor a través de la inhibición interna de los canales de sodio. Estos modelos pueden o no implicar la apertura (activación) de los canales de TRPV1 a través de la inducción del dolor por medios físicos, mecánicos o químicos (por ejemplo, la capsaicina). Los ejemplos de modelos adecuados incluyen, por ejemplo, los descritos en AM Binshtok y col., *Anesthesiology*, julio de 2009, 111(1):127-137; CR Reis y col., *Anesthesiology*, julio de 2009, 111(1):122-126; P Gerner y col., *Anesthesiology*, noviembre de 2008, 109(5):872-878; y AM Binshtok y otros, *Nature*, octubre de 2007, 449:607-610, el uso de preparaciones aisladas de músculo detrusor de la vejiga (Witte, *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* 2011, 384:555-563), medición de la frecuencia y el volumen miccionales en animales con libertad de movimientos (Clouse, 2012, *Urology* 79:1410e1-1410e6), medición de la urodinámica de

la vejiga usando cistometría en animales anestesiados (Shimizu, 2000, *British Journal of Pharmacology* 131:610-616), que se incorporan en el presente documento por referencia. Sin embargo, por una diversidad de razones que serán fácilmente evidentes para los expertos habituales en la técnica, es deseable proporcionar ensayos *in vitro* que permitan la identificación de compuestos con las propiedades deseadas. Se describen en el presente documento varios ensayos *in vitro* de este tipo.

En una realización, se desarrolló un sistema de ensayo basado en un FLIPR® (lector de placas fluorimétrico de formación de imágenes) modificado que es capaz de discriminar entre la entrada de compuestos de ensayo no específica mediada por hTRPV1. Ventajosamente, el sistema de ensayo utiliza la apertura activada por calor de los canales hTRPV1 seguida de una evaluación del bloqueo interno de canales de sodio. El ensayo permite que un compuesto cargado de forma permanente entre selectivamente a través de canales hTRPV1 abiertos y la potencia de ese compuesto en la inhibición de los canales de sodio desde el lado citoplasmático de la misma célula puede evaluarse y cuantificarse.

El ensayo de FLIPR® modificado utiliza células que expresan funcionalmente hTRPV1. Como se usa en el presente documento, el término "que expresan funcionalmente" incluye aquellas células que expresan la proteína TRPV1 humana y que responden a los estímulos que naturalmente abren este canal, incluyendo, por ejemplo, los medios térmicos (por ejemplo, calor) o químicos (por ejemplo, la capsaicina, lidocaína) que se describen en el presente documento. Los ensayos adecuados pueden incluir los ensayos de calcio o de potencial de membrana que se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 49). Sin embargo, se conocen otros ensayos funcionales en la técnica (por ejemplo, la electrofisiología de fijación de voltaje tal como la que usaron Binshtok y col., *Nature* 449(4) 607-610, 2007).

Puede seleccionarse una célula adecuada para la expresión de TRPV1 en *cis* o en *trans* y construido usando técnicas conocidas. En una realización, se selecciona una estirpe celular de neuroblastoma tal como N1E115 [CRL-2263] o ND7/23 [Código de catálogo ECACC: 92090903] para la expresión de hTRPV1. Sin embargo, puede seleccionarse otra estirpe celular de neuroblastoma, por ejemplo, tal como IMR-32 [CRL-127]; Neuro-2a [CRL-131]; NB41A3 [CRL-147]; B104-1-1 [CRL-1887]; SK-N-AS [CRL-2137]; SK-N-F1 [CRL-2142]; SK-N-DZ [CRL-2149]; SH-SY5Y [CRL-2266]; BE(2)-M17 [CRL-2267]; BE(2)-C [CRL-2268]; MC-IXC [CRL-2270]; SK-N-BE(2) (CRL-2271); CHP-212 (CRL-2273); B35 [CRL-2754], que están disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia (EE.UU.). Igualmente pueden seleccionarse otras estirpes celulares.

Para una descripción general de la forma en que se producen las células, véase *en general*, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (EE.UU.) 2001. En una realización, una estirpe celular estable puede prepararse usando las técnicas en Sambrook y col., usando de secuencias de codificación de hTRPV1 de tipo natural (wt, del inglés *wild tipe*) o recombinantes. Por ejemplo, la preparación de una estirpe celular de este tipo se describe en detalle en el presente documento (véase el Ejemplo 32). La preparación de otra estirpe celular se describe en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2007/0066068; puede emplearse el procedimiento de Lipofectamina® para la transfección de TRPV1 y hTRPV1 en células embrionarias de riñón humano (HEK293) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Gibco). Para crear una estirpe celular que exprese de forma permanente, se pueden subclonar células HEK transfectadas con wt-TRPV1 en genética (0,6 mg/ml) que contengan medio (DMEM que contiene FCS al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y anfotericina B 250 ng/ml) y propagar durante dos semanas para permitir la selección. Para obtener una única estirpe celular que exprese TRPV1 permanentemente, las células transfectadas pueden sembrarse en placas de 96 pocillos (1 célula por pocillo) y las colonias cultivadas a partir de células individuales se ensayaron posteriormente para determinar la capacidad de respuesta a la capsaicina mediante la medición de aumentos en el calcio intracelular. Los clones finales seleccionados, se llevaron a otras tres rondas de clonación de células individuales para asegurar que las estirpes celulares se derivan de una sola célula. Las variaciones sobre esta metodología serán fácilmente evidentes para un experto en la materia. En otra realización, las células pueden seleccionarse entre una estirpe celular que expresa establemente la hTRPV1, *en trans*, por ejemplo, a partir de un vector viral u otro elemento genético adecuado.

En una realización, se seleccionó la proteína hTRPV1 que tenía la secuencia de SEQ ID NO: 1: [Número de Referencia de NCBI NM_080706.3].

```

1  MKKWSSTDLDG AAADPLQKDT CPDPLDGDPN SRPPPAKPQL STAKSRTRLF GKGDSEEAFF
61  VDCPHEEGEL DSCPTITVSP VITIQRPGDG PTGARLLSQD SVAASTEKTL RLYDRRSIFE
121 AVAQNNCQDL ESLLLFLQKS KKHLTDNEFK DPETGKTCLL KAMLNLDHGDQ NTTIPLLEI
181 ARQTDLSKEL VNASYTDSYY KGQTALHIAI ERRNMALVTL LVENGADVQA AAHGDFFKKT
241 KGRPGFYFGE LPLSLAACTN QLGIVKFLQ NSWQTADISA RDSVGNFVLH ALVEVADNTA
301 DNTKFBVTSY NEILMLGAKL HPTLKEELT NKKGMTPLAL AAGTGKIGVL AYILQREIQE
361 PECRHLSRKF TEWAYGPVHS SLYDLSCIDT CEKNSVLEVI AYSSSETPNR HDMLLVEPLN
421 RLLQDKWDRF VKRIFYFNFL VYCLYMIIFT MAAYYRPVDG LPPFKMEKGT DYFRVTGEIL
481 SVLGGVYFFF RGIQYFLQRR PSMKTLFVDS YSEMLFFLQS LFMLATVVLY FSHLKEYVAS
541 MVFSLALGWT NMLYYTRGFQ QMGIIYAVMIE KMILRDLCRF MFVYIVFLEFG FSTAVVTLIE
601 DGKNDSLPSE STSHRWRGPA CRPPDSSYNS LYSTCLELFE FTIGMGDLEF TENYDFKAVF
661 IILLLAYVIL TYILLNMLI ALMGETVNKI AQESKNIWKL QRAITILDTE KSFLKCMRKA
721 FRSGKLLQVG YTPDGKDDYR WCFRVDEVNW TWNTNVGII NEDPGNCEGV KRTLSFSLRS
781 SRVSGRHWKN FALVPLLREA SARDRQSAQP EEVYLRQFSG SLKPEDAEVF KSPAASGEK

```

Sin embargo, un experto en la materia es consciente de que pueden hacerse pequeñas modificaciones a esta secuencia al tiempo que se conserva la funcionalidad deseada de la proteína. Como alternativa, se podría seleccionar otra proteína TRPV1 (por ejemplo, de una cobaya, ratón u otras especies) y modificar la secuencia para su uso en la presente invención. Dichas modificaciones pueden hacerse por una diversidad de razones, incluyendo, por ejemplo, para mejorar el rendimiento o la purificación.

Con el fin de preparar una célula que expresara hTRPV1, se seleccionó una construcción que contenía la secuencia codificante de la secuencia de hTRPV1 identificada anteriormente. En una realización, la secuencia de codificación era cualquier secuencia que codificara la proteína identificada anteriormente. En otra realización, la secuencia de codificación se seleccionó entre uno de las cuatro variantes de transcrito notificados en NCBI para TRPV1 humano (TRPV1), (NM_018727.5, NM_080704.3, NM_080705.3 y NM_080706.3). La secuencia codificante de proteína funcional (ORF – Marco de lectura abierto, del inglés *Open Reading Frame*) era igual para los cuatro transcritos. En los ejemplos siguientes, la construcción solo contenía la secuencia de codificación de la proteína funcional. Sin embargo, en otra realización, puede utilizarse otra variante, incluyendo la variante más larga (variante 3, N.º de referencia de NCBI: NM_080706.3). En otra realización más, se seleccionó otro ORF, u otra secuencia que contenía el ORF. En una realización, la secuencia se clonó a partir de una construcción existente, como se describe en los ejemplos a continuación. En otra realización, se utilizó una secuencia recombinante.

Si bien es posible el uso de células que están infectadas o transfectadas de manera que expresan hTRPV1 *en trans*, es deseable el uso de una estirpe celular que expresa de forma estable el canal hTRPV1. Dichas estirpes celulares pueden ser generarse por un experto en la materia usando la información disponible en el presente documento y conocida en la técnica.

En una realización, con el fin de preparar la estirpe celular, se amplificó hTRPV1 por PCR a partir de ADNc IMR322 (una estirpe celular de neuroblastoma). El producto de PCR obtenido que contenía la proteína de secuencia de codificación de hTRPV1 se clonó en un vector de producción con el control de un promotor fuerte. Como se ilustra a continuación, se usó el promotor de citomegalovirus humano. Sin embargo, también puede utilizarse otro promotor con una fuerte expresión constitutiva en células huésped de mamífero. Opcionalmente, la secuencia puede verificarse mediante PCR. Las células que se iban a transducir (por ejemplo, las células N1E115) se prepararon usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, n.º del catálogo 11668-019), como se describe en el presente documento. Las células transducidas se pasaron usando procedimientos convencionales y técnicas de transfección convencionales cuando se utilizaron. Hacia el final de la segunda semana, aparecieron colonias estables transfectadas, que después se expandieron y se ensayaron funcionalmente. El candidato clonal final para el estudio se seleccionó basándose en los datos del ensayo funcional. Estos ensayos evaluaron la capacidad de la célula para expresar hTRPV1 de una manera funcional, es decir, de manera que tras ser puesta en contacto con al menos uno de los estímulos a los que responde wt-hTRPV1, el canal hTRPV1 se abrió. Por ejemplo, una célula que expresa un hTRPV1 funcional puede responder a la capsaicina o al calor o a otros estímulos químicos, mecánicos o físicos característicos de hTRPV1 en su entorno natural. Los ejemplos de ensayos adecuados se describen en el Ejemplo 49 a continuación e incluyen los ensayos de potencial de membrana y de calcio. Otros ensayos adecuados incluyen los enfoques de electrofisiología de fijación de voltaje de una sola célula convencional como los utilizados por Binshtok y col., *Nature* 449 (4) 607-610, 2007. El ensayo de TRPV1 se realizó utilizando una plataforma de medición de fluorescencia FLIPR®-384 (Molecular Devices, Inc.) operando en un modo de ensayo de potencial de membrana, u otro sistema adecuado, usando células que expresaban hTRPV1 tal como se describe en el presente documento. Los kits de ensayo de potencial de membrana FLIPR® (tanto azul como rojo) estaban disponibles en Molecular Devices Corp (Sunnyvale, CA, EE.UU.), que proporcionó muchos de los tintes y materiales utilizados en el siguiente ensayo. Sin embargo, pueden obtenerse materiales similares de otras fuentes, según sea necesario o se desee.

El ensayo que se describe en el presente documento utilizó un procedimiento de activación para el canal de TRPV1 que difiere del que se describe normalmente en la bibliografía y la técnica (es decir, *la* capsaicina). El uso de la capsaicina para abrir el canal de hTRPV1 en las células demostró ser inadecuado, ya que redujo la ventana de señal a ruido del componente de respuesta posterior del canal de sodio del ensayo en la estirpe celular hTRPV1-N1E115.

5 Como alternativa, se prevé que esta estirpe celular podría sustituirse por otra estirpe celular preparada como se describe en el presente documento. Por tanto, tuvo que desarrollarse otro procedimiento para abrir el canal. Se ha descubierto que el procedimiento de activación de calor utilizado en el presente documento para produce un rendimiento robusto y reproducible.

10 El ensayo se realizó fácilmente en placas de ensayo de múltiples pocillos en los que se añadieron células en medio de crecimiento y se incubaron en condiciones que permitieron la formación de una monocapa confluyente en un período de horas antes del comienzo del ensayo. Pueden utilizarse medios y condiciones de cultivo convencionales. Se prepararon placas de ensayo celular por duplicado para cada experimento.

15 Los medios agotados procedentes de las placas de células sembradas se retiraron el día del ensayo y se reemplazaron por colorante azul de potencial de membrana (Molecular Devices). El colorante se preparó en tampón de ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa cargada con colorante se incubó a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante aproximadamente 30 minutos con el fin de cargar previamente las células con colorante. Opcionalmente, las células pueden cargarse con el colorante de forma simultánea a la adición de los compuestos de ensayo.

20 Un tampón de ensayo ilustrativo se preparó utilizando agua purificada, desionizada de acuerdo con la Tabla 1. Si bien los componentes precisos pueden variar, la naturaleza iónica del tampón de ensayo es deseable para su uso en el ensayo. El pH se ajustó a 7,4 usando hidróxido de potasio y el volumen se compuso con agua Milli-Q® (Millipore) hasta 500 ml. A menos que se indique lo contrario, todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo.

Tabla 1

Sal	Concentración (mM)
NaCl	150
KCl	3,25
CaCl ₂ 2H ₂ O	2
MgCl ₂ 6H ₂ O	3
HEPES	10
Glucosa	11 (198 mg/100 ml)

25 Los compuestos de ensayo se diluyeron en el tampón de ensayo y se añadieron a cada pocillo de una 'placa de compuesto' específica de 384 pocillos, que sirvió como una placa fuente para la adición de compuesto usando la plataforma FLIPR®. La concentración de los compuestos en la placa de compuesto se ajustó para conseguir la concentración final deseada cuando se añade a las células en la 'placa de células'. Después de la terminación del período de incubación de colorante, las placas de células cargadas con colorante y las placas fuente de compuesto se insertaron en el dispositivo FLIPR® Tetra con una caja de puntas 384 FLIPR® (Molecular Devices, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los compuestos se añadieron robóticamente a las placas de células cargadas con colorante utilizando el software integrado en el instrumento FLIPR® Tetra.

35 Inmediatamente después de la adición del compuesto, se activó hTRPV1, en una de las placas de células por duplicado, por calentamiento. Específicamente, se incubó toda la placa de múltiples pocillos que contenía la mezcla compuesto-células a 47 °C durante 10 minutos, después de lo cual se devolvieron a la temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos. La activación por calor de hTRPV1 se omitió en la placa de células duplicada que simplemente se mantuvo a temperatura ambiente durante los 40 minutos.

