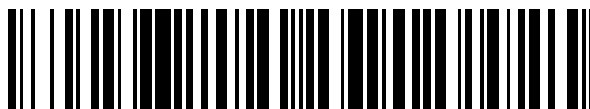


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 421**

51 Int. Cl.:

|                    |                             |           |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61K 31/357</b> | (2006.01) <b>A61Q 11/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 31/443</b> | (2006.01) <b>A61K 8/69</b>  | (2006.01) |
| <b>A61P 13/02</b>  | (2006.01) <b>A61Q 17/04</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 35/00</b>  | (2006.01) <b>A61Q 17/02</b> | (2006.01) |
| <b>A61P 29/00</b>  | (2006.01) <b>A23L 27/00</b> | (2006.01) |
| <b>A61G 9/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 6/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 8/42</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 8/49</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61Q 5/02</b>   | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2009** **PCT/EP2009/061019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010** **WO10026094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009** **E 09782234 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2349239**

54 Título: **Detección y uso de moduladores de bajo peso molecular del receptor de mentol frío TRPM8**

30 Prioridad:

**26.08.2008 EP 08162997**

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

**15.03.2018**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)**  
**Carl-Bosch-Strasse 38**  
**67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**SUBKOWSKI, THOMAS;**  
**BOLLSCHWEILER, CLAUS;**  
**WITTENBERG, JENS;**  
**KROHN, MICHAEL y**  
**ZINKE, HOLGER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 659 421 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

Detección y uso de moduladores de bajo peso molecular del receptor de mentol frío TRPM8

La invención se refiere a nuevos moduladores del receptor de mentol frío TRPM8, a procedimientos para la modulación del receptor TRPM8 usando estos moduladores; al uso de los moduladores para la inducción de sensación de frío; así como a los objetos y productos fabricados usando estos moduladores.

**Antecedentes de la invención**

El receptor de mentol frío TRPM8 (también denominado Cold-Membrane Receptor (CMR)<sup>1</sup>) pertenece a la familia de los "Transient Receptor Potential Ion Channels" [Canales de ion potencial de receptor transitorio], se expresa específicamente en un grupo especial de neuronas y forma poros en la membrana celular (en cada caso 4 unidades se combinan para dar un tetrámero), los cuales dejan pasar selectivamente millones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La proteína presenta 6 dominios de transmembrana y un C- terminal y un N-terminal citoplasmático. Las bajas temperaturas (preferiblemente 10-25 °C) estimulan a este receptor lo que da lugar a una transducción de señal que es interpretada por el sistema nervioso como sensación de frío. El receptor ha sido descrito por primera vez en el 2002 como un receptor frío en varias publicaciones (Peier AM et al, .A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell. 2002 marzo 8;108(5):705-15; McKemy DD et al. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature. 2002 marzo 7;416(6876):52-8; Zuker CS. *Neurobiology: a cool ion channel*. Nature. 2002 marzo 7;416(6876):27-8)

Los compuestos refrigerantes tales como, por ejemplo, mentol, desempeñan ya desde hace tiempo un papel importante en la industria de saborizantes y de fragancias para generar una asociación con la frescura y la limpieza. Para el compuesto mentol se ha mostrado que actúa como un modulador natural del receptor TRPM8 (McKemy D.D., *Molecular Pain* 1, 2005,16; McKemy D.D., Nature 416, 2002, 52-58; Peier A.M., Cell 108, 2002, 705-715; Dhaka A., Annu. Rev. Neurosci. 29, 2006, 135-161). Mediante la aplicación de mentol se activa TRPM8, por lo cual se provoca una corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas sensibles al frío. La señal eléctrica generada de esta manera se percibe finalmente como sensación de frío. Las concentraciones elevadas de mentol conducen a la irritación y a un efecto anestésico. Además, en diferentes publicaciones han sido descritos derivados de mentol con efecto similar (patente británica 1971#1315761; Watson H.R., J. Soc. Cosmet. Chem. 29, 1978, 185-200; Furrer S.M., Chem. Percept. 1, 2008, 119-126). También existen compuestos aislados, que no están relacionados estructuralmente con mentol, que provocan una modulación significativa de TRPM8 tales como, por ejemplo, icilina (Wei E.T., J. Pharm. Pharmacol. 35, 1983, 110-112; WO 2004/026840), WS-23 o los compuestos listados en la solicitud de patente WO 2007/019719.

Otros efectos de sustancias que modulan el receptor de TRPM8 o sus análogos de insectos son un efecto repelente en insectos (publicaciones WO 2002/015692; WO 2004/000023, US 2004/0028714), así como la actividad en la terapia antitumoral (por ejemplo, una influencia en los tumores de próstata), la actividad en el tratamiento de dolores inflamatorios/hiperalgesia y un efecto como antagonistas de TRPM8 en la terapia del síndrome de vejiga o de vejiga hiperactiva (Beck B. Cell Calcium, 41, 2007, 285-294; Levine J.D. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis. 1772, 2007, 989-1003; Mukerji G., BMC Urology 6, 2006, 6; US 2003/0207904; US 2005/6893626, Dissertation Behrendt H.J. 2004, Universität Bochum; Lashinger E.S.R. Am. J. Physiol. Renal Physiol. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Jun 18. [Epub ahead of print]; PMID: 18562636).

Muchos de los moduladores de TRPM8 que han sido encontrados hasta ahora presentan, no obstante, una deficiencia con respecto a la intensidad del efecto, duración del efecto, irritación de piel/mucosa, color, sabor, solubilidad y/o volatilidad.

**Extracto de la invención**

Por lo tanto, fue objeto de la presente invención identificar nuevas sustancias que pudieran conducir a una modulación del receptor de TRPM8, las cuales pudieran emplearse como alternativas a los moduladores conocidos hasta ahora. Tales compuestos también deberían ser adecuados principalmente para aplicaciones en el campo de la cosmetología (por ejemplo, cuidado del cabello, cuidado de la piel, cuidado oral), la nutrición (alimentos para humanos y para animales) textiles, productos OTC (por ejemplo, ungüentos para quemaduras), agentes farmacéuticos (por ejemplo, tratamiento de tumores, debilidad de vejiga), embalajes o como insecticida o repelente.

**Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra (a) la secuencia de ARNm y (b) la secuencia de aminoácidos derivada de esta del receptor de hTRPM8 de acuerdo con el registro en el banco de datos de secuencias NM 024080.

La figura 2 muestra el mapa del vector del plásmido plnd\_M8 que codifica con hTRPM8, el cual fue usado para la transfección de las células HEK293.

Descripción detallada de la invención**1. Definición de términos generales:**

En la literatura existen diferentes sinónimos para "TRPM8": TRPP8, LTRPC6, CMR1, MGC2849, transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 [miembro 8 de la subfamilia de canal de catión potencial de receptor transitorio]. En el sentido de la presente invención, quedan comprendidas todas las denominaciones. También quedan comprendidas todas las modificaciones del receptor tales como, principalmente, variantes de corte y empalme, isoformas tales como, por ejemplo, TRPM8 CRA\_a, TRPM8 CRA\_b y todos los receptores análogos de diferentes organismos como un ser humano, un ratón, una rata. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los diferentes receptores son conocidos per se y están depositadas en los bancos de datos de secuencias. De esta manera, por ejemplo, la información de secuencias para hTRPM8 se encuentra registrada bajo el número NM\_024080.

Un "modulador" en el sentido de la invención representa un compuesto que puede actuar como agonista y/o antagonista del receptor de TRPM8 in vivo y/o in vitro.

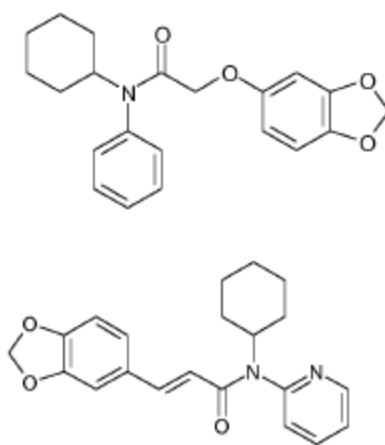
Los moduladores adecuados pueden actuar en este caso ya sea solamente como antagonista o como agonista o tanto en calidad de antagonista como también en calidad de agonista. En esto pueden establecerse principalmente un efecto agonista o un efecto antagonista dependiendo de la respectiva concentración seleccionada del modulador.

Un "agonista" es en este caso un compuesto que proporciona una activación del receptor de TRPM8, es decir que induce una corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas sensibles al frío y, por lo tanto, proporciona una sensación de frío. Un "antagonista" es, por el contrario, un compuesto que puede contrarrestar esta activación del receptor de TRPM8.

Los mediadores según la invención pueden ejercer su efecto uniéndose de manera reversible o irreversible, de manera específica o no específica, a una molécula del receptor de TRPM8. Habitualmente, el enlazamiento se efectúa de modo no covalente por medio de interacciones iónicas y/o no iónicas como, por ejemplo, hidrófugas, con la molécula del receptor. Aquí, "específica" comprende tanto la interacción exclusiva con una o varias moléculas diferentes de receptor de TRPM8 (como, por ejemplo, moléculas de TRPM8 de diferente procedencia o diferentes isoformas). Por el contrario, "no específica" es una interacción del modulador con varias moléculas diferentes de receptor de diferente función y/o secuencia, aunque puede establecerse como consecuencia una modulación agonista y/o antagonista deseada (como se ha descrito antes) del receptor de TRPM8.

**2. Formas preferidas de realización**

Un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la modulación in vitro del receptor de TRPM8 de mentol frío, principalmente del receptor de TRPM8 humano, en el cual el receptor se pone en contacto con al menos un compuesto que se selecciona entre los compuestos de las fórmulas



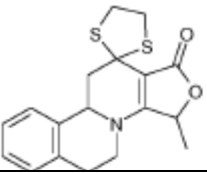
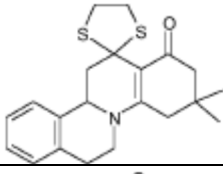
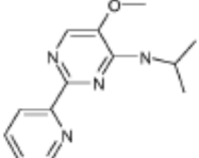
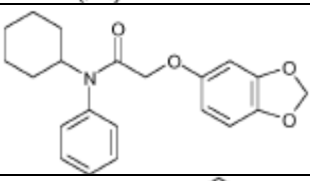
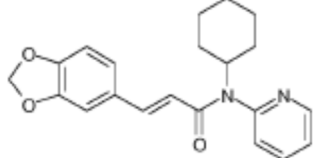
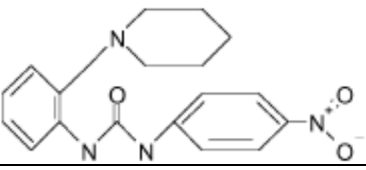
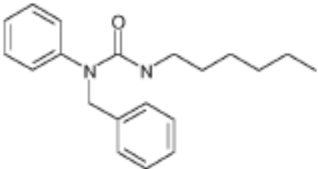
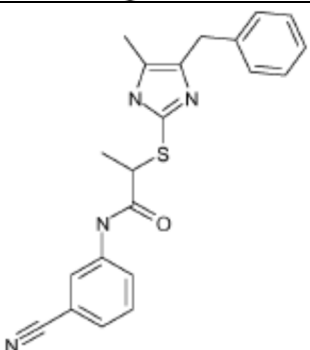
los cuales en un ensayo de actividad celular, principalmente en condiciones estándar, usando células que expresan de modo recombinante el receptor de TRPM8 humano, modulan la permeabilidad de estas células para iones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por "condiciones estándar" se entiende en este contexto un ensayo de actividad que se lleva a cabo con células de HEK293 las cuales han sido transformadas con TRPM8 humano y se cargan con un colorante sensible al calcio (tal como, por ejemplo, Fluo-4AM, es decir éster de Fluo-4-acetoximetilo), adición subsiguiente del compuesto de prueba

