(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 763 946**

(51) Int. CI.:

C07C 233/22 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012 PCT/IL2012/050512**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084238**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 12855522 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2788317**

(54) Título: **Formas estereoisoméricas aisladas de (S) 2-N (3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida**

(30) Prioridad:

08.12.2011 US 201161568219 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2020

(73) Titular/es:

NOVAREMED LTD. (100.0%)
9 Bareket Street
49250 Petah Tiqwa, IL

(72) Inventor/es:

KAPLAN, ELIAHU

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Formas estereoisoméricas aisladas de (S) 2-N (3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a formas estereoisoméricas aisladas del compuesto (S)2-N(3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida. Específicamente, la presente invención se refiere a (S)2-N(3-O -((S)propano 2- ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida para su uso en el tratamiento o profilaxis del dolor, en particular, dolor neuropático.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] El compuesto 2-N(3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida se describe en US 7.754.771, y ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la infección por VIH-1. Este compuesto ha sido revelado adicionalmente para su uso en el tratamiento o la profilaxis del dolor y la inflamación en los documentos WO 2009/109850 WO 2011/030205 y US 2011/0086910.15 Las divulgaciones anteriores sobre este compuesto se han relacionado con el racemato que contiene los cuatro enantiómeros y diastereómeros, a saber (S,S), (S,R), (R,R) y (R,S). El racemato que contiene los enantiómeros S en la posición quiral adyacente a la amida, se describió como una realización particularmente ventajosa.

[0003] El dolor es una respuesta experimental multifacética o multidimensional a una variedad de condiciones de estímulo. El dolor se define por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o descrita en términos de tal daño".

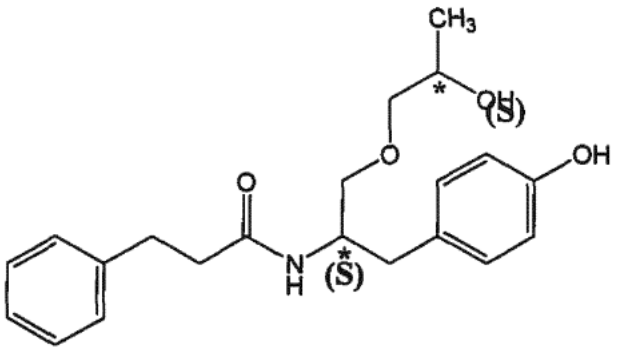
[0004] El dolor puede ser agudo o crónico. El dolor agudo generalmente es causado por daños en los tejidos blandos, infección y/o inflamación, entre otras causas. El dolor crónico puede no tener una causa aparente o puede ser causado por una enfermedad o desequilibrio en desarrollo. El dolor crónico se define como la enfermedad del dolor; su origen, duración, intensidad y síntomas específicos pueden variar. Además, el dolor crónico se puede clasificar como nociceptivo o neuropático. El dolor nociceptivo incluye dolor inducido por lesiones tisulares y dolor inflamatorio como el asociado con la artritis. El dolor nociceptivo se ha tratado tradicionalmente mediante la administración de analgésicos no opioides, como ácido acetilsalicílico, trisalicilato de colina y magnesio, acetaminofeno, ibuprofeno, fenoprofeno, diflusinal y naproxeno; o analgésicos opioides, que incluyen morfina, hidromorfona, metadona, levorfanol, fentanilo, oxicodona y oximorfona. El dolor neuropático, un dolor crónico debilitante después del daño nervioso, se caracteriza por su naturaleza crónica, hiperalgesia o hipersensibilidad anormal del dolor a estímulos inocuos (alodinia táctil). La hiperalgesia es una respuesta exagerada a un estímulo doloroso. La alodinia es la percepción de estímulos normales como dolorosos (los ejemplos incluyen el toque de ropa, aire cálido o frío, etc.). El dolor neuropático puede ser una secuela del daño nervioso en una extremidad, como un brazo o, más a menudo, una pierna. Los eventos precipitantes pueden incluir trauma o amputaciones (p. ej., dolor de miembro fantasma). El dolor neuropático puede ocurrir debido a un efecto adverso de las terapias farmacológicas, por ejemplo, vincristina o paclitaxel (Taxol™), o puede ocurrir como un componente de patologías de enfermedades, como diabetes tipo 1 o tipo 2, culebrilla, infecciones por VIH-1, etc. Por lo general, el dolor neuropático no responde a los opiáceos ni a los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina. Los medicamentos actuales sugeridos para el dolor neuropático incluyen antiepilépticos (p. ej., gabapentina, carbamazepina, ácido valproico, topiramato, feniloína), antagonistas de NMDA (p. ej., ketamina, dextrometorfano), lidocaína tópica (para la neuralgia postherpética) y antidepresivos tricíclicos (p. ej., antidepresivos tricíclicos, p. ej. y amitriptilina).

[**0005]** Están todavía por determinar los mecanismos subyacentes de dolor neuropático. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que Lyn tirosina quinasa, un miembro de las quinasas de la familia Src (SFK) juega un papel importante en la patogénesis del dolor neuropático. La expresión de Lyn en la médula espinal estaba altamente restringida a microglia, y su nivel aumentó después de una lesión nerviosa. Se ha demostrado que los ratones que carecen de Lyn exhiben una reducción notable en su capacidad de alodinia táctil después de una lesión nerviosa. Se concluyó que el dolor neuropático puede estar relacionado con la regulación positiva de la tirosina quinasa Lyn. (*Ver* Tsuda et al., Glia, 2008, 56: 50-8).

[**0006]** Los tratamientos actualmente disponibles para el dolor neuropático sólo tienen baja a moderada eficacia, y muchos pacientes se quedan sin un alivio significativo del dolor. La falta de alivio adecuado del dolor para millones de personas con dolor neuropático, así como para aquellos con otros tipos de dolor, representa una gran necesidad médica no satisfecha, esta invención aborda esa necesidad.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención se refiere a formas estereoisoméricas aisladas del compuesto (S)2-N(3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida de fórmula II



Formula II

que tiene la estereoquímica específica de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto está en una forma sustancialmente pura que comprende al menos 90% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 10% de otras formas estereoisoméricas del compuesto para usar en el tratamiento o profilaxis del dolor, en donde dicho compuesto o sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra una vez en 24 horas.

[0008] La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que los enantiómeros sustancialmente puros (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (también conocida como enantiómero (S,S) o E1) y (S)2-N(3-O-((R)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (también conocido como enantiómero (S,R) o E2) modula la actividad de tirosina quinasas específicas de manera opuesta. Se descubrió inesperadamente que mientras el enantiómero (S,S) activaba la proteína tirosina quinasas LynA y BLK, el enantiómero (S,R) inhibía su actividad. Además, inesperadamente se demostró que el enantiómero (S,S) era eficaz como analgésico del dolor en modelos animales de dolor, mientras que el enantiómero (S,R) era ineficaz o menos efectivo en estos modelos. Además, el efecto analgésico del enantiómero (S,S) fue de acción prolongada, ya que fue eficaz durante más de 24 horas después de la administración, en comparación con el agente analgésico comúnmente utilizado gabapentina que fue efectivo durante no más de 5 horas después de la administración.

[**0009]** De acuerdo con algunas formas de realización, el enantiómero sustancialmente puro de fórmula II comprende al menos 95% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 5% de otras formas estereoisoméricas del compuesto.

[**0010]** De acuerdo con otras formas de realización, el enantiómero sustancialmente puro de fórmula II comprende al menos 98% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 2% de otras formas estereoisoméricas del compuesto.

[**0011]** Según algunas realizaciones, el dolor es agudo o dolor crónico. En realizaciones particulares, el dolor es dolor neuropático. Preferiblemente, el dolor neuropático es al menos un síntoma seleccionado de dolores neuropáticos en neuralgia post herpética, neuralgia del trigémino, neuralgia diabética, dolor por cáncer, dolor postoperatorio o postraumático persistente, hiperalgia, alodinia, dolor postoracotomía, CRPS, dolor asociado con esclerosis múltiple, SIDA, dolor talámico, dolor parapléjico causado por mielopatía, anestesia dolorosa y dolor de miembro fantasma. Cada posibilidad representa una realización separada de la invención. En algunas realizaciones, el dolor es dolor nociceptivo.

[**0012]** De acuerdo con algunas formas de realización, el enantiómero sustancialmente puro de fórmula II se formula en una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Según otras realizaciones, la composición se formula como una forma de dosificación unitaria. Según otras realizaciones, la composición está formulada para administración oral.

[**0013]** Según otras realizaciones, la composición se formula como una forma de dosificación unitaria que comprende de 0,1 a 500 mg del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptables o hidratos de los mismos.

[**0014]** Según otras realizaciones, la composición es adecuada para la administración de una dosis diaria de 1,0 mg a 15 g del compuesto.

[**0015]** La presente invención se entenderá más completamente a partir de las siguientes figuras y detallada descripción de las formas de realización preferidas de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[**0016**]

La figura 1 muestra las medidas de tiempo de latencia medio usando la prueba de movimiento de la cola. Los grupos de estudio de izquierda a derecha incluyen: vehículo (grupo 1); Morfina (grupo 2); 3 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 3) sustancialmente puro 10 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 4) sustancialmente puro 20 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 5) y 10 mg/kg de sustancialmente puro (S)2-N(3-O-((R)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 6). * = p <0,01 vs. Vehículo; & = p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento; ^ = p <0,05 Pretratamiento versus postratamiento.

La figura 2 muestra la diferencia entre los tiempos de latencia postratamiento y pretratamiento medidos utilizando el movimiento de la cola (seg.). Los grupos de estudio de izquierda a derecha incluyen: vehículo (grupo 1); Morfina (grupo 2); 3 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 3) sustancialmente puro 10 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 4) sustancialmente puro 20 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 5) y 10 mg/kg de sustancialmente puro (S)2-N(3-O-((R)propano 2-ol)-1-propil4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 6). * - p <0,01 vs. Vehículo; # = p <0,05 vs. Vehículo.

La figura 3 muestra el peso corporal medio del grupo de los diferentes grupos de estudio medidos durante el curso del estudio (días 1, 7, 14 y 21). Los grupos de estudio de izquierda a derecha incluyen: vehículo (grupo 1); Gabapentina (grupo 2); 30 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 3) sustancialmente puro 15 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 4) sustancialmente puro 7,5 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 5) sustancialmente pura.

La figura 4 muestra la media fuerza de Von Frey requerida para la retirada de la pierna operada izquierda medida en el 14º día de estudio 2, 5 y 24 horas post-tratamiento y en el 21º día del estudio 2, 5, 24 y 48 horas después del tratamiento de 7 días. Los grupos de estudio de izquierda a derecha incluyen: vehículo (grupo 1); Gabapentina (grupo 2); 30 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 3) sustancialmente pura 15 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 4) sustancialmente pura 7,5 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 5) sustancialmente pura * p <0,05 vs. Vehículo # p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento.

La figura 5 muestra la diferencia (delta) de fuerza entre la pierna sana derecha y pierna operada izquierda medida en el 14º día del estudio 2, 5 y 24 horas post-tratamiento y en la 21º día del estudio 2, 5, 24 y 48 horas después del tratamiento. Los grupos de estudio de izquierda a derecha incluyen: vehículo (grupo 1); Gabapentina (grupo 2); 30 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 3) sustancialmente pura 15 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 4) sustancialmente pura 7,5 mg/kg de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida (grupo 5) sustancialmente pura * p <0,05 vs. Vehículo # p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento.

La figura 6 A-D muestra la modulación de las proteínas tirosina quinasas, BLK, LynA, LynB y Src por los compuestos de la invención, presentados en forma de curvas CI_{50} y CE_{50}.