40 Se desencadenó una respuesta de potencial de membrana en las células cargadas de tinte y en las cargadas de compuesto mediante la adición de veratridina que es un 'agonista' conocido del canal de sodio. Como se ilustra en un ejemplo en el presente documento, se preparó una placa agonista que contenía veratridina (Sigma) por adelantado y se insertó en los dispositivos adecuados tales como, por ejemplo, el dispositivo FLIPR® TETRA para una "2ª adición" de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de veratridina en la "placa de agonista" se ajustó para lograr una concentración final de 100 µM cuando se añadiera a las células en la placa de células. También pueden usarse concentraciones finales de veratridina mayores o menores que 100 µM, pero la señal medida por el dispositivo FLIPR® TETRA u otro dispositivo adecuado puede variar en consecuencia.

45 La exposición de las células en la placa de células a la veratridina indujo que los canales de sodio de las células se abrieran y el flujo de iones resultante produjo un potencial de despolarización de la membrana que se detectó como una señal de fluorescencia por el dispositivo FLIPR® Tetra. La actividad de los compuestos de ensayo se determinó

5 por su capacidad para atenuar la señal de fluorescencia inducida por la veratridina, los compuestos más prometedores son los que mostraron una actividad potenciada en la placa de células activada por calor superior a la de la placa de células no activada por calor. Esta actividad diferencial refleja la absorción potenciada de compuesto a través de los canales hTRPV 1 activados por calor y abiertos y se apoya en el hecho de que el bloqueo de los canales de sodio requiere que los compuestos de ensayo actúen desde el lado citoplásmico de la membrana celular.

10 Una vez evaluados usando estos ensayos de exploración, los compuestos pueden seleccionarse para el estudio en modelos animales. La evaluación habitual del efecto analgésico de los compuestos se realizó usando un aparato de ensayo de pellizco-dolor en roedores (Bioseb (Francia)). Pellizcar de la piel proporciona un estímulo mecánico que puede clasificarse y que es particularmente adecuado para evaluar el dolor mecánico agudo (como describieron AM Binshtok y col., *Anesthesiology*, julio de 2009, 111(1):127-137). Otro modelo de dolor en roedores utilizado normalmente es el aparato de ensayo plantar de Hargreaves (IITC (EE.UU.)) que es particularmente adecuado para evaluar la nocicepción térmica.

Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

15 A menos que se indique lo contrario, todas las materias primas se adquirieron de proveedores habituales disponibles en el mercado. Los espectros de RMN ¹H se registraron usando TMS como referencia interna para los compuestos disueltos en CDCl₃. Para los compuestos disueltos en DMSO-d₆, MeOD y D₂O el instrumento se calibró a δ 2,5, 3,3 y 4,82 ppm, respectivamente. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en δ (partes por millón).

Para el análisis por CLEM, se usó el instrumento CLEM/EM IPA 2000 (Applied Biosystems). Las columnas incluían:

20 Columna W: columna Zorbax® Extender C18, 4,6 x 50°mm, 5 μm
 Columna X: columna Gemini® NX C18, 4,6 x 50°mm, 5 μm
 Columna Y: columna Xbridge® C18, 4,6 x 50°mm, 5 μm
 Columna Z: columna Reprosil®, 4,6 x 50°mm, 5 μm

El eluyente (disolvente) normalmente incluía (tampón ácido o básico como fase acuosa):

25 canal A:
 (i) ácido fórmico al 0,05 % en agua;
 (ii) acetato de amonio 10°mM en agua; o
 (iii) TFA al 0,05 % en agua.

canal B: acetonitrilo (fase orgánica).

30 El detector midió en el UV a dos longitudes de onda: 220 y 260 nm.

Los gradientes de CLEM fueron uno de los siguientes:

1. Seguimiento de la reacción de CLEM y procedimiento de análisis del compuesto final (para compuestos de polaridad general)

35 Condición de gradiente: tiempo de ejecución de 5 min
 Programas de tiempo:

P1: acetato de amonio 10°mM en agua/acetonitrilo
 Q1: TFA al 0,05 % en agua/acetonitrilo,
 R1: ácido fórmico al 0,05 % en agua/acetonitrilo

40 El gradiente variaba el acetonitrilo del 10 % al 90 % al 10 %.
 Caudal: 1,2 ml/min

2. Seguimiento de la reacción de CLEM y procedimiento de análisis del compuesto final en un tiempo de ejecución de 12 min (para los compuestos que eluyen muy próximos):

Condición de gradiente: tiempo de ejecución de 12 min
 Programas de tiempo:

45 P2: acetato de amonio 10°mM en agua/acetonitrilo
 Q2: TFA al 0,05 % en agua/acetonitrilo,
 R3: ácido fórmico al 0,05 % en agua/acetonitrilo

El gradiente variaba el acetonitrilo del 5 % al 90 % al 5 %.
 Caudal: 1,0 ml/min

3. CLEM después del desarrollo de procedimientos en HPLC – las condiciones del gradiente son como las del HPLC.

Los datos de espectros de masas se obtuvieron usando lo siguiente:

- 5 Técnica de ionización: IEN (ionización por electronebulización) usando una fuente de IPA (ionización a presión atmosférica)
 Potencial de desagregación: 10-70 V dependiendo de la ionización del compuesto
 Intervalo de masas: 100-800 amu
 Tipo de exploración: Q1
 Polaridad: +/-
- 10 Fuente de iones: Turbo pulverización
 Potencial de la nebulización iónica: +5500 para el modo positivo -4500 para el modo negativo
 Temperatura de la fuente de masa: 200 °C

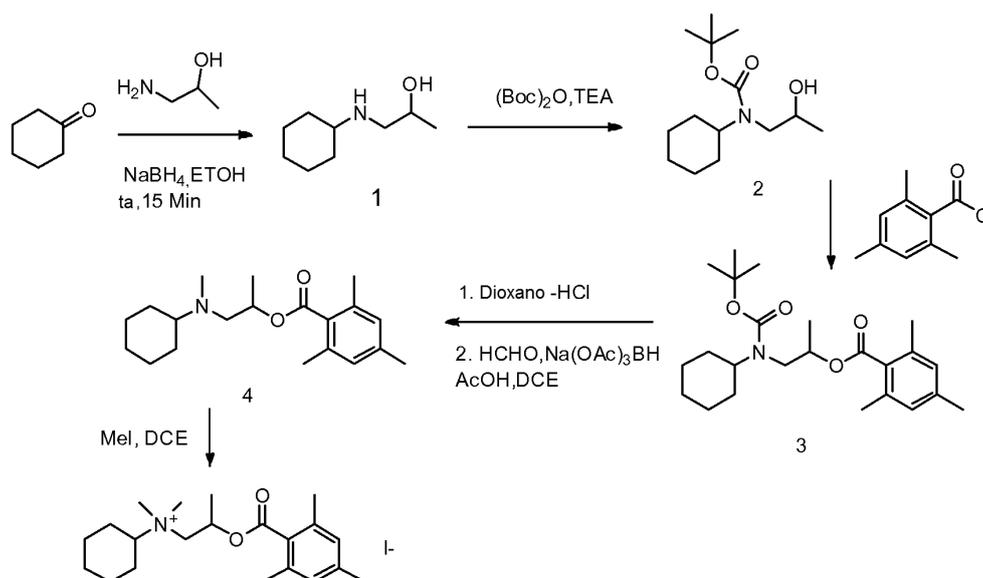
El análisis por HPLC se realizó utilizando el Shimadzu® LC-2010, el Agilent® serie 1200 y los instrumentos Waters® Alliance® HT. El columnas incluyeron (i) la columna Zorbax® SB C18 (50 x 4,6°mm) de 1,8 µ, (ii) la columna Atlantis® dC18 (150 x 4,6°mm) de 5 µ, (iii) la columna Gemini® NX C18, (50 x 4,6°mm) de 3 µm, (iv) la columna XBridge® C18 (50 x 4,6°mm) 3 µ, (v) la columna XBridge® C18 (50 x 4,6°mm) de 5 µ y (iv) la columna XTerra® C18 (250 x 4,6°mm) de 5 µ, (v) la columna Gemini® C18, (50 x 4,6°mm) de 5 µ, (vi) la columna Zorbax® SB-C18 (4,6 x 50°mm) de 5 µ. Las fases móviles incluyeron las siguientes y los gradientes de fase móvil se cambiaron desde el 90 % de A al 10 % al 90 %. El caudal fue de 1 ml/min.

- 20 A. TFA al 0,05 % en agua, HCOOH al 0,05 % en agua, ácido acético al 0,05 % en agua, acetato de amonio 10°mM en agua (tampón ácido o básico) y
 B. acetonitrilo o metanol (fase orgánica).

El análisis por UPLC se realizó usando Agilent serie 1100 e instrumentos de la serie 1200. Las columnas utilizadas fueron (i) Zorbax® SB C18 (50 x 4,6°mm, 1,8 µ) y (ii) Zorbax® XDB C18 (50 x 4,6°mm, 1,8 µ) operando a temperatura ambiente. La fase móvil incluyó las siguientes y los gradientes de fase móvil se cambiaron desde el 95 % de A al 5 % al 95 %. El caudal varió de 0,8 a 1 ml/min.

- 25 A. TFA al 0,05 % en agua, HCOOH al 0,05 % en agua
 B. acetonitrilo

30 **Ejemplo 1: Procedimiento general A - Preparación de yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio**



I: 1-(Ciclohexilamino)propan-2-ol

A una solución de 1-amino-2-propanol (15 g, 0,199 mol) en etanol (300 ml) se le añadió ciclohexanona (31,4 ml, 299 mol). La mezcla de reacción se agitó a 0-10 °C durante 10 minutos. Se añadió borohidruro de sodio (10,8 g, 0,285 mol) a 0 °C, después se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción resultante se inactivó con agua, se filtró a través del reactivo Celite® y se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en HCl 2 N se lavó con acetato de etilo; el pH de la capa acuosa se ajustó a 8 usando una solución saturada de bicarbonato de sodio. El compuesto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se

concentró a sequedad y el material en bruto se sometió a cromatografía en columna para obtener 1-(ciclohexilamino)propan-2-ol. Rendimiento: 22 g (70,1 %); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,25 (s ancho, 1 H), 5,25 (s ancho, 1 H), 3,95-3,91 (m, 1 H), 2,89-2,88 (dd, *J* = 6,9 Hz, 2 H), 2,71-2,66 (m, 1 H), 2,00-1,99 (m, 2 H), 1,75-1,72 (m, 2 H), 1,60-1,57 (m, 1 H), 1,36-0,93 (m, 8 H).

5 II: Ciclohexil(2-hidroxiopropil)carbamato de *tert*-butilo (2)

A una solución de 1-(ciclohexilamino)propan-2-ol (15 g, 95,5^ommol) en THF (300 ml) se le añadió TEA (19,9 ml, 143,2^ommol) a 0 °C. Después, se añadió Boc-anhídrido (22,8 g, 104.46^ommol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El compuesto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 10-15 %/hexano) para obtener Ciclohexil(2-hidroxiopropil)carbamato de *tert*-butilo. Rendimiento: 16 g (65 %); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,41-4,25 (s ancho, 1 H), 3,81-3,96 (m, 1 H), 3,71-3,59 (m, 1 H), 3,11-3,34 (m, 1 H), 2,99-3,02 (m, 1 H), 1,79-1,76 (m, 3 H), 1,68-1,64 (m, 1 H), 1,60 (m, 1H), 1,46-1,45 (s, 9 H), 1,37-1,26 (m, 4 H), 1,14-1,12 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,07-1,03 (m, 1H).

15 III: 2,4,6-Trimetilbenzoato de 1-((*tert*-butoxicarbonil)(ciclohexil)amino)propan-2-ilo (3)

A una solución de Ciclohexil(2-hidroxiopropil)carbamato de *tert*-butilo (1 g, 3,89^ommol) en tolueno seco (10 ml), se le añadió cloruro de 2,4,6-trimetil-benzoilo (0,510 ml, 4,280^ommol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad para obtener 2,4,6-Trimetilbenzoato de 1-((*tert*-butoxicarbonil)(ciclohexil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 1 g (64,10 %); CLEM: m/z = 404,4 [M+H], TR = 2,76 min, (columna: Y, Programa: P1)

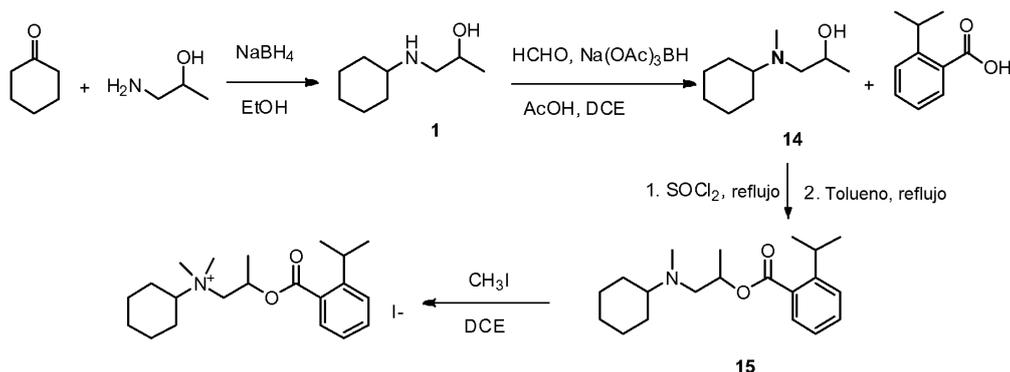
IV: 2,4,6-Trimetilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (4)

Se disolvió Trimetilbenzoato de 1-((*tert*-butoxicarbonil)(ciclohexil)amino)propan-2-ilo (1,0 g, 2,48^ommol) en dioxano-HCl (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 horas. El disolvente se evaporó. El sólido en bruto se disolvió en DCE (10 ml) y formaldehído (0,34 ml, 3,96^ommol) y se añadieron triacetoxiborohidruro de sodio (1,67 g, 7,92^ommol) y ácido acético (0,5 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó en DCM y se lavó con NaOH 1 N, agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El compuesto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 2,4,6-Trimetilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 0,6 (76 %); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,82 (s, 2 H), 5,27-5,25 (m, 1 H), 2,64-2,62 (m, 1 H), 2,51-2,46 (m, 1H), 2,29 (s, 9 H), 2,25 (s, 3 H), 1,75-1,74 (m, 4 H), 1,33-1,31 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,18-1,13 (m, 4 H), 1,09-1,03 (m, 1H); CLEM: m/z = 317,8 [M+H], TR = 2,98 min (Columna: X, Programa: P1)

V: Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio

A una solución de 2,4,6-Trimetilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (0,30 g, 0,946^ommol) en DCE (5 ml), se le añadió yoduro de metilo (0,12 ml, 1,892^ommol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se concentró a sequedad. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna para obtener Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio. Rendimiento: 109 g (25 %) RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,86 (s, 2 H), 5,70-5,67 (m, 1 H), 4,52-4,48 (d, *J* = 14 Hz, 1 H), 3,83-3,77 (m, 1 H), 3,70-3,64 (m, 1 H), 3,34 (s, 3 H), 3,28 (s, 3 H), 2,29-2,01 (m, 10 H), 2,01-1,98 (m, 1 H), 1,84 (m, 1 H), 1,64-1,62 (d, *J* = 6 Hz, 4 H), 1,47-1,38 (m, 4 H), 1,13-1,08 (m, 2 H). CLEM: m/z = 332,2 [M⁺], TR = 3,01 min (Columna: Y, Programa: P1). HPLC: 99,53 % (200 nm), TR 4,11 min (fase móvil: A: ACN, B: TFA al 0,05 % en agua, Columna: Zorbax® SB C18 (50 * 4,6^omm) 1,8 μ.