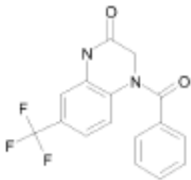
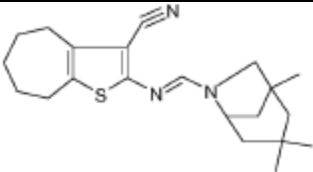
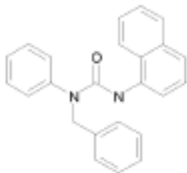
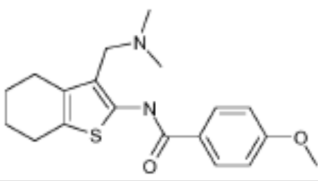
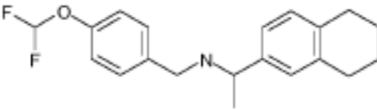
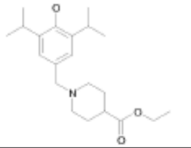
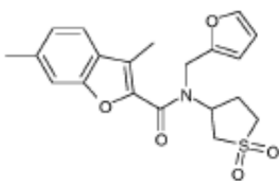
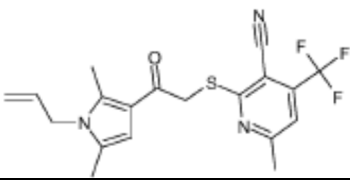
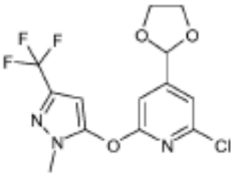
y detección del cambio de color, en cuyo caso la realización del ensayo se efectúa a 37 °C, tal como se describe, por ejemplo, más abajo, en el ejemplo 3, o en Behrendt et al (2004) en el lugar citado).

5 Los moduladores empleados de acuerdo con la invención actúan en este caso de manera agonista o antagonista sobre la permeabilidad celular de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . El modulador es principalmente al menos un compuesto seleccionado entre los compuestos de las siguientes fórmulas 4 y 5, según la siguiente tabla 1 (los compuestos de las fórmulas 1-3, así como 6-19 son ejemplos de referencia).

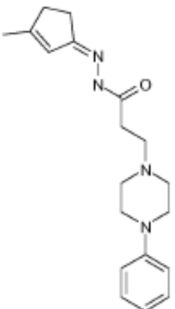
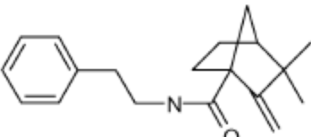
**Tabla 1:** Moduladores según la invención y ejemplo de referencia

|   |                                                                                      |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 |     |
| 2 |     |
| 3 |    |
| 4 |  |
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |

(continuación)

|    |                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 9  |     |
| 10 |    |
| 11 |     |
| 12 |   |
| 13 |  |
| 14 |   |
| 15 |   |
| 16 |  |
| 17 |   |

(continuación)

|    |                                                                                   |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 18 |  |
| 19 |  |

en este caso el compuesto puede estar presente en forma químicamente pura o en forma enriquecida, como un estereoisómero individual o en forma de mezclas de estereoisómeros. Además, los compuestos pueden estar presentes descargados o en forma de sus sales, tales como, por ejemplo, sales de adición de ácido. Los grupos funcionales pueden reemplazarse opcionalmente por grupos químicos equivalentes; los átomos de flúor pueden reemplazarse, por ejemplo, por otros átomos de halógeno tales como Cl, Br o I; los grupos que contienen oxígeno (como, por ejemplo, grupos éter) pueden reemplazarse por correspondientes grupos que contienen azufre y viceversa; los grupos cetona pueden reemplazarse por los correspondientes grupos tionilo. Los compuestos antes mencionados son sustancias químicas conocidas *per se* que se encuentran disponibles para comprar o son accesibles aplicando procedimientos habituales de la síntesis orgánica.

Por lo tanto, son conocidos, por ejemplo:

Compuesto 1 bajo el número CAS: 99602-94-5 (forma 3R-cis)

Compuesto 2 bajo el número CAS: 165753-08-2

Compuesto 3 bajo el número CAS: 338771-57-6

Compuesto 4 bajo el número CAS: 878942-21-3

Compuesto 5 bajo el número CAS: 748783-13-3

Las formas modificadas o los derivados también se denominan análogos funcionales o compuestos equivalentes funcionales si muestran además la actividad biológica deseada (modulación del receptor de TRPM8).

Además, en el contexto de la invención se abarcan particularmente los derivados que permiten un acoplamiento de las sustancias concretamente divulgadas a soportes sólidos; el experto en la materia conoce una gran selección de los grupos correspondientes de conector/espaciador. La derivatización puede efectuarse en este caso antes del acoplamiento a una fase sólida o sólo mediante el acoplamiento.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador, principalmente de agonistas, para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como se ha definido antes, para la inducción de sensación de frío, principalmente a nivel tópico, es decir cutáneo u oral, en una persona y/o un animal. Se presenta una "inducción de sensación de frío" si el compuesto muestra un efecto agonista en el ensayo de actividad celular descrito antes sobre hTRPM8.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como se ha definido antes, en calidad de componente activo de un producto farmacéutico.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como ha sido definido antes, para el tratamiento de carcinomas de próstata, para el tratamiento de debilidades de la vejiga o en la terapia de dolor.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como se ha definido antes, en calidad de repelente de insectos o insecticida.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como se ha definido antes, para la inducción de una sensación de frío en el caso de embalajes (por ejemplo,

