(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 691 411**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/529 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2007** **E 11180427 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 2394646**

(54) Título: **Uso de bloqueadores de los canales de sodio para el tratamiento del dolor neuropático que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia**

(30) Prioridad:

27.03.2006 EP 06384006
08.12.2006 EP 06025476

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2018

(73) Titular/es:

WEX MEDICAL LIMITED (100.0%)
Unit A, 34/F, Manulife Tower, 169 Electric Road, North Point
Hong Kong, CN

(72) Inventor/es:

BUSCHMANN, HELMUT HEINRICH;
VELA HERNÁNDEZ, JOSÉ MIGUEL y
BAEYENS-CABRERA, JOSÉ MANUEL

(74) Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 691 411 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

Uso de bloqueadores de los canales de sodio para el tratamiento del dolor neuropático que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso del bloqueador de los canales de sodio, tetrodotoxina, así como sus sales aceptables, para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención del dolor neuropático que resulta de la quimioterapia.

Antecedentes de la invención

El tratamiento de las afecciones con dolor es de gran importancia en medicina. Actualmente existe una necesidad mundial de obtener un tratamiento del dolor adicional. El requisito apremiante para un tratamiento específico de las afecciones con dolor o así como un tratamiento de las afecciones con dolor específico que sea apropiado para el paciente, que se debe entender como el tratamiento eficaz y satisfactorio del dolor para los pacientes, está documentado en la gran cantidad de obras científicas que han aparecido recientemente y con el paso de los años en el campo de los analgésicos aplicados o en la investigación básica sobre la nocicepción.

El DOLOR se define por la International Association for the Study of Pain (IASP) como una "experiencia sensorial y psíquica desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o se describe en términos de dicho daño (IASP1 Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 210). A pesar de que el dolor siempre es subjetivo, se pueden clasificar sus causas o síndromes. Especialmente el dolor neuropático que en los últimos años se ha convertido en un importante problema de salud en amplias áreas de la población necesita un tratamiento muy específico, especialmente teniendo en cuenta que cualquier tratamiento de dolor neuropático es extremadamente sensible a las causas detrás del dolor, ya sea el agente/enfermedad lo que finalmente lo provoca o la vía mecanicista sobre la que se desarrolla. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, una sustancia que puede tratar un subtipo de dolor neuropático no puede, o al menos necesariamente no puede, tratar otros subtipos específicos debido a la naturaleza altamente diversa de este síntoma generalizado denominado dolor neuropático.

Por otro lado, el cáncer y el tratamiento del mismo son una de las mayores preocupaciones sobre la salud en el mundo. Además de la cirugía y casi siempre completándolo, la quimioterapia es el procedimiento de elección para controlar o ayudar a los pacientes afectados por carcinomas.

La quimioterapia es el uso de sustancias químicas para tratar la enfermedad y, en el sentido de la presente invención, se refiere principalmente al uso de fármacos citotóxicos (llamados antineoplásicos) para tratar el cáncer. La quimioterapia en el cáncer consiste en una combinación personalizada de potentes antineoplásicos, diseñados para retrasar el rápido crecimiento de tumores cancerosos, reducir los tumores, destruir células cancerosas y prevenir la propagación del cáncer. Los antineoplásicos previenen que las células se repliquen de la manera típica, fuera de control, en la que se dividen las células cancerosas.

La neurotoxicidad periférica es una complicación clínicamente significativa de la quimioterapia contra el cáncer. En el caso de varios de los fármacos más eficaces (por ejemplo, taxanos, vincristina, cisplatino), la neurotoxicidad es limitante de la dosis y a veces obliga a la finalización de un tratamiento de otro modo eficaz (Polomano y Bennett, 2001). Dado que estos fármacos son el tratamiento de elección para una multitud de tumores linfoides y sólidos, cientos de miles de pacientes cada año se ven afectados. Las anomalías sensoriales de la neurotoxicidad provocada por antineoplásicos van desde parestesias leves o disestesias en muchos pacientes hasta una neuropatía periférica dolorosa crónica en un subconjunto (Quasthoff y Hartung, 2002). La aparición y gravedad de la neuropatía depende de la intensidad de dosis única, la duración del tratamiento, la dosis acumulada, el tratamiento previo o simultáneo con otros fármacos neuropáticos y afecciones coexistentes, tales como diabetes y alcoholismo (Alberts *et al*., 1995; Postma *et al*., 1995; Forsyth *et al*., 1997; Quasthoff y Hartung, 2002). Por lo tanto, se sabe que, como resultado de la quimioterapia, en un número considerable de casos se desarrolla dolor neuropático/alodinia/hiperalgesia. Este es un desarrollo muy específico de los síntomas que provienen de la neurotoxicidad del antineoplásico y su tratamiento es crucial para garantizar la calidad de vida de los pacientes que padecen estas consecuencias de la quimioterapia.

Eckel, F. *et al*, Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2002, 127, 78-82 divulga la prevención de la neuropatía inducida por oxaliplatino con carbamazepina.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención fue proporcionar una nueva forma de tratamiento o prevención para el dolor neuropático/alodinia/hiperalgesia que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia.

La presente invención se define mediante el juego de reivindicaciones adjunto.

Es sorprendente que la administración de TTX sea altamente eficaz para el tratamiento o prevención del dolor neuropático/alodinia/hiperalgesia que se desarrolla después de la quimioterapia.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso del bloqueador de los canales de sodio, TTX, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención del desarrollo del dolor neuropático como consecuencia de la quimioterapia.

"Quimioterapia", en el sentido de la presente invención, se define como el uso de un antineoplásico para el tratamiento del cáncer o tumores o neoplasia maligna, respectivamente.

"Que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia" de acuerdo con la presente invención se define como a) que se desarrolla después o con el inicio de la quimioterapia y b) que, por tanto, coincide con o después del uso de un antineoplásico. Por lo tanto, el síntoma que se va a tratar, con toda probabilidad científica, está provocado o se debe a la toxicidad/citotoxicidad, especialmente la neurotoxicidad, del antineoplásico.

Los "antineoplásicos", en el sentido de la presente invención, son compuestos usados en quimioterapia, especialmente los que funcionan alterando la mitosis (división celular), que se dirigen eficazmente a las células que se dividen rápidamente. Como estos fármacos provocan daño a las células, se les denomina citotóxicos. Algunos fármacos hacen que las células sufran apoptosis (el llamado "suicidio celular"). Los antineoplásicos especialmente preferentes, en el sentido de la presente invención, son fármacos derivados de platino, especialmente los derivados de platino cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; alcaloides y terpenos (terpenoides) vegetales.

Los "alcaloides vegetales" (y los terpenoides) son alcaloides derivados de plantas y bloquean la división celular previniendo función de los microtúbulos. Los microtúbulos son vitales para la división celular y sin ellos no se puede producir. Los ejemplos principales son alcaloides de la vinca y taxanos.

Los "alcaloides de la vinca" se unen a sitios específicos en la tubulina, inhibiendo el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos (fase M del ciclo celular). Derivan de la vincapervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* (anteriormente conocida como *Vinca rosea*). Los alcaloides de la vinca incluyen: vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina.

Los "taxanos" derivan del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia.* Los taxanos potencian la estabilidad de los microtúbulos, previniendo la separación de los cromosomas durante la anafase. Los taxanos incluyen: paclitaxel y docetaxel.

A continuación hay una lista de antineoplásicos (por sus marcas comerciales), incluyendo paclitaxel (Taxol®), iressa, gefintinib y xyotax:
Ácido 13-cis-retinoico, 2-CdA, 2-clorodesoxiadenosina, 5-fluorouracilo 5-FU, 6-mercaptopurina, 6-MP, 6-TG 6-tioguanina, abraxano, Accutane ®, actinomicina-D, Adriamycin ®, Adrucil ®, Agrylin ®, Ala-Cort ®, aldesleucina, alemtuzumab, ALIMTA, alitretinoina, Alkaban-AQ ®, Alkeran ®, ácido holo-transretinoico, interferón alfa, altretamina, ametopterina, amifostina, aminoglutetimida, anagrelida, Anandron ®, anastrozol, arabinosilcitosina, ara-C, Aranesp ®, Aredia ®, Arimidex ®, Aromasin ®, Arranon ®, trióxido arsénico, asparaginasa, ATRA, Avastin ®, azacitidina, BCG, BCNU, bevacizumab, bexaroteno, BEXXAR ®, bicalutamida, BiCNU, blenoxano ®, bleomicina, bortezomib, busulfán, Busulfex ®, C225, leucovorina cálcica, Campath ®, Camptosar®, camptotecina-11, capecitabina, carac TM, carboplatino, carmustina, oblea de carmustina, Casodex ®, CC-5013, CCNU (o), CDDP (t), CeeNU (t), cerubidina (t), cetuximab, clorambucilo, cisplatino, factor citrovorum, cladribina, cortisona, cosmegen (t), CPT-11 (o), ciclofosfamida, citadren (t), citarabina, citarabina liposomal, citosar-U (t), Cytoxan ®, dacarbazina, dactinomicina, darbepoetina alfa, daunomicina, daunorrubicina, clorhidrato de daunorrubicina (t), daunorrubicina liposomal, DaunoXome (t), Decadron, Delta-Cortef (t), deltasona (t), denileucina, diftitox, DepoCyt (t), dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, dexasona (t), dexrazoxano, DHAD (o), DIC (t), diodex (t), docetaxel, doxil (t), doxorrubicina, doxorrubicina liposomal, droxia (t), DTIC,

DTIC-Dome (t), Duralon (t), Efudex (t), Eligard (t), Ellence (t), eloxatina (t), Elspar (t), Emcyt (t), epirrubicina, epoetina alfa, erbitux, erlotinib, erwinia L-asparaginasa (t), estramustina, etiol, Etopophos (t), etopósido, fosfato de etopósido (t), eulexina (t), Evista (t), exemestano, Fareston (t), Faslodex (t), Femara ®, filgrastim, floxuridina, fludara (t), fludarabina, fluoroplex (t), fluorouracilo, fluorouracilo (crema), fluoximesterona, flutamida, ácido folínico (o), FUDR (t), fulvestrant, G-CSF (t), gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, Gemzar (t), GleevecTM, oblea de gliadel (t), GM-CSF (o), goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos (t), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (o), halotestina (t), herceptina (t), hexadrol (t), hexaleno (t), hexametilmelamina (t), HMM (t), hicamtina (t), hidrea (t), acetato de hidrocortisona (t), hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, fosfato de hidrocortona (t), hidroxiurea, ibritumomab, ibritumomab tiuxetán, Idamycin ®, Idarubicin Ifex®, IFN-alfa, ifosfamida, IL-11, IL-2, mesilato de Imatinib, imidazol carboxamida, interferón alfa, interferón alfa-2b (conjugado PEG) (o), interleucina - 2 (t), interleucina-11 (o), Intron A® (interferón alfa-2b), Iressa ®, irinotecán, isotretinoina, kidrolasa (t), lanacort (t), L-asparaginasa (t), LCR (o), lenalidomida, letrozol, leucovorina, leucerán (t), leucina (t), leuprolida, leurocristina (o), leustatina (t), Ara-C liposomal (t), pred líquido (t), lomustina, L-PAM (o), L-sarcolisina (o), luprón (t), luprón de efecto prolongado (t), matulano (t), maxidex (t), mecloretamina, clorhidrato de mecloretamina, medralona (t), Medrol ®, megace (t), megestrol, acetato de megestrol (o), melfalán, mercaptopurina, mesna, mesnex (t), metotrexato, metotrexato sódico (o), metilprednisolona, meticorten (t), mitomicina, mitomicina-C (o), mitoxantrona, M-prednisol (t), MTC (o), MTX (o), mustargen (t), mustina, mutamicina (t), mileran (t), milocel (t), milotarg (t), navelbina (t), nelarabina, neosar (t), neulasta (t), neumega (t), neupogén (t), nexavar ®, nilandrón (t), nilutamida, Nipent ®, mostaza nitrogenada (o), novaldex (t), novantrona (t), octreotido, acetato de octreotido (o), oncospar (t), oncovina (t), ontak (t), onxal (t), oprevelcina, orapred (t), orasone (t), oxaliplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a proteína, pamidronato, panretina (t), paraplatina (t), pediapred (t), interferrón PEG, pegaspargasa, pegfilgrastim, INTRÓN PEG (t), PEG-L-asparaginasa, PEMETREXED, pentostatina, melfalán (o), platinol (t), platinol-AQ (t), prednisolona, prednisona, prelona (t), procarbacina, PROCRIT ®, proleucina (t), prolifeprospán 20 con implante de carmustina (t), purinetol (t), raloxifeno, Revlimid ®, reumatrex (t), rituxán (t), rituximab, Roferon-A®, (interferón alfa-2a) rubex (t), clorhidrato de rubidomicina (t), Sandostatin ®, Sandostatin LAR (t), sargramostim, Solu-Cortef (t), Solu-Medrol (t), sorafenib, STI-571, estreptozocina, SU11248, sunitinib, Sutent ®, tamoxifeno, Tarceva ®, targretin (t), Taxol ®, taxotero (t), Temodar ®, temozolomida, tenipósido, TESPA (o), talidomida, Thalomid ®, TheraCys (t), tioguanina, Thioguanine Tabloid (t), tiofosfoamida (o), tioplex (t), tiotepa, TICE ®, toposar (t), topotecan, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoina, trexall (t), trisenox (t), TSPA (o), VCR (o), velbán (t), Velcade ®, VePesid (t), vesanoid (t), viadur (t), vidaza (t), vinblastina, sulfato de vinblastina (o), Vincasar Pfs (t), vincristina, vinorelbina, tartrato de vinorelbina (o), VLB (o), VM-26 (o), VP-16 (t), vumon (t), Xeloda ®, xiotax, zanosar (t), zevalina TM1 Zinecard (t), Zoladex ®, ácido zoledrónico, Zometa ®.

Además, hay otra lista de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer (principalmente como quimioterápicos):

(como marcas comerciales): Aldara, Alimta, Androcur, Arimidex, Borea, Caelyx, Campto, Casodex, Decapeptyl, Eloxatin, Eutirox, Faslodex, Femara, Gemzar, Gonapeptyl, Grisetin, Herceptin, Isovorin, Lysodren, Megefren, Metvix, Navelbine, Novaldex, Novantrone, Paraplatin, Procrin, Prostacur, Suprefact, Tamoxifeno Funk, Taxol, Taxotere, Testex, Elmu/Prolongatum, Tomudex, Utefos, Vepesid, Xeloda, Zoladex;
(como compuestos activos): anastrozol, bicalutamida, buserelina, capetabina, cisplatino, carboplatino, desoxorrubicina, docetaxel, etopósido, fulvestrant, gemcitabina, goserelina, irinotecán, letrozol, leuprorelina, megestrol, mitotano, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, raltitrexed, tamoxifeno, tegafur, triptorelina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina.