Ejemplo 2: Procedimiento general B - Preparación de yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio



1. 1-(Ciclohexilamino)propan-2-ol (1)

A una solución agitada de 1-amino-2-propanol (1,0 ml, 13,31^ommol) en etanol (15 ml) se le añadió ciclohexanona (1,9 g, 19,9^ommol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 minutos y después se añadió NaBH₄ (0,725 g, 19,17^ommol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 15 minutos y después se inactivó con agua. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite® y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en DCM, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar 1-(ciclohexilamino)propan-2-ol Rendimiento: 2,6 g (en bruto). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 4,39-4,3 (m, 1 H), 3,61-3,57 (m, 1 H), 2,47-2,30 (m, 3 H), 1,78-1,75 (m, 2 H), 1,66-1,63 (m, 2 H), 1,55-1,52 (m, 1 H), 1,23-1,12 (m, 3 H), 1,03-0,89 (m, 5 H). También puede prepararse 1-(ciclohexilamino)propan-2-ol siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1.

II. 1-(Ciclohexil(metil)amino)propan-2-ol (14)

A una solución agitada de 1-(ciclohexilamino)propan-2-ol (2,6 g en bruto) en DCE (30 ml) se le añadieron sucesivamente HCHO (al 35 % en agua, 2,1 ml, 24,8^ommol), Na(OAc)₃BH (10,5 g, 49,6^ommol) y ácido acético (1 ml) en condiciones de enfriamiento con hielo. La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se basificó con NaOH 1 N. La fase orgánica se separó, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (malla 230-400) eluyendo con MeOH al 5 %/DCM para proporcionar 1-(Ciclohexil(metil)amino)propan-2-ol. Rendimiento: 1,0 g. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 4,11 (s ancho, 1 H), 3,65-3,57 (m, 1 H), 2,35-2,20 (m, 3 H), 2,19 (s, 3 H), 1,72-1,68 (m, 4 H), 1,57-1,54 (m, 1 H), 1,24-1,05 (m, 5 H), 1,01 (d, *J* = 6 Hz, 3 H).

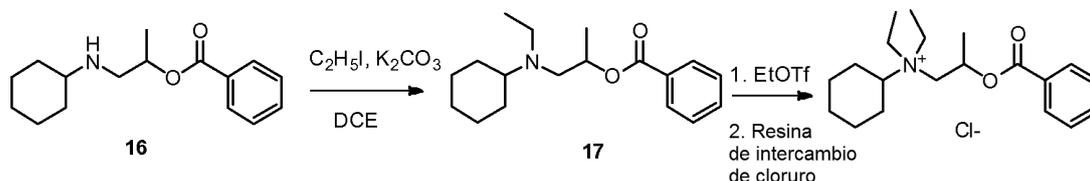
III. 2-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (15)

Se añadió cloruro de tionilo (0,8 ml, 10,52^ommol) a ácido 2-isopropilbenzoico (0,864 g, 5,26^ommol) a 0 °C y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el cloruro de ácido. A una solución agitada del cloruro de ácido en tolueno seco (15 ml) se le añadió una solución de 1-(Ciclohexil(metil)amino)propan-2-ol (0,75 g, 4,38^ommol) en tolueno seco (10 ml) a 0 °C y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado, agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía Combiflash® eluyendo con acetato de etilo al 9-11 %/hexano, para proporcionar 2-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 0,88 g (63,38 %). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 7,56 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 7,51-7,44 (m, 2 H), 7,26 (t, *J* = 7 Hz, 1 H), 5,15-5,12 (m, 1 H), 3,61-3,54 (m, 1 H), 2,67-2,59 (m, 1 H), 2,33-2,31 (m, 1 H), 2,23 (s, 3 H), 1,71-1,67 (m, 4 H), 1,57-1,54 (m, 1 H), 1,25 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,21-1,05 (m, 11 H). CLEM: *m/z* = 318,4 [M+H], TR = 2,51 min (Columna: Y, Programa: P1)

IV: Yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio

A una solución agitada de 2-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (0,45 g, 1,41^ommol) en DCE (3 ml) se le añadió yoduro de metilo (0,35 ml, 5,67^ommol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas en un tubo sellado. La mezcla de reacción se concentró y el material en bruto se purificó mediante cromatografía Combiflash®, eluyendo con CH₃OH al 3-4 %/DCM para proporcionar un sólido que se cristalizó en metanol-éter para proporcionar Yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio de color blanco. Rendimiento: 0,415 g (64 %). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 7,71 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 7,58-7,50 (m, 2 H), 7,31 (t, *J* = 7 Hz, 1 H), 5,57-5,54 (m, 1 H), 3,93-3,87 (m, 1 H), 3,67-3,57 (m, 2 H), 3,38-3,34 (m, 1 H), 3,05 (s, 3 H), 3,02 (s, 3 H), 2,17-2,08 (m, 2 H), 1,87-1,84 (m, 1 H), 1,75-1,72 (m, 1 H), 1,54-1,42 (m, 3H), 1,40 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,24-1,19 (m, 7 H), 1,13-0,99 (m, 2 H). CLEM: *m/z* = 332,0 [M⁺], TR = 3,01 min, (columna: Y, Programa: P1). UPLC: 98,43 % (200 nm), TR = 3,60 min (fase móvil A. TFA al 0,05 % en agua, B. acetonitrilo; Columna: Zorbax® SB-C18 (4,6 x 50^omm) 1,8 μ)

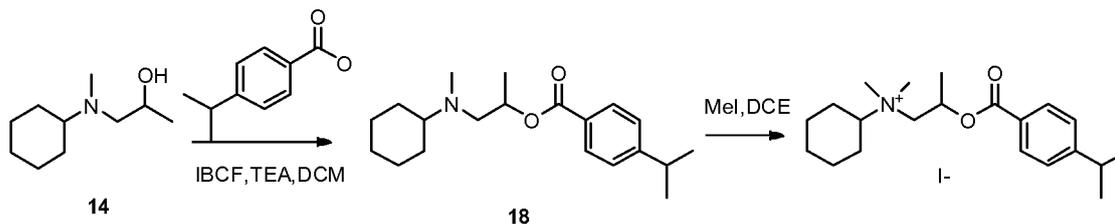
45

Ejemplo 3: Procedimiento general C - Preparación de cloruro de N-[2-(benzoiloxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio**I. Benzoato de 1-(ciclohexil (etil)amino)propan-2-ilo (17)**

5 A una solución agitada de éster 2-ciclohexilamino-1-metil-etílico del ácido benzoico (1,0 g, 3,8°mmol) en DCE (20 ml) se le añadieron sucesivamente K_2CO_3 (2,11 g, 15,2°mmol) y yoduro de etilo (1,8 ml, 22°mmol). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 16 horas en un tubo sellado. Se añadió de nuevo yoduro de etilo (1,8 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante otras 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con metanol al 5 %-DCM. El filtrado se concentró y el material en bruto se purificó mediante cromatografía Combiflash® eluyendo con metanol al 6-7 %/DCM para proporcionar Benzoato de 1-(ciclohexil (etil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 1,04 g (94,70 %) RMN 1H (DMSO- d_6) δ 7,95 (d, J = 7 Hz, 2 H), 7,64 (t, J = 7 Hz, 1 H), 7,52 (t, J = 8 Hz, 2 H), 5,08-5,04 (m, 1 H), 2,68-2,62 (m, 1 H), 2,55-2,40 (m, 4 H), 1,70-1,53 (m, 5 H), 1,26 (d, J = 6 Hz, 3 H), 1,19-1,07 (m, 5 H), 0,93 (t, J = 7 Hz, 3 H). CLEM: m/z = 290,4 [$M+H$], TR = 3,93 min, (Columna: Y, Programa: P1)

II. Cloruro de N-[2-(benzoiloxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio

15 A una solución agitada de Benzoato de 1-(ciclohexil (etil)amino)propan-2-ilo (0,427 g, 1,47°mmol) en DCM seco (20 ml) se le añadió triflato de etilo (0,25 ml, 1,92°mmol) gota a gota en condiciones de enfriamiento con hielo. La mezcla resultante se agitó a ta durante 16 horas en un tubo sellado. La mezcla de reacción se concentró y el material en bruto se purificó mediante cromatografía Combiflash eluyendo con metanol al 3-4 %/DCM para proporcionar un líquido pegajoso. Se añadió resina Amberlite IRA-400 (Cl) en forma de cloruro (3,0 g) a una solución del compuesto líquido en metanol (15 ml) y se agitaron durante 6 horas. Después, la solución se filtró, se concentró y se liofilizó para proporcionar un sólido. Debido a que el espectro de RMN de flúor mostró un intercambio de contraiones incompleto, el sólido se trató de nuevo con resina Amberlite IRA-400 (Cl) en forma de cloruro en agua y se filtró. El filtrado se concentró y el material en bruto se liofilizó para proporcionar Cloruro de N-[2-(benzoiloxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio en forma de un sólido de color blanquecino. Rendimiento: 0,05 g (9,62 %) RMN 1H (DMSO- d_6) δ 7,98 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7,68 (t, J = 7 Hz, 1 H), 7,54 (t, J = 8 Hz, 2 H), 5,52-5,49 (m, 1 H), 3,95-3,89 (m, 1 H), 3,55 (d, J = 15 Hz, 1 H), 3,44-3,35 (m, 5 H), 2,19-2,17 (m, 1 H), 2,09-2,06 (m, 1 H), 1,80-1,78 (m, 2 H), 1,54-1,51 (m, 3 H), 1,36 (d, J = 6 Hz, 3 H), 1,25-1,07 (m, 9 H). CLEM: m/z = 318,0 [M^+], TR = 2,88 min, (columna: Y, Programa: P1). UPLC: 98,70 % (200 nm), TR = 3,59 min, (fase móvil A. TFA al 0,05 % en agua, B. acetonitrilo; Columna: Zorbax® SB-C18 (4,6 x 50°mm) de 1,8 μ)

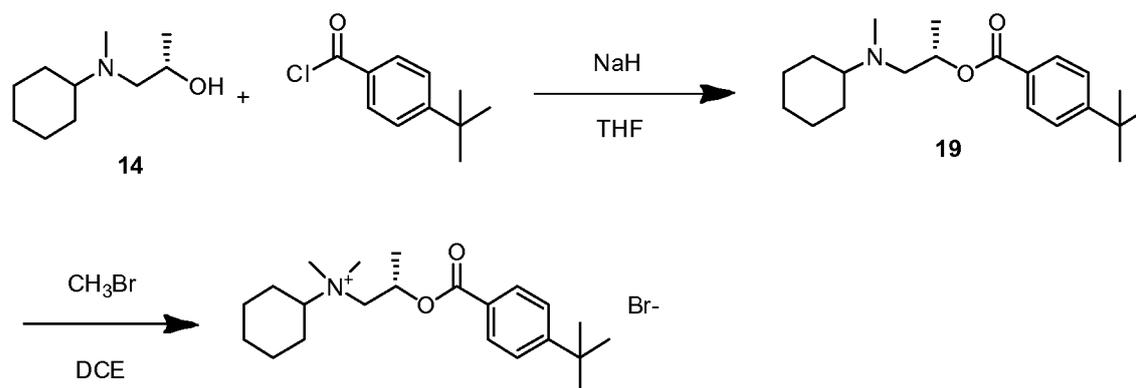
Ejemplo 4: Procedimiento general D - Preparación de yoduro de N-[2-((4-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio**I. 4-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (18)**

35 A una solución de ácido 4-isopropil-benzoico (1 g, 6,09°mmol) en DCM (10 ml) se le añadió cloroformato de isobutilo (0,7 ml, 7,31°mmol) a de -20 a -30 °C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos para proporcionar una solución del anhídrido mixto. En otro matraz de fondo redondo, se disolvió 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ol (1,04 g, 6,09°mmol) en DCM (15 ml) y se añadió TEA (2,1 ml, 15,24°mmol). A esta mezcla de reacción, se le añadió la solución de anhídrido mixto resultante a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a la misma temperatura durante 45 minutos. La mezcla de reacción se extrajo con DCM y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El sólido en bruto se purificó usando cromatografía en columna para obtener 4-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 0,6 g (32,4 %)H. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,95-7,93 (d, J = 8 Hz, 2 H), 7,27-7,25 (d, J = 8 Hz, 2 H), 5,20-5,18 (m, 1 H), 2,96-2,92 (m, 1 H), 2,72-2,67 (m, 1 H), 2,53-2,48 (m, 1 H), 2,33-2,28 (m, 4 H), 1,76-1,74 (s ancho, 4 H), 1,32-1,30 (d, J = 6 Hz, 3 H), 1,25 (s ancho, 6 H), 1,24-1,18 (m, 5 H).

45

II. Yoduro de N-[2-((4-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio

A una solución de 4-Isopropilbenzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (0,5 g, 1,57^ommol) en DCE (5 ml, se le añadió yoduro de metilo (0,2 ml, 3,15^ommol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna. El producto aislado se recristalizó en metanol/éter. Rendimiento: 134,9 mg (18,65 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,94-7,92 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7,43-7,41 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 5,54-5,50 (m, 1 H), 3,95-3,89 (m, 1 H), 3,61-3,58 (d, *J* = 14 Hz, 1 H), 3,40-3,34 (m, 1 H), 3,03-2,95 (m, 7 H), 2,22-2,20 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 2,10-2,07 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 1,86-1,83 (m, 2 H), 1,57-1,43 (m, 3 H), 1,36-1,35 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,16-1,11 (m, 9 H). CLEM: *m/z* = 331,8 [M⁺], TR = 3,08 min (Columna: Y, Programa: P1). UPLC: 99,65 % (200 nm), TR 3,09 min (fase móvil: A. ACN, B. HCOOH al 0,05 % en agua, Columna: Gemini® NX C18 (50 * 4,6^omm) de 3 μ.

Ejemplo 5 - Procedimiento general E - Preparación de bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminioI. 4-(*tert*-butil)Benzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (19)

A una solución agitada de (S)-1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ol (38,0 g, 222,22^ommol) en THF seco (700 ml) se le añadió NaH (al 60 % en aceite, 9,77 g, 244,22^ommol) a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, se añadió cloruro de 4-*tert*-butilbenzoilo (52,1 ml, 266,67^ommol) 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 4 h. La mezcla de reacción se inactivó con solución saturada de NH₄Cl y se diluyó con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía sobre alúmina neutra eluyendo con acetato de etilo al 4-10 %-hexano para proporcionar el compuesto pegajoso 4-(*tert*-butil)Benzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo. Rendimiento: 26,0 g (35,7 %). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 7,86 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7,52 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 5,12-5,07 (m, 1 H), 2,66-2,61 (m, 1 H), 2,46 (d, *J* = 5 Hz, 1 H), 2,31-2,28 (m, 1 H), 2,24 (s, 3 H), 1,68-1,65 (m, 4 H), 1,55-1,53 (m, 1 H), 1,29 (s, 9 H), 1,25 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,18-1,02 (m, 5 H); CLEM: *m/z* = 332,2 [M+H], TR = 2,85 min, (columna: Y, Programa: P1)

II. Bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio

A una solución agitada de 4-(*tert*-butil)Benzoato de 1-(ciclohexil(metil)amino)propan-2-ilo (22,5 g, 67,98^ommol) en DCE (150 ml) se le añadió bromuro de metilo (solución al 25 % en tolueno, 103 ml, 271,90^ommol) y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 16 h. El análisis por CCF mostró muy pequeña cantidad de material de partida sin reaccionar. Por tanto se añadieron otros 0,5 eq de bromuro de metilo y se agitaron a ta durante 8 h. La mezcla de reacción se concentró y el material en bruto se purificó mediante cromatografía e alúmina neutra eluyendo con metanol al 2-8 %-DCM para proporcionar un sólido de color blanquecino. El material sólido se cristalizó en DCM-éter para proporcionar Bromuro de (S)-N-[2-((4-(*tert*-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio. Rendimiento: 15,5 g (53,5 %). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 7,94 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 7,57 (d, *J* = 8 Hz, 2 H), 5,54-5,51 (m, 1 H), 3,93 (dd, *J* = 15, 9 Hz, 1 H), 3,63 (d, *J* = 14 Hz, 1 H), 3,42-3,36 (m, 1 H), 3,05 (s, 6 H), 2,23-2,20 (m, 1 H), 2,11-2,08 (m, 1 H), 1,87-1,83 (m, 2 H), 1,57-1,43 (m, 3 H), 1,36 (d, *J* = 6 Hz, 3 H), 1,30 (s, 9 H), 1,23-1,08 (m, 3 H); CLEM: *m/z* = 346,4 [M⁺], TR = 3,00 min, (columna: Y, Programa: P1). UPLC: 99,90 % (200 nm), TR = 4,04 min (fase móvil A. TFA al 0,05 % en agua, B. acetonitrilo; Columna: Zorbax® SB-C18 (4,6 x 50^omm) de 1,8 μ.