de papel o de plástico en diferentes formas de tratamiento, tales como, (por ejemplo, fibras, tejidos, piezas moldeadas), y la sensación de frío se hace notable al contacto con el material de embalaje. En este caso las sustancias pueden asociarse de la manera más diversa con el material de embalaje: por ejemplo, mediante la técnica de spin-coating (recubrimiento por rotación), de estampado, en forma de microencapsulamiento, mediante incorporación directa al material de embalaje (por ejemplo, mediante extrusión), acoplamiento covalente de derivados adecuados de los moduladores (mediante grupos adecuados espaciadores/conectores, con cuya ayuda la molécula se enlaza de modo reversible o irreversible al material de embalaje). El experto en la materia conoce procedimientos de operación adecuados.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador es tal como se ha definido antes, para la inducción de una sensación de frío en el caso de textiles. En este caso, las sustancias pueden asociarse con el textil de las maneras más diversas: por ejemplo, mediante recubrimiento por rotación, estampado, en forma de microencapsulamiento, mediante incorporación directa al material textil (por ejemplo, mediante extrusión), acoplamiento covalente de derivados adecuados de los moduladores (mediante grupos adecuados espaciadores/conectores, con cuya ayuda la molécula se enlaza de modo reversible o irreversible al material de embalaje). El experto en la materia conoce los procedimientos de trabajo adecuados.

Otro objeto de la invención se refiere a sustancias *per se* según la definición anterior para el uso como mediadores, principalmente agonistas y/o antagonistas, del receptor de TRPM8 en un medicamento. Otro objeto de la invención se refiere a productos que contienen al menos un compuesto según la definición anterior.

Tales productos se seleccionan principalmente entre

a) agentes farmacéuticos tales como agentes antitumorales, agentes para el tratamiento de enfermedades de la vejiga, analgésicos;

b) productos nutricionales como helado, mousse, crema, bebidas, productos de confitería,

c) productos para el cuidado de la piel tales como dentífrico, enjuagues bucales, gomas de mascar, productos para refrescar el aliento

d) productos para el cuidado de la piel y del cabello tales como protectores solares, cremas para quemaduras por el sol, lociones, champús, apósitos, enjuagues bucales, lociones, cremas de afeitar, acondicionadores, limpiadores para la cara, jabones, aceites de baño y espumas de baño, productos antitranspirantes, desodorantes,

e) repelentes de insectos, insecticidas.

Los productos de este tipo contienen, además de los componentes habituales respectivos para los productos respectivos, una cantidad efectiva de al menos un modulador según la invención. "Efectiva" significa en este contexto una concentración del modulador que es suficiente para proporcionar el efecto deseado al aplicarse (por ejemplo, aplicarse sobre la piel), tal como, por ejemplo, un efecto farmacológico o un efecto sensorial como, por ejemplo, el efecto olfatorio de frío.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden combinarse opcionalmente con otros principios activos conocidos, principalmente incluso con aquellos que tienen un efecto comparable. Por ejemplo, estos pueden combinarse con compuestos de enfriamiento conocidos tales como, por ejemplo, mentol, mentona, N-etil-p-mentancarboxamida (WS-3), N-2,3-trimetil-2-isopropilbutanamida (WS-23), lactato de mentilo (Frescolat® ML), acetal de mentona-glicerina (Frescolat® MGA), succinato de mono-mentilo (Physcool®), glutarato de mono-mentilo, O-mentilglicerina, succinamato de mentil-N,N-dimetilo.

Además, son objeto de la invención los productos textiles tales como camisas, pantalones, calcetines, toallas, acabados (principalmente en la superficie) con al menos un compuesto según la definición anterior.

Además, son objeto de la invención los materiales de embalaje que se asocian con al menos un compuesto según la definición anterior.

Ahora la invención se describirá por medio de los siguientes ejemplos no limitantes de realización.

#### **Parte experimental:**

##### **Ejemplo 1 -Clonación de TRPM8 humano**

El punto inicial para la clonación del receptor de TRPM8 humano es una biblioteca de ADNc LnCaP. Por ejemplo, esta se encuentra disponible comercialmente (por ejemplo, la compañía BioChain, Hayward, Estados Unidos de América) o puede producirse a partir de la línea celular de adenocarcinoma de próstata humana sensible a andrógeno LnCaP (por ejemplo, ATCC, CRL1740 o ECACC, 89110211) usando kits estandarizados.

La secuencia de TRPM8 codificante (cf. Fig.1A; así como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=109689694>) puede amplificarse mediante PCR usando procedimientos estándar y clonarse. El gen de TRPM8 humano aislado ácido aislado para la preparación del plásmido plnd\_M8, cuya construcción se ilustra por medio del mapa de plásmidos según la figura 2.

- 5 Como alternativa a esto, el gen de TRPM8 también puede prepararse sintéticamente.

### Ejemplo 2 -Generación de las células de ensayo HEK293

Como sistema de células de ensayo ha sido preparada la línea celular HEK293 establemente transfectada con el ADN de TRPM8 humano (cf. el plásmido plnd-M8 anterior). En este caso se prefiere HEK293 que ofrece la posibilidad, a través del plásmido introducido, de inducir la expresión de TRPM8 mediante tetraciclina.

- 10 Los procedimientos para preparar sistemas de células de ensayo adecuados son conocidos por el experto en la materia. Por lo tanto, la preparación de las células usadas según la invención puede tomarse de las indicaciones en Behrendt H.J. et al." Br. J. Pharmacol. 141, 2004, 737-745 o la disertación de Behrendt "Vergleichende funktionale Untersuchungen des Hitze-Capsaicin-Rezeptors (TRPV1) und des Kälte-Menthol-Rezeptors (TRPM8) in rekombinanten und nativen Zellssystemen" ["Investigaciones funcionales comparativas del receptor de capsaicina de calor (TRPV1) y del receptor de mentol de frío (TRPM8) en sistemas celulares recombinantes y nativos"], a la cual  
15 puede accederse en <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/BehrendtHansJoerg/diss.pdf>. A la divulgación de estas publicaciones se hace referencia de manera expresa.