Paclitaxel (Taxol®) es uno de los fármacos antineoplásicos más eficaces y de uso común para el tratamiento de tumores sólidos. Tiene dos efectos secundarios graves, mielosupresión y neurotoxicidad periférica. El factor estimulante de colonias de granulocitos contrarresta eficazmente la neutropenia en la mayoría de los pacientes. Desafortunadamente, no existen tratamientos aceptables para prevenir o minimizar el daño nervioso, lo que hace que la neurotoxicidad sea un efecto secundario limitante de la dosis significativo (Rowinsky *et al.*, 1993a, b; Wasserheit *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 1997). La neurotoxicidad inducida por paclitaxel típicamente se presenta como una neuropatía sensorial, siendo las quejas más comunes entumecimiento, hormigueo, dolor urente y alodinia al frío (Rowinsky *et al.*, 1993a; Chaudhry *et al.*, 1994; Forsyth *et al.*, 1997; Dougherty *et al.*, 2004). Los síntomas sensoriales usualmente comienzan simétricamente en los pies, pero a veces aparecen simultáneamente en ambas manos y pies (Rowinsky *et al.*, 1993a; Quasthoff and Hartung, 2002). Un número clínicamente significativo de pacientes con neuropatía inducida por paclitaxel experimenta dolor neuropático. Por ejemplo, en un estudio de 27 pacientes tratados con dosis de paclitaxel de 135, 175 y 250-300 mg/m^2, se presentaron síntomas neuropáticos en un 50, 79 y 100 % de los pacientes, que progresaron a neurotoxicidad limitante de la dosis en un 0, 21 y 71 % de los pacientes, respectivamente (Postma *et al.*, 1995).

El "dolor neuropático" se define por la IASP como "el dolor iniciado o provocado por una lesión o disfunción primaria en el sistema nervioso" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 210). Para el propósito de la presente invención incluida bajo este encabezado o para tratarse como sinónimo es "dolor neurogénico" que se define por la IASP como "dolor iniciado o provocado por una lesión primaria, disfunción o perturbación transitoria en el sistema nervioso periférico o central". Con respecto a la presente invención, el dolor neuropático tratado de acuerdo o prevenido con respecto a la presente invención se restringe al dolor neuropático que resulta de la quimioterapia, lo que significa que se provoca por el uso de un antineoplásico en quimioterapia. La causa más probable de esto es la neurotoxicidad del antineoplásico, especialmente la neurotoxicidad periférica.

La neurotoxicidad del antineoplásico a menudo conduce a una neuropatía sensorial, que produce un dolor urente y/o alodinia al frío, especialmente alodinia al frío.

El término "análogos" como se usa en la divulgación se define aquí como que significa un compuesto químico que es un derivado de un compuesto que tiene actividad bioquímica similar a ese compuesto. Por ejemplo, los "análogos" de TTX se unen al mismo sitio en la subunidad alfa de los canales de sodio como lo hace TTX.

El término "derivados" como se usa en la divulgación se define aquí como que significa un compuesto químico que ha experimentado una derivación química tal como sustitución o adición de otro grupo químico para cambiar (para uso farmacéutico) cualquiera de sus propiedades físicoquímicas, tales como solubilidad o biodisponibilidad. Los derivados incluyen los llamados profármacos, por ejemplo, derivados de éster y éter de un compuesto activo que produce el compuesto activo *per se* después de su administración a un sujeto.

Los ejemplos de procedimientos bien conocidos de producción de un profármaco de un compuesto de actuación dado conocen por los expertos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Krogsgaard-Larsen *et al*., Textbook of Drug design and Discovery, Taylor & Francis (abril de 2002).

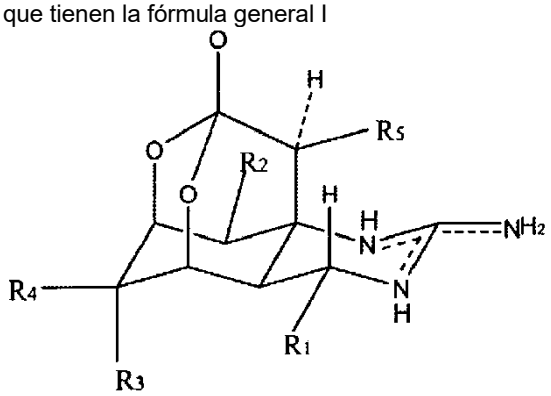
"Bloqueadores de los canales de sodio" o "compuestos que bloquean los canales de sodio" engloban cualquier producto químico que se una selectivamente a un canal de sodio y de ese modo desactive el canal de sodio. En particular, incluyen productos químicos que se unen a los dominios extracelulares SS1 o SS2 de una subunidad alfa de un canal de sodio. Se ha descubierto que los compuestos que bloquean los canales de sodio que se unen a la subunidad SS1 o SS2 de un canal de sodio, particularmente tetrodotoxina y saxitoxina, poseen una actividad farmacéutica similar (documento US 6,407,088).

La tetrodotoxina (de forma alternativa en el contexto de esta aplicación abreviada TTX), también conocida como Ti Qu Duo Xin, es un alcaloide encontrado en el pez globo (*Tetradontiae*). El nombre químico es octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5, 9,7,10a-dimetano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pirimidin-4,7,10,11,12-pentol con fórmula molecular $C_nH_{17}N_3O_8$ y un peso molecular de 319,27. Es una potente neurotoxina no proteica y una herramienta indispensable para el estudio de la neurobiología y la fisiología. La tetrodotoxina (TTX) es una toxina orgánica marina encontrada principalmente en los testículos, ovarios, huevos, hígados, bazos, globos oculares y sangre de peces globo, así como en diversas especies animales, incluyendo peces gobio, tritones, ranas y pulpos de anillos azules e incluso en algas marinas. Se conocen varios procedimientos para producir TTX. Por lo general, TTX se extrae de organismos marinos (por ejemplo, el documento JP 270719 de Goto y Takahashi), pero, además, también se describen (y usan para la preparación de tetrodotoxina en relación con la presente invención) numerosos otros procedimientos de síntesis en los documentos US 6.552.191, US6.478.966, US 6.562.968 o 2002/0086997. Tetrodotoxina es un compuesto bien conocido descrito, por ejemplo, en el documento WO02/22129 como analgésico sistémico. Para una de las muchas descripciones de TTX, se recomienda consultar, por ejemplo, Tu, Anthony (Ed.) Handbook of Natural Toxins, vol. 3: Marine Toxins and Venoms, 1988, 185-210, así como Kao (1966), Pharmacol. Rev. 18:997 - 1049 y otros.

La frase "sus derivados (de tetrodoxina)" como se divulga en el presente documento se define - utilizando la definición del documento US 6.030.974 (incluido aquí por referencia) - en el sentido de compuestos aminoperhidroquinazolina que tienen la fórmula molecular $C_{11}H_{17}N_3O_8$. "Derivados de tetrodoxina" como se divulga en el presente documento abarca compuestos descritos en el documento US 5,846,975 como quinazolinas amino hidrogenadas y derivados incluyendo las sustancias presentadas desde la columna 3, línea 40, hasta la columna 6, línea 40. Los "derivados de tetrodotoxina" ejemplificados específicamente como se divulga incluyen anhidrotetrodotoxina, tetrodaminotoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, desoxitetrodotoxina y ácido tetrodónico, 6 epi-tetrodotoxina, 11-desoxitetrodotoxina, así como los derivados de TTX de tipo hemilactal (por ejemplo, 4-*epi*-TTX, 6-*epi*-TTX, 11-*desoxi*-TTX, 4-*epi*-11-*desoxi*-TTX, TTX-8-O-hemisuccinato, chiriquitoxina, 11-nor-TTX-6(S)-ol, 11-*nor*-TTX-6(R)-ol, 11-nor-TTX-6,6-diol,

11-oxo-TTX y TTX-ácido 11-carboxílico), los derivados de TTX de tipo lactona (por ejemplo, 6-*epi*-TTX (lactona), 11-*desoxi*-TTX (lactona), 11-nor-TTX-6(S)-ol (lactona), 11-*nor*-TTX-6(R)-ol (lactona), 11-nor-TTX-6,6-diol (lactona), 5-*desoxi*-TTX, 5,11-*did*e*soxi*-TTX, 4-*epi*-5, 11-*didroxi*-TTX, 1-*hidroxi*-5,11-*didesoxi*-TTX, 5,6,11-*tridesoxi*-TTX y 4-*epi*-5,6,11-*tridesoxi*-TTX) y los análogos de TTX de tipo 4,9-anhidro (por ejemplo, 4,9-*anhidro*-*TTX,* 4,9-*anhidro*-6-*epi*-TTX, 4,9-*anhidro*-11-*desoxi*-TTX, 4,9-*anhidro*-TTX-8-*O*-hemisuccinato, 4,9-*anhidro*-TTX-11-*O*-hemisuccinato). Los derivados típicos de TTX poseen solo 1/8 a 1/40 de la toxicidad de TTX en ratones, basándose en bioensayos en ratones. Se ha observado que estos derivados producen acción conjunta y no interactúan negativamente. Los ejemplos de derivados de TTX incluyen derivados de TTX novedosos aislados de diversos organismos, así como aquellos que se sintetizan químicamente parcial o totalmente (véase, por ejemplo, Yotsu, M. et al. Agric. Biol. Chem., 53(3):893-895 (1989)).

"Derivados y análogos de TTX", como se hace referencia en la divulgación, pueden incluir compuestos que tienen la fórmula general I



en la que, R_2 y R_5 se pueden seleccionar del grupo que consiste en H, OH, OAC, respectivamente; R_1 puede ser H, o un alquilo con C_1-C_4, OH, OR, OC(O)R', NH_2, NHR", NR"R"', entre ellos R puede ser un alquilo con C_1-C_6, R' puede ser un alquilo con C_1-C_3 y R", R"' puede ser un alquilo con C_1-C_4, respectivamente;

R_3 y R_4 puede ser =O, o

cuando R_3 es H, R_4 se puede seleccionar del grupo que consiste:

-ROH, y R es un alquilo de cadena lineal o ramificado con C_1-C_7,

-CH(OH)NHOMe,

-NAP-gly,

-NAP-en,

-CH_2NH_2,

- CH_2NHCH_3,

-AAG,

-NMAG, y

-ANT;

cuando R_3 es OH o OC(O)R y R es un alquilo con C_1-C_3, R_4 se puede seleccionar del grupo que consiste en:

-CHO,

-CH_2-gly,

-CH_2-P-Ala,

$-CH_2$-Lys,

$-CH_2$-en,

$-CH_2$-NAP-Lys,

$-CH_2$-NAP-en,

$-CH(OH)CH(NH_2)COOH$; y,

$-NH(CH_2)_nCOOH$,

$-NH(CH_2)_nNH_2$; y

$-NH(CH_2)_nCH(NH_2)COOH$,

en la que:

n=1-6.

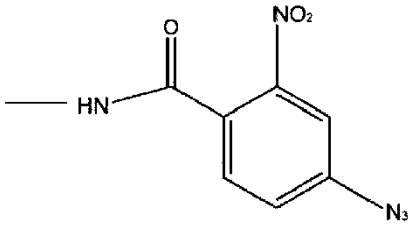
en es etileno;

NAP es amida 4-triazo-2-nitrobenzoica, indicada como fórmula (a);

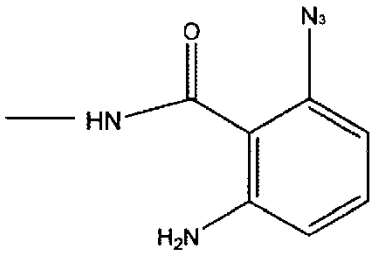
AAG es amida 2-triazo-O-aminobenzoica, indicada como forma (b);

NMAG es amida O-metilaminobenzoica, indicada como fórmula (c);

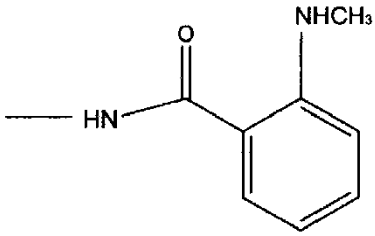
ANT es amida O-aminobenzoica, indicada como fórmula (d);



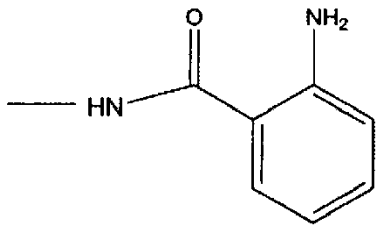
(a)



(b)



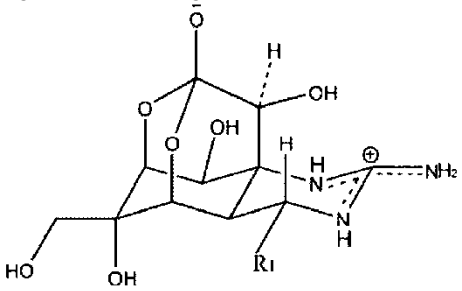
(c)



(d)

Entre ellos, tres tipos de compuestos con la fórmula general II, III, IV son alternativos.

Los compuestos de quinazolina amino hidrogenada y sus derivados son compuestos que tienen la siguiente fórmula general II,

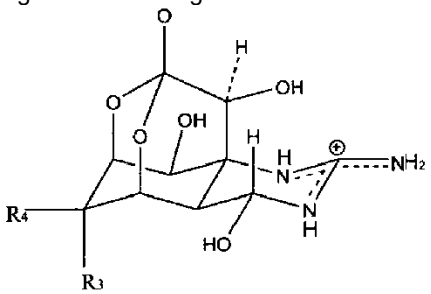


en la que: R_1 se puede seleccionar del grupo que consiste en OH, un alquilo o un oxialquilo con C_1-C_4, NH_2, NHR", NR"R"', entre ellos R" y R"' pueden ser un alquilo con C_1-C_4.

Entre ellos, los compuestos más preferentes son:

Tetrodotoxina R_1 =OH (1);
desoxitetrodotoxina R_1=H (2);

Los compuestos de quinazolina amino hidrogenada y sus derivados son compuestos que tienen la siguiente fórmula general III



en la que:

R_3, R_4 son =O, o

cuando R_3 es H, R_4 se selecciona del grupo que consiste en:

CH_2OH,

CH(OH)NHOMe,

-NAP-gly,

-NAP-en,

$-CH_2NH_2$,

$-CH_2NHCH_3$,

-AAG,

-NMAG, y

-ANT.

Entre ellos, los compuestos más preferentes son:

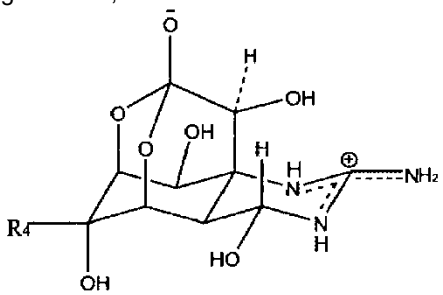
AAG-degradación tetrodotoxina R_4=AAG (3);

NMAG-degradación tetrodotoxins R_4=NMAG (4);

ANT-degradación tetrodotoxina R_4=ANT (5); y,

degradación tetrodotoxina R_3, R_4 es =O (6).

La quinazolina amino hidrogenada y sus derivados son compuestos que tienen la siguiente fórmula general IV,



en la que R4 se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- CHO,
- CH_2-Gly,
- CH_2-β-Ala,
- CH_2-Lys,
- CH_2-en,
- CH_2-NAP-Lys
- CH_2-NAP-en,
- $CH(OH)CH(NH_2)COOH$;
- $NH(CH_2)_4CH(NH_2)COOH$;
- $NHCH_2COOH$;
- $NHCH_2CH_2COOH$; y
- $NHCH_2CH_2NH_2$.

Entre ellos, los compuestos más preferentes son:

oxitetrodotoxina R_4=CHO (7);

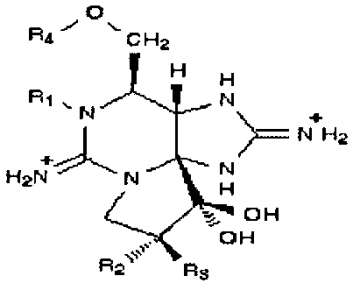
chiriquitoxina R_4=$CH(OH)CH(NH_2)COOH$ (8);

y los compuestos con los grupos sustituidos de R_4:

- $NH(CH_2)_4\ CH(NH_2)COOH$ (9);
- $NHCH_2COOH$ (10);
- $NHCH_2CH_2COOH$ (11); y,
- $NHCH_2\ CH_2\ NH_2$ (12).