La figura 7 A-C muestra la separación quiral de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y (S)2-N(3-O-((R)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida usando una cromatografía de fluido supercrítico (SFC) en combinación con fases estacionarias quirales. A: racemato de los enantiómeros E1 y E2; B: enantiómero E1 sustancialmente puro; C: enantiómero E2 sustancialmente puro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

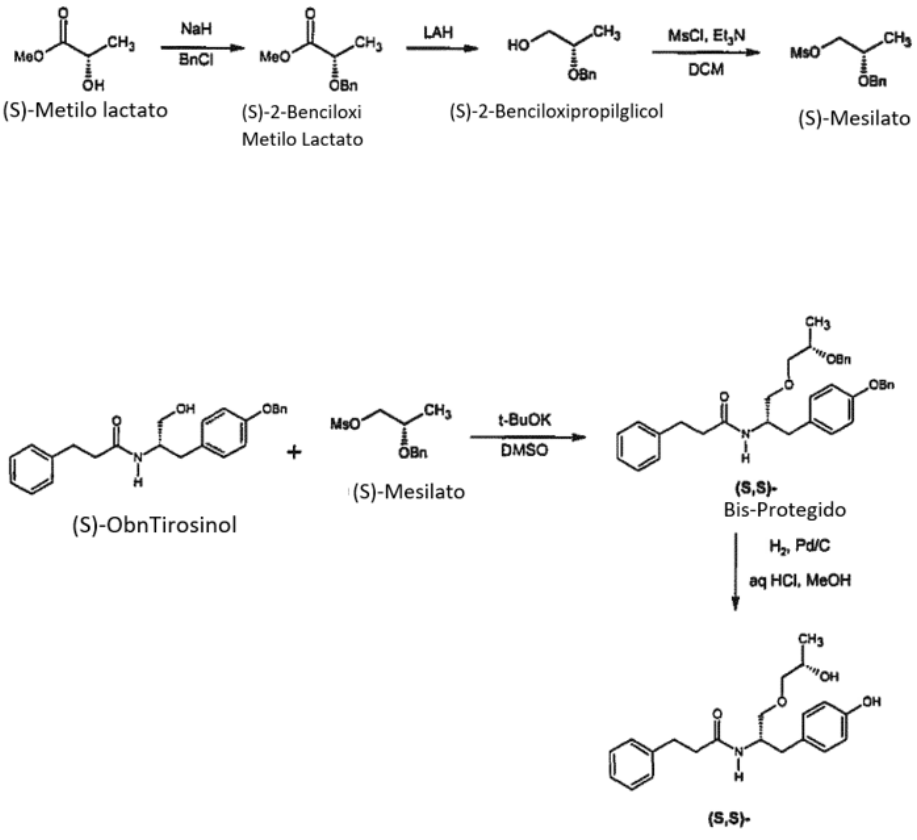
[0017] La presente invención se refiere a formas estereoisoméricas aisladas del compuesto (S)2-N(3-O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y a usos de los mismos para la modulación terapéutica de procesos mediados por quinasas y el tratamiento de enfermedades y síntomas de enfermedades, particularmente aquellos mediados por ciertas enzimas quinasas. Específicamente, la presente invención proporciona (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida sustancialmente pura para usar en el tratamiento del dolor, preferiblemente dolor neuropático.

[**0018]** Como se usa en el presente documento y a menos que se indique lo contrario, el término "sustancialmente puro" cuando se usa para describir un enantiómero de un medio compuestas que un enantiómero está sustancialmente libre de otras formas estereoisoméricas del compuesto. Un enantiómero representativo sustancialmente puro comprende más del 90% en peso de un enantiómero del compuesto y menos del 10% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto, más preferiblemente mayor que aproximadamente 95% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 5% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 96% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 4% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto, incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 97% en peso de una forma enantiomérica del compuesto y menos de aproximadamente 3% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto, incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 98% en peso de una forma enantiomérica del compuesto y menos que aproximadamente 2% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto y lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 99% en peso de una forma antiomérica del compuesto y menos de aproximadamente 1% en peso de las otras formas estereoisoméricas del compuesto. Como se usa en el presente documento, "otras formas estereoisoméricas" pueden incluir al menos una de las formas enantioméricas o diastereoméricas (S,S), (S,R), (R,S) y (R,R) del compuesto 2-N(3 -O-(propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida.

[**0019]** El término "aproximadamente" tal como se utiliza aquí denota como máximo ± 10% del valor indicado, preferiblemente no más de ± 5%.

[**0020]** Los enantiómeros aislados se pueden sintetizar en forma de racemato por métodos conocidos en la técnica descritos por ejemplo en los documentos US 7.754.771, US 7.642,290, US 7.674.829 o US 2011/0086910. El racemato puede separarse adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica para la separación de compuestos quirales. Los enantiómeros pueden sintetizarse como un racemato (que comprende (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y (S)2-N(3-O-((R)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y se separará adicionalmente mediante una cromatografía de fluido supercrítico (SFC) en combinación con fases estacionarias quirales. Los compuestos (S,S) y (S,R) se pueden separar en la columna RegisPack™, una columna quiral recubierta de polisacárido (con un selector de tris-(3,5-dimetilfenilo) carbamoil celulosa) generalmente utilizado para separaciones enantioméricas de una amplia gama de clases de racemato (Figura 7A-C).

[**0021]** Los enantiómeros pueden sintetizarse directamente usando, por ejemplo, el proceso descrito en el esquema 1 para la preparación del enantiómero (S,S).



Esquema 1

[0022] El (S,R) enantiómero se puede sintetizar en consecuencia, mediante la reacción de (S)-OBnTyrosinol con (R)-Mesilato a la forma (S,R)-Bis-Protegido

[0023] Uno de los problemas que puede surgir en un procedimiento de síntesis de compuestos quirales se produce la racemización en uno (o más) de los pasos sintéticos. Aquí se muestra, por primera vez, que la temperatura de reacción y el orden de adición de las materias primas juegan un papel muy importante en la pureza quiral del producto formado. Se demostró además que la racemización ocurre específicamente en el primer paso de reacción que implica la conversión de lactato de metilo (enantiómero S o R) en lactato de 2-benciloximetilo (enantiómero S o R). Para reducir la ocurrencia de racemización en el proceso para la preparación de los compuestos (S,S) o (S,R), en el primer paso de reacción, el bromuro de bencilo y el lactato de metilo se pueden mezclar antes de su adición a la solución base (por ejemplo, hidruro de sodio). La aparición de racemización puede reducirse al realizar la reacción a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, preferiblemente inferior a 10°C, preferiblemente inferior a 5°C, preferiblemente inferior a 2°C, más preferiblemente a una temperatura inferior a -10°C, lo más preferiblemente a una temperatura de -15°C o inferior. La menor racemización (es decir, <1% de racemización) se obtuvo suspendiendo hidruro de sodio en THF a una temperatura de al menos aproximadamente -10°C, preferiblemente de al menos aproximadamente -15°C. Se añadió una mezcla de (S) metilo lactato y bromuro de bencilo a la solución de hidruro de sodio a una temperatura de al menos aproximadamente -10ºC, preferiblemente de al menos aproximadamente -15ºC.

[**0024]** Se ha encontrado, además, por primera vez, que el rendimiento del paso de reacción que implica la reacción de (S)-OBn-tirosinol y mesilato de (S o R enantiómero) se puede incrementar a aproximadamente 15%, preferiblemente a aproximadamente 20%, más preferiblemente hasta aproximadamente 25% al usar DMF como disolvente en lugar de DMSO e hidruro de sodio como base en lugar de terc-butóxido de potasio. También se describe un agente terapéutico para tratar o prevenir el dolor, preferiblemente dolor neuropático, que comprende (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida como ingrediente activo; una composición farmacéutica para tratar o prevenir el dolor, preferiblemente dolor neuropático, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y un vehículo farmacéuticamente aceptable y métodos para tratar o prevenir el dolor, específicamente el dolor neuropático que comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida.

[**0025]** Los ejemplos no limitantes de dolor neuropático incluyen dolores neuropáticos en neuralgia post herpética, trigémino neuralgia, neuralgia diabética, dolor por cáncer, postoperatorio persistente o dolor postraumático, dolor de espalda baja no específico, hiperalgesia, alodinia, ciática, dolor post-toracotomía, CRPS, dolor asociado con esclerosis múltiple, SIDA (o neuropatía relacionada con el VIH), fibromialgia, dolor talámico, dolor parapléjico causado por mielopatía, anestesia dolorosa, dolor de miembro fantasma y similares. Un agente terapéutico para el dolor neuropático según la presente invención es especialmente efectivo para tratar la hiperalgia y la alodinia. Además, las condiciones de dolor neuropático incluyen dolor asociado con sensaciones normalmente no dolorosas como "alfileres y agujas" (parestesias y disestesias), aumento de la sensibilidad al tacto (hiperestesia), sensación dolorosa después de la estimulación inocuo (alodinia dinámica, estática, térmica o fría), aumento de la sensibilidad a estímulos nocivos (hiperalgesia térmica, fría, mecánica), sensación de dolor continua después de la eliminación de la estimulación (hiperpatía) o ausencia o déficit de vías sensoriales selectivas (hipoalgesia).

[**0026]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella cantidad de (S)2-N(3-0 -((S)propano 2- ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida sustancialmente pura que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al cual se administra (S)2-N(3-0-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida sustancialmente pura. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida sustancialmente pura efectiva para aliviar o mejorar los síntomas de dolor en el sujeto que se está tratando.

[**0027]** En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" se refiere a un tratamiento sintomático y el término "profilaxis" se usa para significar la prevención de síntomas en un sujeto ya afligido o prevención de la recurrencia de los síntomas en un sujeto afligido y no se limita para completar la prevención de una aflicción.

[**0028]** El agente terapéutico para el tratamiento o la prevención del dolor se pueden administrar por vía oral o parenteral con ninguna limitación específica sobre la forma de administración. (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida como ingrediente activo del agente terapéutico para el dolor neuropático según la presente invención puede proporcionarse de forma independiente, o proporcionarse como contenido en una formulación junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéutico.

[**0029]** Los ejemplos del vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable que se pueden usar en la presente invención incluyen excipiente, desintegrador, aglutinante, lubricante, agente de recubrimiento, colorante, diluyente, agente de disolución, coadyuvante de disolución, agente de tonicidad, modificador de pH, estabilizador y similares.

[**0030]** De manera adecuada, la composición de la presente invención puede formularse como una forma de dosificación unitaria. Cada forma de dosificación unitaria puede comprender la totalidad o una fracción predeterminada

de la cantidad de dosis diaria del uno o más compuestos de la invención, por ejemplo, la mitad o la cuarta parte de la cantidad de dosis diaria.

[**0031]** Así, la composición puede formularse como un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, gránulo fino, gránulos, una solución parenteral estéril o suspensión, un aerosol medido o pulverización de líquido, jarabe, gotas, una ampolla, un dispositivo autoinyector, un supositorio, una crema o un gel. Dicha composición puede adaptarse para administración oral, enteral, parenteral, intratecal, intranasal, sublingual, rectal o tópica, o para administración por inhalación o insuflación. Se prefieren particularmente las composiciones orales tales como tabletas, píldoras, cápsulas o obleas.

[**0032]** Para preparar una forma de dosificación sólida tal como un comprimido, dicho uno o más compuestos se pueden mezclar con uno o más excipientes farmacéuticos, por ejemplo, celulosa microcristalina, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato dipotásico, glicina y similares pueden utilizarse junto con cualquiera de varios desintegradores tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, papa o tapioca), ácido algínico, cierto tipo de sal doble de silicato y similares; y un aglutinante formador de gránulos tal como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina, goma arábiga o similares. Un lubricante como el estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, talco o similares a menudo es muy efectivo para la formación de tabletas. Se puede usar una cápsula de gelatina llena con el mismo tipo de composición sólida. Las sustancias que se pueden usar preferiblemente en relación con esto incluyen lactosa y también polietilenglicol de alto peso molecular. Para preparar una suspensión acuosa y/o elixir para administración oral, el ingrediente activo puede usarse junto con cualquiera de varios tipos de edulcorantes, saborizantes, agentes colorantes o colorantes, opcionalmente un emulsionante y/o un agente de suspensión, así como un diluyente tal como agua, etanol, propilenglicerol, glicerol o similares o una combinación de los mismos.