Los compuestos de los Ejemplos 6 a 48 se prepararon usando los esquemas anteriores y los procedimientos de síntesis descritos en los Ejemplos 1-5. Los procedimientos generales específicos seguidos para cada uno de Ejemplos 6 a 48 se indican en la siguiente tabla, junto con el espectro de masas y los datos cromatográficos respectivos.

Tabla 2

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
1		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoi)oxi)propil]ciclohexanaminio	332,2	3,01 (P1, Y)	A
2		Yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	332	3,01 (P1, Y)	B
3		Cloruro de N-[2-(benzoi)oxi]propil]-N,N-dietilciclohexanaminio	318	2,88 (P1, Y)	c
4		Yoduro de N-[2-((4-isopropilbenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	331,8	3,08 (P1, Y)	D
5		Bromuro de (S)-N-[2-((4-(tert-butil)benzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346,4	3,00 (P1, Y)	E
6		Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318,2	2,38 (R1, X)	A

(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
7		Yoduro de N-[2-((2,6-dimetoxibenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	350,2	2,69 (P1, Y)	A
8		Yoduro de N-[2-((2-fluorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	308,0	2,68 (P1, W)	A
9		Yoduro de N-[2-((2-clorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	323,8	2,93 (P1, Y)	A
10		Yoduro de N-[2-((2,4-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	357,8	3,07 (P1, Y)	A
11		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-metilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio	304,0	2,88 (P1, Y)	A
12		Yoduro de N-[2-((4-(tert-Butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346	3,09 (P1, X)	B

(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
13		Yoduro de N-[2-((4-clorobenzoyl)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	324,0	2,86 (P1, Y)	B
14		Yoduro de N-[2-((3-fluorobenzoyl)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	308,2	2,77 (P1, Y)	B
15		Yoduro de N-[2-((4-fluoro-2-(trifluorometil)benzoyl)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	375,8	2,90 (P1, Y)	B
16		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-(trifluorometil)benzoyl)oxi)propil]ciclohexanaminio	358,3	2,99 (P1, Y)	B
17		Yoduro de N-[2-((2-(trifluorometil)benzoyl)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	358,0	2,90 (P1, Y)	B
18		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-nitrobenzoyl)oxi)propil]ciclohexanaminio	335,3	2,79 (P1, Y)	B
19		Yoduro de N-[2-((3,5-diclorobenzoyl)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	358,1	3,14 (P1, Y)	B

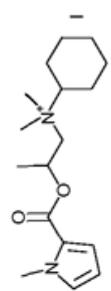
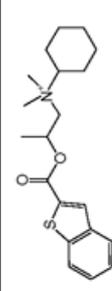
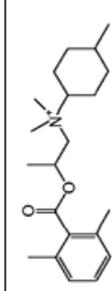
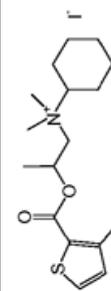
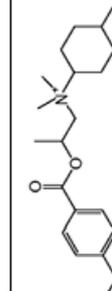
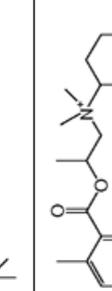
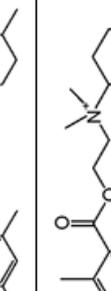
(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
20		Yoduro de N-[2-(4-etilbenzoyloxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318	2,94 (P1, Y)	B
21		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-(trifluorometil)benzoyloxi)propil]ciclohexanaminio	358,4	2,91 (P1, Y)	B
22		Yoduro de (S)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoyloxi)propil]ciclohexanaminio	332	2,96 (P1, Y)	A
23		Yoduro de (S)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoyloxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318	2,85 (P1, Y)	A
24		Yoduro de (R)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoyloxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318,2	2,83 (P1, Y)	A
25		Yoduro de (R)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoyloxi)propil]ciclohexanaminio	332,2	2,96 (P1, Y)	A
26		Yoduro de N-[2-(3-isopropilbenzoyloxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	332,2	3,03 (P1, Y)	B

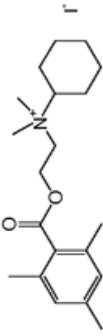
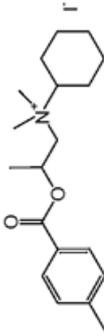
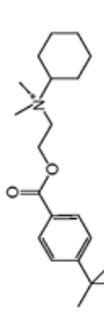
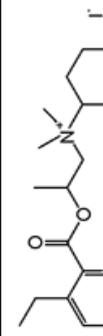
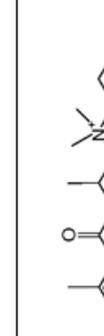
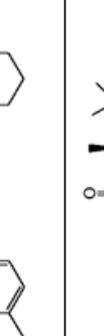
(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
27		Yoduro de N-[2-((2,6-diclorobenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanamio	334,2	2,65 (P1, Y)	A
28		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoi)oxi)propil]tetrahidro-2H-piran-4-amio	357,8	2,82 (P1, Y)	A
29		Yoduro de N-[2-((2,3-diclorobenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanamio	357,8	2,93 (P1, Y)	B
30		Yoduro de N-[2-((ciclohexanocarboni)oxi)propil]-N,N-dietilciclohexanamio	296,0	2,97 (P1, Y)	B
31		Yoduro de N-[2-((3-clorobenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanamio	380,0	3,11 (P1, Y)	B
32		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofeno-2-carboni)oxi)propil]ciclohexanamio	296,2	2,60 (P1, Y)	B
33		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofeno-3-carboni)oxi)propil]ciclohexanamio	296,2	2,52 (P1, Y)	B

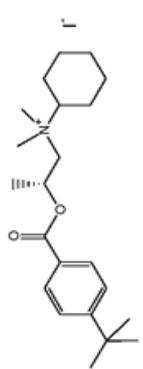
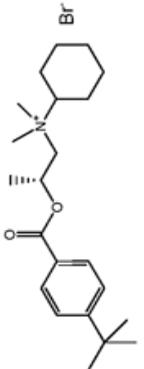
(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
34		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((1-metil-1H-pirrol-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio	293,2	2,77 (P1, Y)	B
35		Yoduro de N-[2-((benzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346,0	2,89 (P1, Y)	B
36		Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio	332,3	3,02 (P1, Y)	B
37		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-metiltiofeno-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio	310,0	2,78 (P1, X)	B
38		Yoduro de N-[2-((4-(tert-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio	360,4	3,17 (P1, Y)	B
39		Yoduro de N,N,4-trimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio	346,2	2,98 (P1, Y)	B
40		Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	304,2	2,80 (P1, Y)	B

(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
41		Yoduro de N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoi)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318,2	2,89 (P1, Y)	B
42		Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-metilbenzoi)oxi)propil]ciclohexanaminio	304,2	2,82 (P1, Y)	B
43		Yoduro de N-[2-((4-(tert-butil)benzoi)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	332,4	3,04 (P1, Y)	B
44		Yoduro de N-[2-((2-etilbenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318,2	3,05 (P1, Y)	B
45		Yoduro de N-[2-((2,4-dimetilbenzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	318,0	3,03 (P1, Y)	B
46		Yoduro de (S)-N-[2-((4-(tert-butil)benzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346,0	2,82 (P1, W)	B

(continuación)

Ej	Estructura	Nombre del compuesto	M+	Tiempo de retención en CL, min (Programa, Columna)	Procedimiento de síntesis general
47		Yoduro de (R)-N-[2-((4-(<i>tert</i> -butil)benzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346,0	3,12 (P1, Y)	B
48		Bromuro de (R)-N-[2-((4-(<i>tert</i> -butil)benzoi)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio	346,0	3,11 (P1, Y)	E

Ejemplo 49: Células que expresan hTRPV1 y ensayos *in vitro*

Se desarrollaron ensayos *in vitro* para la evaluación de la inhibición de la respuesta de los canales de sodio con los compuestos después de la estimulación por calor (47 °C) en células que expresaban hTRPV1.

A. Generación de células que expresan hTRPV1

5 Las siguientes células se desarrollaron como un cribado preliminar para ayudar a seleccionar el compuesto que progresaría a una evaluación adicional en un ensayo *in vivo*.

(i) *Plásmido para la entrega de hTRPV1 a las células*

10 Con el fin de preparar la estirpe celular, el marco de lectura abierto que codificaba hTRPV1 se amplificó mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc basada en la estirpe celular de neuroblastoma humano IMR322 [NCBI dbEST ID: 18353] utilizando los siguientes cebadores:

(a) TRPV1_KpnIF (Cebador Directo) [SEQ ID NO:2]

5'-

ATAAACGGTACCGCCGCCACCATGAAGAAATGGAGCAGCAC-3'

(b) TRPV1_PmeIR (Cebador Inverso) [SEQ ID NO:3] 5' ATCGGTTTAAACTCACTTCTCTCCGGAAGCGGC-3

15 El cebador directo contiene un sitio *KpnI* [GGTACC (subrayado en (a) anteriormente)] y una secuencia Kozak [GCCGCCACC (doble subrayado en (a))]. El cebador inverso contiene un sitio *PmeI* [GTTTAAAC, subrayado en (b)].

El marco de lectura abierto de hTRPV1 (correspondiente a NCBI NM_080706.3) es: SEQ ID NO:4:

ATGAAGAAATGGAGCAGCACAGACTTGGGGGCAGCTGCGGACCCACTCCAAAAGGACACC
 TGCCCAGACCCCCCTGGATGGAGACCCTAACTCCAGGCCACCTCCAGCCAAGCCCCAGCTC
 TCCACGGCCAAGAGCCGCACCCGGCTCTTTGGGAAGGGTGACTCGGAGGAGGCTTTCCCG
 GTGGATTGCCCTCACGAGGAAGGTGAGCTGGACTCCTGCCCGACCATCACAGTCAGCCCT
 GTTATCACCATCCAGAGGCCAGGAGACGGCCCCACGGTGCCAGGCTGCTGTCCAGGAC
 TCTGTGCGCGCCAGCACCGAGAAGACCCTCAGGCTCTATGATCGCAGGAGTATCTTTGAA
 GCCGTTGCTCAGAATAACTGCCAGGATCTGGAGAGCCTGCTGCTCTTCCTGCAGAAGAGC
 AAGAAGCACCTCACAGACAACGAGTTCAAAGACCCTGAGACAGGGAAGACCTGTCTGCTG
 AAAGCCATGCTCAACCTGCACGACGGACAGAACACCACCATCCCCCTGCTCCTGGAGATC
 GCGCGGCAAACGGACAGCCTGAAGGAGCTTGTCAACGCCAGCTACACGGACAGCTACTAC
 AAGGGCCAGACAGCACTGCACATCGCCATCGAGAGACGCAACATGGCCCTGGTGACCCTC
 CTGGTGGAGAACGGAGCAGACGTCCAGGCTGCGGCCCATGGGGACTTCTTTAAGAAAACC
 AAAGGGCGGCCTGGATTCTACTTCGGTGAAGTGCCTGCCCCCTGTCCCTGGCCGCGTGCACCAAC
 CAGCTGGGCATCGTGAAGTTCCTGCTGCAGAACTCCTGGCAGACGGCCGACATCAGCGCC
 AGGGACTCGGTGGGCAACACGGTGTGCACGCCCTGGTGGAGGTGGCCGACAACACGGCC
 GACAACACGAAGTTTGTGACGAGCATGTACAATGAGATTCTG**ATC**CTGGGGGCCAAACTG
 CACCCGACGCTGAAGCTGGAGGAGCTCACCAACAAGAAGGGAATGACGCCGCTGGCTCTG
 GCAGCTGGGACCGGGAAGATCGGGGTCTTGGCCATATTTCTCCAGCGGGAGATCCAGGAG
 CCCGAGTGCAGGCACCTGTCCAGGAAGTTCACCGAGTGGCCCTACGGGCCCGTGCCTCC
 TCGCTGTACGACCTGTCTGCATCGACACCTGCGAGAAGAACTCGGTGCTGGAGGTGATC
 GCCTACAGCAGCAGCGAGACCCCTAATCGCCACGACATGCTCTTGGTGGAGCCGCTGAAC

CGACTCCTGCAGGACAAGTGGGACAGATTTCGTCAAGCGCATCTTCTACTTCAACTTCCTG
 GTCTACTGCCTGTACATGATCATCTTACCATGGCTGCCTACTACAGGCCCGTGGATGGC
 TTGCCTCCCTTTAAGATGGAAAAACTGGAGACTATTTCCGAGTTACTGGAGAGATCCTG
 TCTGTGTTAGGAGGAGTCTACTTCTTTTTCCGAGGGATTAGTATTTCTGCAGAGGCGG
 CCGTCGATGAAGACCCTGTTTGTGGACAGCTACAGTGAGATGCTTTTCTTCTGCAGTCA
 CTGTTTCATGCTGGCCACCGTGGTGTGTACTTACGCCACCTCAAGGAGTATGTGGCTTCC
 ATGGTATTCTCCCTGGCCTTGGGCTGGACCAACATGCTCTACTACACCCGCGGTTTTCCAG
 CAGATGGGCATCTATGCCGTCATGATAGAGAAGATGATCCTGAGAGACCTGTGCCGTTTC
 ATGTTTGTCTACATCGTCTTCTTGTTCGGGTTTTCCACAGCGGTGGTGACGCTGATTGAA
 GACGGGAAGAATGACTCCCTGCCGTCTGAGTCCACGTCGCACAGGTGGCGGGGGCCTGCC
 TGCAGGCCCCCGATAGCTCCTACAACAGCCTGTACTCCACCTGCCTGGAGCTGTTCAAG
 TTCACCATCGGCATGGGCGACCTGGAGTTCACTGAGAACTATGACTTCAAGGCTGTCTTC
 ATCATCCTGCTGCTGGCCTATGTAATTCTCACCTACATCCTCCTGCTCAACATGCTCATC
 GCCCTCATGGGTGAGACTGTCAACAAGATCGCACAGGAGAGCAAGAACATCTGGAAGCTG
 CAGAGAGCCATCACCATCCTGGACACGGAGAAGAGCTTCCTTAAGTGCATGAGGAAGGCC
 TTCCGCTCAGGCAAGCTGCTGCAGGTGGGGTACACACCTGATGGCAAGGACGACTACCGG
 TGGTGTCTCAGGGTGGACGAGGTGAACTGGACCACCTGGAACACCAACGTGGGCATCATC
 AACGAAGACCCGGGCAACTGTGAGGGCGTCAAGCGCACCCCTGAGCTTCTCCCTGCGGTCA
 AGCAGAGTTTCAGGCAGACACTGGAAGAAGTTTGCCTGGTCCCCCTTTTAAGAGAGGCA
 AGTGCTCGAGATAGGCAGTCTGCTCAGCCGAGGAAGTTTATCTGCGACAGTTTTTCAGGG
 TCTCTGAAGCCAGAGGACGCTGAGGTCTTCAAGAGTCCTGCCGCTTCC**GGAGAGAAGTGA**

ATG: Codón de inicio del gen (inicio del ORF)

TGA: Codón de terminación del gen (final del ORF)

GGG→GGA: bamboleo hecho en el cebador inverso (Glicina a Glicina)

5 ATG→ATC: polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) notificado en GENECARD, Met-> Ile, SNP ID: rs222747.