Los derivados/análogos de tetrodotoxina como se divulga en el presente documento comprenden tetrodotoxina, anhidrotetrodotoxina, tetrodaminotoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitotexotoxina, desoxitetrodotoxina, epitetrodotoxina y ácido tetrodónico, más preferentemente los derivados/análogos de tetrodotoxina a que consisten en tetrodotoxina, anhidrotetrodotoxina, tetrodaminotoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, desoxitetrodotoxina, epitetrodotoxina (4 y 6-epi-tetrodotoxina) y ácido tetrodónico.

La saxitoxina (STX) y sus sales farmacológicamente aceptables como se divulga en el presente documento son especies de 2,6-diamino-4-((aminocarbonil)oxi)metil-3a,4,8,9-tetrahidro-1H,10H-pirrolo(1,2-c)purina-10,10-diol (3aS-(3a-a-a-4-a,10aR*)). La fórmula molecular de saxitoxina es C $C_{10}H_{17}N_7O_4$, tiene un peso molecular de 299,3 y una estructura general de:



Esta, y sus derivados y sus análogos se pueden usar de acuerdo con la divulgación. La saxitoxina es fácilmente soluble en agua y puede dispersarse en aerosoles. Es tóxica por ingestión y por inhalación, la inhalación dando lugar a un colapso respiratorio rápido y la muerte. Químicamente, la saxitoxina es estable, aunque puede inactivarse mediante tratamiento con álcali fuerte. Es de origen natural, producida por bacterias que crecen en otros organismos, incluidos los dinoflagelados *Gonyaulax catenella* y *G. tamarensis*; que se consumen por la almeja amarilla de Alaska de *Saxidomus giganteus* y el mejillón de mar de California, *Mytilus californianeus*. La toxina se puede aislar de *S. giganteus* o *M. californianeus*. La primera síntesis de STX fue completada por Kishi y colaboradores en Harvard en 1977 (J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 2818). Una segunda síntesis se llevó a cabo por Jacobi y sus colaboradores en Wesleyan University, Connecticut (J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 5594). Una gama de procedimientos alternativos para la síntesis y purificación de saxitoxina será evidente para los expertos en la técnica. Los análogos y derivados de saxitoxina incluyen neosaxitoxina y anhidrosaxitoxina, cualquier otra variante biológicamente activa de la estructura de saxitoxina anterior y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

También se divulga que para los fines expuestos en el presente documento, los derivados de tetrodotoxina o análogos o metabolitos y saxitoxina, y sus derivados o análogos o metabolitos, pueden estar opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato.

En esta solicitud "aproximadamente" significa "alrededor", y de manera ilustrativa, el uso del término "aproximadamente" indica que las dosificaciones ligeramente fuera de los intervalos citados también pueden ser eficaces y seguras, y dichas dosificaciones también están abarcadas por el alcance de las presentes reivindicaciones.

Los compuestos que se administran junto con TTX o en combinación con TTX pueden administrarse como parte de la misma composición, o pueden administrarse por separado, en el mismo momento o en momentos separados, en el mismo régimen terapéutico.

En conexión con la presente invención, "forma neutra" se refiere a una forma no iónica o a una forma cargada netamente de forma neutra, por ejemplo un ión dipolar en su punto isoeléctrico.

El término "sal" de acuerdo con la presente invención debe entenderse que significa cualquier forma del compuesto activo de acuerdo con la invención en la que este compuesto adopta una forma iónica o está cargado y, si corresponde, también está acoplado con un contraión (un catión o anión). Por esto también se debe entender complejos del compuesto activo con otras moléculas e iones, en particular complejos que están complejados por medio de interacciones iónicas. Como ejemplos preferentes de sales, esto incluye acetato, monotrifluoracetato, sal de éster de acetato, citrato, formiato, picrato, bromhidrato, monobromhidrato, monoclorhidrato o clorhidrato. El término "sal fisiológicamente aceptable" en el contexto de la presente invención se entiende que significa una "sal" (como se define anteriormente) de al menos uno de los compuestos de acuerdo con la invención que son fisiológicamente tolerados por seres humanos y/o mamíferos.

El término "solvato" de acuerdo con la presente invención debe entenderse que significa cualquier forma del compuesto activo de acuerdo con la invención que tiene otra molécula (lo más probable es que sea un disolvente polar) unida a ella mediante enlace no covalente. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo, metanolato.

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de esta memoria descriptiva significa la administración de un compuesto o formulación de acuerdo con la invención para prevenir, mejorar o eliminar uno o más síntomas asociados con dolor neuropático, hiperalgesia y/o alodinia.

Además, los términos "tratar" o "tratamiento" de acuerdo con la presente invención incluyen el tratamiento de síntomas de dolor neuropático, hiperalgesia y/o alodinia, la prevención o la profilaxis de los síntomas de dolor neuropático, hiperalgesia y/o alodinia, la prevención o profilaxis que provoca los síntomas de dolor neuropático, hiperalgesia y/o alodinia, así como la prevención o la profilaxis de las consecuencias que provocan los síntomas.

De acuerdo con los diversos modos de realización, el bloqueador de los canales de sodio, TTX, o las composiciones farmacéuticas que los comprenden, se pueden administrar en forma de dosificación unitaria, por vía intestinal, enteral, parenteral o tópica, oral, subcutánea, intranasal, por inhalación, por absorción oral, intravenosa, intramuscular, percutánea, intraperitoneal, rectal, intravaginal, transdérmica, sublingual, bucal, transmucosa oral. Las formas de dosificación de administración pueden incluir las siguientes: comprimidos, cápsulas, grageas, pastillas, parches, pastillas, geles, pastas, gotas, aerosoles, píldoras, polvos, licores, suspensiones, emulsiones, gránulos, ungüentos, cremas, supositorios, inyecciones liofilizadas, composiciones inyectables, en complementos alimenticios, barras nutritivas y alimenticias, jarabes, bebidas, líquidos, refrescos, etc., que podrían ser una preparación regular, preparación de liberación retardada, preparación de liberación controlada y varios sistemas de distribución de microgránulos, en suplementos alimenticios, barras nutritivas y alimenticias, jarabes, bebidas, líquidos, refrescos. En el caso de comprimidos, se pueden usar diversos vehículos conocidos en la técnica, por ejemplo, diluyentes y resorbentes tales como almidón, dextrina, sulfato de calcio, caolín, celulosa microcristalina, silicato de aluminio, etc.; agentes humectantes y adhesivos tales como agua, glicerina, polietilenglicol, etanol, propanol, mucílago de almidón, dextrina, jarabe, miel, solución de glucosa, goma arábiga, gelatina, carboximetilcelulosa sódica, goma laca, metilcelulosa, fosfato de potasio, polivinilpirrolidona, etc.; agente desintegrante, tal como almidón seco, alginato, agar en polvo, laminarano, bicarbonato de sodio y ácido cítrico, carbonato de calcio, éster alifático de polioxietileno sorbitol, lauril sulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manitol, fructosa, diversos disacáridos y polisacáridos, etc.; agente inhibidor de la desintegración, tal como sacarosa, triestearina, manteca de cacao, aceite hidrogenado, etc.; acelerador de absorción, tal como sal de amonio cuaternario, lauril sulfato de sodio, etc.; lubricante, tal como talco, sílice, almidón de maíz, estearato, ácido bórico, cera fluida, polietileno, etc. El comprimido se puede formular adicionalmente en un comprimido recubierto, por ejemplo, comprimido recubierto de azúcar, comprimido recubierto de película, comprimido gastrorresistente o comprimido de doble capa y comprimido de múltiples capas. En el caso de la píldora, se pueden usar diversos vehículos conocidos en la técnica, por ejemplo, diluyentes y resorbentes, tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, polivinilpirrolidona, caolín, talco, etc. adhesivos, tales como goma arábiga, goma bassora, gelatina, etanol, miel, azúcar líquido, pasta de arroz o pasta de harina, etc.; agente desintegrante, tal como agar en polvo, almidón seco, alginato, lauril sulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa. En el caso de un supositorio, se pueden usar diversos vehículos conocidos en la técnica, por ejemplo, polietileno, lecitina, manteca de cacao, alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores, gelatina, glicérido semisintético, etc. En el caso de una cápsula, se puede preparar mezclando dichos bloqueadores de los canales de sodio como ingrediente activo con los vehículos mencionados anteriormente, seguido de colocar la mezcla en una cápsula de gelatina dura o cápsula blanda. Además, dichos bloqueadores de los canales de sodio pueden

aplicarse en las siguientes formas de dosificación: microcápsulas, suspensión en una fase acuosa, cápsula dura o inyección. En el caso de una inyección, tal como licor, emulsión, inyección liofilizada y suspensión, se pueden usar todos los diluyentes comunes en la técnica, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, alcohol isoestearílico oxietilado, alcohol isoestearílico polioxidado, éster alifático de sorbitol polioxietilenado, etc. Además, a fin de obtener una inyección isotónica, se puede añadir a la preparación una cantidad adecuada de cloruro de sodio, glucosa o glicerina, así como un cosolvente regular, tampón, agente de ajuste del pH, etc. Además, se pueden añadir un agente colorante, antiséptico, perfume, correctivos, edulcorante alimenticio u otros materiales a la preparación farmacéutica si fuera necesario.

En determinados modos de realización, una formulación o composición farmacéutica de acuerdo con la invención contiene el ingrediente activo (TTX) así como opcionalmente al menos un material auxiliar y/o aditivo y/u opcionalmente otro ingrediente activo.

En determinados modos de realización, el material auxiliar y/o el aditivo se pueden seleccionar específicamente entre agentes conservantes, emulsionantes y/o vehículos para su aplicación parenteral. La selección de estos materiales auxiliares y/o aditivos y de las cantidades que se van a usar depende de cómo se va a aplicar la composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen aquí especialmente formulaciones de aplicación intravenosa, subcutánea, intravenosa y especialmente parenteral, pero que también podrían usarse para otras vías de administración.

En determinados modos de realización, las vías de administración de tetrodotoxina y sus derivados y sus análogos pueden incluir inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, sublingual, bucal, parche a través de la piel, ingestión oral, bomba osmótica implantable, implantes de colágeno, aerosoles o supositorios.

En modos de realización alternativos, el bloqueador de los canales de sodio, TTX, puede administrarse en un programa de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más dosis por día, solo o en combinación con otros medicamentos, en un rango de periodos de tiempo que incluyen periodos de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, dieciséis, dieciocho, veinte, veinticuatro, treinta o más días; o durante un periodo de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, dieciséis, dieciocho, veinte, veinticuatro, treinta, treinta y seis, cuarenta y ocho, sesenta, setenta y dos, ochenta y cuatro o más meses.

En modos de realización particulares, el bloqueador de los canales de sodio, TTX, puede ser un bloqueador de los canales de sodio bloqueado por voltaje y puede unirse a una subunidad α1 o SS2 de un canal de sodio. La dosis diaria máxima del bloqueador de los canales de sodio puede ser de hasta aproximadamente 10 µg, hasta aproximadamente 50 µg, hasta aproximadamente 100 µg, hasta aproximadamente 144 µg, hasta aproximadamente 150 µg, hasta aproximadamente 300 µg, hasta aproximadamente 500 µg, hasta aproximadamente 750 µg, hasta aproximadamente 1000 µg, hasta aproximadamente 1250 µg, hasta aproximadamente 1500 µg, hasta aproximadamente 1750 µg, hasta aproximadamente 2000 µg o más. En modos de realización particulares, el bloqueador de los canales de sodio se puede administrar en una cantidad que oscila entre 5 y 4000 µg/día, o en intervalos entre 10 y 2000 µg/día, 10 y 1000 µg al día, 10 y 750 µg al día, 10 y 500 µg al día, 10 y 400 µg al día, 10 y 300 µg al día, 10 y 200 µg al día, o 10 y 100 µg/día.

En modos de realización particulares, la dosis diaria aplicada puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 160 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 140 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 120 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 µg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg, o de 1 a 20 µg. En otros modos de realización, la dosificación diaria del bloqueador de los canales de sodio puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 µg por kilogramo de peso corporal, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 µg por kilogramo de peso corporal, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal, de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 µg por kilogramo de peso corporal o de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 µg por kilogramo de peso corporal. La dosis unitaria puede estar dentro de un intervalo de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 2000 µg y puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 µg, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 µg, aproximadamente 15 a aproximadamente 20 µg, aproximadamente 20 a aproximadamente 25 µg, aproximadamente 25 a aproximadamente 30 µg,

aproximadamente 30 aproximadamente 40 µg, aproximadamente 40 µg a aproximadamente 50 µg, aproximadamente 50 µg a aproximadamente 75 µg, aproximadamente 75 µg a aproximadamente 150 µg, aproximadamente 150 a aproximadamente 100 µg, aproximadamente 150 a aproximadamente 100 µg, aproximadamente 150 a aproximadamente 100 µg, aproximadamente 500 a aproximadamente 100 µg, aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 µg, aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 µg o aproximadamente 1500 a aproximadamente 2000 µg o más de 2000 µg.

En algunos modos de realización, la dosis administrada está entre 10 y 4000 µg/día de tetrodotoxina, especialmente la dosis de tetrodotoxina administrada está normalmente entre 10 y 4000 µg/día o, dado el probable tratamiento dos veces por día, entre 5 a 2000 µg de cada dosis dada, a veces preferentemente entre 250 y 1000 µg de cada dosis dada, a veces preferentemente entre 25 y 50 µg de cada dosis dada dependiendo de la vía de administración.

En algunos modos de realización, la eficacia de un ciclo de tratamiento de una, dos, tres, cuatro, cinco o más dosis o uno, dos o tres días puede durar hasta aproximadamente cinco, diez, quince, veinte, veinticinco o treinta. En algunos modos de realización, la dosificación solo se realiza una vez al día o una vez cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, dieciséis, dieciocho, veinte, veinticuatro, treinta o más días.

De acuerdo con la presente invención, la dosificación de dicho bloqueador de los canales de sodio, TTX, depende de una variedad de factores, que incluyen la naturaleza y la gravedad de las enfermedades, el sexo, la edad, el peso y la reacción individual del sujeto, el compuesto particular empleado, el vía y frecuencia de administración, etc. Dicho bloqueador de los canales de sodio, TTX, o las composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden administrar en forma de dosificación única o dividida, por ejemplo de una a cuatro dosis por día. Los expertos en la técnica comprenderán e implementarán fácilmente los cambios en los procedimientos de tratamiento ejemplificados en el presente documento que son necesarios o deseables para reflejar diversos requisitos terapéuticos.

Una sustancia nombrada como un "ingrediente activo" tendrá una pureza de al menos un 97 %. Por ejemplo, una formulación que se dice que tiene "500 µg de TTX como ingrediente activo" puede contener tanto como 15 µg de anhidrotetrodotoxina como impureza. Por otro lado, una formulación que se dice que tiene "500 µg de TTX y 500 µg de anhidrotetrodotoxina como ingredientes activos" contendrá al menos 485 µg de TTX y 485 µg de anhidrotetrodotoxina, pero puede contener hasta 30 µg de otras sustancias como impurezas de los ingredientes activos. Por supuesto, las sustancias nombradas como otros componentes de una formulación no se incluyen cuando se considera la pureza del ingrediente activo.