[**0033]** La composición de pre-formulación sólida puede entonces subdividirse en formas de dosificación unitarias del tipo mencionado anteriormente y cada uno puede contener de 0,1 mg a aproximadamente 500 mg de los compuestos de la invención. Las formas de dosificación unitarias pueden contener de 1 mg a 500 mg, por ejemplo, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 o 500 mg de los compuestos.

[**0034]** Cuando se formula como un comprimido o píldora, dicho comprimido o la píldora pueden recubrirse o componerse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, dicha tableta o píldora puede comprender una dosificación interna y un componente de dosificación externa, esta última en forma de una envoltura sobre la primera. Estos dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en libertad. Se conoce una variedad de materiales en el uso en tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales que incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

[**0035]** La composición farmacéutica puede formularse como una forma de dosificación líquida para administración por vía oral o parenteral por inyección supositorio y similares; por ejemplo, una solución acuosa, un jarabe aromatizado adecuadamente, una suspensión acuosa o oleosa o una emulsión aromatizada con aceites comestibles como, por ejemplo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de maní, así como un elixir o un producto farmacéutico similar vehículo. Los agentes dispersantes o de suspensión adecuados para una suspensión acuosa incluyen gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, tragacanto, acacia, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina. Cuando es necesario, la solución acuosa se tampona adecuadamente (preferiblemente a pH 8 o superior) para isotonizar primero el diluyente líquido. Tal solución acuosa es adecuada para inyección intravenosa, y una solución oleaginosa es adecuada para inyección intraarticular, inyección intramuscular e inyección subcutánea. La forma de dosificación líquida se puede producir fácilmente en condiciones asépticas mediante una tecnología farmacéutica estándar bien conocida por los expertos en la materia. Además, el ingrediente activo de la presente invención puede administrarse tópicamente a la piel o similares. En tal caso, es deseable administrar tópicamente el ingrediente activo en forma de crema, gelatina, pasta o pomada de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar.

[**0036]** Un agente terapéutico para el dolor neuropático de acuerdo con la presente invención se puede administrar en una dosis apropiada, sin limitación específica, que se selecciona de acuerdo con diversas condiciones, incluyendo el tipo de dolor, la edad o síntoma del paciente, la vía de administración, propósito del tratamiento y presencia o ausencia de otro medicamento usado junto con el agente. Una dosis diaria del agente terapéutico para el dolor neuropático según la presente invención es, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 1 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente 5-30 mg/Kg de peso corporal.

EJEMPLOS

[0037] Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la descripción y sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1: La síntesis de E1

[0038] El procedimiento de síntesis general de E1 se resume en el Esquema 1. Específicamente, E1 se sintetizó usando el procedimiento que comprende las siguientes etapas:

1. Se hizo reaccionar 2 g de lactato de metilo con un exceso de bromuro de bencilo a obtener 880 mg de (S)-benciloximetilo lactato. La reacción se realizó suspendiendo hidruro de sodio en THF y enfriando a aproximadamente -15ºC. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 1 a 2 horas. La reacción se interrumpió con una solución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con MTBE dos veces, seguido de la eliminación del disolvente en un evaporador rotatorio para obtener un aceite crudo. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener lactato de (S)-2-benciloximetilo puro. El isómero de lactato de (R)-2-benciloximetilo estaba presente solo al 0,93%. El rendimiento de este paso puede aumentarse evitando la presencia de humedad en la solución de reacción (es decir, THF).
2. 880 mg (S)-2-benciloximetilo lactato obtenido en el paso 1 se redujeron usando hidruro de litio y aluminio para obtener (S)-2-benciloxipropilenglicol con un rendimiento del 83,8% con 98,7% de pureza. Se agitó una solución de lactato de (S)-2-benciloximetilo puro en cloruro de metileno y se le añadió lentamente una solución de hidruro de litio y aluminio a aproximadamente 5°C. La reacción se controló mediante el sistema TLC y se inactivó con agua USP-PW con mucho cuidado. No se produjo racemización en este paso.
3. Luego se hizo reaccionar (S)-2-benciloxipropilenglicol con cloruro de metanosulfonilo en cloruro de metileno en presencia de trietilamina para obtener el mesilato con un rendimiento del 88%. Una solución del paso 2 se agitó en cloruro de metileno y se le añadió cloruro de metanosulfonilo gota a gota a <5ºC. Después de completar la adición, el progreso de la reacción fue monitoreado por el sistema TLC. La reacción se sofocó con agua USP-PW. Después de que las capas se separaron, la capa acuosa se volvió a extraer con cloruro de metileno. Las capas de cloruro de metileno se combinaron y se lavaron con agua USP-PW 3 veces para eliminar la mayor parte del ácido metanosulfónico. No se produjo racemización en este paso.
4. El mesilato (del Paso 3) se acopló con S-Obencilo tirosinol para formar E1 protegido con bis con un rendimiento del 22,7%, con una pureza del 97,4%. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente usando una combinación de DMF como disolvente e hidruro de sodio como base. La reacción se completó después de agitar durante al menos 12 horas a temperatura ambiente. Cuando se usó DMSO como solvente con terc-butóxido de potasio como base, parecía que el anión demsilo se forma por la reacción de la base con DMSO descompone el mesilato o lo convierte en impurezas. Como resultado, solo se formaron trazas del producto o no se formó ningún producto.
5. 340 mg del producto del paso 4 se redujo por hidrogenación en presencia de paladio al 10% sobre catalizador de carbono y ácido clorhídrico usando cloruro de metileno como disolvente a 50ºC. La reacción se completó en aproximadamente 4 horas sin racemización para producir E1 con 84,3% de rendimiento y 98,9%.

Ejemplo 2: La síntesis de E2

[0039] El enantiómero de E2 se sintetizó como el racemato de la (S,S) y (S,R) enantiómeros como se describe en los Estados Unidos 2011/0086910 y se separó adicionalmente en una columna de RegisPack™, una columna quiral recubierta con polisacárido (con un selector de tris-(3,5-dimetilfenilo) carbamoil celulosa) (Figura 7A-C).

Ejemplo 3: Evaluación del efecto analgésico de E1 y E2 en una prueba de retirada de la cola:

[0040] En el presente estudio se evaluó el efecto analgésico de los enantiómeros sustancialmente puros E1 y E2 usando el modelo de retirada de la cola para el dolor nociceptivo en ratones.

Preparación de los productos de ensayo y materiales:

[0041]

Grupo	Compuesto	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Ruta	Volumen de dosificación
1	Vehículo	3	0	IP	5 ml/kg
2	Morfina	3	5		
3	E1	6	3		
4	E1	6	10		
		2			
5	E1	6	20		
6	E2	6	10		

[0042] Preparación de morfina: 19 ml de solución salina se añadió a 1 ml de morfina ampolla y fue de 0,1 ml de solución recibido inyectada por 20 g ratones (5 ml/kg).

[**0043]** Preparación del vehículo: 1 ml de DMSO se disolvió en 4 ml de solución salina.

Preparación E1 y E2 de la muestra (concentración de 2 mg/ml para la dosificación de 10 mg/kg):

[0044]

- Se pesaron 4 mg de E1 o E2.
- El E1 o E2 medido se disolvió completamente en 0,4 ml de DMSO.
- La solución se diluyó luego en 1,6 ml de solución salina.

Preparación de E1 para la Parte B:

La solución madre E1 se preparó del siguiente modo:

[0045]

- Se pesaron 16,5 mg de E1.
- El E1 medido se disolvió completamente en 0,82 ml de DMSO.
- La solución se diluyó luego en 3,28 ml de solución salina.

Preparación E1 (concentración de 4 mg/ml para la dosificación de 20 mg/kg):

[0046] 20 mg/kg de solución de E1 se dosificó de solución madre a través de la administración i.p. en un volumen de inyección de 5 ml/kg.

Preparación E1 (concentración de 2 mg/ml para la dosificación de 10 mg/kg):

[0047] Se diluyó 0,7 ml de solución madre en 0,7 Vehículo ml.

[**0048**] 10 mg/kg de solución de E1 se dosificó de solución madre a través de la administración i.p. en un volumen de inyección de 5 ml/kg.

Preparación E1 (concentración de 0,6 mg/ml para la dosificación de 3 mg/kg):

[0049] Se diluyó 0,5 ml de solución madre en vehículo de 3,35 ml.

[**0050**] 3 mg/kg de solución de E1 se dosificó de solución madre a través de la administración i.p. en un volumen de inyección de 5 ml/kg.

El sistema de prueba *(Ver* Tabla 1):

[0051] El experimento se realizó utilizando la cepa ICR macho de 7 semanas de edad, los ratones (25-27 g) (suministrada por Harlan Israel, Ltd.).

[0052] El experimento incluyó un total de 18 ratones (parte a) y 20 ratones (parte B).

[**0053**] La variación de peso de los animales en el momento de la iniciación del tratamiento no excedió de ± 20% del peso medio.

[**0054**] El estado de salud de los animales utilizados en este estudio se examinó a su llegada. Solo los animales con buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio.

[**0055**] Los animales se aclimataron durante 5 días. Durante la aclimatación y durante toda la duración del estudio, los animales se alojaron dentro de una instalación de roedores de acceso limitado y se mantuvieron en grupos con un máximo de 6 ratones por jaulas de polipropileno. Las jaulas se equiparon con fondos sólidos y se rellenaron con virutas de madera estériles como material de cama. Los animales recibieron *ad libitum* una dieta comercial de roedores estéril y tuvieron acceso libre al agua potable que se suministró a cada jaula a través de botellas de polietileno con tubos de acero inoxidable. El agua fue monitoreada periódicamente. Se establecieron condiciones ambientales controladas automáticamente para mantener la temperatura a 20-24°C con una humedad relativa (HR) del 30-70 %, un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas y 15-30 cambios de aire/h en la sala de estudio. La temperatura y la HR fueron monitoreadas diariamente.

[**0056**] Durante el experimento cada grupo de dosificación se mantuvo en jaulas separadas para evitar la contaminación cruzada que puede ocurrir a través del consumo de la materia fecal. Al final del estudio, los animales supervivientes fueron sacrificados por asfixia con CO_2.

Tabla 1: Grupos de prueba y régimen de dosis del presente estudio:

Nº de grupo	Compuesto	Tamaño del grupo	Dosis (mg/kg)	Ruta	Volumen de dosificación	Administración del tiempo
1	Vehículo	3	0	IP	5 ml/kg	Los ítems de prueba se administraron 0,5 horas antes de la prueba de movimiento
2	Morfina	3	5			
3	E1	6	3			
4	E1	8	10			
5	E1	6	20			
6	E2	6	10			

Principios de la prueba de movimiento de la cola:

[**0057]** La respuesta al dolor se evaluó usando el método de movimiento de la cola que utiliza un instrumento de movimiento de la cola Ugo Basile. El animal se coloca y se mantiene suavemente sobre la superficie del instrumento de movimiento de cola Ugo Basile (TF) con la cola recta hacia atrás y por encima de una célula fotoeléctrica que sirvió como fuente de calor. La fuente de calor y el temporizador se activan al presionar el pedal y se apagan automáticamente cuando el animal apaga la cola del emisor. La latencia se mide y analiza como un efecto analgésico.