10 Se creó un vector de expresión híbrido a partir de dos vectores disponibles en el mercado, de la siguiente manera. Se digirió el vector pTK-Hygro (Clonetech n.º del catálogo 631750) con HindIII y Aval para liberar el casete de higromicina que contenía el promotor TK, el gen de higromicina y la señal de HSV-TK poliA. Este casete de higromicina se clonó en pcDNA4myc-HisB (Invitrogen n.º del catálogo V863-20) usando el sitio Avril. La secuencia que codificaba hTRPV1 se insertó en el vector pcDNA Hygro resultante en los sitios KpnI (5') y PmeI (3') y por tanto quedó flanqueado aguas arriba por el promotor de citomegalovirus y aguas abajo por señal de poli adenilación de la hormona de crecimiento bovina. La inserción correcta de todo el ORF en el ADN vector de expresión recombinante (de ahora en adelante mencionado como el ADN) se confirmó mediante análisis de secuencia. La estructura principal del plásmido completa contenía un punto de origen pUC (ori), un gen de resistencia a la ampicilina, el promotor pCMV, un sitio de clonación múltiple que contenía los sitios *KpnI* y *PmeI*, un promotor EM-7 de *E. coli*, y un gen de resistencia a la higromicina, además del ORF hTRPV1 ORF.

(ii) *Desarrollo de N1E115 recombinante que expresa hTRPV1*

Se usaron los siguientes materiales para el procedimiento:

20 Lipofectamina 2000 (Invitrogen, n.º del catálogo 11668-019), polietilenimina (Aldrich, n.º del catálogo J40872), Higromicina-B (Invitrogen, n.º del catálogo 10687-010). El kit ultra puro preparó ADN súper enrollado mientras que la transfección se realizó en DMEM sin suero y sin antibiótico.

25 Para el pase de células, las células N1E115 [American Type Culture Collection, Manassas, Virginia (EE.UU.), número de referencia CRL2263] se cultivaron en medio de crecimiento que contenía 1 x DMEM (Sigma) + FBS al 10 % (Gibco) + penicilina-estreptomicina al 1 % (Gibco) en matraces de 175°cm² (Nunc). El día de la siembra, el medio agotado de los matraces se aspiró y los matraces se golpearon por los lados con las palmas para desalojar las células del fondo de los matraces. Se añadieron 10 ml de medio de crecimiento para suspender las células y 1 ml

de las células en suspensión se inoculó en un matraz T-175 nuevo que contenía 35 ml de medio de crecimiento.

El protocolo de cultivo de las células en placas para la transfección fue el siguiente: se añadieron $0,2 \times 10^6$ células en 2 ml de medio de crecimiento a cada pocillo de una placa de 6 pocillos con tapas en el interior del flujo de aire laminar. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en una incubadora (Thermo) durante 24 horas.

- 5 En el día de la transfección mediada por Lipofectamina, el ADN y la Lipofectamina se diluyeron en la campana laminar de la siguiente manera: se diluyeron 4 µg de ADN se diluyó en 250 µl de DMEM. A continuación, se diluyeron 10 µg de Lipofectamina en 250 µl de DMEM. Las soluciones se dejaron en reposo a temperatura ambiente (TA) durante 7 minutos, después de lo cual se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante otros 20 minutos. Una vez que se preparó la mezcla de transfección, células cultivadas en placas se lavaron con 500 µl de DMEM. Después del lavado, se añadieron 500 µl de mezcla de Lipofectamina-ADN a los pocillos. En los pocillos de control, se añadió Lipofectamina-DMEM y la placa se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 4,5 horas. Después de la incubación, los medios de las células transfectadas se decantó cuidadosamente sin perturbar a las células. Después, las células se lavaron una vez con 1 ml de DMEM. Se añadió medio de crecimiento (DMEM + FBS al 10 %) a las células después del lavado y se incubaron las células a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas.
- 10
- 15 Veinticuatro horas después de las incubaciones, las células transfectadas se examinaron visualmente para determinar la viabilidad y la adherencia. El medio gastado se retiró de los pocillos y se añadieron 1,2 ml de medio de crecimiento fresco que contenía 300 µg/ml de higromicina por pocillo. Las células se desalojaron pipeteando arriba y abajo. Las células de cada pocillo se dividieron 1:4 y se transfirieron a placas de 6 pocillos nuevas (300 µl de células/pocillo). Se observaron las células transfectadas y las células de control todos los días, el medio gastado se cambió cada dos días inicialmente. Al final de la segunda semana aparecieron colonias transfectadas estables que después se expandieron y se ensayaron funcionalmente en un ensayo de calcio y se realizó un ensayo de sodio de la siguiente manera.
- 20

(iii) Pases celulares y Aislamiento clonal de células

- 25 El protocolo de pase de células descrito anteriormente se siguió para hacer pases de células como anteriormente. Y el aislamiento clonal mediante el procedimiento de dilución limitante se realizó como se describe a continuación.

- Preparación de células de Feeder: se recogieron N1E115 (células de tipo natural) de aspecto saludable. Se trataron 1×10^6 células/ml de células N1E115 con mitomicina C a una concentración de 10 µg/L $\times 10^6$ células durante 20 minutos a 37 °C en una incubadora de CO₂. Después de 20 minutos, las células se lavaron con DMEM 5-6 veces. Las células se transfirieron a continuación a un matraz de 75 cm² que contenía 15 ml de medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C durante 4 horas en una incubadora de CO₂. Después de la incubación las células de Feeder se lavaron con DMEM y las células quedaron listas para la siembra en placas.
- 30

- Preparación de células estables: Se sedimentaron células de hTRPV1-N1E115 de aspecto saludable y se resuspendieron en medio de crecimiento a una concentración que si se sembraran en una placa de 96 pocillos la distribución sería de 0,3 células/pocillo/100 µl de medio. Se añadió antibiótico selectivo higromicina B (300 µg/ml) a las mismas.
- 35

- Las células de Feeder se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1000 células/100 µl/pocillo. No se sembraron células en los pocillos de los bordes. Se añadieron doscientos µl de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) en su lugar. A la capa de células de Feeder, se le añadieron 100 µl de la suspensión celular estable que contenía 0,3 células/pocillo/100 µl. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Las placas se dejaron reposar en una incubadora de CO₂ durante 10 días. Desde el día 10 en adelante, se observaron todas las placas de células con mucho cuidado para detectar colonias individuales (que se presupone que se generaron a partir de una sola célula). Todos y cada uno de los pocillos se comprobó cuidadosamente. Se marcaron los pocillos con únicamente colonia individuales.
- 40

- A los pocillos marcados se les proporcionó un cambio de medio, el medio agotado se desechó y se añadió medio de crecimiento fresco que contenía 300 µg/ml de higromicina B. Los pocillos marcados con colonias individuales se expandieron desde la placa de 96 pocillos a la de 48 pocillos seguida de la placa de 6 pocillos. Finalmente las células se transfirieron a matraces de 25 cm² (5 mL de medios de cultivo + 300 µg/ml de higromicina B). Desde los matraces de cultivo las células se contaron y se sembraron para la exploración funcional en las plataformas de ensayo de sodio y de calcio. El candidato clonal final para el estudio se seleccionó basándose en los datos de ensayo que confirmaron una expresión robusta de hTRPV1 usando una respuesta al calcio provocada por capsaicina en el ensayo de calcio y sin pérdida de la actividad constitutiva de los canales de sodio, a juzgar por una robusta respuesta a la veratridina en el ensayo de potencial de membrana.
- 45
- 50

(iv) Ensayo de calcio para evaluar la función de las células que expresan hTRPV1

- Para el ensayo del calcio, las células se colocaron en placas a 5000 por 50 µl de DMEM + FBS al 10 % + higromicina 300 µg/ml por pocillo en una placa de fondo transparente revestida de poli-D-lisina 384 y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48 horas. El día del ensayo, los medios se descartaron suavemente y se lavaron con tampón Tyrodes™ modificado (20 µl/pocillo)] que después se desechó suavemente. Véase, Tabla 3.
- 55

TABLA 3

Composición de tampón Tyrodes™ modificado para el ensayo de los canales de calcio	
Sal	Concentración (mM)
NaCl	145
KCl	2,5
Sal	Concentración (mM)
CaCl ₂ 2 H ₂ O	5,4
MgCl ₂ 6H ₂ O	1,2
HEPES	10
Glucosa	10 (180 mg/100 ml)
Probenecid	2,943

- El volumen se completó hasta 500 •l con agua Milli-Q.
- El pH se ajustó a 7,4 con KOH.

Se añadió ácido plurónico al colorante Calcio 4 (Molecular Devices) a una concentración de 0,025 % (250 µl de solución madre al 1 % para 10 ml del colorante). A continuación, se añadieron 20 µl de colorante calcio 4 (Molecular Devices) preparado en tampón de Tyrodes modificado [se añadió probenecid (42 mg en 60 µl de NaOH 5N) a 50 ml de tampón Tyrodes modificado antes del ajuste de pH] por pocillo y la placa se incubó a 25 °C durante 30 minutos antes de la adición de capsaicina [la solución madre de capsaicina era 20°mM en DMSO, la solución madre de trabajo 1°mM (en tampón) y la concentración final en la placa de ensayo era 10°µM] se utilizara para el ensayo de calcio siguiendo las instrucciones del fabricante.] Se añadieron veinte µl de capsaicina 2x (20°µM) a las células en el FLIPR™ (Molecular Devices, Inc.) y la lectura se tomó durante 15 minutos.

10 (v) *Potencial de membrana de ensayo para evaluar la función del canal de sodio en células que expresan hTRPV1*

Se sembraron células a 5000 por 50 µl de DMEM + FBS al 10 % + higromicina 300 µg/ml por pocillo en una placa de fondo transparente revestida de poli-D-lisina 384 y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48 horas. El día del ensayo, los medios se descartaron suavemente y se añadieron 30 µl de colorante [se preparó colorante azul FMP en tampón de ensayo] por pocillo y se dejó que la carga del colorante transcurriera durante 20 min a temperatura ambiente. Una placa 'agonista' de adición de fármaco se preparó para el instrumento FLIPR™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante; esta placa contenía tanto veratidina (Sigma-Aldrich, n.º del catálogo V5754) como toxina-II de *Anemonia sulcata* (ATX-II, Sigma-Aldrich n.º del catálogo T3268). Las concentraciones de veratidina y ATX-II en la placa de adición de fármaco fueron 400 µM y 12°µM, respectivamente, a fin de alcanzar concentraciones de ensayo finales de 100°µM y 3°µM cuando se distribuyeron 10 µl de la solución combinada en la placa de células usando el instrumento FLIPR. La adición del agonista se programó en el FLIPR™ para coincidir con el inicio de la lectura de la señal de fluorescencia y dichas lecturas se tomaron a intervalos regulares para una duración de 10 minutos.

B. Ensayo in vitro desarrollado para evaluar la inhibición de la respuesta del canal de sodio con compuestos después de la estimulación por calor (47 °C) en células que expresan hTRPV1

Se hicieron pases de hTRPV1-N1E115 mediante el cultivo en medio de crecimiento [que contenía 1x DMEM (Sigma) + FBS al 10 % (Gibco) + penicilina-estreptomicina al 1 % (Gibco) + higromicina B 300 µg/ml (Invitrogen, como el marcador de selección)] en matraces de 175 ml (Nunc). Las células se dividieron 1:10. Los medios agotados de los matraces se aspiraron y los matraces se golpearon por los lados con las palmas para desalojar las células del fondo de los matraces. Se añadieron 10 ml de medio de crecimiento para suspender las células y se inoculó 1 ml de las células en suspensión en un matraz T-175 nuevo que contenía 35 ml de medio de crecimiento. Para el cultivo en placas de las células para el ensayo, se añadieron 5000 células en 50 µl de medio de crecimiento a cada pocillo de placas de fondo transparente, estériles, de 384 pocillos, revestidas de poli-D-lisina, con tapas (Greiner-bio one) en el interior del flujo de aire laminar. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en una incubadora de CO₂ (Thermo). Cuarenta y ocho horas más tarde, eel día del ensayo se observaron las placas de células se sembraron bajo el microscopio para comprobar la salud, la unión y la confluencia de la monocapa antes del ensayo.

Los medios agotados procedentes de las placas de células sembradas se decantaron suavemente y se añadió colorante azul de potencial de membrana FLIPR™ (disponible en el mercado de Molecular Devices Inc., de los EE.UU., como es "FLIPR Membrane potential assay kit blue") en cada pocillo de las placas. El colorante se preparó en tampón de ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa con colorante añadido se incubó a temperatura ambiente (25 °) durante 30 minutos dentro de una incubadora de placas (Thermo). Se preparó Tampón de ensayo de acuerdo con la siguiente tabla 4. El pH se ajustó a 7,4 con KOH (Sigma) y el volumen se completó hasta 500 ml con agua Milli-Q® (Millipore). A menos que se indique lo contrario, todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo.

Tabla 4

Sal	Concentración(mM)
NaCl	150
KCl	3,25
CaCl ₂ 2H ₂ O	2
MgCl ₂ 6 H ₂ O	3
HEPES	10
Glucosa	11 (198 mg/100 ml)

Los compuestos se diluyeron en tampón de ensayo y se añadieron a placas de fondo redondo de 384 pocillos de polipropileno (Costar) para servir como placa fuente para la adición del compuesto. Después de que se terminara el período de incubación del colorante, las placas cargados con colorante y las placas de fuente de compuesto se insertaron dentro del FLIPR^{Tetra} (Molecular Devices, Inc.) con cajas de 384 puntas FLIPRTM (Molecular Devices, Inc.). Los compuestos se añadieron a las placas cargadas con colorante mediante el sistema FLIPR^{Tetra} (primera adición). Después de la adición de compuesto, las placas se transfirieron inmediatamente a la incubadora de placas a 47 °C (Thermo) y se incubaron durante 10 minutos para activar hTRPV1. Las placas después se transfirieron inmediatamente a la incubadora de placas a 25 °C (Thermo) y se incubaron durante 30 minutos. Las placas sembradas con células que se iban a activarse se transfirieron a la incubadora de placas a 25 °C (Thermo) y se incubaron durante 30 minutos. Se preparó una placa agonista que contenía veratridina (Sigma) y ATX-II, como se describió anteriormente, antes de la segunda adición. La adición de agonista se consiguió usando el software FLIPRTM y se hizo coincidir con las lecturas de fluorescencia que se tomaron a intervalos regulares para una duración total de 12 minutos.

El compuesto de referencia, QX-314 tenía un valor de Cl_{50} a 47 °C para hTRPV1-N1E115, de 733^omM en el ensayo FLIPRTM. Una Cl_{50} <100^oµM indica una actividad 10 veces mejor que la de QX-314.

C. Método para evaluar el grado de inhibición de la respuesta del canal de sodio con compuestos en células hNav1.5-HEK293.