En un modo de realización altamente preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es dolor neuropático periférico o dolor neurogénico periférico.

De acuerdo con la IASP "dolor neuropático periférico" se define como "un dolor iniciado o provocado por una lesión primaria o disfunción en el sistema nervioso periférico" y "dolor neurogénico periférico" se define como "un dolor iniciado o provocado por una lesión primaria, disfunción o perturbación transitoria en el sistema nervioso periférico" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 213).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es alodinia.

De acuerdo con la IASP "alodinia" se define como "un dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 210).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es causalgia.

De acuerdo con la IASP "causalgia" se define como "un síndrome de dolor urente sostenido, alodinia e hiperpatia después de una lesión nerviosa traumática, a menudo combinada con disfunción vasomotora y sudomotora y cambios tróficos posteriores" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 210).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es hiperalgesia.

De acuerdo con la IASP, "hiperalgesia" se define como "una respuesta incrementada a un estímulo que normalmente es doloroso" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 211).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es hiperestesia.

De acuerdo con la IASP "hiperestesia" se define como "sensibilidad incrementada a la estimulación, excluyendo los sentidos" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 211).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es hiperpatia.

De acuerdo con la IASP "hiperpatia" se define como "un síndrome doloroso caracterizado por una reacción anormalmente dolorosa a un estímulo, especialmente un estímulo repetitivo, así como un umbral incrementado" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 212).

La IASP establece la siguiente diferencia entre "alodinia", "hiperalgesia" e "hiperpatia" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 212):

Alodinia	Umbral reducido	Estímulo y modo de respuesta difieren
Hiperalgesia	Respuesta incrementada	Estímulo y tasa de respuesta son los mismos
Hiperpatia	Umbral elevado; Respuesta incrementada	El estímulo y la tasa de respuesta pueden ser iguales o diferentes

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es neuralgia.

De acuerdo con la IASP, "neuralgia" se define como "dolor en la distribución de un nervio o nervios" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 212).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es neuritis.

De acuerdo con la IASP "neuritis" se define como "inflamación de un nervio o nervios" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 212).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es neuropatía/neuritis.

De acuerdo con la IASP "neuritis" se define como "una alteración de la función o cambio patológico en un nervio: en un nervio, mononeuropatía, en varios nervios, mononeuropatía múltiple, si es difusa y bilateral, polineuropatía" (IASP, Classification of chronic pain, 2.º edición, IASP Press (2002), 212).

En otro modo de realización preferente del uso de acuerdo con la invención, el dolor neuropático es dolor orofacial.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del bloqueador de los canales de sodio, TTX, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato para la producción de un medicamento para el tratamiento de alodinia que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del bloqueador de los canales de sodio, TTX, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato para la producción de un medicamento para el tratamiento de hiperalgesia que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia.

En un modo de realización altamente preferente de la invención del uso de acuerdo con la invención, se usa tetrodotoxina en una cantidad entre 10 µg/día y 4 mg/día.

En un modo de realización altamente preferente de la invención del uso de acuerdo con la invención, se aísla tetrodotoxina de una fuente biológica, preferentemente de pescado, especialmente pez globo.

En un modo de realización muy preferente de la invención del uso de acuerdo con la invención, la tetrodotoxina usada se sintetiza/es sintética.

En un modo de realización altamente preferente de la invención, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia se selecciona de un derivado de platino, un alcaloide de la vinca o un taxano.

En un modo de realización altamente preferente de la invención, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; paclitaxel y docetaxel. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es cisplatino. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es carboplatino. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es oxaliplatino. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es vincristina. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es vinblastina. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es vinorelbina. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es vindesina. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es paclitaxel. Preferentemente, al menos un antineoplásico usado en quimioterapia es docetaxel.

En la presente invención también se usan especialmente en la prevención o tratamiento de un paciente o un mamífero, incluidos hombres, que padecen dolor neuropático que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia usando un bloqueador de los canales de sodio tal como tetrodotoxina opcionalmente en forma de su racemato, puro estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato. También es preferente si el tratamiento de acuerdo con la invención se restringe a tetrodotoxina, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato. También es preferente si el tratamiento de acuerdo con la invención se restringe a tetrodotoxina, en forma neutra o como una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, mientras que preferentemente se usa tetrodotoxina en una cantidad entre 10 µg/día y 4 mg/día, se aísla de una fuente biológica, preferentemente de pescado, especialmente pez globo, o se sintetiza. También es preferente que el tratamiento de acuerdo con la invención se restrinja a modos de realización en los que al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona de un derivado de platino, un alcaloide de la vinca o un taxano; especialmente si al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; paclitaxel y docetaxel

Especialmente, el tratamiento anterior de acuerdo con la invención incluye también un cotratamiento durante la quimioterapia, en el que el fármaco/fármacos antineoplásicos se administra(n) junto con el bloqueador de los canales de sodio tal como tetrodotoxina o en combinación con un bloqueador de los canales de sodio tal como tetrodotoxina. Este cotratamiento se podría producir durante toda la quimioterapia, durante partes de la quimioterapia, al comienzo de la quimioterapia, en la mitad de la quimioterapia o al final de la quimioterapia.

Otro modo de realización alternativo de la presente invención se refiere a un kit que comprende TTX, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, preferentemente en cualquier proporción adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato.

Otro aspecto de la invención es una combinación de sustancias activas que comprende

(A) al menos un bloqueador de los canales de sodio, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de

estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato;
y

(B) al menos un antineoplásico.

Otro modo de realización alternativo de la presente invención es una combinación de sustancias activas, en la que el bloqueador de los canales de sodio (A) es tetrodotoxina, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato.

Otro modo de realización alternativo de la presente invención es una combinación de sustancias activas, en la que el antineoplásico (B) se selecciona de un derivado de platino, un alcaloide de la vinca o un taxano, especialmente el antineoplásico (B) se selecciona de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; paclitaxel y docetaxel.

Otro modo de realización alternativo de la presente invención es una combinación de sustancias activas, en la que el bloqueador de los canales de sodio (A) es tetrodotoxina, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato;

Y

el antineoplásico (B) se selecciona de un derivado de platino, un alcaloide de la vinca o un taxano, especialmente el antineoplásico (B) se selecciona de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; paclitaxel y docetaxel.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, en la que el bloqueador de los canales de sodio (A) es tetrodotoxina; y el antineoplásico (B) se selecciona de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina; paclitaxel y docetaxel.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y cisplatino.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y carboplatino.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y oxaliplatino.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y vincristina.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y vinblastina.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y vinorelbina.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y vindesina.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y paclitaxel.

Otro modo de realización alternativo altamente preferente de la presente invención es una combinación de sustancias activas, de tetrodotoxina y docetaxel.

Otro aspecto altamente preferente de la invención es el uso del bloqueador de los canales de sodio, TTX, opcionalmente en forma de su racemato, estereoisómeros puros, especialmente enantiómeros o diastereómeros o en forma de mezclas de estereoisómeros, especialmente enantiómeros o diastereómeros, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención del dolor orofacial, preferentemente en forma de dolor neuropático, hiperalgesia o alodinia, más preferentemente en forma de dolor neuropático, hiperalgesia o alodinia, que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia.

La región orofacial, la cara y la boca, representan sitios de algunos de los dolores más comunes en el cuerpo. Los estudios epidemiológicos han revelado la alta prevalencia de varias afecciones con dolor orofacial como trastornos temporomandibulares (TTM), síndrome de boca ardiente y dolor de muelas (Dworkin, 2001; Feinman y Newton-John, 2004; LeResche, 2001; Lipton *et al.*, 2001). Muchas de las dificultades experimentadas por los médicos con el tratamiento de las afecciones agudas y crónicas del dolor orofacial provienen de la falta de reconocimiento y comprensión de sus complejos factores e interacciones, de las incertidumbres de la etiología o patogénesis de muchas de las afecciones, así como de la falta de información sobre la efectividad comparativa de los analgésicos en el dolor orofacial.

Los ejemplos y figuras en la siguiente sección que describen ensayos farmacológicos son meramente ilustrativos y la invención no se puede considerar de ninguna manera como restringida a estas aplicaciones.

Ejemplos

Experimentos farmacológicos

GRUPO EXPERIMENTAL 1

Recientemente, se han desarrollado modelos de neuropatía dolorosa inducida por paclitaxel en ratones y ratas. Estos modelos demostraron que la administración repetida de paclitaxel produce hiperalgesia mecánica y alodinia (Authier *et al.*, 2000; Polomano *et al.*, 2001; Dina *et al.*, 2001 y 2004; Smith *et al.*, 2004; Flatters y Bennett, 2004), alodinia al frío (Polomano *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Flatters y Bennett, 2004) y en algunos estudios una hiperalgesia térmica (caliente) (Polomano *et al.*, 2001; Dina *et al.*, 2001; Flatters y Bennett, 2004); sin embargo, otros estudios no encontraron esta hiperalgesia térmica (Authier *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004). Por lo tanto, la neuropatía dolorosa inducida por paclitaxel en roedores representa un modelo interesante para someter a prueba los efectos de los fármacos en el dolor neuropático.

FIGURAS:

Fig. 1: La evolución temporal de paclitaxel indujo hiperalgesia térmica, alodinia al frío y alodinia mecánica en ratones. Los animales fueron tratados una vez al día desde los días 1 a 5 con paclitaxel (2 mg/kg) o su vehículo por vía i.p. La latencia para la retirada de la pata trasera en la prueba plantar (**A**), la duración del lamido/mordedura de la pata trasera en la prueba de acetona (**B**) y la fuerza umbral para la retirada de la pata trasera en la prueba de Von Frey (**C**) se registraron 3 días antes (PRE) y varios días después de la primera inyección de paclitaxel o su vehículo. Cada animal se sometió a prueba solo en un modelo nociceptivo. Cada punto y línea vertical representa la media ± D.E.M de los valores obtenidos en al menos 12 ratones. Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con paclitaxel y con vehículo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y entre los valores en el día de pretratamiento y los días después del tratamiento: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas bidireccionales seguida de la prueba de Newman-Keuls).

Fig. 2: Evolución temporal del efecto de la coadministración de paclitaxel + TTX (3 o 6 µg/kg) o paclitaxel + solución salina sobre la latencia para la retirada de la pata trasera en la prueba plantar (**A**), duración del lamido/mordedura de la pata trasera en la prueba de acetona (**B**) y la fuerza umbral para la retirada de la pata trasera en la prueba de Von Frey (**C**). Los ratones se trataron una vez al día desde los días 1 a 5 con una inyección s.c. de TTX (3 o 6 µg/kg) o solución salina 30 minutos antes de cada inyección i.p. de paclitaxel (2 mg/kg). La respuesta evaluada se registró en cada animal 3 días antes (PRE) y varios días después de la primera inyección de paclitaxel + TTX o paclitaxel + solución salina. Cada animal se sometió a prueba solo en un modelo nociceptivo. Cada punto y línea vertical representa la media ± D.E.M de los valores obtenidos en al menos 16 animales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambos grupos de tratamiento en la prueba plantar, pero solo se puede observar una ligera tendencia. Diferencias estadísticamente significativas en comparación con paclitaxel +

solución salina: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; y entre los valores en el día de pretratamiento y los días después del tratamiento: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas bidireccionales seguida de la prueba de Newman-Keuls).

Fig. 3: Evolución temporal del efecto sobre la latencia para la retirada de la pata trasera (prueba plantar) de una única inyección s.c. de tetrodotoxina (TTX; 3 o 6 µg/kg) o solución salina en ratones pretratados con (**A**) paclitaxel o (**B**) paclitaxel-vehículo. Los animales se trataron una vez al día desde los días 1 a 5 con paclitaxel o su vehículo por vía i.p. y el día 7 recibieron una única inyección s.c. de TTX o solución salina. La latencia para la retirada de la pata trasera se registró en cada animal 3 días antes (PRE) y 7 días después de la primera inyección de paclitaxel o su vehículo. Este día, la latencia de retirada de la pata se registró inmediatamente antes (tiempo 0) y en varias ocasiones (30, 60, 90, 120 y 180 minutos) después de la inyección de TTX o solución salina. Cada animal recibió solución salina o una dosis de TTX. Cada punto y línea vertical representa la media ± D.E.M de los valores obtenidos en al menos 12 animales. (**A**) Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con TTX y solución salina al mismo tiempo después del tratamiento: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y entre los valores en el día de pretratamiento y los días después del tratamiento: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas bidireccionales seguida de la prueba de Newman-Keuls). (**B**) No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los tres grupos en ningún momento de observación, ni en comparación con sus propios valores del día de pretratamiento (ANOVA de medidas repetidas bidireccionales).

Fig. 4: Evolución temporal del efecto sobre la duración del lamido/mordedura de la pata trasera (prueba de acetona) de una única inyección s.c. de tetrodotoxina (TTX; 3 o 6 µg/kg) o solución salina en ratones pretratados con (**A**) paclitaxel o (**B**) paclitaxel-vehículo. Los animales se trataron una vez al día desde los días 1 a 5 con paclitaxel o su vehículo por vía i.p. y el día 14 recibieron una única inyección s.c. de TTX o solución salina. La duración del lamido/mordedura de la pata trasera se registró en cada animal 3 días antes (PRE) y 14 días después de la primera inyección de paclitaxel o su vehículo. Este día, la duración del lamido/mordedura de la pata trasera se registró inmediatamente antes (tiempo 0) y en varias ocasiones (60, 120 y 180 minutos) después de la inyección de TTX o solución salina. Cada animal recibió solución salina o una dosis de TTX. Cada punto y línea vertical representa la media ± D.E.M de los valores obtenidos en al menos 12 animales. (**A**) Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con TTX y solución salina al mismo tiempo después del tratamiento: ** $p < 0,01$; y entre los valores en el día de pretratamiento y los días después del tratamiento: ## $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas bidireccionales seguida de la prueba de Newman-Keuls). (**B**) No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los dos grupos en ningún momento de observación, ni en comparación con sus propios valores del día de pretratamiento (ANOVA de medidas repetidas bidireccionales).

Fig. 5: Evolución temporal del efecto sobre la fuerza umbral para la retirada de la pata trasera (prueba de Von Frey) de una única inyección s.c. de tetrodotoxina (TTX; 3 o 6 µg/kg) o solución salina en ratones pretratados con (**A**) paclitaxel o (**B**) paclitaxel-vehículo. Los animales se trataron una vez al día desde los días 1 a 5 con paclitaxel o su vehículo por vía i.p. y el día 10 recibieron una única inyección s.c. de TTX o solución salina. La fuerza umbral para la retirada de la pata trasera se registró en cada animal 3 días antes (PRE) y 10 días después de la primera inyección de paclitaxel o su vehículo. Este día, la latencia de retirada de la pata se registró inmediatamente antes (tiempo 0) y en varias ocasiones (30, 60, 90, 120 y 180 minutos) después de la inyección de TTX o solución salina. Cada animal recibió solución salina o una dosis de TTX. Cada punto y línea vertical representa la media ± D.E.M de los valores obtenidos en al menos 12 animales. (**A**) Diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos tratados con TTX y solución salina al mismo tiempo después del tratamiento: ** $p < 0,01$; y entre los valores en el día de pretratamiento y los días después del tratamiento: ## $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas bidireccionales seguida de la prueba de Newman-Keuls). (**B**) No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los tres grupos en ningún momento de observación, ni en comparación con sus propios valores del día de pretratamiento (ANOVA de medidas repetidas bidireccionales).