### Ejemplo 3- Ensayo en moduladores de TRPM8

- 20 Se realiza un ensayo comparable con ella descrito en la literatura por Behrendt H.J. et al., Br. J. Pharmacol. 141, 2004, 737-745. La agonización o antagonización del receptor pueden cuantificarse por medio de un colorante sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  (por ejemplo, FURA, Fluo-4 etc.). Los agonistas provocan solos un incremento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ ; en presencia de mentol, los antagonistas provocan, por ejemplo, una reducción de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ - (detectada respectivamente mediante el colorante Fluo-4, el cual tiene otras propiedades fluorescentes gracias a  $\text{Ca}^{2+}$ ).

a) Procedimiento del ensayo:

- 25 Primero se prepara, de manera conocida *per se*, un cultivo fresco de células de HEK transformadas en frascos de cultivo celular. Las células para ensayo HEK293-TRPM8 se desprenden de los frascos de cultivo celular por medio de tripsina y se siembran 40.000 células/pozo con 100  $\mu\text{l}$  de medio en placas de 96 agujeros (Greiner # 655948 recubiertos con poli-D-lisina). Para la inducción del receptor de TRPM8, al medio de crecimiento se le adiciona la tetraciclina (DMEM/HG, 10 % FCS sin tetraciclina, L-glutamina de 4 mM, 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de blasticidina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de higromicina B, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tetraciclina). Al día siguiente, las células se cargan con el colorante Fluo-4AM y se realiza  
30 el ensayo para esto se procede tal como sigue:

-adición de a 100  $\mu\text{l}$ /pozo de solución colorante Ca-4 Kit (RB 141, Molecular Devices) a cada 100  $\mu\text{l}$  de medio (DMEM/HG, 10 % FCS sin tetraciclina, L-glutamina de 4 mM, 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de blasticidina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de higromicina B, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tetraciclina)

- 35 - incubación en la incubadora, 30 Minuten / 37°C / 5 % de  $\text{CO}_2$ , 30 minutos/temperatura ambiente

-preparación de las sustancias de ensayo (diferentes concentraciones en 200  $\mu\text{l}$  de regulador de pH HBSS), así como de controles positivos (diferentes concentraciones de mentol, icilina y de ionomicina en 200  $\mu\text{l}$  de regulador de pH HBSS) y controles negativos (sólo 200  $\mu\text{l}$  de regulador de pH HBSS)

- 40 -adición de las sustancias para ensayo en cantidades de 50  $\mu\text{l}$ /pozo y medición del cambio de fluorescencia (por ejemplo, en el aparato de ensayo FLIPR, Molecular Devices o NovoStar, BMG) a 485 nm de excitación, 520 nm de emisión, y evaluación de la efectividad de las diversas sustancias/concentraciones y determinación de los valores de EC50

Las sustancias para ensayo se emplean por triplicado en concentraciones de 0,1 -200  $\mu\text{M}$  en el ensayo. Normalmente, los compuestos se mantienen listos en soluciones de DMSO y se diluyen a una concentración  
45 máxima de DMSO de 2 % para el ensayo.

b) Resultado del ensayo

Los valores de EC50 determinados de los moduladores según la invención se recopilan en la siguiente tabla 2.

**Tabla 2:** Actividad de sustancias de ensayo en el receptor humano TRPM8

| # | Actividad TRPM8 EC50 |
|---|----------------------|
| 1 | 0,4                  |
| 2 | 2                    |
| 3 | 2                    |

(continuación)

| #  | Actividad TRPM8 EC50 |
|----|----------------------|
| 4  | 2,5                  |
| 5  | 2,5                  |
| 6  | 3,5                  |
| 7  | 4                    |
| 8  | 5                    |
| 9  | 10                   |
| 10 | 10                   |
| 11 | 10                   |
| 12 | 10                   |
| 13 | 10                   |
| 14 | 20                   |
| 15 | 20                   |
| 16 | 25                   |
| 17 | 50                   |
| 18 | 100                  |
| 19 | 100                  |

La evaluación muestra de manera sorprendente que según la invención fue posible por primera vez preparar agonistas de TRPM8 los cuales difieren significativamente en términos estructurales de los agonistas conocidos hasta ahora, tales como (-) mentol, icilina y otros moduladores descritos por Behrendt H.J. et al., in Br. J. Pharmacol. 141, 2004, 737-745 (cf. la tabla 1 de allí) y, además, en algunos casos muestran mejores actividades que (-) mentol, o son comparativamente tan efectivos como icilina.

#### Ejemplo 4 -Preparación de un enjuague bucal

Se prepara un enjuague bucal de la siguiente composición:

Etanol 95 % 177 mL

Sorbitol 70 % 250 g

Agonistas de TRPM8 según la Tab.2

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| como solución al 1 % en etanol | 50 mL   |
| aceite de menta,               | 0,30 g  |
| salicilato de metilo           | 0,64 g  |
| eucaliptol                     | 0,922 g |
| timol                          | 0,639 g |
| ácido benzoico                 | 1,50 g  |

Pluronic ® F127

|                        |        |
|------------------------|--------|
| tensioactivo no iónico | 5,00 g |
| sacarina de sodio      | 0,60 g |
| citrato de sodio       | 0,30 g |
| ácido cítrico          | 0,10 g |

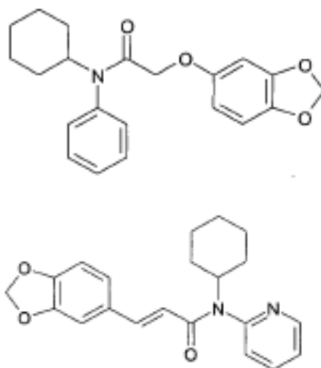
agua q.s. 1 litro

Para la preparación de un enjuague bucal se mezclan entre sí los componentes antes descritos en las cantidades indicadas.

Aquí se hace referencia de manera expresa a la divulgación de las citas bibliográficas citadas en el presente documento.