El siguiente ensayo se utilizó para evaluar la tendencia de los compuestos de ensayo para bloquear la isoforma cardíaca dominante del canal de sodio. Los canales de sodio Nav1.5 son conocidos por ser permeables a los bloqueantes del canal de sodio cuaternario tales como QX-314 y, por tanto, el ensayo se realizó en ausencia de un agonista de TRPV1 químico.

Las células hNav1.5 HEK-293 (CreaCell, Francia, una estirpe celular de riñón embrionario humano que expresa el canal de sodio Nav1.5 humano) se cultivaron en medio de crecimiento (que contenía 1XDMEM (Gibco) + FBS al 10 % (PAA Gold) + 2 % de glutamina 100^omM (Gibco) + 1 % de penicilina 10.000 U/ml estreptomicina 10.000 µg/ml (Invitrogen) + 1,2 mg/ml de Geneticin® G418 (Invitrogen)) en matraces de unión celular de 75 ml (Corning). Las siguientes etapas se siguieron exactamente como se ha mencionado. El medio gastado se desechó y las células se aclararon una vez con PBS-1X. Se añadió solución Accutase® (PAA 1-2 ml). La placa se colocó en una incubadora de calentamiento a 37 °C durante 3-5 minutos. Tan pronto como se separaron las células, se añadió medio completo (9 ml) a 37 °C. La suspensión celular se introdujo en una pipeta estéril y las células se homogeneizaron suavemente para disociar los agregados de células. Las células se contaron usando un hemocitómetro con azul de tripano y después se centrifugaron 5 minutos a 400 g. Las células pueden amplificarse o mantenerse mediante la siembra de 2.105 células/ml en un matraz T75 (volumen final: 15 ml). Se añadieron 8000 células en 50 µl de medio de crecimiento a cada pocillo de placas de fondo transparente, de 384 pocillos, estériles revestidas de poli-D-lisina con tapa (Greiner-bio one) en el interior del flujo de aire laminar. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % deCO₂ en una incubadora de CO₂ (Thermo) durante 48 horas.

El día del ensayo, las células se lavaron con tampón de ensayo, que se preparó usando los componentes y las cantidades de la Tabla 5 a continuación. El pH se ajustó a 7,4 con NaOH, el volumen se completó hasta 500 ml con agua Milli-Q®.

Tabla 5

Sal	Concentración(mM)
NaCl	165
KCl	4,5
CaCl ₂ 2H ₂ O	2
MgCl ₂ 6 H ₂ O	1
HEPES	10
Glucosa	10 (180 mg/100 ml)

Se añadió tampón de ensayo a las células y se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos. Los compuestos se diluyeron en tampón de ensayo. Se añadieron los compuestos y se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos. Se añadió colorante Red FMP (MDC) a las células y la placa se incubó a temperatura ambiente (25 °C) durante 30 minutos. Se preparó solución madre de veratridina (20°mM; Sigma) en DMSO; se añadió veratridina (concentración final de 30°µM) en tampón de ensayo a cada pocillo de las placas de células sembradas en el FLIPR y se tomaron lecturas durante 10 minutos. La siguiente tabla proporciona los datos que ilustran la actividad de los canales de sodio de los compuestos de ensayo en respuesta a la presencia o ausencia de estimulación por calor en células que expresan hTRPV1. Los compuestos se ensayaron para determinar la actividad diferencial a 25 °C y 47 °C y a dos concentraciones de ensayo. Se evaluaron ciertos compuestos adicionalmente para determinar la CI₅₀ en el ensayo a 47 °C y los ejemplos se muestran en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

Ej	hTRPVI-NIE Nav 0,1°mM (% de inhibición)		hTRPVI-NIE Nav 1°mM (% de inhibición)		hTRPVI-NIE CI ₅₀ (µM) 47 °C
	25 °C	47 °C	25 °C	47 °C	
1	13 (N = 4)	73 (N = 4)	53 (N = 4)	92 (N = 4)	A'
2	23 (N = 4)	77 (N = 4)	78 (N = 4)	89 (N = 4)	A'
3	14 (N = 2, 0,5°mM)	19 (N = 2, 0,5°mM)	52 (N = 2, 5°mM)	67 (N = 2, 5°mM)	NE
4	24 (N = 4)	86 (N = 4)	NE	NE	A'
5	45 (N = 4)	NE	NE	NE	A'
6	24 (N = 2, 0,5°mM)	80 (N = 2, 0,5°mM)	58 (N = 2, 5°mM)	92 (N = 2, 5°mM)	B'
7	1 (N = 4)	28 (N = 4)	0 (N = 4)	70 (N = 4)	NE
8	14 (N = 4)	38 (N = 4)	22 (N = 4)	53 (N = 4)	NE
9	16 (N = 4)	67 (N = 4)	NE	NE	NE
10	10 (N = 4)	59 (N = 4)	61 (N = 4)	95 (N = 4)	B'
11	16 (N = 4)	40 (N = 4)	NE	NE	B'
12	25 (N = 4)	84 (N = 4)	17 (N = 4)	88 (N = 4)	A'
13	0 (N = 4)	44 (N = 4)	51 (N = 4)	89 (N = 4)	A'
14	0 (N = 4)	31 (N = 4)	10 (N = 4)	66 (N = 4)	NE
15	6 (N = 4)	45 (N = 4)	59 (N = 4)	92 (N = 4)	B'
16	31 (N = 4)	60 (N = 4)	50 (N = 4)	83 (N = 4)	B'
17	4 (N = 4)	54 (N = 4)	72 (N = 4)	96 (N = 4)	B'
18	3 (N = 4)	41 (N = 4)	28 (N = 4)	66 (N = 4)	NE
19	25 (N = 4)	NE	12 (N = 4)	52 (N = 4)	A'
20	14 (N = 4)	77 (N = 4)	46 (N = 4)	95 (N = 4)	A'
21	11 (N = 4)	57 (N = 4)	35 (N = 4)	96 (N = 4)	B'
22	33 (N = 4)	NE	91 (N = 4)	NE	A'
23	38 (N = 4)	NE	76 (N = 4)	NE	A'
24	22 (N = 4)	NE	81 (N = 4)	NE	A'
25	48 (n = 4)	NE	89 (n = 4)	NE	A'
26	4 (N = 4)	88 (N = 4)	57 (N = 4)	89 (N = 4)	A'
27	23 (N = 4)	73 (N = 4)	74 (N = 4)	85 (N = 4)	B'
28	0 (N = 4)	32 (N = 4)	5 (N = 4)	58 (N = 4)	NE
29	36 (N = 4)	52 (N = 4)	50 (N = 4)	61 (N = 4)	A'
30	28 (N = 4)	33 (N = 4)	58 (N = 4)	75 (N = 4)	NE
31	27 (N = 4)	94 (N = 4)	NE	NE	A'
32	4 (N = 4)	48 (N = 4)	1 (N = 4)	54 (N = 4)	NE
33	3 (N = 4)	36 (N = 4)	23 (N = 4)	57 (N = 4)	NE
34	35 (N = 4)	36 (N = 4)	35 (N = 4)	55 (N = 4)	NE
35	35 (N = 4)	74 (N = 4)	NE	NE	A'
36	50 (N = 4)	83 (N = 4)	84 (N = 4)	95 (N = 4)	A'
37	15 (N = 4)	31 (N = 4)	20 (N = 4)	70 (N = 4)	NE
38	75 (N = 4)	95 (N = 4)	NE	NE	A'
39	41 (N = 4)	7 (N = 4)	NE	NE	A'
40	10 (N = 4)	43 (N = 4)	12 (N = 4)	80 (N = 4)	NE
41	13 (N = 4)	66 (N = 4)	22 (N = 4)	89 (N = 4)	A'
42	8 (N = 4)	45 (N = 4)	16 (N = 4)	90 (N = 4)	A'
43	13 (N = 4)	78 (N = 4)	NE	NE	A'
44	56 (N = 4)	89 (N = 4)	81 (N = 4)	96 (N = 4)	NE

(continuación)

Ej	hTRPVI-NIE Nav 0,1 ^o mM (% de inhibición)		hTRPVI-NIE Nav 1 ^o mM (% de inhibición)		hTRPVI-NIE Cl ₅₀ (μ M) 47 °C
	25 °C	47 °C	25 °C	47 °C	
45	4 (N = 4)	72 (N = 4)	46 (N = 4)	83 (N = 4)	A'
46	40 (N = 4)	NE	NE	NE	A'
47	54 (N = 4)	NE	NE	NE	A'
48	48 (N = 4)	NE	NE	NE	A'

A': Cl₅₀ = 10-100 μ M

B': Cl₅₀ = 100-1000 μ M

NE: no ensayado

- 5 De forma similar, la siguiente Tabla 7 proporciona datos que ilustran la actividad en los canales de sodio de los compuestos de ensayo que mostraron una inhibición importante de la respuesta a 47 °C junto con una inhibición mínima a 25 °C. Estos compuestos se evaluaron para determinar su capacidad de bloquear el canal de sodio cardiaco en una célula que expresa Nav1.5. Los datos para varios de dichos compuestos se muestran en la Fig. 1, se demuestra que las concentraciones de estos compuestos necesarias para bloquear Nav1.5 son mayores que las necesarias para bloquear la respuesta del canal de sodio en la estirpe celular TRPV1-N1E115.
- 10

Tabla 7

Ej	HEK Nav 1,5 % de inh. a 0,5 ^o mM	HEK Nav 1,5 % de inh. a 1,5 ^o mM	HEK Nav 1,5 Cl ₅₀ (μ M) (AVG)
1	NT	NT	240
2	NT	NT	188
5	NT	NT	305
6	30	68	684
12	NT	NT	134
31	NT	NT	160
38	NT	NT	54
39	NT	NT	89
46	NT	NT	232
47	NT	NT	255
48	NT	NT	252

Ejemplo 50: Ensayo *in vivo* de la nocicepción mecánica

Este ensayo se realizó para supervisar el curso de tiempo de la analgesia cuando se inyectaron compuestos ya sea solos o en combinación con lidocaína directamente en la proximidad del nervio ciático.

- 15 Las ratas Sprague Dawley (SD) macho tenían un intervalo de peso corporal de 180 a 220 gramos. Los animales se aclimataron durante tres días con el técnico de laboratorio y el medio ambiente experimental. El día 1, todos los animales recibieron tres sesiones de aclimatación con el laboratorio (30-45 minutos) y se envolvieron en una toalla (1 minuto por animal). El día 2, se siguió el mismo programa de aclimatación junto con el tacto del pellizcador (aplicación sin fuerza) en la sesión 3. El día 3, se siguió un programa de aclimatación similar al del día 2 y se registró el primer valor basal. El día 4, se registró el segundo valor basal antes de administrar la inyección de fármaco/compuesto de ensayo. El segundo valor basal se incluyó para la evaluación del efecto del tratamiento.
- 20

Se registraron el umbral de retirada/fuerza de vocalización (PWF, por sus siglas en inglés) de la pata ipsilateral (trasera derecha) para todos los animales la mañana del día de la experimentación. El pellizcador se aplicó en la base de la última falange, en algún lugar a medio camino entre el 5^o y 4^o metatarso, con un valor de corte de 500 gramos. Los brazos de fórceps del pellizcador se mantuvieron de manera el extremo calibrado se enfrentó al dorso de la pata y extremo plano se enfrentó a la superficie plantar. La aplicación de la fuerza con los brazos del pellizcador se hizo de manera que aumentara lentamente y de manera constante. La velocidad de aplicación de la fuerza se ha optimizado con la práctica para alcanzar el valor de corte (500 g) en aproximadamente 6-7 segundos.

25

Para la inyección, las ratas se anestesiaron con isoflurano (obtenido de Baxter Pharma, EE.UU.) durante un breve período de tiempo y se mantuvieron en la posición en decúbito prono con las piernas extendidas. El trocánter mayor y la tuberosidad isquiática se localizaron por palpación y se dibujó una línea imaginaria entre los dos y se estimó un punto en esa línea a aproximadamente un tercio de la distancia caudal del trocánter mayor. Se inyectó el compuesto de ensayo/solución de vehículo respectivo (aproximadamente 100 μ l o 200 μ l, experimentos separados) con la aguja

30

de inyección avanzada desde una dirección dorsolateral en un ángulo de 45 ° y la punta de la aguja tocando el isquion. Se usó para la inyección una aguja de calibre 27 conectada a una jeringa de tuberculina. El volumen de la inyección se empujó suavemente. Después de la inyección, los animales se mantuvieron en la cámara de recuperación y solo después de la recuperación completa de la anestesia se devolvieron a las jaulas. Se tuvo cuidado de que la anestesia leve se administrara de manera que los animales permanecieran anestesiados durante un período de tiempo muy breve.

Los compuestos de ensayo se formularon a las concentraciones requeridas (0-15 %) en un vehículo de solución salina fisiológica normal (cloruro de sodio al 0,9 %) para proporcionar la formulación en solución. Después, se disolvió lidocaína.HCl en polvo (Sigma, EE.UU.) en la misma solución para proporcionar una formulación en solución de combinación de compuesto de ensayo y lidocaína. Se utilizaron ultrasonidos para reducir el tamaño de partícula en caso necesario - según se juzga mediante inspección visual de la solución. La formulación final se esterilizó por filtración con filtros de jeringa (0,22 μ m) antes de la administración.

El día 4, después de la inyección de compuesto/vehículo, se tomaron las dos lecturas de PWL a las 0,5 y 2 horas después de la inyección seguidas de lecturas a intervalos de 1 hora o 2 horas dependiendo de si la respuesta se mantenía en valores de corte o mostraba signos de sensibilidad recuperada. Los registros continuaron hasta que la respuesta en gramos-fuerza se redujo a un nivel que no era significativamente diferente del valor basal antes del fármaco. De lo contrario, los registros continuaron hasta 14 horas, seguidos de la siguiente lectura en el día 5, 24 horas después de la inyección. Cuando todavía se observaba un efecto anti-nocicepción significativo a las 24 horas, los registros continuaban adicionalmente igual que el día 4.

Se usó el software estadístico GraphPad® Prism 5 para el análisis. En el análisis de las columnas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para cada grupo, seguido del test de Dunnett para comprobar la significación de la diferencia entre los valores basales y las lecturas en diferentes puntos temporales.

A. Comparación de los compuestos con QX-314

Usando el resumen y el ensayo proporcionados anteriormente, se prepararon y ensayaron las formulaciones de la siguiente Tabla 8. Los resultados de estos ensayos se proporcionan en las Figuras 1 y 2 y se resumen en la siguiente tabla. Específicamente, las Figuras 1 y 2 son gráficos de fuerza de vocalización de retirada de la pata (g) frente a vocalización al tiempo (horas).

Tabla 8

Duración de la analgesia para la nocicepción mecánica				
Ejemplo de compuesto de ensayo	Cantidad de compuesto de ensayo (%)	Cantidad de lidocaína (%)	Cantidad total de inyección (µl)	Tiempo promedio de la analgesia (h)
6	0,5	2	200	14
		2	200	10
		0	200	5
		2	100	8
1	0,5	2	100	7
		2	200	8
		2	200	14
		2	200	12
		2	200	6
2	0,5	2	200	12
12	0,5	2	200	0,5
5	0,2	2	200	2
	0,3	2	200	24
	0,4	2	200	44
	0,45	2	200	>64
	0,5	2	200	

(continuación)

Duración de la analgesia para la nocicepción mecánica				
Ejemplo de compuesto de ensayo	Cantidad de compuesto de ensayo (%)	Cantidad de lidocaína (%)	Cantidad total de inyección (µl)	Tiempo promedio de la analgesia (h)
46	0,5	2	200	24
47	0,5	2	200	24

Estos datos ilustran que los compuestos de los ejemplos 1, 2, 5, 6 y 12 proporcionan efectos analgésicos durante al menos 7 horas, que es más que QX-314. En cuanto a la significación, el compuesto del Ejemplo 6 proporcionó efectos analgésicos de duración significativa en ausencia de lidocaína.