[**0058]** Descripción del estudio: La retirada de la cola de línea de base se midió un día antes del experimento comenzado. El día del experimento, primero se midieron los pesos corporales de los animales, seguidos de la administración i.p. de los elementos de prueba (vehículo, morfina, NRD 13 S E1 y E2). 30 minutos después de la administración de los artículos de prueba, los animales fueron sometidos a la prueba de movimiento de la cola. Los experimentos de movimiento de la cola fueron seguidos por muestras de sangre de todos los grupos. El experimento se terminó después de que se hayan recogido las médulas espinales y los cerebros de todos los grupos.

[**0059]** Estadísticas y evaluación de datos: Todos los parámetros se representan como medias y el error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron usando una prueba T no emparejada de dos colas para comparar cada grupo de tratamiento con los animales tratados con vehículo. Se usó una prueba T de dos colas para comparar el pretratamiento y el postratamiento de cada grupo de tratamiento. Los valores de probabilidad $p < 0,01$ y $p < 0,05$ se consideran significativos.

Resultados:

[0060] Peso corporal: El peso corporal medio de todos los animales era 27,42 ± 0,22 g. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.

Ensayo de movimiento de cola:

[0061] Los resultados de la prueba de retirada de la cola se presentan en la figura 1 como el tiempo de latencia (segundos) que tarda el animal para chasquear su cola lejos de la fuente de calor. Los resultados también se presentan como la diferencia entre los tiempos de latencia TF posteriores al tratamiento menos el tiempo de latencia TF del pretratamiento (Figura 2). Un aumento en la diferencia entre los tiempos de latencia presenta un estado más saludable para los animales.

[**0062]** El tiempo de latencia para el movimiento de cola (seg) se resume en la Tabla 2, columnas 4-5: el tiempo medio de latencia para los animales tratados con vehículo (Grupo 1) en la línea base (pre-tratamiento) fue de 8,72 ± 0,65 seg. Treinta minutos después de la administración del fármaco, el tiempo de latencia promedio fue de 7,78 ± 0,36 segundos, que no es estadísticamente diferente del valor inicial.

[**0063]** El tratamiento con morfina (Grupo 2) a una dosis de 5 mg/kg fue significativamente efectivo para aumentar el tiempo de latencia en comparación con el valor previo al tratamiento: 7,92 ± 0,17 segundos antes del tratamiento frente a 15,38 ± 1,47 segundos después del tratamiento ($p < 0,01$).

[**0064]** El tratamiento con E1 a una dosis de 10 mg/kg (Grupo 4) fue significativamente efectivo para aumentar el tiempo de latencia en comparación con el valor previo al tratamiento: 8,16 ± 0,39 segundos antes del tratamiento frente a 10,63 ± 0,64 segundos después del tratamiento ($p < 0,01$). Además, el tratamiento con E1 a una dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg expresó actividad de alivio del dolor en comparación con los animales tratados con Vehículo (Grupo 1): 10,63 ± 0,64 segundos (Grupo 4) y 10,65 ± 0,81 segundos (Grupo 5) vs. 7,78 ± 0,36 segundos Vehículo ($p < 0,01$).

[**0065]** Aunque los tiempos de latencia aumentaron entre los estados de pretratamiento y post-tratamiento, este aumento no fue estadísticamente significativo para el tratamiento con E1 a una dosis de 3 mg/kg o con E2 a una dosis

de 10 mg/kg. Además, estos tratamientos no fueron significativamente activos en la reducción del dolor en comparación con el vehículo.

Diferencia entre tiempos de latencia del movimiento de cola por pretratamiento y post-tratamiento (sec):

[0066] Cuanto mayor es la diferencia entre el tiempos de latencia en pretratamiento y post-tratamiento, mayor es la actividad del alivio del dolor. Esta diferencia se resume en la Tabla 2, columna derecha. Se puede ver que E1 mostró una importante actividad de alivio del dolor en comparación con el vehículo tratado, en particular a dosis de 10 y 20 mg/kg (p <0,01). En contraste, E2 no causó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de latencia del movimiento de la cola.

Tabla 2: Resumen de datos experimentales del movimiento de la cola

Nº de grupo	Compuesto	Peso corporal medio	Tiempo medio de latencia (seg.)		Δ del tiempo de latencia postratamiento y pretratamiento (seg.)
			Pretratamiento	Post-tratamiento	
1	Vehículo	27,70 ± 0,49	8,72 ± 0,65	7,78 ± 0,36	-0,93 ± 0,50
2	Morfina	27,43 ± 0,70	7,92 ± 0,1 7	15,38*& ± 1,47	7,47*± 1,53
3	E1	26,83 ± 0,48	7,62 ± 0,74	9,53 ± 0,85	1,92# ± 1,10
4	E1	27,44 ± 0,38	8,16 ± 0,39	10,63*& ± 0,64	2,46*± 0,60
5	E1	28,00 ± 0,45	7,58 ± 0,41	10,65*^ ± 0,81	3,07*± 0,92
6	E2	27,13 ± 0,76	8,30 ± 0,46	8,93 ± 0,93	0,63 ± 0,87
* = p <0,01 vs. Vehículo & = p <0,05 Pretratamiento medido para el nº de grupo 4 vs. Post-tratamiento ^ = p <0,05 Pretratamiento medido para el nº de grupo 5 vs. Post-tratamiento # = p <0,05 vs Vehículo					

Conclusiones:

[0067] En vista de los resultados obtenidos bajo las condiciones de este estudio y confinados a los datos en la vida, E1 a dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg era activo en la reducción del dolor cuando se compara con el tratado con vehículo grupo en modelo de movimiento de cola para nocicepción.

[**0068]** Artículo de prueba E1 a una dosis de 3 mg/kg mostró actividad significativa el alivio del dolor solamente en la diferencia calculada entre tiempos de latencia TF para pretratamiento y postratamiento, lo que sugiere la tendencia de la actividad. E2 a una dosis de 10 mg/kg no fue activo en este estudio.

Ejemplo 4: Evaluación de la actividad terapéutica de E1 utilizando el modelo de ligación del nervio espinal (Chung) en ratas:

[0069] La actividad antinociceptiva y analgésica de E1 en un modelo de ligación de nervios espinales (SNL o Chung) para dolor neuropático se evaluó en ratas.

[**0070]** En el día de estudio 0, todos los animales fueron sometidos a cirugía Chung, que consistía en una operación en la que los nervios espinales L5-L6 izquierdos se aislaron y se cortaron. Catorce días después de la cirugía, los animales se seleccionaron usando resultados de umbral de dolor de la prueba de Von Frey. Solo se incluyeron en el estudio los animales que indicaban signos de alodinia mecánica. Después del proceso de selección, los animales se agruparon y los artículos de prueba se administraron por IP. La respuesta al dolor se midió utilizando la metodología de Von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la administración del elemento de prueba el día 14 del estudio, y a las 2, 5, 24 y 48 horas el día 21 del estudio después de 7 días de administración del elemento de prueba.

[**0071]** Todos los animales ganaron peso durante el estudio. No hubo diferencias significativas en el aumento de peso corporal entre los grupos. Este aumento en el peso corporal refleja una buena salud general durante todo el estudio.

Materiales y su preparación:

[0072] Vehículos: 1 ml de DMSO (Sigma) se disolvió en 4 ml de solución salina (Proveedor: TEVA medical).

[0073] Control Positivo: Gabapentina (proveedor: USP) existe como un polvo. Para lograr una dosis de 150 mg/kg, 250 mg de la gabapentina se disolvió en 5 ml de solución salina (50 mg/ml).

[**0074]** Una rata que pesa 200 g se inyectó con 0,6 ml de solución disuelta.

[0075] Solución madre E1: se disolvieron 2,43 g de E1 completamente en 81 ml de DMSO.

- Preparación E1 (concentración de 6 mg/ml para la dosificación de 30 mg/kg): se diluyeron 3 ml del stock con 12 ml de solución salina.

- Preparación E1 (concentración de 3 mg/ml para la dosificación de 15 mg/kg): se diluyeron 1,5 ml del stock con 1,5 ml de DMSO y 12 ml de solución salina.

- Preparación E1 (concentración de 1,5 mg/ml para la dosificación de 7,5 mg/kg): se diluyeron 0,75 ml del stock con 2,25 ml de DMSO y 12 ml de solución salina.

[**0076]** Para todas las formulaciones el volumen de aplicación fue de 5 ml/kg.

Sistema de ensayo:

[0077] Los grupos de prueba y régimen de dosis del presente estudio se resumen en la Tabla 3.

[**0078]** Especie: ratas macho SD 50 adulto joven, 225-260 g al inicio del estudio (Harlan Laboratories, Israel Ltd.)

[0079] Peso corporal: variación de peso de los animales en el momento de la iniciación del tratamiento no excede de ± 20% de la media de peso.

[**0080]** Sanidad animal: el estado de salud de los animales utilizados en este estudio se examinó a su llegada. Solo los animales con buena salud se aclimataron a las condiciones de laboratorio y se usaron en el estudio.

[**0081]** Aclimatación: 5 días.

[**0082]** Carcasa: durante la aclimatación y durante toda la duración del estudio, los animales fueron alojados dentro de un limitado servicio de acceso de roedores y mantenidos en grupos con un máximo de 3 ratas por jaulas de polipropileno. Las jaulas se equiparon con fondos sólidos y se rellenaron con virutas de madera estériles como material de cama.

[**0083]** Alimentos y agua: a los animales se les proporcionó ad libitum una dieta de roedores comercial, estéril y tuvieron libre acceso al agua potable que se suministra a cada jaula a través de botellas de polietileno con tubos de acero inoxidable. Se incluyó un análisis del lote de alimentación del lote de dieta utilizado en el estudio en los archivos con los datos del estudio. El agua fue monitoreada periódicamente.

[0084] Medio ambiente: se establecieron condiciones ambientales controladas automáticamente para mantener la temperatura a 20-24°C con una humedad relativa (HR) del 30-70%, un ciclo de luz: oscuridad de 12:12 horas y 15-30 cambios de aire/h en la sala de estudio. La temperatura y la HR fueron monitoreadas diariamente. El ciclo de luz fue monitoreado por el reloj de control.

[0085] Cada grupo de dosificación se mantuvo en jaulas separadas para evitar la contaminación cruzada que podría ocurrir a través del consumo de materia fecal. Se alojaron 2 o 3 animales por jaula.

[**0086]** Terminación: Al final del estudio, los animales supervivientes fueron sacrificados por CO_2.