PROCEDIMIENTOS:

En general:

Los experimentos se realizaron en ratones CD-1 (Charles River, SA) con n = 10/grupo experimental. La neuropatía periférica dolorosa inducida por paclitaxel se produjo por administración i.p. de paclitaxel una vez al día durante dos semanas como se describió previamente (Dina *et al.*, 2001), los animales de control recibieron el mismo volumen de disolvente (una mezcla de etanol y cremophor EL)

La hiperalgesia mecánica y la alodinia se evaluaron con filamentos de Von Frey y un analgesímetro de presión en la pata Randall-Sellito (Dina *et al.*, 2001; Flatters y Bennet, 2004), la alodinia al frío se evaluó utilizando el procedimiento de la gota de acetona (Polomano *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004), mientras que la hiperalgesia térmica se midió con el procedimiento de Hargreaves (Dina *et al.*, 2001; Polomano *et al.*, 2001).

TTX ejerció claros efectos analgésicos en este modelo de dolor neuropático.

Se inyectó TTX s.c. inmediatamente antes de cada inyección de paclitaxel para someter a prueba si TTX afectaba al desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa o en la tercera semana (cuando la inyección de paclitaxel ha finalizado y la neuropatía se ha desarrollado completamente) para someter a prueba si TTX interfería con la expresión de los diferentes signos de dolor neuropático inducido por paclitaxel.

Descripción específica:

Animales. Se usaron ratones hembra CD-1 con un peso de 25-30 g. Los animales fueron se alojaron en jaulas en colonias con libre acceso a alimento y agua antes de los experimentos. Se mantuvieron en habitaciones con control de temperatura y luz (22 ± 1 °C, luces encendidas a las 08.00 h y apagadas a las 20.00 h, reemplazo de aire cada 20 minutos). Las pruebas se llevaron a cabo durante la fase de luz (de 9.00 a 15.00 h).

Paclitaxel se disolvió en una solución compuesta por un 50 % de Cremophor EL y un 50 % de etanol absoluto para obtener una concentración de 6 mg/ml. Esta solución de paclitaxel se conservó a -20 °C durante un máximo de 14 días y se diluyó en solución salina normal (NaCl al 0,9 %), justo antes de la administración, hasta una concentración final de 2 mg/10 ml. El vehículo de paclitaxel se diluyó en el momento de la inyección con solución salina (NaCl al 0,9 %) en la misma proporción que la solución de paclitaxel.

Paclitaxel (2 mg/kg) se administró por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen de 10 ml/kg, una vez al día durante cinco días consecutivos. Por lo tanto, la dosis acumulada fue de 10 mg/kg por ratón. En el grupo de control, el vehículo de paclitaxel se administró siguiendo el mismo programa.

La solución de base de TTX (concentración de 15 µg/ml) se diluyó en solución salina normal justo antes de la administración a concentraciones finales de 3 y 6 µg/5 ml. La inyección de TTX (3 o 6 µg/kg) o su disolvente (solución salina normal) se administró por vía subcutánea (s.c.) en el área interescapular, usando un volumen de inyección de 5 ml/kg.

Los efectos de TTX s.c. sobre el dolor neuropático inducido por paclitaxel se examinaron de dos maneras diferentes. Para evaluar el efecto de TTX sobre el *desarrollo* del dolor inducido por paclitaxel, los animales recibieron en primer lugar una inyección s.c. de TTX 30 minutos antes de cada inyección i.p. de paclitaxel durante cinco días consecutivos. Posteriormente, la respuesta de los animales a los diferentes estímulos nociceptivos se sometió a prueba durante 2-4 semanas, dependiendo de la prueba (ver a continuación), sin ningún tratamiento adicional. Cada animal se sometió a prueba solo en un modelo nociceptivo. Para someter a prueba el efecto de TTX en la *expresión* del dolor inducido por paclitaxel, se realizó una única inyección de TTX el día de máxima expresión de hiperalgesia térmica (día 7 desde el comienzo de la administración de paclitaxel), alodinia mecánica (día 10) o alodinia al frío (día 14) (ver resultados para más detalles). Cada animal recibió solo una dosis de TTX y se sometió a prueba en solo un modelo nociceptivo.

Procedimiento para la evaluación de la hiperalgesia térmica. La hiperalgesia térmica se evaluó mediante el siguiente procedimiento: Los ratones se habituaron a cámaras de plexiglás individuales (7 x 7 x 22 cm), colocadas sobre un piso de vidrio, durante dos horas. Durante este tiempo, los ratones inicialmente exhibieron un comportamiento exploratorio, pero posteriormente dejaron de explorar y se mantuvieron en silencio con ocasionales ataques de acicalamiento. Después de la habituación, se enfocó un haz de calor radiante a la superficie plantar de las patas traseras, usando un aparato de prueba plantar (Ugo Basile, Comerio, Italia), hasta que el ratón realizó una respuesta de abstinencia. El reflejo de retirada nocifensivo interrumpe la luz reflejada desde la pata en una fotocélula y apaga automáticamente la luz y un temporizador. Por lo tanto, la latencia del valor de extracción (que indirectamente indicaba el umbral de dolor de calor) se registró automáticamente.

La intensidad de la luz se ajustó al inicio de los experimentos, de modo que las latencias de referencia promedio fueron de aproximadamente 8 s. Esta intensidad nunca se cambió. Cada ratón se sometió a prueba tres veces de forma alternativa en cada pata trasera y las latencias para ambas patas se promediaron juntas en cada tiempo de medición. Al menos, se permitió un minuto entre los mismos

intentos consecutivos de pata. Se impuso un tiempo de latencia de corte de 16 segundos en cada medición para evitar lesiones en la piel y sufrimiento innecesario a los animales.

Para dilucidar la evolución temporal de la hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel en ratones de control, las latencias de referencia de pretratamiento se obtuvieron tres días antes del tratamiento con fármaco. Luego, los animales fueron tratados con paclitaxel o su vehículo una vez al día durante 5 días. Las latencias postratamiento se evaluaron los días 7, 10, 14 y 17 después de la primera inyección de paclitaxel. Cuando se sometió a prueba el efecto de TTX en el desarrollo de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel, el procedimiento fue el mismo excepto que se inyectó TTX o su disolvente 30 minutos antes de cada dosis diaria de paclitaxel o su vehículo (i.p.) durante los 5 días de tratamiento. tratamiento. El efecto de TTX sobre la expresión de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel se sometió a prueba el día 7 después de la primera inyección de paclitaxel, ya que la hiperalgesia máxima de calor se observó ese día. Por lo tanto, el día 7, después del periodo de habituación al aparato, se registraron las latencias de referencia e inmediatamente después se inyectó s.c. TTX o su disolvente, las latencias de retirada de la pata se evaluaron nuevamente 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la inyección. Alrededor del 9 % de los animales tratados con paclitaxel no desarrollaron hiperalgesia térmica el día 7 después del tratamiento con paclitaxel. Estos animales no se usaron para evaluar el efecto de TTX sobre la expresión de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel.

Procedimiento para la evaluación de alodinia al frío. La alodinia al frío se sometió a prueba como se describió previamente por Smith et al., 2004, tocando suavemente la piel plantar de las patas traseras con una burbuja de acetona formada con una jeringa conectada a un tubo delgado de polietileno. Los ratones fueron alojados y habituado durante 30 minutos en cajas de plástico transparente (7 x 7 x 13 cm) con un piso hecho de malla de alambre. Después del periodo de adaptación, se aplicó acetona de forma alternativa tres veces a cada pata a intervalos de 30 s, y se registraron la duración y la frecuencia de lamer o morder. Se colocó un espejo pequeño detrás de las cámaras para permitir una observación clara de las patas. El tiempo dedicado a lamer o morder la pata fue registrado por un cronómetro y representado como el tiempo acumulado de lamido/mordedura en las seis mediciones. Dado que en los experimentos lamer persistir más de 10 s fue muy inusual, se utilizó un tiempo de corte de 10 s para cada prueba. La frecuencia del lamido/mordedura se expresó como un porcentaje y se calculó con la siguiente fórmula: (número de ensayos acompañados por lamido o mordedura/número total de ensayos) x 100.

Para dilucidar la evolución temporal de la alodinia al frío inducida por paclitaxel en ratones control, los animales se analizaron previamente con respecto a la administración de paclitaxel (valor de pretratamiento) y en días diferentes (días 7, 10, 14, 17, 21 y 24) después de la primera inyección de paclitaxel o vehículo. Se siguió el mismo procedimiento para someter a prueba el efecto de TTX en el desarrollo de alodinia al frío, pero en este caso, TTX o su disolvente se inyectaron s.c. 30 min antes de cada una de las 5 inyecciones i.p. de paclitaxel. Debido a que el máximo efecto alodínico inducido por paclitaxel se observó en los días 10-14 después de su primera inyección, los efectos de TTX sobre la expresión de alodinia al frío se evaluaron el día 14. Este día, una vez que se registró la respuesta de referencia a la acetona, los animales recibieron una inyección s.c. de TTX o su disolvente, y la respuesta a la acetona se registró nuevamente a los 60, 120 y 180 minutos después de la inyección. Alrededor de un 33 % de los animales de control tratados con paclitaxel no mostraron alodinia al frío; por lo tanto, se diferenció entre los ratones 'que respondían' y 'que no respondían' en esta prueba. Los ratones 'que no respondían' se identificaron fácilmente porque pasaron menos de 2 s lamiendo/mordiendo la pata estimulada con acetona los días 7 y 10 después de la administración de paclitaxel. Los animales 'que no respondían' no se usaron para someter a prueba el efecto de TTX sobre la expresión de alodinia al frío, puesto que no expresan suficiente alodinia al frío.

Procedimiento para la evaluación de alodinia mecánica. Para evaluar la alodinia mecánica, los umbrales de retirada de la pata se midieron usando un anestesiómetro plantar dinámico (Ugo Basile, Italia). El dispositivo electrónico Von Frey emplea un único filamento no flexible que aplica una fuerza progresivamente creciente (de 0 a 10 g) contra la superficie plantar de la pata trasera durante un periodo de 20 s. El reflejo de retirada nocifensivo apaga automáticamente el estímulo y el valor del umbral mecánico se muestra en una pantalla. El día del experimento, los ratones se colocaron individualmente en compartimentos de prueba (9 x 9 x 14 cm) con un fondo de malla de alambre y se les permitió aclimatarse a ellos durante 2 h. Después de la habituación, cada ratón se sometió a prueba tres veces de forma alternativa en cada pata trasera.

Para dilucidar la evolución temporal de la alodinia mecánica inducida por paclitaxel en ratones control, los animales se analizaron previamente con respecto a la administración de paclitaxel (valor de pretratamiento) y en días diferentes (días 7, 10, 14 y 17) después de la primera inyección de paclitaxel o vehículo. Se siguió el mismo procedimiento para evaluar el efecto de TTX en el desarrollo de alodinia mecánica inducida por paclitaxel, excepto que TTX o su disolvente se inyectaron s.c. 30 minutos antes de

cada dosis diaria de paclitaxel o su vehículo (i.p.) durante los 5 días de tratamiento. El efecto de TTX sobre la expresión de alodinia mecánica inducida por paclitaxel se evaluó el día 10, porque el cambio máximo del umbral mecánico se observó en ese día. Por lo tanto, el día 10, después del periodo de habituación al aparato, se registraron las latencias de referencia, posteriormente se inyectó s.c. TTX o su disolvente y las latencias de retirada de la pata se evaluaron nuevamente 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la inyección. La mayoría de los animales (96 %) tratados con paclitaxel mostraron una reducción del umbral mecánico; aquellos animales que no mostraron alodinia mecánica no se usaron para someter a prueba el efecto de TTX sobre la expresión de alodinia mecánica inducida por paclitaxel.

Resultados

Evolución temporal de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel, alodinia al frío y mecánica en ratones de control. Los valores obtenidos en el día de pretratamiento en animales tratados con paclitaxel y vehículo no fueron significativamente diferentes en la prueba plantar (fig. 1A), la prueba de acetona (fig. 1 B) y la prueba de Von Frey (fig. 1C). La administración durante 5 días de paclitaxel-vehículo no modificó significativamente la respuesta de los animales en ninguna prueba en ningún día de postratamiento en comparación con el valor de pretratamiento (figs. 1A-C). Por otro lado, 5 días de tratamiento con paclitaxel (2 mg/kg, i.p.) redujeron significativamente los valores de latencia de la retirada de la pata en la prueba plantar todos los días de postratamiento, en comparación con el valor del día de pretratamiento (fig. 1A). La hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel fue máxima 7 días después de la primera inyección del antineoplásico (fig. 1A); por lo tanto, el efecto de TTX sobre la expresión de hiperalgesia térmica se evaluó el día 7.

En la prueba de acetona, la administración de paclitaxel (2 mg/kg, i.p.) una vez al día durante 5 días permite distinguir dos grupos de animales en función de su respuesta. La mayoría de los animales (67 %) tratados con paclitaxel aumentaron significativamente (p <0,01) el tiempo dedicado al lamido/mordedura la pata estimulada (fig. 1 B) y la frecuencia de lamido/mordedura de la patas todos los días de postratamiento, en comparación al valor del día de pretratamiento. Estos animales constituyen los animales que respondían a paclitaxel. Por otro lado, un 33 % de los animales tratados con paclitaxel no mostraron alodinia al frío, y su respuesta a la acetona era indistinguible de la de los animales tratados con paclitaxel-vehículo tanto en la duración (fig. 1B) como en la frecuencia del lamido/mordedura. Cuando se compararon los valores de estas dos variables entre los diferentes grupos en el mismo día de la evaluación, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales que respondían a paclitaxel y los otros dos grupos (animales que no respondían a paclitaxel o paclitaxel-vehículo) cada día de evaluación después del tratamiento (fig. 1 B). La alodinia al frío inducida por paclitaxel fue máxima 10-14 días después de la primera inyección del antineoplásico para ambas variables registradas (fig. 1 B); por lo tanto, el efecto de TTX sobre la expresión de alodinia al frío se evaluó el día 14.

La administración de paclitaxel (2 mg/kg, i.p., durante 5 días) indujo alodinia mecánica en ratones, ya que redujo significativamente la fuerza umbral para la retirada de la pata en la prueba de Von Frey en el día 10, en comparación tanto el valor del día de pretratamiento y con el valor obtenido el mismo día en los animales tratados con paclitaxel-vehículo (fig. 1C). Por lo tanto, el efecto de TTX en la expresión de alodinia mecánica se sometió a prueba el día 10.

Efecto de la tetrodotoxina (TTX) en el desarrollo de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel, alodinia al frío y mecánica. Los valores de pretratamiento fueron similares en los dos grupos experimentales (paclitaxel + solución salina y paclitaxel + TTX) en todas las pruebas realizadas (pruebas plantar, de acetona y de Von Frey) (figs. 2A, 2B y 2C).

En la prueba plantar, los valores de la latencia de retirada de la pata fueron significativamente menores que los valores de pretratamiento en ambos grupos experimentales en todo momento evaluados de 7 a 17 días después de la primera inyección de paclitaxel (fig. 2A). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los valores de latencia de retirada de la pata (durante los 17 días de las mediciones) después de la coadministración de paclitaxel + 6 µg/kg de TTX en comparación con la obtenida después de paclitaxel + solución salina (fig. 2A) y solo se puede ver una ligera tendencia. Por lo tanto, la coadministración de paclitaxel y TTX parece tener solo un efecto muy limitado sobre el desarrollo de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel.