C. Efecto del volumen y de la concentración de la inyección

Se prepararon inyecciones de acuerdo con la descripción proporcionada anteriormente y se incluyeron (i) 100 µl de una solución que contenía un 0,5 % del compuesto del ejemplo 6 y un 2 % de lidocaína y (ii) 200 µl de una solución que contenía un 0,5 % del compuesto del ejemplo 6 y un 2 % de lidocaína. Estas inyecciones se administraron como se ha descrito anteriormente, permitiendo de este modo el análisis del efecto de los volúmenes de la formulación de 100 µl frente a 200 µl.

Los resultados de estos ensayos se proporcionan en las Figuras 1 y 2. Específicamente, las Figuras 1 y 2 son gráficos de la fuerza vocalización de la retirada de la pata (g) frente al tiempo (horas). Se observa que en cantidades de compuesto de ensayo del 0,5 %, la duración total de la analgesia densa (es decir, 500 g de fuerza ejercida) fue más corta para el volumen de inyección de 100 µl en comparación con el de 200 µl, como también fue más corto el período global de analgesia - según se define por el último punto temporal en el que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con las respuestas basales.

Ejemplo 52: Actividad anestésica tópica

Se aplicaron alícuotas (0,25 ml) de soluciones de ensayo en el saco conjuntival de conejos conscientes (de cualquier sexo; 2-4 kg) y los párpados se mantuvieron cerrados durante aproximadamente 20 segundos. Se comprobó el reflejo corneal antes de la aplicación de la solución de ensayo y cada 5 minutos desde entonces. Para ensayar el reflejo corneal, la córnea se tocó seis veces con una cerda elástica. La duración de la anestesia se calculó como el período desde el punto temporal cuando el animal no sentía ninguno de los seis toques de la cerda hasta el punto temporal al que el animal reaccionó nuevamente a tres de los seis toques. Para verificar la reversibilidad del efecto anestésico tópico, el ensayo continuó hasta que el animal reaccionó a los seis toques de la cerda durante al menos 15 minutos.

Ejemplo 53: Actividad anestésica dérmica

Aproximadamente 18 a 24 horas antes de cada experimento, se rasuró la piel del lomo de cobayas macho y se depilaron con un eliminador de pelo disponible en el mercado. La acción anestésica de cada agente después de la aplicación dérmica se determinó utilizando un procedimiento de "pinchazo" como se describe por Aberg (*Acta Pharmacol Toxicol*, 273-286). Antes y a diversos intervalos después del tratamiento, se ensayó la zona de la piel para determinar la presencia o ausencia de una contracción de la piel en respuesta a seis sondeos dérmicos normalizados con "algesímetro" de metal con punta a una carga máxima predeterminada de 10 g. El número promedio de sondeos que no producen una respuesta de contracción de la piel se señala como "puntuación anestésica".

En este sistema, seis respuestas a seis estímulos representan "ninguna actividad anestésica" y ninguna respuesta a ninguno de los seis estímulos representa una "actividad anestésica máxima". En los experimentos sobre la actividad dérmica anestésico, se marcó una sola zona de la piel de 1 pulgada cuadrada en el centro del lomo de cada animal. Esta zona se cubrió con una almohadilla de gasa de 1 pulgada cuadrada, de 16 capas de grosor, sobre la que se depositaron 0,45 ml de una solución al 10 % de agente de ensayo en agua con DMSO. La almohadilla de gasa se cubrió con una lámina de cinco pulgadas cuadradas de Saran Wrap que se unió a la piel circundante con cinta adhesiva. Después, se cubrió toda la zona enrollando una venda elástica alrededor del tronco del animal. Después de una duración predeterminada de tratamiento, las cubiertas se retiraron y la piel se evaluó para determinar la presencia de anestesia como se ha descrito anteriormente. Los ensayos de anestesia dérmica se realizaron a

intervalos de diez minutos para medir el tiempo de inicio y la duración de la actividad anestésica dérmica; se hicieron comparaciones con los compuestos de referencia y el vehículo.

Ejemplo 54: C. Actividad anestésica local (infiltración)

5 Aproximadamente 18 a 24 horas antes de cada experimento, se preparó la piel del lomo de cobayas macho de acuerdo con el Ejemplo 53. La acción anestésica de cada agente después de la inyección intradérmica se determinó utilizando un procedimiento de "pinchazo" similar al descrito en el Ejemplo 53. Antes y a diversos intervalos después del tratamiento, se ensayó la zona de la piel para determinar la presencia o ausencia de una contracción de la piel en respuesta a seis sondeos dérmicos normalizados con "algesímetro" de metal con punta a una fuerza máxima predeterminada de 20 gramos. El número promedio de sondeos que no producen una respuesta de contracción de la piel se señala como "puntuación anestésica". En este sistema, seis respuestas a seis estímulos representan "ninguna actividad anestésica" y ninguna respuesta a ninguno de los seis estímulos representa una "actividad anestésica máxima". En experimentos con inyecciones intradérmicas de agentes, se dividieron los lomos de las cobayas en cuatro secciones usando una rotulador y se realizaron las inyecciones de 0,1 ml de soluciones al 0,25 %, 0,5 % y 1,0 % de los compuestos de ensayo en solución salina fisiológica, vehículo (solución salina fisiológica) y al menos un compuesto de referencia, una inyección en cada una de las cuatro zonas definidas.

Ejemplo 55: Toxicidad intravenosa aguda en ratones

20 Se usaron ratones (machos) de la cepa NMRI, que pesaban de 20 a 22 g después de un período de estabilización de al menos diez días en las instalaciones de ensayo y al menos una hora en el laboratorio. Se les retuvo la comida, pero no el agua a todos los animales durante 16 horas antes del ensayo. Se proporcionó a los animales libre acceso a los alimentos comenzando dos horas después de la administración del fármaco, que por lo general se realiza alrededor de las 9.00 de la mañana. Todos los animales se observaron diariamente durante 7 días después de la dosificación.

Ejemplo 56: Ensayo *in vitro* para determinar el efecto de los compuestos sobre el músculo detrusor de la vejiga

25 Este estudio evalúa los efectos de los compuestos de ensayo que se describen en el presente documento sobre la respuesta contráctil del músculo detrusor aislado (Iravani y Zar, *British Journal of Pharmacology* 1994, 113: 95-102.)

30 Se obtuvieron tiras de músculo liso de la vejiga urinaria de cobayas hembra (cepa Dunkin-Hartley, peso corporal de 300-350 g). Se prepararon y se conectaron tiras de vejiga a transductores de tensión en baños de órganos de 5 ml que contenían solución de Krebs-Henseleit (mantenidos a 37 °C, pH 7,4, gasificados con O₂ al 95 %/CO₂ al 5 %). Las tiras se equilibraron durante al menos 60 minutos a 1,0 g de tensión de reposo, tiempo durante el cual los tejidos se lavaron cada 15 minutos. Después, cada tira se expuso a KCl 80 mM para verificar la viabilidad. Después de un período de 30 minutos de equilibrado y lavado, las tiras de músculo detrusor se sometieron a la estimulación por campo eléctrico (parámetros de ECE: 800 mA, frecuencia de 15 Hz, duración del pulso 0,1 ms, sucesión de pulsos de 4 segundos cada 2 minutos).

35 Después de aproximadamente 20-25 minutos (estabilización), se construyó una curva de concentración-respuesta acumulativa (CCR) mediante la adición de (i) de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 0,108 % de un compuesto descrito en el presente documento y de aproximadamente el 0,00025 a aproximadamente el 0,03325 % de lidocaína (Experimento 1) o (ii) de aproximadamente el 0,00003 a aproximadamente el 0,10843 % de un compuesto descrito en el presente documento y de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,01333 % de lidocaína (Experimento 2) al baño de órganos. Al final de la CCR, se añadió tetrodotoxina (TTX) 1 μM para confirmar el origen neurógeno de las contracciones. Los resultados se expresan como el % de variación a partir de las contracciones inducidas por ECE basales.

45 Se prevé que tanto la lidocaína como los compuestos que se describen en el presente documento producirán inhibiciones dependientes de la concentración de las contracciones del detrusor inducidas por ECE. También se prevé que la exposición del tejido detrusor a una combinación de lidocaína más el compuesto de ensayo dará como resultado una relación de concentración-inhibición que indica que los dos fármacos actúan de manera aditiva para inhibir la respuesta contráctil.

Ejemplo 57: Inhibición sostenida de las contracciones de la vejiga inducidas por ECE

50 Este ejemplo se realizó para demostrar la sostenibilidad de los compuestos analizados en el presente documento en la inhibición de las contracciones de la vejiga inducidas por ECE.

55 Las tiras de músculo liso de vejiga urinaria tratadas con ECE se prepararon como se ha descrito en el primer párrafo del Ejemplo 58. Después de aproximadamente 20-25 minutos (estabilización), se añadió una concentración única de lidocaína (0,01 o 0,003 %), un compuesto descrito en el presente documento (0,01 % o 0,0004 %) o disolvente. Después de obtenerse un efecto máximo (aproximadamente 15 minutos), todas las preparaciones se lavaron cuatro veces. Después, las contracciones inducidas por ECE se registraron durante 120 minutos. La amplitud de las contracciones inducidas por ECE durante el período de recuperación se expresan como el % de las contracciones

inducidas por ECE basales (antes del tratamiento). El análisis se realizó a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos después del final del período de lavado.

Se prevé que los datos indicarán que el compuesto de ensayo actúa sobre el músculo detrusor de la vejiga para inhibir la contractilidad y este efecto será de reversión lenta.

5 **Ejemplo 58: Ensayo *in vitro* de la función de la vejiga**

Este estudio evaluó los efectos de los compuestos que se describen en el presente documento en diversos aspectos de la función de la vejiga en ratas conscientes.

10 Las ratas se prepararon con catéteres de polietileno permanentes situados dentro la vejiga a través de la cúpula y que se exteriorizaban a nivel escapular. Se controló la presión intracisternal conectando el catéter a un calibrador de tensión comercial a través de un conector en T que permitía la infusión de soluciones y fármacos. El registro cistométrico comenzó 48 horas después de la implantación del catéter. A los animales se les administró de forma continua solución salina, con o sin compuestos de ensayo, a través del catéter, a una velocidad de 2 ml/h. La orina se recogió y se pesó usando un transductor de fuerza y la presión intravesical se controló continuamente con el fin de evaluar la amplitud, la frecuencia y el volumen de la micción y la capacidad de la vejiga. Las perfusiones de solución salina se complementaron con el compuesto de ensayo con el fin de determinar los efectos en cada uno de los parámetros de la función de la vejiga anteriores.

15 Se prevé que la infusión de una solución de un compuesto de ensayo descrito en el presente documento producirá un aumento de la capacidad de la vejiga y una disminución en el volumen de micción después de la administración. Se prevé que una infusión de una solución combinada del compuesto de ensayo con lidocaína al 2 % dará como resultado la supresión de la micción y un aumento correspondiente en la presión intravesical. Finalmente se prevé que, en comparación con la lidocaína sola, el compuesto de ensayo tendrá una duración de acción más larga sobre la frecuencia de la micción.

20 En resumen, se prevé que los compuestos que se describen en el presente documento van a cambiar la función de la vejiga y proporcionarán un beneficio terapéutico a pacientes que padecen enfermedades o afecciones patológicas que conducen, directa o indirectamente, a la vejiga hiperactiva y/o la cistitis intersticial (síndrome de vejiga dolorosa), el síndrome del intestino irritable o sensibilidades químicas.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Endo Pharmaceuticals, Inc.

<120> CICLOHEXILAMINAS

30 <130 > SKT-112-WO/END7APCT

<150> US 61/550.489

<151> 24-10-2011

<150> US 61/683.519

<151> 15-08-2012

35 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210 > 1

<211> 839

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 596 215 T3

Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu
 1 5 10 15

Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Asp Pro Asn Ser Arg
 20 25 30

Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys Ser Arg Thr Arg
 35 40 45

Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro Val Asp Cys Pro
 50 55 60

His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro
 65 70 75 80

Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu
 85 90 95

Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg Leu
 100 105 110

Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Glu Ala Val Ala Gln Asn Asn Cys Gln
 115 120 125

Asp Leu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Gln Lys Ser Lys Lys His Leu
 130 135 140

Thr Asp Asn Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys Thr Cys Leu Leu
 145 150 155 160

ES 2 596 215 T3

Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu
165 170 175

Leu Leu Glu Ile Ala Arg Gln Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Val Asn
180 185 190

Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr Ala Leu His Ile
195 200 205

Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Ala Leu Val Thr Leu Leu Val Glu Asn
210 215 220

Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe Phe Lys Lys Thr
225 230 235 240

Lys Gly Arg Pro Gly Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro Leu Ser Leu Ala
245 250 255

Ala Cys Thr Asn Gln Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Leu Gln Asn Ser
260 265 270

Trp Gln Thr Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val Gly Asn Thr Val
275 280 285

Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys
290 295 300

Phe Val Thr Ser Met Tyr Asn Glu Ile Leu Met Leu Gly Ala Lys Leu
305 310 315 320

His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr Asn Lys Lys Gly Met Thr
325 330 335

Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Leu Ala Tyr
340 345 350

Ile Leu Gln Arg Glu Ile Gln Glu Pro Glu Cys Arg His Leu Ser Arg
355 360 365

Lys Phe Thr Glu Trp Ala Tyr Gly Pro Val His Ser Ser Leu Tyr Asp
370 375 380

Leu Ser Cys Ile Asp Thr Cys Glu Lys Asn Ser Val Leu Glu Val Ile
385 390 395 400

Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp Met Leu Leu Val

ES 2 596 215 T3

				405						410					415
Glu	Pro	Leu	Asn	Arg	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Trp	Asp	Arg	Phe	Val	Lys
			420					425					430		
Arg	Ile	Phe	Tyr	Phe	Asn	Phe	Leu	Val	Tyr	Cys	Leu	Tyr	Met	Ile	Ile
		435					440					445			
Phe	Thr	Met	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Gly	Leu	Pro	Pro	Phe
	450					455					460				
Lys	Met	Glu	Lys	Thr	Gly	Asp	Tyr	Phe	Arg	Val	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu
465					470					475					480
Ser	Val	Leu	Gly	Gly	Val	Tyr	Phe	Phe	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Tyr	Phe
				485					490					495	
Leu	Gln	Arg	Arg	Pro	Ser	Met	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Ser	Tyr	Ser
			500					505					510		
Glu	Met	Leu	Phe	Phe	Leu	Gln	Ser	Leu	Phe	Met	Leu	Ala	Thr	Val	Val
		515					520					525			
Leu	Tyr	Phe	Ser	His	Leu	Lys	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Met	Val	Phe	Ser
	530					535					540				
Leu	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Asn	Met	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Arg	Gly	Phe	Gln
545					550					555					560
Gln	Met	Gly	Ile	Tyr	Ala	Val	Met	Ile	Glu	Lys	Met	Ile	Leu	Arg	Asp
				565					570					575	
Leu	Cys	Arg	Phe	Met	Phe	Val	Tyr	Ile	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Phe	Ser
			580					585					590		
Thr	Ala	Val	Val	Thr	Leu	Ile	Glu	Asp	Gly	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Pro
		595					600					605			
Ser	Glu	Ser	Thr	Ser	His	Arg	Trp	Arg	Gly	Pro	Ala	Cys	Arg	Pro	Pro
	610					615					620				
Asp	Ser	Ser	Tyr	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ser	Thr	Cys	Leu	Glu	Leu	Phe	Lys
625					630					635					640
Phe	Thr	Ile	Gly	Met	Gly	Asp	Leu	Glu	Phe	Thr	Glu	Asn	Tyr	Asp	Phe
				645					650					655	