Tabla 3: grupos de prueba y régimen de dosis del presente estudio:

Nº de grupo	Artículos de prueba	Volumen	Régimen de dosificación	Régimen de prueba
1	Vehículo (DMSO)	5 ml/kg	Una vez al día, comenzando en el día de estudio 14 hasta el día de estudio 21. En el día de estudio 14, 2, 5 y 24 horas antes de la prueba de Von Frey. El día del estudio 21, 2, 5, 24 y 48 horas antes de la prueba de Von Frey.	Prueba de Von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la dosificación el día 14 del estudio y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la dosificación el día 21 del estudio. El día 15 del estudio Prueba de Von Frey antes de la administración del artículo de prueba

(Continuación)

Nº de grupo	Artículos de prueba	Volumen	Régimen de dosificación	Régimen de prueba
2	Gabapentina 150 mg/kg i.p.	5 ml/kg	El día de estudio 14, 2, 5 y 24 horas antes de la prueba de Von Frey. El día del estudio 21, 2, 5, 24 y 48 horas antes de la prueba de Von Frey.	Pruebas de von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la administración el día 14 del estudio y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la administración el día 21 del estudio.
3	E1 30mg/kg i.p.	5 ml/kg	Una vez al día, comenzando en el día de estudio 14 hasta el día de estudio 21. En el día de estudio 14, 2, 5 y 24 horas antes de la prueba de Von Frey. El día del estudio 21, 2, 5, 24 y 48 horas antes de la prueba de Von Frey.	Prueba de Von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la dosificación el día 14 del estudio y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la dosificación el día 21 del estudio. El día 15 del estudio Prueba de Von Frey antes de la administración del artículo de prueba
4	E1 15 mg/kg i.p.	5 ml/kg	Una vez al día, comenzando en el día de estudio 14 hasta el día de estudio 21. En el día de estudio 14, 2, 5 y 24 horas antes de la prueba de Von Frey. El día del estudio 21, 2, 5, 24 y 48 horas antes de la prueba de Von Frey.	Prueba de Von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la dosificación el día 14 del estudio y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la dosificación el día 21 del estudio. El día 15 del estudio Prueba de Von Frey antes de la administración del artículo de prueba
5	E1 7,5 mg/kg i.p.	5 ml/kg	Una vez al día, comenzando en el día de estudio 14 hasta el día de estudio 21. En el día de estudio 14, 2, 5 y 24 horas antes de la prueba de Von Frey. El día del estudio 21, 2, 5, 24 y 48 horas antes de la prueba de Von Frey.	Prueba de Von Frey a las 2, 5 y 24 horas después de la dosificación el día 14 del estudio y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la dosificación el día 21 del estudio. El día 15 del estudio Prueba de Von Frey antes de la administración del artículo de prueba

Procedimiento de prueba:

[0087] Principios de la Induced Modelo Chung: El modelo de Chung es un modelo fiable para el dolor de la neuropatía que permite la medición de umbral de dolor del animal inmediatamente después de que el animal despierta de la cirugía.

[**0088]** El horario de estudio (día 1 del estudio hasta el día de estudio 14) incluyendo el funcionamiento y el tratamiento se resume en la tabla 4:

Tabla 4: Actividad terapéutica de E1 usando el modelo de ligadura del nervio espinal (Chung) en ratas. Horario de estudio:

Día	Tarea
-1	Mediciones de respuesta de von Frey (línea de base); Mediciones de peso corporal.
0	Operación Chung.
7	Mediciones de peso corporal.
14	1. Mediciones de respuesta de Von Frey (administración previa a TI); 2. Selección y agrupación; 3. Mediciones del peso corporal; 4. Administración de los artículos de prueba a todos los grupos; 5. Mediciones de respuesta de Von Frey (2 y 5 horas después de la administración de TI).
15	Mediciones de respuesta de Von Frey (24 horas después de la administración de TI); Prueba de la administración de artículos a todos los grupos.

(Continuación)

Día	Tarea
16-20	Administración de vehículos (Grupo 1M) y E1 (Grupos 3M - 5M).
21	1. Mediciones de respuesta de Von Frey (administración previa a TI); 2. Mediciones del peso corporal; 3. Administración de los ítems de prueba a todos los grupos; 4. Mediciones de respuesta de Von Frey (2 y 5 horas después de la administración de TI).
22	1. Mediciones de respuesta de Von Frey (24 horas después de la administración de TI).
23	1. Mediciones de respuesta de Von Frey (48 horas después de la administración de TI); 2. Terminación

[0089] Inducción del dolor neuropático: bajo anestesia usando ketamina/xilazina de sodio y después el área fue afeitada, la rata se colocó en una posición prona y los músculos paraespinales izquierdos se separaron del proceso espinoso en los niveles de L4-S2. El proceso transversal vertebral L6 se eliminó cuidadosamente con una pequeña gubia para identificar visualmente los nervios espinales L5-L6. Se cortaron los nervios espinales L5-L6 izquierdos. El músculo se cerró con suturas de seda 4-0 y la piel se cerró con una pinza. Después de la cirugía, las ratas fueron devueltas a la jaula y permanecieron bajo una lámpara de calentamiento hasta que despertaron.

[0090] Criterios de inclusión/exclusión para la preselección: en el día 14 postoperatorio, se sometió a prueba a los animales para detectar alodinia mecánica utilizando la metodología de Von Frey antes de colocarlos en sus grupos experimentales. Solo se incluyeron en el estudio animales con un umbral de dolor de δ 26 g para la pierna operada. Para formar grupos de tratamiento homogéneos y adherirse a la aleatorización, todas las ratas operadas se agruparon según los criterios de inclusión/exclusión.

Tratamiento:

[0091] Inicio de tratamiento: animales se seleccionaron utilizando el parámetro del desarrollo del dolor (Von Frey prueba) y luego se colocaron en sus grupos experimentales.

[**0092**] Vehículo y E1 se administraron desde el día de estudio 14 a través de días de estudio 21.

[**0093**] La gabapentina, el control positivo, se administró sólo en los días de prueba 14, 15 y 21.

[**0094**] Se realizó la prueba Von Frey antes de administraciones de los artículos de prueba (inyección previa a TI) y 2 y 5 horas después de la administración de TI (inyección posterior a TI) en los días 14 y 21 del estudio.

[**0095**] La prueba de Von Frey se realizó antes de la administración de TI el día 15 del estudio (24 horas después de la administración de TI el día del estudio 14) y en los días de estudio 22 y 23 (24 y 48 horas respectivamente después de la administración de TI el día 21 del estudio).

[**0096**] Vía de administración: E1 (producto de ensayo); El vehículo y el control positivo (gabapentina) se administraron IP. En todos los casos, a menos que se decida lo contrario en el curso del estudio, todas las soluciones de dosificación se aplicaron como una administración diaria en cada una de las sesiones de dosificación repetidas.

[**0097**] Terminación: Al final del estudio, los animales fueron sacrificados con CO_2.

Observaciones experimentales:

[0098] Pesos corporales: el peso corporal se midió a intervalos regulares en los días de estudio -1 para los valores de línea de base y siete días después de la cirugía (día de estudio 7). Además, los animales que demostraron criterios para la alodinia mecánica en el estudio día 14 fueron también pesados después de la selección y agrupamiento en los días de estudio 14 y 21.

[**0099**] Evaluación de respuesta al dolor: La respuesta al dolor se evaluó mediante la prueba de Von Frey para alodinia mecánica.

[**0100**] La prueba de Von Frey para alodinia mecánica se basa en la aplicación de pulsos cortos de presión que no son dolorosos para un animal ingenuo. De hecho, para lograr la retirada de la pata de un animal ingenuo, la presión aplicada es a veces superior a 60 g. Esto a menudo requiere que el investigador aplique suficiente presión con el filamento de Von Frey para realmente levantar la pata del animal ingenuo. Sin embargo, en condiciones de enfermedad, los animales son sensibles a una presión mucho más baja y experimentan dolor como resultado de un estímulo normalmente no doloroso.

[**0101**] Evaluación de alodinia mecánica (pruebas Von FREV): la respuesta alodínica a la estimulación táctil se evaluó utilizando el aparato de Von Frey (Touch®).

[**0102]** Las ratas se colocaron en un recinto y se posicionaron en una superficie de malla de metal, pero les permite moverse libremente. Las cabañas de las ratas estaban cubiertas con celofán rojo para disminuir las perturbaciones ambientales. La prueba comenzó después del cese del comportamiento exploratorio. El conjunto de monofilamentos de Von Frey proporciona una escala logarítmica aproximada de fuerza real y una escala lineal de intensidad percibida según lo provisto por el fabricante del aparato de Von Frey (Ugo Basil). El principio de funcionamiento: cuando la punta de una fibra de longitud y diámetro dados se presiona contra la piel en ángulo recto, la fuerza de aplicación aumenta mientras el investigador continúa avanzando la sonda hasta que la fibra se dobla. Después de que la fibra se dobla, la sonda continúa avanzando, haciendo que la fibra se doble más, pero sin aplicar fuerza adicional a la pata.

Tabla 5: la fuerza (g) y su tamaño correspondiente de monofilamentos

tamaño	Fuerza (g)
1,65	0,008
2,36	0,02
2,44	0,04
2,83	0,07
3,22	0,16
3,61	0,40
3,84	0,60
4,08	1,00
4,17	1,40
4,31	2,00
4,56	4,00
4,74	6,00
4,93	8,00
5,07	10
5,18	15
5,46	26
5,88	60
6,10	100
6,45	180
6,65	300

[**0103]** Los roedores exhiben un reflejo de retirada de la pata cuando su pata se toca inesperadamente. El Touch Test™ Sensory Evaluator se puede usar en las superficies plantares del pie de la rata. El animal indicará sensación tirando hacia atrás su pata. La fuerza mínima necesaria para elevar el reflejo de retirada se designa/considera como el valor de referencia.

[0104] Evaluación de estadísticas/datos: Todos los datos se presentan como medias ± SEM. Cada grupo de tratamiento se comparó con su grupo de vehículo relevante usando una prueba T no emparejada de dos colas (Software: Microsoft®Excel). Se usó una prueba T en pares de dos colas para comparar la respuesta al dolor previa al tratamiento con la respuesta al dolor posterior al tratamiento para cada grupo de prueba. Se considera que un valor de $p < 0,05$ representa una diferencia significativa.

[0105] La prueba de Von Frey se realizó los días 22 y 23 del estudio (24 y 48 horas, respectivamente, después de la administración de TI el día 21 del estudio).

Resultados:

[0106] Peso corporal (Tabla 6; Figura 3): Todos los animales ganaron peso durante el estudio; sin embargo, no hubo diferencias significativas en el aumento de peso entre los grupos. El peso corporal basal para todos los animales fue de 243,76 ± 1,21 g en el día de estudio -1.

[**0107]** Los pesos corporales también se midieron en los días 7, 14 y 21 del estudio. En el día 7 del estudio, el peso corporal medio para todos los grupos fue de 258,12 ± 1,71 g. En el día 14 del estudio, el peso corporal promedio para todos los grupos fue de 286,34 ± 1.93 g. En el día 21 del estudio, el peso corporal promedio fue 302,34 ± 2,29 g.

Tabla 6: Peso corporal medio del grupo en todos los grupos de estudio

Codigo del grupo	Tratamiento	Base	Día 7	Día 14	Día 21
1	Vehículo DMSO	240,70 ± 2,73	256,10^6 4,32	282,30 ± 4,73	298,20 ± 6,12
2	Gabapentina 150 mg/kg i,p,	242,10^6 2,44	255,20 ± 2,83	283,30 ± 2,53	307,90 ± 3,42,
3	E1 30 mg/kg i,p,	245,20 ± 3,19	261,20 ± 4,45	288,70 ± 5,51	303,30 ± 6,01
4	E1 15 mg/kg i,p,	245,00 ± 2,80	259,20 ± 3,29	289,80 ± 3,27	298,50 ± 3,27
5	E1 7,5 mg/kg i,p,	245,80 ± 2,54	258,90 ± 4,41	287,60 ± 5,14	303,80 ± 6,26

[**0108]** Prueba de Von Frey (Tablas 7, 8, 9 y 10; Figuras 4 y 5): Los resultados se presentaron como la fuerza media de la retirada de la pierna operada izquierda (g). La alodinia mecánica se observó como un aumento en la sensibilidad animal a los filamentos de Von Frey en diferentes puntos de tiempo en los días de estudio 14 (2, 5 y 24 horas) y 21 (2, 5, 24 y 48 horas). Todos los valores también se calcularon y se presentaron como la fuerza necesaria para retirar la pierna sana derecha menos la fuerza necesaria para retirar la pierna operada izquierda. Este cálculo presenta los valores de un animal en un estado saludable cercano a 0, por lo tanto, la fuerza de retirada para ambas patas es igual. Los animales en un estado doloroso se presentan como una brecha de fuerza más grande entre la pierna sana derecha y la pierna operada izquierda. El aumento en las diferencias de fuerza de retirada (fuerza delta) presenta un estado más doloroso.