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la modulación in vitro del receptor de mentol frío TRMP8, en donde se pone en contacto el receptor con al menos un compuesto que se selecciona de los compuestos de las fórmulas



- 5 los cuales, en un ensayo de actividad celular, usando células que expresan de manera recombinante el receptor de TRPM8 humano, modulan la permeabilidad de estas células para iones  $\text{Ca}^{2+}$ .
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el modulador actúa de modo agonista o antagonista en la permeabilidad celular de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 10 3. Uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en donde el modulador se define según la reivindicación 1, para la inducción de la sensación de frío en una persona y/o un animal.
4. Uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en cuyo caso el modulador se define según la reivindicación 1, como un componente activo de un producto farmacéutico.
5. Modulador para el receptor de TRPM8, en donde el modulador se define según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de carcinomas de próstata, para el tratamiento de debilidades de vejiga y en la terapia del dolor.
- 15 6. Uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en donde el modulador se define según la reivindicación 1, como repelente de insectos o insecticida.
7. Uso de un modulador para el receptor de TRPM8, en donde el modulador se define según la reivindicación 1, para la inducción de una sensación de frío en un embalaje o en un textil.
8. Sustancia según la definición en la reivindicación 1 para usar como medicamento.
- 20 9. Producto que contiene en mezcla con componentes habituales al menos un compuesto según la reivindicación 1.
10. Producto según la reivindicación 9, seleccionado entre
  - a) agentes farmacéuticos tales como agentes antitumorales, agentes para el tratamiento de enfermedades de la vejiga, analgésicos;
  - b) productos nutricionales como helado, mousse, cremas, bebidas, productos de confitería,
  - 25 c) productos para el cuidado bucal tales como dentífrico, enjuague bucal, goma para mascar,
  - d) productos para el cuidado de la piel o para el cuidado del cabello tales como cremas solares, cremas para quemaduras por el sol, champús, apósitos,
  - e) repelentes de insectos, insecticidas.
- 30 11. Productos textiles tales como camisas, pantalones, calcetines, toallas, acabados con al menos un compuesto según la reivindicación 1.
12. Material de embalaje que está asociado a al menos un compuesto según la reivindicación 1.