ES 2 596 215 T3

Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val Ile Leu Thr Tyr
 660 665 670

Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Asn
 675 680 685

Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu Gln Arg Ala Ile
 690 695 700

Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys Met Arg Lys Ala
 705 710 715 720

Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Tyr Thr Pro Asp Gly Lys
 725 730 735

Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn Trp Thr Thr
 740 745 750

Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu
 755 760 765

Gly Val Lys Arg Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg Ser Ser Arg Val Ser
 770 775 780

Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala
 785 790 795 800

Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg
 805 810 815

Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser
 820 825 830

Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
 835

5 <210> 2
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 2
 ataaacggta cgcgccac catgaagaaa tggagcagca c 41

10 <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 596 215 T3

<223> cebador

<400> 3

atcggtttaa actcacttct ctccggaagc ggc 33

<210> 4

<211 > 2520

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

5

atgaagaaat ggagcagcac agacttgggg gcagctgcgg acccactcca aaaggacacc 60

tgcccagacc ccctggatgg agaccctaac tccaggccac ctccagccaa gccccagctc 120

tccacggcca agagccgcac cgggctcttt ggggaagggtg actcggagga ggctttcccg 180

gtggattgcc ctcacgagga aggtgagctg gactcctgcc cgaccatcac agtcagccct 240

gttatcacca tccagaggcc aggagacggc cccaccgggtg ccaggctgct gtcccaggac 300

tctgtcggcg ccagcaccga gaagaccctc aggctctatg atcgcaggag tatctttgaa 360

gccgttgctc agaataactg ccaggatctg gagagcctgc tgctcttcct gcagaagagc 420

aagaagcacc tcacagacaa cgagttcaaa gaccctgaga caggggaagac ctgtctgctg 480

aaagccatgc tcaacctgca cgacggacag aacaccacca tccccctgct cctggagatc 540

gcgcggcaaa cggacagcct gaaggagctt gtcaacgccca gctacacgga cagctactac 600

aagggccaga cagcactgca catcgccatc gagagacgca acatggccct ggtgaccctc 660

ctggtggaga acggagcaga cgtccaggct gcggcccatg gggacttctt taagaaaacc 720

aaagggcggc ctggattcta ctccggtgaa ctgcccctgt ccctggccgc gtgcaccaac 780

cagctgggca tcgtgaagtt cctgctgcag aactcctggc agacggccga catcagcgcc 840

agggactcgg tgggcaacac ggtgctgcac gccctggtgg aggtggccga caacacggcc 900

gacaacacga agtttgtgac gagcatgtac aatgagattc tgatcctggg ggccaaactg 960

cacccgacgc tgaagctgga ggagctcacc aacaagaagg gaatgacgcc gctggctctg 1020

gcagctggga ccgggaagat cggggctctg gcctatattc tccagcggga gatccaggag 1080

cccgagtgca ggcacctgct caggaagttc accgagtggg cctacgggcc cgtgcaactcc 1140

tcgctgtacg acctgtcctg catcgacacc tgcgagaaga actcggtgct ggaggtgatc 1200

gcctacagca gcagcgagac ccctaatcgc cacgacatgc tcttggtgga gccgctgaac 1260

cgactcctgc aggacaagtg ggacagattc gtcaagcgca tcttctactt caacttcctg 1320

gtctactgcc tgtacatgat catcttcacc atgggtgcct actacaggcc cgtggatggc 1380

ttgcctccct ttaagatgga aaaaactgga gactatttcc gagttactgg agagatcctg 1440

ES 2 596 215 T3

tctgtgtag	gaggagtcta	cttctttttc	cgagggattc	agtatttcct	gcagaggcgg	1500
ccgtcgatga	agaccctggt	tgtggacagc	tacagtgaga	tgcttttctt	tctgcagtca	1560
ctgttcatgc	tggccaccgt	ggtgctgtac	ttcagccacc	tcaaggagta	tgtggcttcc	1620
atggtattct	ccctggcctt	gggctggacc	aacatgctct	actacacccg	cggtttccag	1680
cagatgggca	tctatgccgt	catgatagag	aagatgatcc	tgagagacct	gtgccgtttc	1740
atgtttgtct	acatcgtctt	cttgttcggg	ttttccacag	cggtggtgac	gctgattgaa	1800
gacgggaaga	atgactccct	gccgtctgag	tccacgtcgc	acaggtggcg	ggggcctgcc	1860
tgcaggcccc	ccgatagctc	ctacaacagc	ctgtactcca	cctgcctgga	gctgttcaag	1920
ttcaccatcg	gcatgggcca	cctggagttc	actgagaact	atgacttcaa	ggctgtcttc	1980
atcatcctgc	tgctggccta	tgtaattctc	acctacatcc	tcctgctcaa	catgctcatc	2040
gccctcatgg	gtgagactgt	caacaagatc	gcacaggaga	gcaagaacat	ctggaagctg	2100
cagagagcca	tcaccatcct	ggacacggag	aagagcttcc	ttaagtgcac	gaggaaggcc	2160
ttccgctcag	gcaagctgct	gcaggtgggg	tacacacctg	atggcaagga	cgactaccgg	2220
tggtgcttca	gggtggacga	ggtgaactgg	accacctgga	acaccaacgt	gggcatcatc	2280
aacgaagacc	cgggcaactg	tgagggcgtc	aagcgcaccc	tgagcttctc	cctgcggtca	2340
agcagagttt	caggcagaca	ctggaagaac	tttgccttgg	tccccctttt	aagagaggca	2400
agtgctcgag	ataggcagtc	tgctcagccc	gaggaagttt	atctgcgaca	gttttcaggg	2460
tctctgaagc	cagaggacgc	tgaggtcttc	aagagtcctg	ccgcttccgg	agagaagtga	2520

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Cloruro de N-[2-(benzoiloxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio;
 5 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetoxibenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-fluorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-clorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 10 Yoduro de N-[2-((2,4-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-metilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-clorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 15 Yoduro de N-[2-((3-fluorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-fluoro-2-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-nitrobenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 20 Yoduro de N-[2-((3,5-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-etilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de (S)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de (S)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (R)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 25 Yoduro de (R)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((3-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]tetrahidro-2H-piran-4-amino;
 Yoduro de N-[2-((2,3-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 30 Yoduro de N-[2-((ciclohexanocarbonil)oxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofeno-3-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 35 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((1-metil-1H-pirrol-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((benzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-metil-tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio;
 40 Yoduro de N,N,4-trimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-metilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 45 Yoduro de N-[2-((2-etilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,4-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (S)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (R)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 50 Bromuro de (S)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Bromuro de (R)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Bromuro de 1-ciclohexil-1-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]pirrolidin-1-io;
 Bromuro de 1-ciclohexil-1-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil] piperidin-1-io;
 Bromuro de 1-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-1-ciclohexilpirrolidin-1-io;
 Bromuro de 1-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-1-ciclohexilpiperidin-1-io;
 55 Bromuro de 1-[2-((3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-1-ciclohexilpirrolidin-1-io; y
 Bromuro de 1-[2-((3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-1-ciclohexilpiperidin-1-io.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:

- Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Cloruro de N-[2-(benzoiloxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio;
 60 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetoxibenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-fluorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-clorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;

Yoduro de N-[2-((2,4-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-metilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 5 Yoduro de N-[2-((4-clorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((3-fluorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-fluoro-2-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 10 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2-nitrobenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((3,5-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-etilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-(trifluorometil)benzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de (S)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 15 Yoduro de (S)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (R)-N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (R)-N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro N-[2-((3-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 20 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]tetrahidro-2H-piran-4-aminio;
 Yoduro de N-[2-((2,3-diclorobenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((ciclohexanocarbonilo)oxi)propil]-N,N-dietilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 25 Yoduro de N-[2-((4-isopropilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((tiofen-3-carbonilo)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((1-metil-1H-pirrol-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((benzo[b]tiofeno-2-carbonil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio;
 30 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((3-metiltiofeno-2-carbonil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N,4-trimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N,N,4-trimetil-N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,6-dimetilbenzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,4,6-trimetilbenzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 35 Yoduro de N,N-dimetil-N-[2-((4-metilbenzoil)oxi)propil]ciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)etil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2-etilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de N-[2-((2,4-dimetilbenzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Yoduro de (S)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 40 Yoduro de (R)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio;
 Bromuro de (S)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio; y
 Bromuro de (R)-N-[2-((4-(terc-butil)benzoil)oxi)propil]-N,N-dimetilciclohexanaminio.

3. Una composición que comprende dicho compuesto de la reivindicación 1 o 2.

45 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende adicionalmente un activador del receptor TRPV1.

50 5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho activador del receptor TRPV1 se selecciona entre el grupo que consiste en capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, lidocaína, articaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, bupivacaína, eugenol, alcanfor, clotrimazol, N-araquidonoilvainillamina, anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo, AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato 13-acetato 20-homovainillato de forbol, olvanilo, N-oleildopamina, N-araquidonildopamina, 6'-yodoresiniferatoxina, una N-aciletanolamina C₁₈, un derivado de la lipoxigenasa, nonivamida, una acil amida grasa de un péptido de nudo de cisteína inhibidor de tetrahidroisoquinolina, N-[2-(3,4-dimetilbencilo)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida, N-[2-(3,4-dimetilbencilo)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea, hidroxil-a-sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol, N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea, aprindina, benzocaína, 55 butacaína, cocaína, dibucocaína, encainida, mexiletina, oxtacaína, prilocaína, proparacaína, procainamida, n-acetilprocainamida, cloroprocaína, diclonina, etidocaína, levobupivacaína, ropivacaína, ciclometacaína, dimetocaína, propoxicaína, trimecaína y sympocaína.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho activador del receptor TRPV1 es la lidocaína.

60 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 4 que se formula para la administración oral, intramuscular, rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, epidural u ocular a un paciente.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende al menos el 0,2 % de dicho compuesto, o

preferentemente hasta el 5 % de dicho compuesto, o el 2 % de dicho activador del receptor TRPV1.

9. Compuesto de la reivindicación 1 o 2 y un activador del receptor TRPV1 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor en un paciente.
10. Compuesto de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor en un paciente.
- 5 11. Compuesto de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de la vejiga hiperactiva.
12. Compuesto de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de la cistitis intersticial.
13. El compuesto y el activador del receptor TRPV1 de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor, en el que el activador del receptor TRPV1 se administra antes de dicho compuesto o en el que el activador del receptor TRPV1 y dicho compuesto se coadministran.
- 10 14. El compuesto y el activador del receptor TRPV1 de la reivindicación 9 o el compuesto de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor, en el que dicho dolor es dolor neuropático, dolor inflamatorio, dolor nociceptivo, dolor procedimental, o en el que dicho dolor es provocado por el cáncer de esófago, el síndrome del intestino irritable o la neuropatía idiopática.
- 15 15. El compuesto y el activador del receptor TRPV1 de la reivindicación 9 o el compuesto de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor, en el que dicha administración es oral, intramuscular, rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, epidural u ocular.
- 20 16. El compuesto y el activador del receptor TRPV1 de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor, en el que la relación de dicho activador del receptor TRPV1 a dicho compuesto es al menos aproximadamente 4:1, y preferentemente en el que la relación de dicho activador del receptor TRPV1 a dicho compuesto es de entre 1:10 y 10:1.
- 25 17. El compuesto de la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de la vejiga hiperactiva o la cistitis intersticial, en el que dicha administración es a) a través de la instilación directa de dicho compuesto en la vejiga o el urotelio, instilado preferentemente como una solución de fármaco, o b) en el que dicho compuesto se coloca dentro de dicha vejiga o urotelio como una formulación de liberación prolongada, preferentemente en forma de un depósito que contiene fármaco, un material revestido de fármaco, un material impregnado de fármaco, o una formulación de liposomas-fármaco, o c) en el que dicho compuesto se inyecta directamente en el urotelio.
- 30 18. El compuesto y el activador del receptor TRPV1 de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento del dolor o el picor, en el que dicho activador del receptor TRPV1 se selecciona entre el grupo que consiste en capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, lidocaína, articaína, procaína, tetracaína, mepivacaína, bupivacaína, eugenol, alcanfor, clotrimazol, N-araquidonoilvainillamina, anandamida, borato de 2-aminoetoxidifenilo, AM404, resiniferatoxina, 12-fenilacetato 13-acetato 20-homovainillato de forbol, olvanilo, N-oleoildopamina, N-araquidonildopamina, 6'-yodoresiniferatoxina, una N-aciletanolamina C₁₈, un derivado de la lipoxigenasa, nonivamida, una acil amida grasa de un péptido de nudo de cisteína inhibidor de tetrahidroisoquinolina, N-[2-(3,4-dimetilbencilo)-3-(pivaloiloxi)propil]-2-[4-(2-aminoetoxi)-3-metoxifenil]acetamida, N-[2-(3,4-dimetilbencilo)-3-(pivaloiloxi)propil]-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea, hidroxil- α -sanshool, borato de 2-aminoetoxidifenilo, 10-shogaol, oleilgingerol, oleilshogaol, N-(4-terc-butilbencil)-N'-(4-hidroxi-3-metoxibencil)tiourea, aprindina, benzocaína, butacaína, cocaína, dibucocaína, encainida, mexiletina, oxtacaína, prilocaína, proparacaína, procainamida, n-acetilprocainamida, cloroprocaína, diclonina, etidocaína, levobupivacaína, ropivacaína, ciclometacaína, dimetocaína, propoxicaína, trimecaína y sympocaína, y en el que dicho activador del receptor TRPV1 es preferentemente lidocaína.
- 40

FIGURA 1

Relación dosis-respuesta para los efectos analgésicos del compuesto del ejemplo 5 en combinación con una dosis fija de lidocaína (2 %) en el modelo de pinchazo en rata

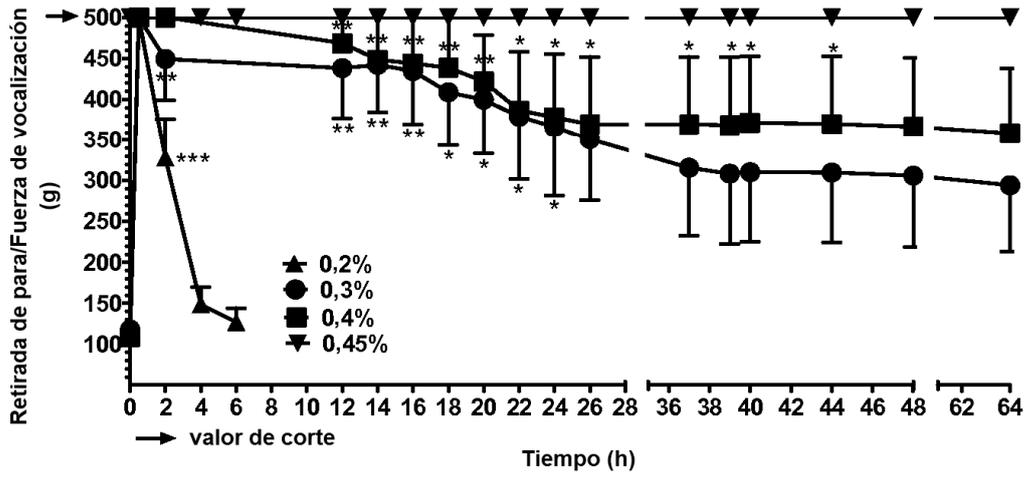


FIGURA 2

Efecto del volumen de inyección sobre la duración de la analgesia observado con el compuesto 6