[**0109]** Respuesta de von Frey de los elementos de prueba frente al vehículo: la fuerza media de referencia requerida para retirar la pata operada a la izquierda de los animales tratados con vehículo (Grupo 1) fue 56,60 ± 3,40 g. En el día de estudio 14 antes del tratamiento, la fuerza de retirada de la pierna izquierda fue significativamente menor que la medición inicial, lo que indica un estado doloroso: 10,00 ± 0,93g; p <0,05.

[**0110]** E1 30 mg/kg i.p. (Grupo 3): en comparación con el tratamiento de control del vehículo (Grupo 1) con E1 a una dosis de 30 mg/kg el día 14 del estudio, no inhibió la alodinia 2 horas después de su administración (13,20 ± 1,70 g ns. Vs. 10,70 ± 0,98 g en el grupo Vehículo). El tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg en el día 14 del estudio inhibió efectivamente la alodinia a las 5 horas después de su administración en comparación con los animales tratados con vehículo: 30,60 ± 5,10 g frente a 10,10^6 0,60 g en el grupo vehículo; p <0,05 y también a las 24 horas después de su administración: 25,20 ± 6,25 g ns vs. 11,80 ± 1,79 g en el grupo vehículo; p = 0,05.

[**0111]** En comparación con el tratamiento de control del vehículo con E1 a una dosis de 30 mg/kg en el día 21 del estudio, inhibió efectivamente la alodinia 2 horas después de su administración: 19,40 ± 1,80 g vs. 11,40 ± 1,01 g en el grupo de vehículos p <0,05, a las 5 horas después de su administración: 22,90 ± 4,64 g frente a 9,80 ± 0,90 g en el grupo vehículo; p <0,05 y también a las 24 horas después de su administración: 17,50 ± 2,48 g vs. 11,00 ± 1,11 g en el grupo vehículo; p <0,05.

[**0112]** En comparación con el control del vehículo, el tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg el día 21 del estudio no inhibió la alodinia a las 48 horas después de su administración: 8,90 ± 0,82 g frente a 9,90 ± 1,21 g en el grupo vehículo.

Tabla 7: La fuerza media Von Frey requerida para la retirada de la pierna operada izquierda (g): las mediciones se realizaron en el 14º día del estudio:

Código de grupo	Tratamiento	Línea de base	Pretratamiento día 14	Día 14 Post-tratamiento		
				2 horas	5 horas	24 horas
1	Vehículo DMSO	56,60 ± 3,40	10,00 ± 0,93	10,70 ± 0,98	10,10^6 0,90	11,80 ± 1,79
2	Gabapentina 150 mg/kp i.p.	53,20 ± 4,53	10,00 ± 0,88	36,30*# ± 6.60	11,80 ± 1,85	15,20 # ± 1,95
3	E1 30 mg/kg i.p.	60,00 ± 0,00	10,50 ± 1,06	13,20 ± 1,70	30.60*# ± 5,10	25,20 ± 6,25
4	E1 15 mg/kg i.p.	56,60 ± 3,40	9,80 ± 0,90	11,80 ± 5.67	30,80*# ± 6.66	35,80*# ± 6,80
5	E1 7,5 mg/kg i.p.	56,60 ± 3,40	9,90 ± 0.64	28,80*# ± 7,10	32,20*# ± 6,37	35,80*# ± 6,80
*** p <0,05 vs. vehículo #p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento**						

[0113] E1 15 mg/kg i.p. (Grupo 4): Cuando se compara con el control de vehículo (Grupo 1) el tratamiento con E1 a una dosis de 15 mg/kg el día 14 del estudio no inhibió la alodinia 2 horas después de su administración.

[0114] El tratamiento con E1 a una dosis de 15 mg/kg en el día 14 del estudio inhibió la alodinia 5 y aún después de 24 horas después de su administración en comparación con los animales tratados con vehículo.

[**0115]** En comparación con el control del vehículo, el tratamiento con E1 a una dosis de 15 mg/kg inhibió la alodinia en el pretratamiento del día 21 del estudio ; 2, 5 y 24 horas después de su administración, sin embargo, el tratamiento con una dosis de 15 mg/kg en el día 21 del estudio fue menos efectivo 48 horas después de su administración.

Tabla 8: La fuerza media de Von Frey requerida para la extracción de la pierna operada izquierda (g): las mediciones se realizaron el día 21:

Código de grupo	Tratamiento	Pretratamiento día 21	Día 21 Post-tratamiento			
			2 horas	5 horas	24 horas	48 horas
1	Vehículo DMSO	10,10[6] 1,11	11,40 ± 1,01	9,80 ± 0,90	11,00 ± 1,11	9,90 ± 1,21
2	Gabapentina 150 mg/kg i.p.	10,20 ± 0,85	41,90 * # ± 6,12	12.60 ± 1,85	13,40 ± 2,29	9,50 ± 0.69
3	E1 30 mg/kg i.p.	13,00 ± 1,76	19,40 * # ± 1,80	22,90 * # ± 4.64	17,50 * # ± 2,48	8,90 ± 0,82
4	E1 15 mg/kg i.p.	33,50 * ± 6,04	43,00 * ± 5,67	34,70 * ± 7,06	24,70 * ± 6,17	20,20 ± 4,80
5	E1 7,5 mglkg i.p.	29,00 * ± 5,72	28,40 * ± 5,52	43,10 * # ± 6,97	31,30 * ± 6,50	29,30 * ± 6,97
*** p <0,05 vs. vehículo #p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento**						

[**0116]** E1 7,5 mg/kg i.p. (Grupo 5): en comparación con el control del vehículo (Grupo 1), el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg el día 14 del estudio inhibió efectivamente la alodinia 2, 5 y también 24 horas despues de su administracion.

[**0117]** En comparación con el control del vehículo, el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg inhibió la alodinia en el pretratamiento del día 21 del estudio y también 2, 5, 24 e incluso 48 horas después de su administración.

[**0118]** Gabapentina 150 mg/kg i.p. (Grupo 2): en comparación con el control del vehículo (Grupo 1), el tratamiento con gabapentina el día 14 del estudio inhibió la alodinia 2 horas después de su administración; pero no fue efectivo 5 horas después de su administración.

[0119] En comparación con el control del vehículo, el tratamiento con gabapentina el día 21 del estudio inhibió efectivamente la alodinia 2 horas después de su administración; pero no fue efectivo ya 5 horas después de su administración.

Tabla 9: La diferencia (fuerza) entre la pierna sana derecha y la pierna operada izquierda (g): un estudio de 14 días. La diferencia se calcula restando el valor de extracción de fuerza de la pierna operada izquierda del valor de extracción de fuerza de la pierna sana derecha.

Código de grupo	Tratamiento	Línea de base	Pretratamiento día 14	Día 14 Post-tratamiento		
				2 horas	5 horas	24 horas
1	Vehículo DMSO	-3,40 ± 3,40	46,60 ± 3,07	49,30 ± 0,98	49,90 ± 0,90	48,20 ± 1,79
2	Gabapentina 150 mg/kg i.p.	0,00 ± 0,00	50,00 ± 0,88	23,70 * # ± 6.60	48,20 ± 1,85	44,80 # ± 1,95
3	E1 30 mg/kg i.p.	0,00 ± 0,00	49,50 ± 1,06	46,80 ± 1,70	29,40 * # ± 5,10	34,80 ± 6,25
4	E1 15 mg/kg i.p.	0,00 ± 0,00	50,20 ± 0,90	48,20 ± 5,67	29,20 * # ± 6.66	24,20 * # ± 6,80
5	E1 7,5 mg/kg i.p.	0,00 ± 0,00	50,10[6] 0,64	31,20 * # ± 7,10	24,40 * # ± 6,89	20,80 * ± 7,10
*** p <0,05 vs. vehículo #p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento**						

Respuesta de von Frey de los artículos de prueba - Post tratamiento versus pretratamiento:

[0120] E1 30 mg/kg i.p. (Grupo 3): en comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg en el día 14 del estudio inhibió alodinia 5 horas después de su administración antes y después del tratamiento. En comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg el día 21 del estudio inhibió la alodinia 2, 5 e incluso 24 horas después de su administración.

Tabla 10: La diferencia (fuerza delta) entre la pierna sana derecha y la pierna operada izquierda (g): un estudio de 21 días. La diferencia se calcula restando el valor de extracción de fuerza de la pierna operada izquierda del valor de extracción de fuerza de la pierna sana derecha.

Código de grupo	Tratamiento	Pretratamiento día 21	Día 21 Post-tratamiento			
			2 horas	5 horas	24 horas	48 horas
1	Vehículo DMSO	49,90 ± 1,11	48,60 ± 1,01	50,20 ± 0,90	49,00 ± 1,11	$50,10^{6}$ 1,21
2	Gabapentina 150 mg/kg i.p.	49,80 ± 0,85	$18,10^{*\#}$ ± 6,12	47,40 ± 1,85	46,60 ± 2,29	50,50 ± 0.69
3	E1 30 mg/kg i.p.	47,00 ± 1,76	$40.60^{*\#}$ ± 1,80	$37,10^{*\#}$ ± 4.64	$42,50^{*\#}$ ± 2,48	$51,10^{6}$ 0,82
4	E1 15 mg/kg i.p.	26,50 * ± 6,04	17,00 * ± 5.67	25,30 * ± 7,06	35,30 * ± 6,17	39,80 ± 4,80
5	E1 7,5 mg/kg i.p.	31,00 * ± 5,72	31,60 * ± 5,52	$16,90^{*\#}$ ± 6,97	28,70 * ± 6,50	30,70 * ± 6,97
*** p <0,05 vs. vehículo** **#p <0,05 Pretratamiento vs. Post-tratamiento**						

[0121] E1 15 mg/kg i.p. (Grupo 4): en comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con E1 a una dosis de 15 mg/kg el día 14 del estudio inhibió la alodinia 5 horas e incluso 24 horas después de su administración.

[0122] E1 7,5 mg/kg i.p. (Grupo 5): en comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg en el día de estudio 14 inhibió la alodinia 2, 5 e incluso 24 horas después de su administración. En comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg el día 21 del estudio inhibió la alodinia 5 horas después de su administración.

[**0123**] Gabapentina 150 mg/kg i.p. (Grupo 2): en comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con gabapentina el día 14 del estudio inhibió la alodinia 2 horas después de su administración; pero no fue efectivo 24 horas después de su administración.

[**0124**] En comparación con el valor de pretratamiento, el tratamiento con gabapentina el día 21 del estudio inhibió la alodinia 2 horas después de su administración.

Fuerza de retirada delta de los artículos de prueba frente al vehículo:

[0125] E1 30 mg/kg i.p. (Grupo 3): el cálculo de la fuerza de retirada delta entre las dos piernas el día 14 mostró una actividad de alivio del dolor significativa para E1 a una dosis de 30 mg/kg a las 5 horas después de su administración. El cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas el día 21 mostró una importante actividad de alivio del dolor para E1 a una dosis de 30 mg/kg a las 2, 5 e incluso 24 horas después de su administración.

[**0126**] E1 15 mg/kg i.p. (Grupo 4): el cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas el día 14 mostró una actividad significativa de alivio del dolor para E1 a una dosis de 15 mg/kg a las 5 e incluso 24 horas después de su administración: 29,20 ± 6,66 g vs. 49,90 ± 0,60 g en el grupo vehículo; p <0,05.

[**0127**] El cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas mostró una actividad significativa de alivio del dolor para E1 a una dosis de 15 mg/kg en el pretratamiento del día 21 del estudio; 2, 5 e incluso 24 horas después de su administración

[0128] E1 7,5 mg/kg i.p. (Grupo 5): el cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas el día 14 mostró una actividad de alivio del dolor significativa para E1 a una dosis de 7,5 mg/kg a las 2, 5 y aún a las 24 horas después de su administración.