ORIGEN

1 aagaaaatcc tgcttgacaa aaacccgtcac ttaggaaaag atgtcccttc gggcagccag  
 61 gctcagcatg aggaacagaa ggaatgacac tctggacagc acccgacccc tgtactccag  
 121 cgcgtctcgg agcacagact tgtcttacag tgaaagcgac ttggtgaatt ttattcaagc  
 181 aaatttttaag aaacgagaat gtgtcttctt taccaaagat tccaaggcca cggagaatgt  
 241 gtgcaagtgt ggctatgccc agagccagca catggaagge acccagatca accaaagtga  
 301 gaaatggaac tacaagaaac acaccaagga atttctctacc gacgcctttg gggatattca  
 361 gtttgagaca ctggggaaga aagggaagta tatacgtctg tcttgcgaca cggacgcgga  
 421 aatccttttac gagctgctga cccagcactg gcaectgaaa acacccaacc tgggtcatttc  
 481 tgtgaccggg ggccccaaga acttcgcctt gaagccgcgc atgcccgaaga tcttcagccg  
 541 gctcatctac atcgcgcagt ccaaaggtgc ttggattctc acgggaggga cccattatgg  
 601 cctgatgaag tacatcgggg aggtggtgag agataacacc atcagcagga gttcagagga  
 661 gaataattgtg gccattggca tagcagcttg gggcatggtc tccaaccggg acacccctcat  
 721 caggaattgc gatgctgagg gctatttttt agcccagtag cttatggatg acttcacaag  
 781 agatccactg tatatcctgg acaacaacca cacacatttg ctgctcgtgg acaatggctg  
 841 tcatggacat cccactgtcg aagcaaaagt ccggaatcag ctagagaagt atatctctga  
 901 gcgcactatt caagattcca actatggtgg caagatcccc attgtgtgtt ttgcccagg  
 961 aggtggaaaa gagactttga aagccatcaa tacctccatc aaaaataaaa ttccttgggt  
 1021 ggtggtggaa ggctcggggc agatcgttga tgtgatcgt agcctggtgg aggtggaggga  
 1081 tgccctgaca tcttctgcgg tcaaggagaa gctggtgcgc tttttacccc gcacgggtgc  
 1141 ccgctgctt gagaggaga ctgagagttg gatcaaatgg ctcaaagaaa ttctcgaatg  
 1201 ttctcaccta ttaacagtta ttaaaatgga agaagctggg gatgaaattg tgagcaatgc  
 1261 catctcctac gctctataca aagccttcag caccagtgag caagacaagg ataactggaa  
 1321 tgggcagctg aagcttctgc tggagtggaa ccagctggac ttagccaatg atgagatttt  
 1381 caccaatgac cgcgatggg agtctgttga ccttcaagaa gtcagtgtta cggctctcat  
 1441 aaaggacaga cccaagtgtg tccgcctctt tctggagaat ggcttgaaac tacggaagt  
 1501 tctcacccat gatgtcctca ctgaactctt ctccaaccac ttcagcacgc ttgtgtaccg  
 1561 gaatctgcag atcgccaaga attcctataa tgatgccttc ctacgtttg tctggaaact  
 1621 ggttgcgaaac ttccgaagag gcttccggaa ggaagacaga aatggccggg acgagatgga  
 1681 catagaactc cagcagctgt ctctatttac tggcacccc ctgcaagctc tcttcacttg  
 1741 ggccattctt cagaataaga aggaactctc caaagtcat tgggagcaga ccaggggctg  
 1801 cactctggca gccctgggag ccagcaagct tctgaagact ctggccaaag tgaagaacga  
 1861 catcaatgct gctggggagt ccgaggagct ggctaagtga tacgagaccc ggcctgttga  
 1921 gctgttctact gagtgttaca gcagcgatga agacttggca gaacagctgc tgggtctatc  
 1981 ctgtgaagct tggggtggaa gcaactgtct ggagctggcg gtggaggcca cagaccagca  
 2041 ttctcatcgcc cagcctgggg tccagaattt tctttctaag caatggtatg gagagatttc  
 2101 ccgagacacc aagaactgga agattatcct gtgtctgttt attataccct tgggtgggctg  
 2161 tggctttgta tcatttagga agaaacctgt cgacaagcac aagaagctgc tttgggtacta  
 2221 tgtggcggtc ttacctccc cttctcctgg aatgtgtgtt aatgtgtgtt tctacatgc  
 2281 ctctcctctg ctgtttgctt acgtgtgtgt catggatttc cattcggtgc cacaccccc  
 2341 cgagctggtc ctgtactgc tgggtctttgt cctctctgtg gatgaagtga gacagtggta  
 2401 cgtaaatggg gtgaattatt ttactgacct gtggaatgtg atggacacgc tggggctttt  
 2461 ttacttcata gcaggaaattg tatttcggct ccaactctct aataaaagct ctttgtatc  
 2521 tggacagagtc attttctgtc tggactacat tattttcact ctaagattga tccacatttt  
 2581 tactgtaagc agaaacttag gacccaagat tataatgctg cagaggatgc tgatcgatgt  
 2641 gttctctctc ctgttctctt ttgcgtgtgt gatggtggcc tttggcggtg ccaggcaagg  
 2701 gatccttagg cagaatgagc agcgtggag gtggatattc cggttcggtc tctacagacc  
 2761 ctacctggcc atgttcggcc aggtgcccag tgacgtggat ggtaccacgt atgactttgc  
 2821 ccaactgcacc ttactggga atgagtcaca gccactgtgt gtggagctgg atgagcaca  
 2881 cctgccccgg ttccccaggt ggatcaccat cccctggtg tgcactctca tgttatccac  
 2941 caacatcctg ctggtcaacc tgcgtgtgc catgtttggc tacacggtg gcaacgtcca  
 3001 ggagaacaat gaccaggtct ggaagtcca gaggtacttc ctggtgcagg agtactgcag  
 3061 ccgctccaat atcccttcc cttcatcgt cttcgttac ttctacatgg tggtaagaa  
 3121 gtgcttcaag tgttctgca aggagaaaaa catggagtct tctgtctgtt gtttcaaaaa  
 3181 tgaagacaat gagactctgg catgggaggg tgtcatgaag gaaaactacc ttgtcaagat  
 3241 caacacaaaa gccaacgaca cctcagagga aatgaggcat cgatttagac aactggatc  
 3301 aaagcttaat gatctcaagg gtctctgtaa agagattgct aataaaatca aataaaactg  
 3361 tatgaactct aatggagaaa aatctaatta tagcaagatc atattaagga atgctgatga  
 3421 acaattttgc tatcgactac taaatgagag attttcagac ccctgggtac atgggtgatg  
 3481 attttaaaac accctagtgt gctgagacct tgagaataaa gtgtgtgatt ggtttcatc  
 3541 ttgaagacgg atataaagga agaataattt ctttatgtgt ttctccagaa tgggtgctgt  
 3601 ttctctctgt gtctcaatgc ctgggactgg aggttgatag ttttaagtgt ttcttaccgc  
 3661 ctcttttttc ctttaatttt atttttgatg aacacatata taggagaaca tctatcctat  
 3721 gaataagaac ctggtcatgc tttactctct tattgttatt ttgttcattt ccaattgatt

```

3781 ctctactttt cctttttttg tattatgtga ctaattagtt ggcatattgt taaaagtctc
3841 tcaaatttag ccagattcta aaacatgctg cagcaagagg acccgcctct cttcaggaaa
3901 agtggttttca tttctcagga tgcttcttac ctgtcagagg aggtgacaag gcagtcctct
3961 gctctcttgg actcaccagg ctcttattga aggaaccacc cccattccta aatatgtgaa
4021 aagtcgcca aaatgcaacc ttgaaaggca ctactgactt tggtcttatt ggatactcct
4081 cttattattt ttccattaaa aataatagct ggctattata gaaaatttag accatacaga
4141 gatgtagaaa gaacataaat tgtccccatt accttaaggt aatcactgct aacaatttct
4201 ggatgggttt tcaagtctat tttttttcta tgtatgtctc aattctcttt caaaatttta
4261 cagaatgtta tcatactaca tatatacttt ttatgtaagc tttttcactt agtattttat
4321 caaatatgtt tttattatat tcatagcctt cttaaaccatt atatcaataa ttgcataata
4381 ggcaacctct agcgattacc ataattttgc tcattgaagg ctatctccag ttgatcattg
4441 ggatgagcat ctttgtgcat gaatcctatt gctgtatttg ggaaaatttt ccaagggttag
4501 attccaataa atatctattt attattaaat attaaaatat ctatttatta ttaaaacat
4561 ttataaggct ttttcataaa tgtatagcaa ataggaatta ttaacttgag cataagatat
4621 gagatacatg aacctgaact attaaaataa aatattatat ttaacctta gtttaagaag
4681 aagtcaatat gcttatttta atattatgga tgggtggcag atcacttgag gtcaggagtt
4741 cgagaccagc ctggccaaca tggcaaaacc acatctctac taaaaataaa aaaatttagct
4801 ggggtgtgtg gtgcactcct gtaatccag ctactcagaa ggctgaggta caagaattgc
4861 tggaaacctg gaggcggagg ttgcagtga ccaagattgc accactgcac tccagccggg
4921 gtgacagagt gagactccga ctgaaaataa ataaataaat aaataataa ataaataat
4981 attatggatg gtgaaggga tggtatagaa ttggagagat tatcttactg aacacctgta
5041 gtcccagctt tctctggaag tggctgtatt tgagcaggat gtgcacaagg caattgaaat
5101 gcccataatt agtttctcag ctttgaatac actataaact cactggctga aggaggaaat
5161 tttagaagga agctactaaa agatctaatt tgaaaaacta caaaagcatt aactaaaaaa
5221 gtttattttc cttttgtctg ggcagtatg aaaataacta ctcaacaat tcaactatgtt
5281 tgcagaagat taacacaaat aaaagatgcc tttttactta aacaccaaga cagaaaaactt
5341 gcccaatact gagaagcaac ttgcattaga gagggaaactg ttaaatgttt tcaaccagct
5401 tcatctggtg gatgtttttg caggttactc tgagaatttt gcttatgaaa aatcattatt
5461 tttagtgtag ttcacaataa tgtattgaac atacttctaa tcaaagggtc tatgtccttg
5521 tgtatggtac taaatgtgtc ctgtgtactt ttgcacaact gagaatcctg cagcttggtt
5581 taatgagtg gttcatgaaa taaataatgg aggaattgtc a