El grupo de animales en el que paclitaxel (i.p.) y solución salina (s.c.) se coadministraron durante los días 1 a 5 mostró un aumento significativo en la duración del lamido/mordedura de la pata (fig. 2B) y un aumento de la frecuencia del lamido/mordedura de la pata, que se volvió máximo los días 10-14 después de la primera inyección, como en los experimentos en los que solo se inyectó paclitaxel (fig. 1B). Por otro lado, en los animales que reciben una inyección s.c. de TTX (6 µg/kg) 30 minutos antes de cada dosis de i.p. paclitaxel durante los días 1 a 5, la duración y la frecuencia del lamido/mordedura de la pata (durante

los 24 días después de la coadministración) no fueron significativamente diferentes de las obtenidas el día de pretratamiento (fig. 2B). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en ambos grupos (paclitaxel + solución salina y paclitaxel + 6 µg/kg de TTX) en los días 10 y 14 cuando se analizó la duración del lamido/mordedura (fig. 2B) y en los días 7, 10 y 14 cuando se consideró la frecuencia del lamido/mordedura. Por lo tanto, la administración concomitante de paclitaxel i.p. y 6 µg/kg de TTX s.c. inhibió el desarrollo de alodinia al frío inducida por paclitaxel. También se evaluó el efecto de la coadministración de paclitaxel con una dosis más baja de TTX (3 µg/kg), pero esta dosis de TTX no afectó significativamente el desarrollo de alodinia al frío inducida por paclitaxel en las dos variables evaluadas.

Los valores de la fuerza umbral de la retirada de la pata (prueba de Von Frey) en animales tratados con paclitaxel + solución salina fueron significativamente menores que los valores de pretratamiento los días 10 y 14 después de la primera inyección de paclitaxel (fig. 2C). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los valores de pretratamiento y postratamiento en cualquier día en los animales tratados con paclitaxel + 3 o 6 µg/kg de TTX (fig. 2C). Además, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la fuerza umbral de la retirada de la pata después de la coadministración de paclitaxel con 3 o 6 µg/kg de TTX en comparación con los obtenidos después de paclitaxel con solución salina en los días 10 y 14 (fig. 2C). Por lo tanto, la coadministración de paclitaxel y TTX inhibió el desarrollo de alodinia mecánica inducida por paclitaxel en ratones.

Efecto de la tetrodotoxina (TTX) en la expresión de la hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel. Los valores de latencia de retirada de la pata en la prueba plantar, registrada el día 7, antes de la administración de TTX o solución salina (tiempo 0), fueron significativamente diferentes de los valores en el día de pretratamiento en todos los grupos de animales que se trataron con paclitaxel (fig. 3A, tiempo 0 frente a PRE); es decir, como se esperaba, el paclitaxel indujo hiperalgesia térmica 7 días después de su primera inyección. La administración de solución salina en el tiempo 0 no modificó significativamente la hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel. Los ratones tratados con solución salina mantuvieron todos sus valores de latencia de retirada de la pata durante las 3 horas posteriores a su inyección, no significativamente diferente de la del momento 0; mientras que, todos estos valores fueron significativamente diferentes (p <0,01) del valor de latencia obtenido antes de la administración de paclitaxel (valor PRE) (fig. 3A). Por otro lado, la administración s.c. de TTX (3 o 6 µg/kg) inhibió la hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel de una manera dependiente de la dosis. Este efecto de TTX fue significativamente diferente del de solución salina de 30 a 120 minutos después de la inyección de 6 µg/kg de TTX, y de 60 a 120 minutos en el grupo de ratones tratados con 3 µg/kg de TTX (fig. 3A). Por lo tanto, la administración aguda de TTX inhibió la expresión de hiperalgesia térmica inducida por paclitaxel.

Como era de esperar, 5 días de tratamiento con paclitaxel-vehículo no cambiaron significativamente el valor de latencia de la retirada de la pata en el día 7 (fig. 3B, tiempo 0 frente a PRE). En estos animales, la administración s.c. de TTX (3 o 6 µg/kg) o solución salina no afectó significativamente los valores de latencia de retirada de la pata inducidos por un estímulo térmico durante las 3 horas de registro (fig. 3B). Por lo tanto, la administración de TTX no modificó la respuesta a un estímulo térmico doloroso en animales de control.

Efecto de la tetrodotoxina (TTX) sobre la expresión de alodinia al frío inducida por paclitaxel. La duración y la frecuencia del lamido/mordedura de la pata el día 14, antes del tratamiento con TTX o solución salina, fueron significativamente diferentes de sus valores en el día de pretratamiento en todos los grupos de animales tratados durante 5 días con paclitaxel (fig. 4A, tiempo 0 frente a PRE), es decir, como se esperaba, paclitaxel indujo una alodinia al frío 14 días después de su primera inyección. Una única inyección s.c. de solución salina el día 14 no modificó significativamente la expresión de alodinia al frío inducida por paclitaxel. Los ratones tratados con solución salina mantuvieron los valores de las dos variables evaluados durante las 3 horas después de su inyección no significativamente diferentes de las del momento 0; mientras que todos estos valores fueron significativamente diferentes (p <0,01) de los valores obtenidos antes de la administración de paclitaxel (valor PRE) (fig. 4A). Por otro lado, el tratamiento agudo con TTX (3 o 6 µg/kg; s.c.) inhibió la expresión de alodinia al frío inducida por paclitaxel. Este efecto de TTX fue significativamente diferente del de la solución salina 1 h después de la inyección de 3 o 6 µg/kg de TTX cuando se evaluó la duración del lamido/mordedura (figs. 4A), y solo en los animales tratados con 6 µg/kg de TTX cuando se evaluó la frecuencia del lamido/mordedura.

Como se esperaba, el tratamiento con paclitaxel-vehículo durante 5 días no cambió significativamente la duración y la frecuencia del lamido/mordedura de la pata el día 14 (fig. 4B, tiempo 0 frente a PRE). En estos ratones, la administración el día 14 de una única inyección s.c. de solución salina o TTX (6 µg/kg) no cambió significativamente, en comparación con los valores de pretratamiento, la duración (fig. 4B) y los valores de frecuencia del lamido/mordedura de la pata durante las 3 h de evaluación. Por lo tanto, la

administración de paclitaxel-vehículo no indujo alodinia al frío en la prueba de acetona en el día 14, y una única inyección de TTX no afectó a la respuesta de referencia a la acetona en esta prueba.

Efecto de la tetrodotoxina (TTX) sobre la expresión de alodinia mecánica inducida por paclitaxel. El día 10, antes de la administración de TTX o solución salina, los valores de la fuerza umbral en la prueba de Von Frey fueron significativamente menores que los valores en el día de pretratamiento en el grupo tratado con paclitaxel (fig. 5A; tiempo 0 frente a PRE), es decir, como se esperaba, la alodinia mecánica inducida por antineoplásicos 10 días después de su primera inyección. La administración de solución salina (disolvente TTX) en el tiempo 0 no modificó significativamente la alodinia mecánica inducida por paclitaxel. Los ratones tratados con solución salina mantuvieron todos sus valores de fuerza umbral durante 3 horas después de su inyección significativamente no diferentes de los obtenidas en el tiempo 0; mientras que, todos los valores de 0 a 180 minutos fueron significativamente diferentes ($p < 0{,}01$) en comparación con el obtenido en el día de pretratamiento (fig. 5A). Por otro lado, la administración s.c. de TTX (1 y 3 µg/kg) inhibió la alodinia mecánica inducida por paclitaxel. Este efecto de TTX fue estadísticamente significativo ($p < 0{,}01$) de 30 a 90 minutos después de la administración de TTX en ambos grupos de animales tratados con TTX (1 y 3 µg/kg) en comparación con animales tratados con solución salina (fig. 5A).

Como era de esperar, los 5 días de tratamiento con paclitaxel-vehículo no cambiaron significativamente el valor de la fuerza umbral para la retirada de la pata trasera en el día 10 (fig. 5B, tiempo 0 frente a PRE). La administración subcutánea de TTX (3 o 6 µg/kg, s.c.) o solución salina, no modificó significativamente la fuerza umbral en estos animales (fig. 5B). Por lo tanto, la administración de TTX no alteró la respuesta a un estímulo mecánico en animales de control.

Análisis

Se descubrió que la administración aguda de TTX inhibía la expresión de hiperalgesia inducida por paclitaxel, alodinia mecánica y fría en ratones, y que la coadministración repetida de TTX y paclitaxel evitaba el desarrollo de ambos tipos de alodinia sin afectar claramente el calor. hiperalgesia

REFERENCIAS:

Alberts DS, Noel JK. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? Anticancer Drugs. 1995 Jun;6(3):369-83.

Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. Brain Res. 2000 Dec 29;887(2):239-49.

Chaudhry V, Rowinsky EK, Sartorius SE, Donehower RC, Comblath DR. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. Ann Neurol. 1994 Mar;35(3):304-11.

Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. Neuroscience. 2001;108(3):507-15.

Dina OA, Parada CA, Yeh J, Chen X, McCarter GC, Levine JD. Integrin signaling in inflammatory and neuropathic pain in the rat. Eur J Neurosci. 2004 Feb;19(3):634-42.

Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. Pain. 2004 May; 109(1 -2): 150-61.

Forsyth PA, Balmaceda C, Peterson K, Seidman AD, Brasher P, DeAngelis LM. Prospective study of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with quantitative sensory testing. J Neurooncol. 1997 Oct;35(1):47-53.

Gordon AN, Stringer CA, Matthews CM, Willis DL, Nemunaitis J. Phase I dose escalation of paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer receiving cisplatin: rapid development of neurotoxicity is dose-limiting. J Clin Oncol. 1997 May; 15(5): 1965-73.

Polomano RC, Bennett GJ. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. Pain Med. 2001 Mar;2(1):8-14.

Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. Pain. 2001 Dec;94(3):293-304.

Postma TJ, Vermorken JB, Liefting AJ, Pinedo HM, Heimans JJ. Paclitaxel-induced neuropathy. Ann Oncol. 1995 May;6(5):489-94.

Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. J Neurol. 2002 Jan;249(1):9-17.

Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG1 Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). Semin Oncol. 1993a Aug;20(4 Suppl 3):1-15.

Rowinsky EK, Chaudhry V, Forastiere AA, Sartorius SE, Ettinger DS, Grochow LB, Lubejko BG, Cornblath DR, Donehower RC. Phase I and pharmacologic study of paclitaxel and cisplatin with granulocyte colony-stimulating factor: neuromuscular toxicity is dose-limiting. J Clin Oncol. 1993b Oct;11(10):2010-20.

Smith SB, Crager SE, Mogil JS. Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains. Life Sci. 2004 Apr 9;74(21):2593-604.

Wasserheit C, Frazein A, Oratz R, Sorich J, Downey A, Hochster H, Chachoua A, Wernz J, Zeleniuch-Jacquotte A, Blum R, Speyer J. Phase II trial of paclitaxel and cisplatin in women with advanced breast cancer: an active regimen with limiting neurotoxicity. J Clin Oncol. 1996 Jul; 14(7): 1993-9. Erratum in: J Clin Oncol 1996 Dec;14(12):3175.

GRUPO EXPERIMENTAL 2

Recientemente, se han propuesto varios nuevos modelos animales para estudiar los mecanismos subyacentes al desarrollo de estas neuropatías, como la inyección intravenosa continua de vincristina en ratas y la administración intraperitoneal (i.p.) de paclitaxel (Polomano et al., 2001).

La eficacia analgésica de TTX se sometió a prueba en un modelo de dolor neuropático inducido por paclitaxel.

Figuras

Fig 6. Desarrollo de alodinia e hiperalgesia después del tratamiento con control de paclitaxel y paclitaxel-vehículo en la región orofacial (**A**) y de la pata (**B**, **C**). Los datos se expresan como el porcentaje (%) de la respuesta media de control con pre-paclitaxel ± E.E.M. registrada de B (antes del tratamiento con paclitaxel) hasta el día 29, Tn = día en que se inyectó paclitaxel. * Diferencia estadística frente a grupo de vehículo (* p < 0,05, ***p<0,001, ANOVA unidireccionales más prueba de Bonferroni *a posteriori*) n=9.

FIG 7. Efecto de una inyección única de TTX sobre alodinia orofacial (A), alodinia de la pata (B) e hiperalgesia de la pata (C). Las barras muestran el umbral medio (g) ± E.E.M. registrado el día 0 (antes del tratamiento con paclitaxel), el día 21 y el día 22 después de la inyección de paclitaxel. + Diferencia estadística frente al día 0, * Diferencia estadística frente al día 21, (ANOVA unidireccionales más prueba de Bonferroni *a posteriori*). • p<0,05, •• p<0,01, ••• p<0,001.

Fig 8. Efecto de TTX sobre la evolución temporal de la alodinia inducida por paclitaxel en animales de control. Los datos se expresan como el porcentaje del umbral medio de control con pre-paclitaxel ± E.E.M. registrado desde el día 0 (antes del tratamiento con paclitaxel) hasta el día 29 en ratas de control y en ratas tratadas con TTX crónica, Tn = día en que se inyectó paclitaxel. * Diferencia estadística frente a control (' D < 0,05. ***o<0,001 (ANOVA unidireccionales más prueba de Bonferroni *a posteriori*) n=9.

Procedimientos

Se usaron ratas Wistar macho adultas (200-250 g) (Harlan Ibérica, España) en todos los experimentos. Los animales se alojaron en jaulas de plástico transparente en condiciones estándar de laboratorio: temperatura controlada de 23 ± 1 °C, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h y acceso libre a alimento y agua. Se observó comportamiento espontáneo en las jaulas antes de iniciar los procedimientos experimentales, se descartaron las ratas que mostraban agresividad o alteraciones de la motilidad (2 %). El número de animales por grupo experimental separado fue de al menos 8.

Neuropatía periférica inducida por paclitaxel

Después de la habituación al entorno de prueba y las mediciones de referencia de la sensibilidad al dolor (véase a continuación), a los animales se les inyectó i.p. en cuatro días alternos (días 1, 3, 5 y 7) paclitaxel (1 mg/kg) usando un volumen de inyección de 1 ml/kg. La dosis acumulada final de paclitaxel

administrada fue de 4,0 mg/kg (Polomano et al., 2001). El vehículo era una mezcla de solución salina y Cremophor EL al 10 %, un derivado de aceite de ricino y óxido de etileno. Este vehículo se usa clínicamente para inyecciones de paclitaxel. Se registró el peso corporal (pretratamiento, y los días 3, 5, 7, 13, 16, 18, 22, 24 y 29 después de la primera administración de oaclitaxel o vehículo) en el grupo de animales a los que se administró paclitaxel (n = 9) y en aquellos tratados con vehículo (n = 9).

Ensayos conductuales

Hiperalgesia térmica y alodinia mecánica.

La superficie plantar de las patas traseras (territorio del nervio ciático) se sometió a prueba para hiperalgesia térmica y alodinia táctil y la zona vibrisal (territorio del nervio trigémino) para evaluar el efecto de la administración de los diferentes tratamientos.

Hiperalgesia térmica en el territorio del nervio ciático (pata trasera)

La hiperalgesia térmica de la pata trasera se sometió a prueba midiendo la latencia (tiempo de extracción) de las patas traseras a partir de un haz concentrado de calor radiante aplicado a la superficie plantar usando un aparato de prueba plantar (Ugo Basile). Brevemente, la rata se colocó dentro de un compartimiento de plástico sobre un piso de vidrio; una fuente de luz debajo del piso estaba dirigida a la superficie plantar media de la pata trasera. El reflejo de retirada interrumpe la luz y apaga automáticamente la luz y un temporizador. La intensidad de la luz se ajustó al comienzo del experimento de tal manera que las latencias de referencia promedio de control fueron de aproximadamente 8 segundos y se impuso una latencia de punto de corte de 30 segundos. La latencia de retirada de cada pata se midió durante tres ensayos en intervalos de 2 minutos y la media de las tres lecturas se utilizó para el análisis de datos.