[**0129**] El cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas mostró una importante actividad de alivio del dolor para E1 a una dosis de 7,5 mg/kg en el pretratamiento del día 21 del estudio; 2, 5, 24 y aún a las 48 horas después de su administración.

Gabapentina 150 mg/kg i.p. (Grupo 2):

[0130] El cálculo de la fuerza de abstinencia delta entre las dos piernas el día 14 y el día 21 mostró una actividad de alivio del dolor significativa para la gabapentina a las 2 horas después de su administración.

Fuerza de retirada delta de los artículos de prueba - después del tratamiento vs. tratamiento previo:

[0131] E1 30 mg/kg i.p. (Grupo 3): Cuando se compara con el valor pretratamiento de delta fuerza de extracción en el día 14, el tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg inhibe la alodinia 5 horas después de su administración En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de abstinencia delta en el día 21, el tratamiento con E1 a una dosis de 30 mg/kg inhibió la alodinia 2, 5 y 24 horas después de su administración. E1 15 mg/kg i.p. (Grupo 4):

[0132] En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de abstinencia delta el día 14, el tratamiento con E1 a una dosis de 15 mg/kg inhibió la alodinia 5 e incluso 24 horas después de su administración.

E17,5 mg/kg i.p. (Grupo 5):

[0133] En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de abstinencia delta en el día 14, el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg inhibió la alodinia 2, 5 y 24 horas después de su administración.

[**0134]** En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de retirada delta en el día 21, el tratamiento con E1 a una dosis de 7,5 mg/kg inhibió la alodinia 5 horas después de su administración.

Gabapentina 150 mg/kg i.p. (Grupo 2):

[0135] En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de abstinencia delta el día 14, el tratamiento con gabapentina inhibió la alodinia 2 horas después de su administración, sin embargo, no fue eficaz 5 horas después de la administración.

[**0136]** En comparación con el valor de pretratamiento de la fuerza de retirada delta en el día 21, el tratamiento con gabapentina inhibió efectivamente la alodinia 2 horas después de su administración.

[**0137]** Es de notar que el tratamiento con los compuestos de ensayo como se describe anteriormente, los animales tratados con E1 puso completamente la pata operada en la superficie de metal del aparato de Von Frey de malla.

Conclusiones:

[0138] En vista de los resultados obtenidos en las condiciones de este estudio, el E1 a una dosis de 30 mg/kg fue eficaz como artículo analgésico del dolor en el modelo de ligadura del nervio espinal para el dolor neuropático en ratas como se refleja en los parámetros de alodinia mecánica a los 5 días de administración del artículo de prueba el día 14 del estudio, y a las 2, 5 y 24 horas posteriores a la administración del artículo de prueba el día 21 del estudio.

[0139] E1 a una dosis de 15 mg/kg fue eficaz como un artículo analgésico contra el dolor como se refleja en los parámetros de la alodinia mecánica a las 5 y 24 horas después de la administración del elemento de prueba el día 14 del estudio, y a las 2, 5 y 24 horas después de la administración del elemento de prueba el día 21 del estudio.

[0140] E1 a una dosis de 7,5 mg/kg fue eficaz como artículo analgésico contra el dolor, como se refleja en los parámetros de la alodinia mecánica a las 2, 5 y 24 horas después de la administración del elemento de prueba el día 14 del estudio, y a las 2, 5, 24 y 48 horas después de la administración del elemento de prueba el día 21 del estudio.

[0141] La gabapentina, el control positivo en este estudio, estaba activa a las 2 horas después de su administración en los días 14 y 21 del estudio. A diferencia de los artículos de prueba, la actividad analgésica de la gabapentina ya no se detectó 5 horas, 24 horas y 48 horas después de la dosificación.

Ejemplo 5: Enantiómeros E1 y E2 modulan la actividad de la tirosina quinasa

[0142] Los enantiómeros E1 y E2 se probaron en los ensayos de quinasa BLK, Lyn A, Lyn B y Src (únicamente EI) en un rango de 5 concentraciones desde 1,0 E-03 hasta 1,0 E-05 (M). Los estudios incluyeron los ensayos de quinasa BLK, LynA, LynB y Src. Cada compuesto y concentración se probó en pocillos duplicados.

[**0143]** Este proyecto se completó utilizando el Caliper LabChip 3000 y un LabChip de 12 sorbos. Los ensayos LabChip se basan en separaciones, lo que significa que el producto y el sustrato están electroforéticamente separados, minimizando así las interferencias y produciendo la mayor calidad de datos disponible en cualquier plataforma de detección. Los factores Z' para los ensayos enzimáticos EZ Reader y LC3000 están rutinariamente en el rango de 0,8

a 0,9. Las ventajas de los ensayos LabChip incluyen valores altos de Z', pocos falsos positivos, pocos falsos negativos y reproducibilidad de calidad analítica.

[**0144]** El ensayo de incubación de ensayo de quinasa de desplazamiento de movilidad fuera de chip utiliza un chip microfluídico para medir la conversión de un sustrato peptídico fluorescente a un producto fosforilado. La mezcla de reacción, procedente de un pocillo de placa de microtitulación, se introduce a través de un extractor capilar en el chip, donde el sustrato no fosforilado y el producto fosforilado se separan por electroforesis y se detectan mediante fluorescencia inducida por láser. La firma de la señal de fluorescencia con el tiempo revela el alcance de la reacción.

[**0145]** La precisión de la microfluídica permite la detección de interacciones sutiles entre candidatos a fármacos y objetivos terapéuticos. La tecnología es capaz de detectar inhibidores fuertes y débiles con alta precisión, e identifica rutinariamente a los candidatos a fármacos que las técnicas convencionales fallan. Las condiciones del ensayo se resumen en la Tabla 8:

Tabla 8: Condiciones de ensayo de quinasa

Quinasa	[Enzima] nM	ATP (@ Km, µM)	Tampón	Detergente	Péptido	Inhibidor de referencia
BLK	10,0	19,0	100 mM Hepes, pH 7,5	0,01% Brij-35	1,5 µM FL-péptido	Estaurosporina
Lyn A	3,5	20,0		0,01% Brij-35		
Lyn B	15,0	10,0		0,01% Brij-35		
Src	0,2	38,0		0,004% tween 20, 0,003% Brij-35		

[0146] Datos de control del ensayo: Todos los ensayos deben pasar los estándares internos de QA/QC que incluyen una CI50 de referencia para cada ejecución del ensayo que debe estar dentro de la mitad de la unidad de registro (más o menos) del promedio histórico aceptado. Los datos de control del ensayo se resumen en la Tabla 9:

Tabla 9: Datos de control del ensayo de quinasa:

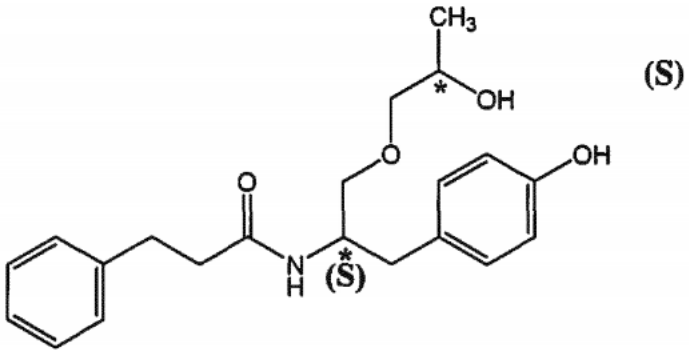
Quinasa probada	Compuesto de referencia CI50	100% de actividad media de control	Control 100% DESEST	0% de actividad media de control	0% control DESEST
	(M)	% de conversión	% de conversión	% de conversión	% de conversión
BLK	4,87E-09	14,25	0,18	0,59	0,32
Lyn A	3,38E-09	37,82	0,11	0,61	0,43
Lyn B	3,20E-09	14,69	0,08	0,31	0,14
Src	5,88E-09	24,64	2,94	0,49	0,28

[0147] Resultados: La actividad de los enantiómeros E1 y E2 como moduladores de varias proteínas tirosina quinasas se presenta gráficamente (curvas CI_{50}) en las Figuras 6A-D. Las curvas CI_{50} se generan utilizando GraphPad 5 y un modelo estándar de regresión no lineal de 4 parámetros (log (inhibidor) vs respuesta - pendiente variable). Las curvas CE_{50} se generan utilizando GraphPad 5 y un modelo de regresión no lineal estándar de 4 parámetros (respuesta de dosis sigmoidal - pendiente variable). Los puntos de datos son los promedios de pozos duplicados. Las barras de error representan la actividad replicada media de ± %.

[0148] Los expertos en la materia apreciarán que la presente invención no está limitada por lo que se ha mostrado y descrito particularmente anteriormente en el presente documento. Más bien, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones que siguen.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II



II

que tiene la estereoquímica específica de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo, en donde el compuesto está en una forma sustancialmente pura que comprende al menos 90% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 10% de otras formas estereoisoméricas del compuesto para su uso en el tratamiento o profilaxis del dolor, en donde dicho compuesto o sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra una vez cada 24 horas.

2. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1,

en donde la forma sustancialmente pura comprende al menos el 95% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 5% de otras formas estereoisoméricas del compuesto; preferiblemente en donde la forma sustancialmente pura comprende al menos 98% de (S)2-N(3-O-((S)propano 2-ol)-1-propilo-4-hidroxibenceno)-3-fenilpropilamida y menos del 2% de otras formas estereoisoméricas del compuesto.

3. El compuesto para uso de acuerdo con 1, en el que el dolor es dolor agudo o crónico.

4. El compuesto para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dolor es dolor neuropático, preferiblemente en donde el dolor neuropático es al menos un síntoma seleccionado de dolores neuropáticos en neuralgia post herpética, neuralgia del trigémino, neuralgia diabética, dolor por cáncer, dolor postoperatorio o postraumático persistente, hiperalgia, alodinia, dolor de postoracotomía, SDRC, dolor asociado con esclerosis múltiple, SIDA, dolor talámico, dolor parapléjico causado por mielopatía, anestesia dolorosa y dolor de miembro fantasma.

5. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dolor es dolor nociceptivo.

6. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 formulado en una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

7. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 formulado en la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde dicha composición se formula como una forma de dosificación unitaria.

8. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 formulado en la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde dicha composición está formulada para administración oral.

9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 formulado en la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde dicha composición se formula como una forma de dosificación unitaria que comprende de 0,1 a 500 mg del compuesto o una de sus sales o hidratos farmacéuticamente aceptables.

10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 formulado en la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde dicha composición es adecuada para la administración de una dosis diaria de 1,0 mg a 15 g del compuesto de la reivindicación 1.