```

**Fig. 1a**

```

/translation="MSFRAARLSMRNRNDTLDSTRITLYSSASRSTDLSESDLVNF
IQANPKKRECVFPTKDSKATENVCKCGYAQSQHMEGTQINQSEKWNYYKHTKEFPTDA
PGDIQFETLGKKGKYIRLSCDTDAEILYELLTQHWHLKT PNLVISVTGGAKNFALKPR
MRKIFSRLIYIAQSKGAWILTGGTHYGLMKYIGEVVRDNTISRSEENIVAIGIAAWG
MVSNRDTLIRNCDAGYFLAQYLMDDFTRDPLYILDNNHTHLLLVDNGCHGHPTVEAK
LRNQLKXYISERTIQDSNYGGKIPVCFQAQGGGKETLKAINTSIKNKIPCVVVEGSGQ
IADVIALSVEVEDALTSSAVKEKLVRLPRTVSRLPBEETESWIKWLKEILECSHLLT
VIKMEEGAGDEIVSNALSYALYKAFSTSEQDKDNWNGQLKLLLEWNQLDLANDEIFTND
RRWESADLQEVMTALIKDRPKFVRLFLENGLNLRKFLTHDVLTELSNHFSTLVYRN
LQIAKNSYNDALLTPVWKLVA NFRRGPRKEDRNGRDEMDELHDVSPITRHPLQALFI
WAILQNKKELSKVIWEQTRGCTLAALGASKLLKTLAKVKNDINAAGESEELANEYETR
AVELPTECYSSDEDLAEQLLVYSCEAWGGSNCLELAVEATDQHFIAQPGVQNFLSKQW
YGEISRDTKNWKIILCLFIIPLVGC GPFVSFRKKPVDKHKLLWYVVAFFTSPFVVSFV
NVVFYIAFLLLFAYVLLMDFHSVPHPELVLYSLVFLFCDEVQRQWYVNGVNYFTDLW
NVMDTLGLFPYFIAGIVFRLHSSNKSSLYSGRVIFCLDYIIFTLRLIHIPTVSRNLGPK
IIMLQRM LIDVFFFLFLFAVWMVAFGVARQGILRQNEQRWRWIFRSVIYEPYLAMEGQ
VPSDVDGTTYDFAHCTFTGNESKPLCVELDEHNLPRPPEWITIPLVCYIMLSTNILLV
NLLVAMPGYTVGTQENNDQVWKQRYFLVQEYCSRLNIPFPFIVFAYPYMVVKKCFK
CCCKEKNMESVCCFKNEDNETLAWEGVMKENYLVKINTKANDTSEENRHRFRQLDTK
LNDLKGLLKEIANKIK"

```

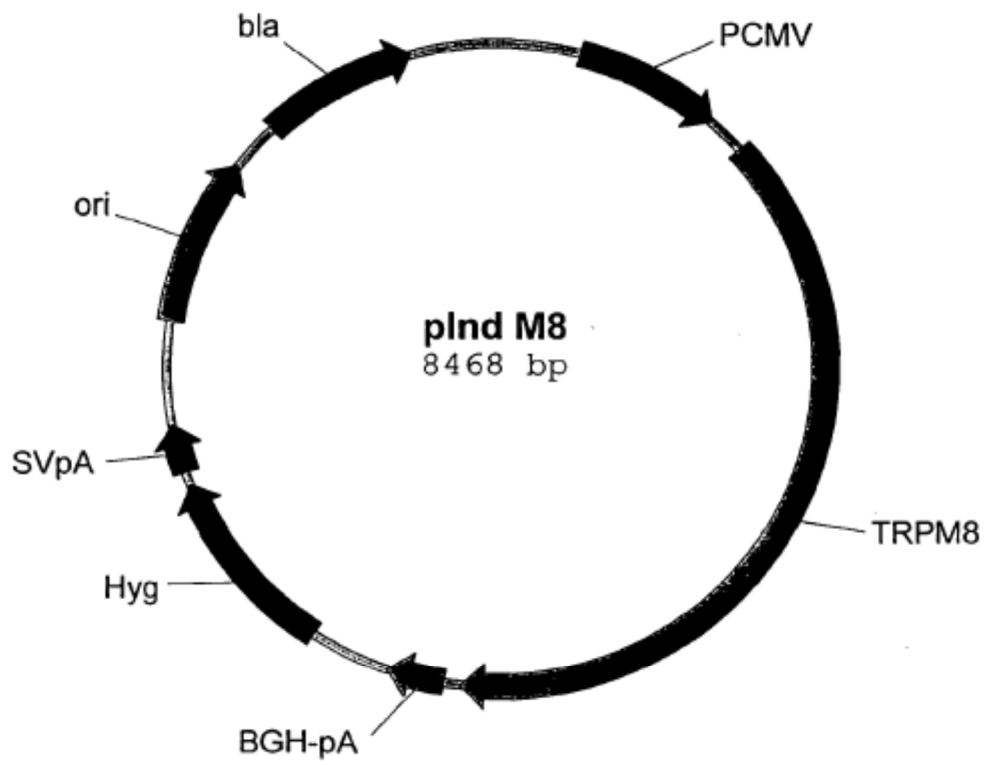


Fig. 2