Alodinia táctil en el territorio del nervio ciático (pata trasera)

La alodinia táctil se evaluó midiendo el umbral de retirada a pelos de von Frey calibrados con intensidades que varían de 0,9 a 40 g. Los filamentos que ejercen una fuerza superior a 40 g no se usaron cuando levantaron las patas. El día del experimento, los animales se colocaron en una cámara de Perspex con un suelo metálico de malla y se dejaron aclimatar durante 15 minutos. Comenzando con la fuerza de filamento más baja, los pelos de von Frey se aplicaron perpendicularmente a la superficie plantar media de ambas patas traseras, con fuerza suficiente para provocar una ligera flexión contra la pata, y se mantuvieron hasta que se logró una respuesta, la Estimulación mecánica se mantuvo durante 2 segundos (máximo), esto se repitió cinco veces en un intervalo de 1-2 s. Cuando se retiró bruscamente la pata, o cuando se estremeció al retirar el cabello, se observó una respuesta positiva; cuando al menos 3 de 5 respuestas fueron positivas (60 %), este valor se aceptó como umbral táctil. El procedimiento se repitió con la siguiente fuerza de pelo más alta si se observaron menos de 3 respuestas positivas en cualquier prueba de cabello.

Alodinia táctil en el territorio del nervio trigémino (región orofacial)

El efecto de la administración de paclitaxel en el territorio del trigémino no se ha estudiado previamente. Paclitaxel se administró tal como se describió anteriormente para evaluar neuropatías periféricas en nervios espinales (Polomano et al., 2001).

El área orofacial se definió como la piel sobre la piel perioral (PO). Medimos el umbral de retirada a pelos de von Frey calibrados con intensidades que van desde 0,9 hasta 40 g. Se utilizó una serie descendente de filamentos cuando la rata respondió al filamento de partida. Cada filamento se sometió a prueba cinco veces en un intervalo de algunos segundos. Si la retirada de la cabeza se observó al menos tres veces después de sondear con un filamento, la rata se consideró sensible a ese filamento. El umbral de respuesta se definió como la fuerza más baja de los filamentos que produjo al menos tres respuestas de retirada en cinco pruebas.

Los umbrales de extracción mecánica y térmica se probaron consecutivamente en los siguientes grupos de animales:

1. Grupos de control: un grupo inyectado con el vehículo de paclitaxel (para controlar los efectos de manipulación). Las pruebas se llevaron a cabo siguiendo el mismo cronograma que sus correspondientes grupos tratados.

2. Animales tratados con paclitaxel: los umbrales de retirada mecánica y térmica se analizaron antes de la administración de paclitaxel (día B) y en días: 3, 5, 7, 18, 21 y 22 después de comenzar la administración de paclitaxel. Cuando se administró una inyección de paclitaxel el mismo día que las pruebas de comportamiento, se inyectaron ratas después de que se tomaron las medidas.

Después de estos procedimientos (día 22 después de la primera administración de paclitaxel) las ratas recibieron 3 µg/kg s.c.

Las pruebas se llevaron a cabo 30 minutos después de la inyección i.p. o s.c. Los umbrales de extracción mecánica y térmica se probaron en ambas patas en cada grupo en esta secuencia. La alodinia táctil en el orofacial se sometió a prueba al final del experimento.

Para evaluar si TTX fue capaz de prevenir o reducir el desarrollo de comportamientos nociceptivos inducidos por paclitaxel, se siguió otro procedimiento de administración. Las ratas se trataron simultáneamente durante una semana con inyecciones s.c. dos veces al día de TTX (3 ug/kg) y el protocolo habitual de administración de paclitaxel (véase anteriormente). Los comportamientos nociceptivos se probaron 3 semanas después.

3.1. Neuropatía periférica inducida por paclitaxel

Como el efecto de la administración repetida de paclitaxel en el comportamiento nociceptivo no se ha evaluado previamente en el territorio del trigémino, el primer paso fue comparar el desarrollo de alodinia en la región perioral con el registrado en la pata trasera (territorio ciático). La Figura 6 muestra el efecto de la administración de paclitaxel sobre la alodinia orofacial y la alodinia de la pata y la hiperalgesia. El paclitaxel (1 mg/kg) redujo significativamente la latencia térmica y el umbral mecánico en comparación con el grupo tratado con vehículo (fig. 6).

Para evaluar el efecto del TTX agudo, los umbrales táctiles y térmicos se evaluaron los días 0 (antes paclitaxel), el día 21 (control de alodinia e hiperalgesia inducida por paclitaxel) y el día 22 después de que las ratas fueron inyectadas i.p. con el fármaco.

El tratamiento con una sola dosis de TTX indujo una disminución parcial pero significativa de la alodinia en los territorios trigémino y ciático (FIG 7A y 7B).

TTX no redujo significativamente esta hiperalgesia, aunque se puede ver una ligera tendencia a hacerlo.

Finalmente, el tratamiento simultáneo con paclitaxel y TTX fue capaz de prevenir el desarrollo de alodinia en la región orofacial y en la pata, así como la hiperalgesia en la pata (fig 8).

Ejemplos de composiciones farmacéuticas

<u>Formulaciones administrables por vía oral</u>

<u>Ejemplo 1: Formulaciones de cápsula</u>

Ejemplo de una formulación (A) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,03 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	98,47 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (B) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,15 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	98,35 mg

Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (C) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,3 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	98,2 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (D) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,9 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	97,6 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (E) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,25 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	98,25 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (F) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,5 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	98,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (G) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,0 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Lactosa	97,5 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (H) para una cápsula

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,5 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg

Lactosa	97,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo 2: Formulaciones de comprimido

Ejemplo de una formulación (A) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,03 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	93,47 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (B) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,15 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	93,35 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (C) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,3 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	93,2 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (D) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,9 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	92,6 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (E) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,25 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg

Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	93,25 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (F) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,5 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	93,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (G) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,0 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	92,5 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (H) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,5 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio	5,0 mg
Lactosa	92,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo 3: Formulaciones de comprimido adicionales

Ejemplo de una formulación (A) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,03 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	68,47 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (B) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,15 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	68,35 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (C) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,3 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	68,2 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (D) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,9 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	67,6 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (E) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,25 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	68,25 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (F) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,5 mg

Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	68,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (G) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,0 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	0 mg
Lactosa	67,5 mg
Total	100 mg

Ejemplo de una formulación (H) para un comprimido (granulación húmeda)

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,5 mg
Dióxido de silicio coloidal	0,5 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
POVIDONA K-30	5,0 mg
Carboximetilalmidón sódico	5,0 mg
Celulosa microcristalina	20 mg
Lactosa	67,0 mg
Total	100 mg

Ejemplo 4: Formulaciones de comprimido adicionales

Ejemplo de una formulación (A) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,03 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (AVICEL PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,97 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (B) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,06 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (AVICEL PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,94 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (C) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,12 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,88 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (D) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,18 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF 16 mg POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,82 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (E) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,3 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,7 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (F) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,9 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg

Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,1 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (G) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,25 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,75 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (H) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,5 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,5 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (I) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg
Estearato de magnesio, NF	16 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	365,0 mg
Total	800 mg

Ejemplo de una formulación (J) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,5 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	40 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	8 mg

Estearato de magnesio, NF 1	6 mg
POVIDONA K-30	40 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	346 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	364,5 mg
Total	800 mg

Ejemplo 5: Formulaciones de comprimido adicionales

Ejemplo de una formulación alternativa (A) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,03 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,97 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (B) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,15 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,85 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (C) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,3 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,7 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (D) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,9 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio 1	2 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,1 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (E) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,25 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,75 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (F) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	0,5 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio 12 mg Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,5 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (G) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,0 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102) 7	5 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	420,0 mg
OPADRY II ®	24 mg

Total	600 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (H) para un comprimido

Tetrodotoxina (TTX) (material en polvo)	1,5 mg
Croscarmelosa de sodio (AC-DI-SOL)	35 mg
Dióxido de sílice coloidal (AEROSYL 200)	3 mg
Estearato de sodio	12 mg
Polietilenglicol 8000	30 mg
Celulosa microcristalina (Avicel PH-102)	75 mg
Lactosa monohidrato (FARMATOSE 200M)	419,5 mg
OPADRY II ®	24 mg
Total	600 mg

Ejemplo 6: Formulaciones de cápsula adicionales

Ejemplo de una formulación alternativa (A) de una cápsula

Tetrodotoxina	0,03 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	476,77 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (B) de una cápsula

Tetrodotoxina	0,15 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	476,65 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (C) de una cápsula

Tetrodotoxina	0,3 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	476,5 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (D) de una cápsula

Tetrodotoxina	0,9 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	475,9 mg

Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (E) de una cápsula

Tetrodotoxina 0,25 mg	
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	476,55 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (F) de una cápsula

Tetrodotoxina	0,5 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	476,3 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (G) de una cápsula

Tetrodotoxina	1,0 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	475,8 mg
Total	480 mg

Ejemplo de una formulación alternativa (H) de una cápsula

Tetrodotoxina	1,5 mg
Dióxido de sílice coloidal	0,8 mg
Estearato de magnesio	2,4 mg
Lactosa	475,3 mg
Total	480 mg

EJEMPLO 7: Formulaciones sólidas en el exterior

Formulación encapsulada sólida en el exterior (A)

Tetrodotoxina	60 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (B):

Tetrodotoxina	300 mg

Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (C)

Tetrodotoxina	600 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (D)

Tetrodotoxina	1800 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (E)

Tetrodotoxina	500 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (F)

Tetrodotoxina	1000 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (G)

Tetrodotoxina	2000 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml

Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

Formulación encapsulada sólida en el exterior (H)

Tetrodotoxina	3000 mg
Ácido acético diluido al 0,5 %	1 ml
Solución tampón de ácido acético-acetato (pH = 3,5)	50 ml (5 % del volumen total de la solución farmacéutica preparada)
Agua, estéril, añadir a	1000 ml

Se encapsularon 0,5 ml de esta solución preparada en cápsulas consumibles adecuadas y se almacenó.

EJEMPLO 8:

Ejemplo de una formulación alternativa adicional de un comprimido listo para procesarse en una formulación gastrorresistente

Tetrodotoxina	0,5 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	46,8 mg
Avicel PH 101	50,0 mg
NATROSOL 250 HHX	1,0 mg
CAB-O-SIL M5	0,5 mg
Estearato de magnesio NF	1,0 mg
Yellow Lake F D & C n.º 6	0,2 mg
Agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 9:

Ejemplo de una versión gastrorresistente del ejemplo 8

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 8	100 mg
Suspensión de recubrimiento amarillo Acryl-Eze, House Std	40,0 mg

EJEMPLO 10:

Ejemplo de otra forma de comprimido listo para procesarse en una formulación recubierta de liberación controlada

Tetrodotoxina	0,5 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	40,0 mg
Avicel PH 101	46,8 mg
NATROSOL 250 HHX	10,0 mg
CAB-O-SIL M5 0,5 mg estearato de magnesio NF	2,0 mg
Blue F D & C n.º1 0,2 mg de agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 11:

Ejemplo de una versión recubierta de liberación controlada del ejemplo 10

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 10	100 mg
Suspensión de SURETERIC Blue, House Std	20,0 mg
Suspensión transparente 90/10 SURELEASE / OPADRY	30,0 mg

EJEMPLO 12:

Ejemplo de una formulación alternativa adicional de un comprimido listo para procesarse en una formulación recubierta

Tetrodotoxina	0,5 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	46,0 mg
Avicel PH 101	50,0 mg
AC-DI-SOL	2,0 mg
CAB-O-SIL M5	0,5 mg
Estearato de magnesio NF	1,0 mg
Agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 13:

Ejemplo de una versión recubierta del ejemplo 12

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 12	100 mg
Suspensión de recubrimiento OPADRY II, House Std	20,0 mg

EJEMPLO 14:

Ejemplo de una formulación alternativa adicional de un comprimido listo para procesarse en una formulación gastrorresistente

Tetrodotoxina	1,0 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	46,3 mg
Avicel PH 101	50,0 mg
NATROSOL 250 HHX	1,0 mg
CAB-O-SIL M5	0,5 mg
Estearato de magnesio NF	1,0 mg
Yellow Lake F D & C n.º 6	0,2 mg
Agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 15:

Ejemplo de una versión gastrorresistente del ejemplo 14

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 14	100 mg

Suspensión de recubrimiento amarillo Acryl-Eze, House Std	40,0 mg

EJEMPLO 16:

Ejemplo de otra forma de comprimido listo para procesarse en una formulación recubierta de liberación controlada

Tetrodotoxina	1,0 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	40,0 mg
Avicel PH 101	46,3 mg
NATROSOL 250 HHX	10,0 mg
CAB-O-SIL M5	0,5 mg
Estearato de magnesio NF	2,0 mg
Blue F D & C n.º 1	0,2 mg
Agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 17:

Ejemplo de una versión recubierta de liberación controlada del ejemplo 16

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 16	100 mg
Suspensión de SURETERIC Blue, House Std	20,0 mg
Suspensión transparente 90/10 SURELEASE / OPADRY	30,0 mg

EJEMPLO 18:

Ejemplo de una formulación alternativa adicional de un comprimido listo para procesarse en una formulación recubierta

Tetrodotoxina	1,0 mg
Fosfato de calcio dibásico USP	45,5 mg
Avicel PH 101	50,0
mg AC-DI-SOL	2,0 mg
CAB-O-SIL M5	0,5 mg
Estearato de magnesio NF	1,0 mg
Agua purificada USP (se evapora durante el procedimiento)	
Total	100 mg

EJEMPLO 19:

Ejemplo de una versión recubierta del ejemplo 18

Comprimido de acuerdo con el ejemplo 18	100 mg
Suspensión de recubrimiento OPADRY II, House Std	20,0 mg

Con la guía proporcionada en el presente documento, una vez que se conocen los parámetros requeridos de una composición o procedimiento, los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente las cantidades y proporciones de componentes activos y otros componentes requeridos para fabricar una forma de dosificación requerida, fabricar un kit o composición o usar los procedimientos y composiciones

divulgados. Los modos de realización anteriores se han descrito en detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad y comprensión.

REIVINDICACIONES

1. Tetrodotoxina, opcionalmente en forma de un racemato, un estereoisómero puro, especialmente un enantiómero o diastereómero o en forma de una mezcla de estereoisómeros, especialmente un enantiómero o un diastereómero, en cualquier proporción de mezcla adecuada; en forma neutra, en forma de un ácido o base o en forma de una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable, o en forma de un solvato, especialmente un hidrato, para su uso en el tratamiento o prevención del dolor neuropático que se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia.

2. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la tetrodotoxina está en forma neutra o como una sal, especialmente una sal fisiológicamente aceptable.

3. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** la tetrodotoxina se usa en una cantidad entre 10 µg/día y 4 mg/día.

4. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** la tetrodotoxina se aísla de una fuente biológica, preferentemente de pescado, especialmente pez globo.

5. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** la tetrodotoxina es sintética.

6. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en derivados de platino, alcaloides vegetales y terpenoides.

7. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** el al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en alcaloides de la vinca y taxanos.

8. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** el al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel y docetaxel.

9. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** el al menos un antineoplásico usado en la quimioterapia se selecciona del grupo de taxanos.

10. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático periférico, alodinia, causalgia, hiperalgesia, hiperestesia, hiperpatia, neuralgia, neuritis y neuropatía.

11. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la neuropatía es neuropatía sensorial.

12. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizada por que** el antineoplásico es paclitaxel o docetaxel.

13. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en la que la sal se selecciona del grupo que consiste en un acetato, un monotrifluoroacetato, una sal de éster de acetato, un citrato, un formiato, un picrato, un bromhidrato, un monobromhidrato, un monoclorhidrato y un clorhidrato.

14. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizada por que** la tetrodotoxina se usa en una dosis diaria máxima, y en la que la dosis diaria máxima es de hasta aproximadamente 300 µg, preferentemente hasta aproximadamente 150 µg, preferentemente hasta aproximadamente 144 µg, preferentemente hasta aproximadamente 100 µg, preferentemente hasta aproximadamente 50 µg y más preferentemente hasta aproximadamente 10 µg.

15. Tetrodotoxina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el antineoplásico se administra en combinación con la tetrodotoxina.

FIG. 1)

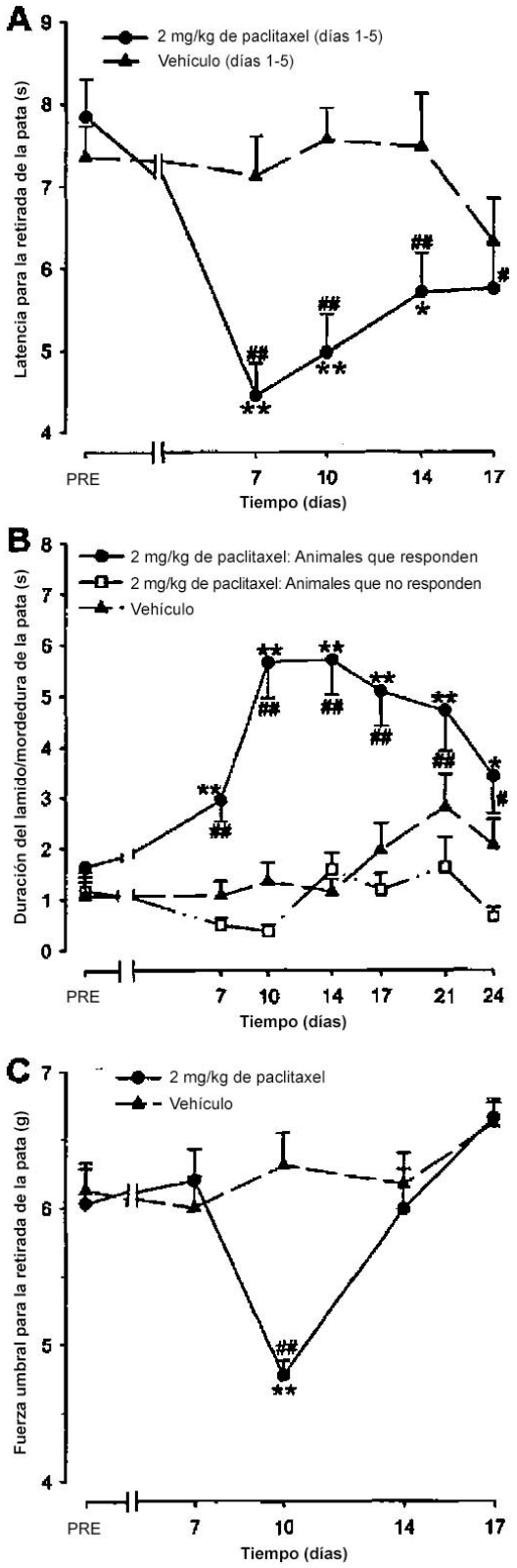

A
2 mg/kg de paclitaxel (días 1-5)
Vehículo (días 1-5)
Latencia para la retirada de la pata (s)
PRE
7
10
14
17
Tiempo (días)
B
2 mg/kg de paclitaxel: Animales que responden
2 mg/kg de paclitaxel: Animales que no responden
Vehículo
Duración del lamido/mordedura de la pata (s)
PRE
7
10
14
17
21
24
Tiempo (días)
C
2 mg/kg de paclitaxel
Vehículo
Fuerza umbral para la retirada de la pata (g)
PRE
7
10
14
17
Tiempo (días)

FIG. 2)

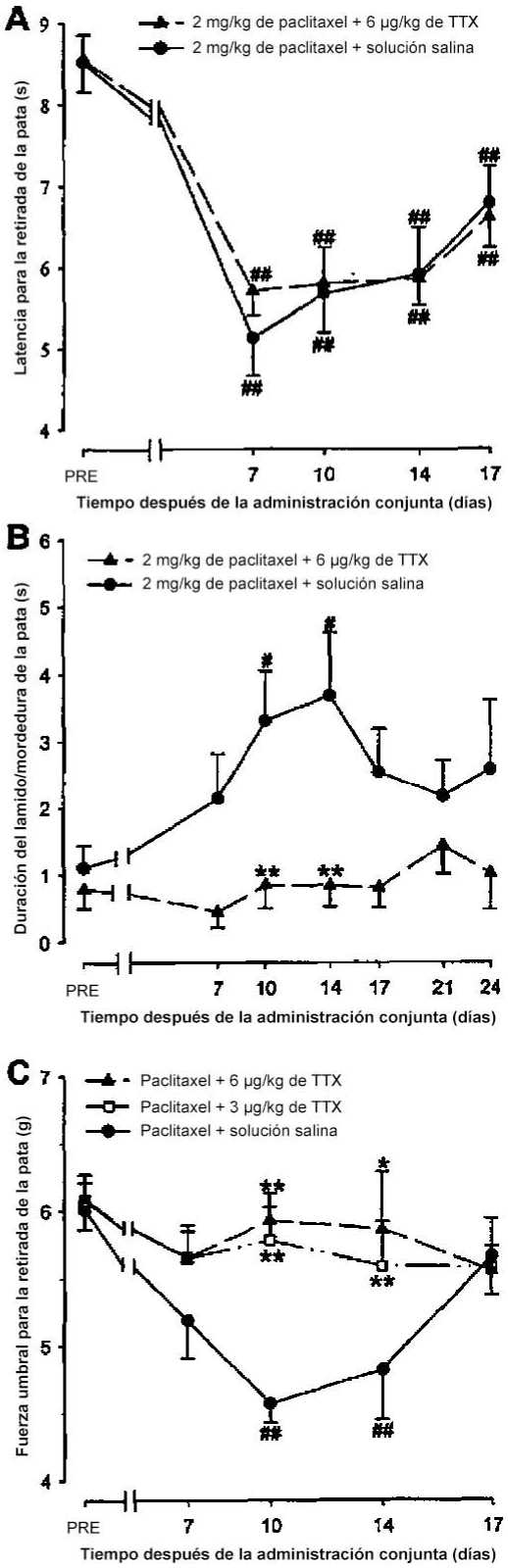

A
2 mg/kg de paclitaxel + 6 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + solución salina
Latencia para la retirada de la pata (s)
PRE
7
10
14
17
Tiempo después de la administración conjunta (días)
B
2 mg/kg de paclitaxel + 6 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + solución salina
Duración del lamido/mordedura de la pata (s)
PRE
7
10
14
17
21
24
Tiempo después de la administración conjunta (días)
C
Paclitaxel + 6 µg/kg de TTX
Paclitaxel + 3 µg/kg de TTX
Paclitaxel + solución salina
Fuerza umbral para la retirada de la pata (g)
PRE
7
10
14
17
Tiempo después de la administración conjunta (días)

FIG. 3)

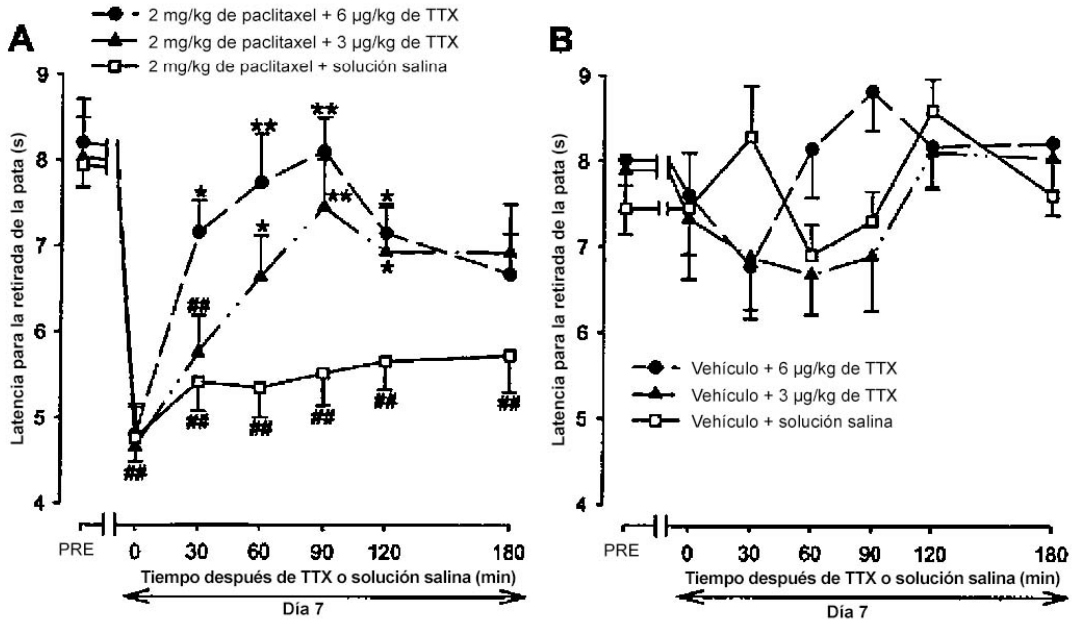

A
2 mg/kg de paclitaxel + 6 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + 3 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + solución salina
Latencia para la retirada de la pata (s)
PRE
0
30
60
90
120
180
Tiempo después de TTX o solución salina (min)
Día 7
B
Vehículo + 6 µg/kg de TTX
Vehículo + 3 µg/kg de TTX
Vehículo + solución salina
Latencia para la retirada de la pata (s)
PRE
0
30
60
90
120
180
Tiempo después de TTX o solución salina (min)
Día 7

FIG. 4)

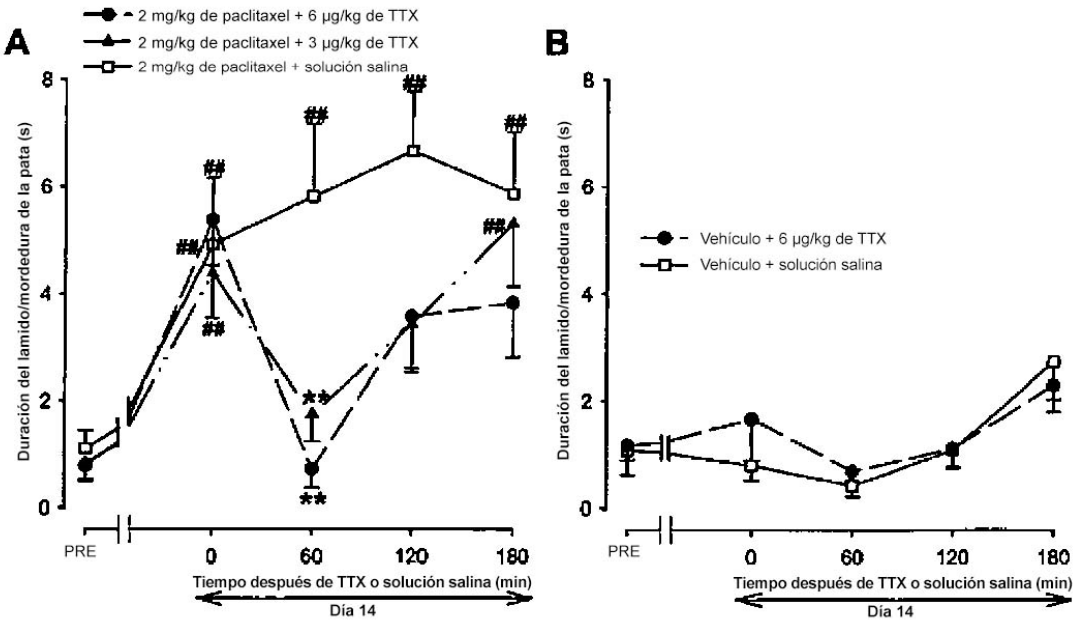
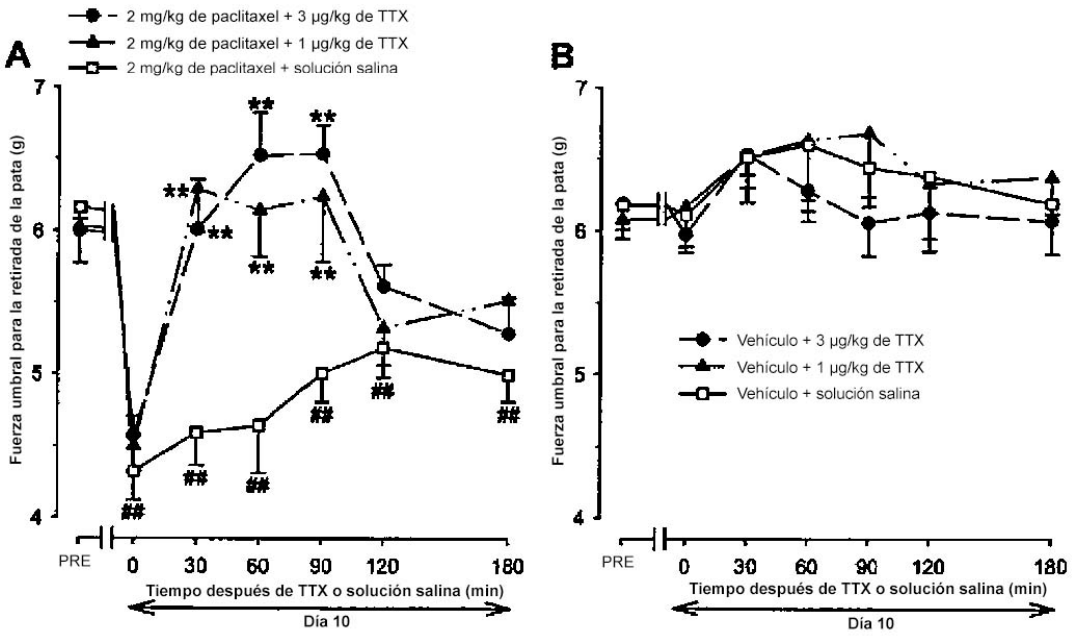

A
2 mg/kg de paclitaxel + 6 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + 3 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + solución salina
Duración del lamido/mordedura de la pata (s)
PRE
0
60
120
180
Tiempo después de TTX o solución salina (min)
Día 14
B
Vehículo + 6 µg/kg de TTX
Vehículo + solución salina
Duración del lamido/mordedura de la pata (s)
PRE
0
60
120
180
Tiempo después de TTX o solución salina (min)
Día 14

FIG. 5)


A
2 mg/kg de paclitaxel + 3 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + 1 µg/kg de TTX
2 mg/kg de paclitaxel + solución salina
Fuerza umbral para la retirada de la pata (g)
7
6
5
4
PRE
0
30
60
90
120
180
Tiempo después de TTX o solución salina (min)
Día 10
B
Vehículo + 3 µg/kg de TTX
Vehículo + 1 µg/kg de TTX
Vehículo + solución salina