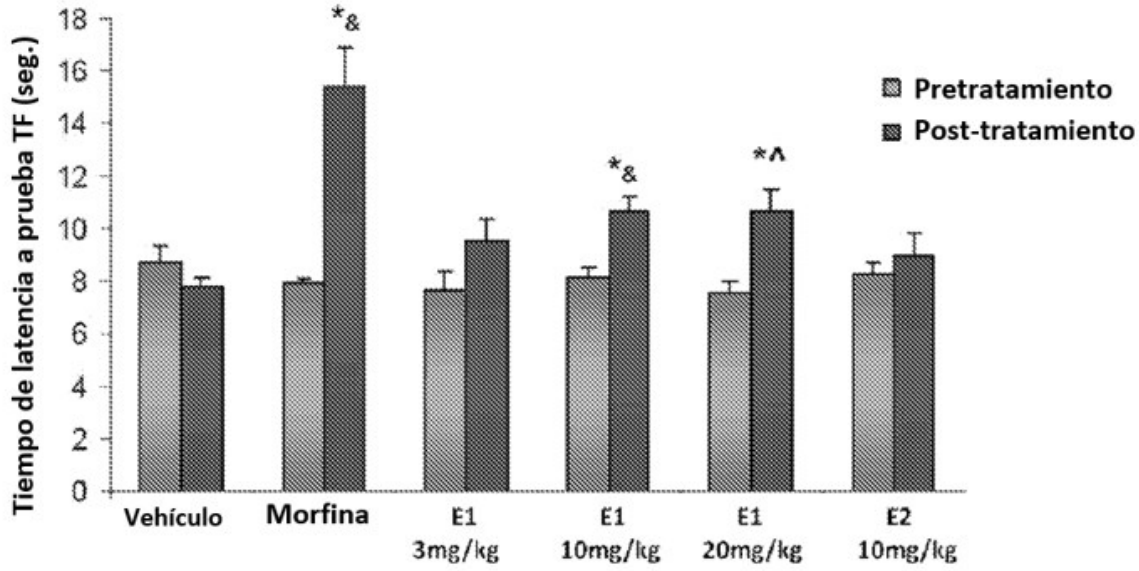


Figura 1

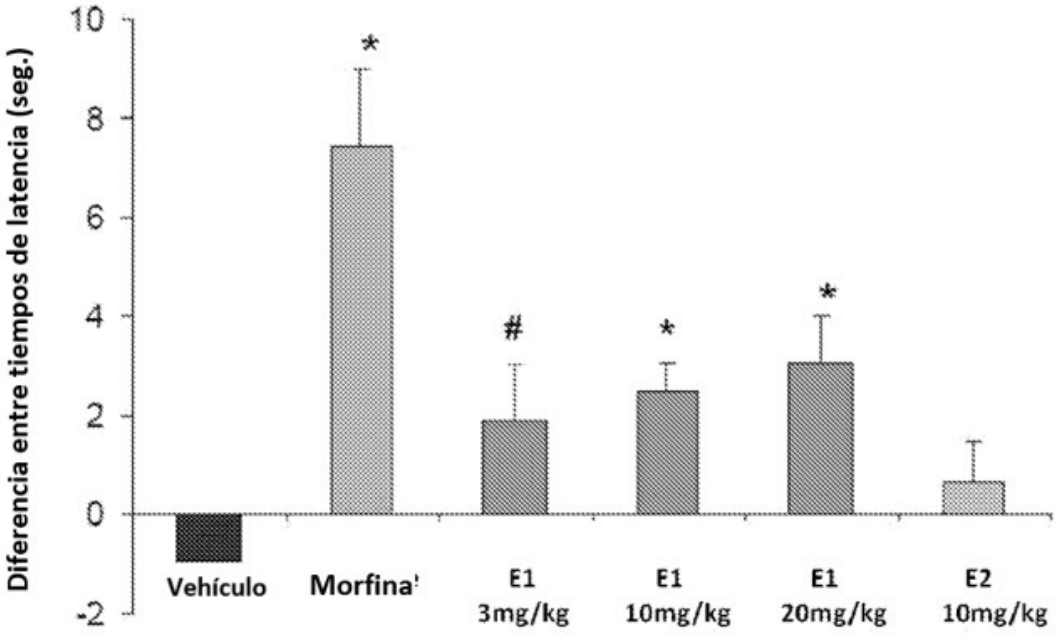


Figura 2

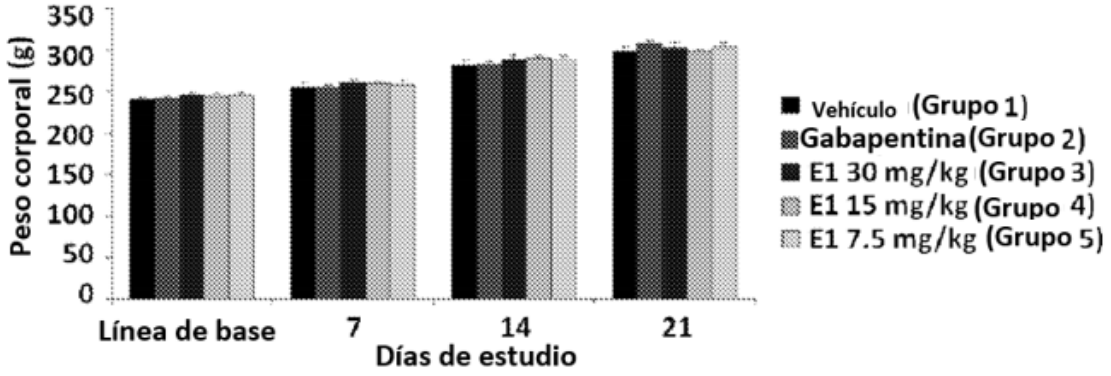


Figura 3

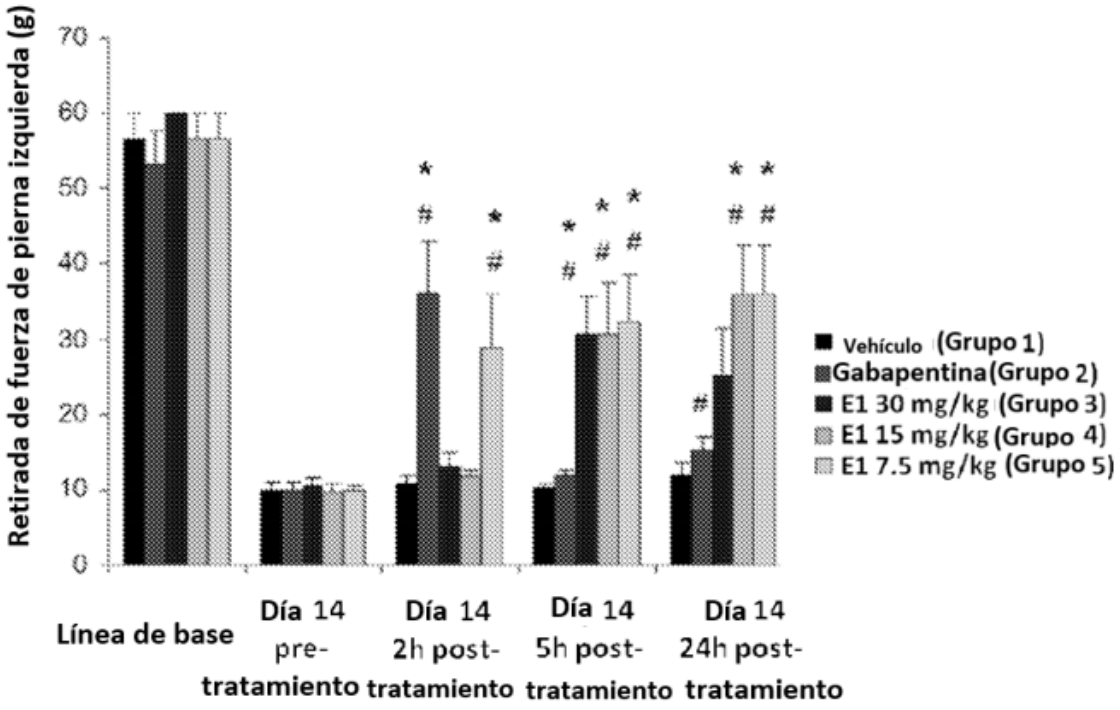


Figura 4A

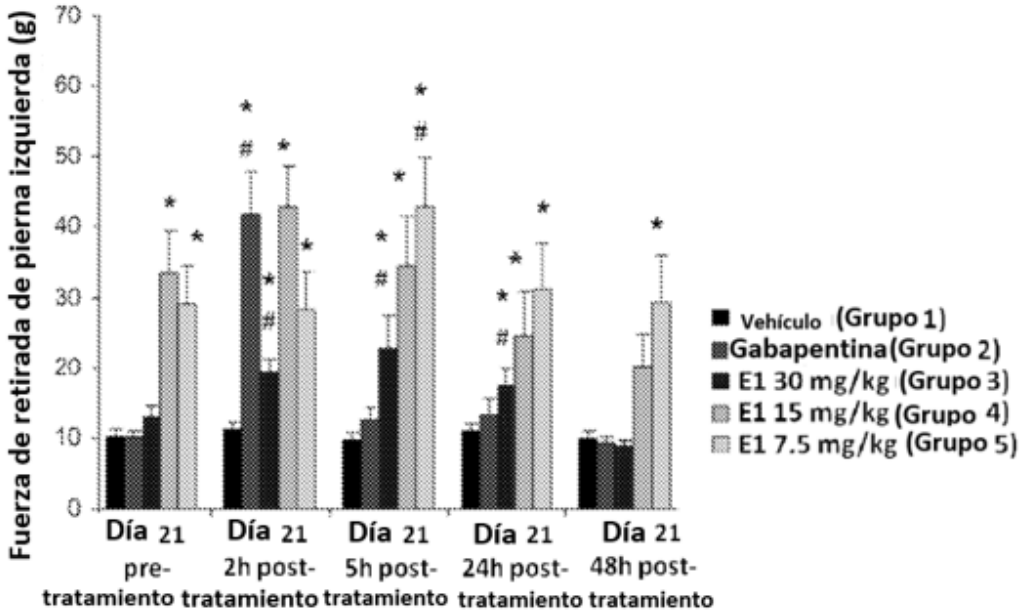


Figura 4B

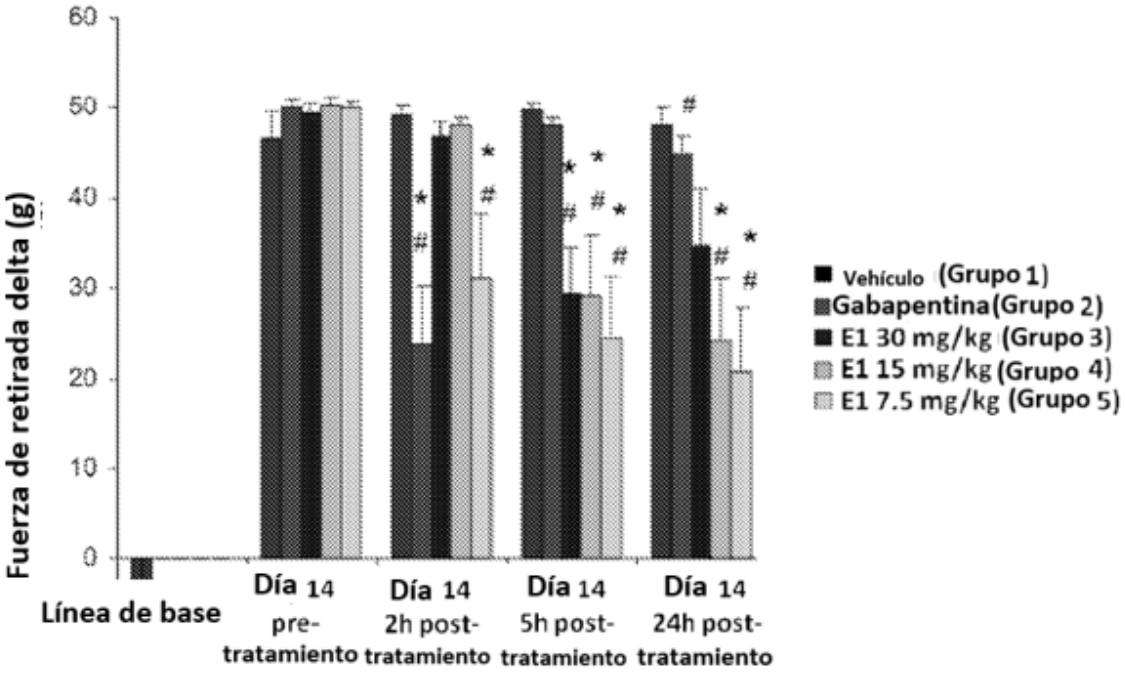


Figura 5A

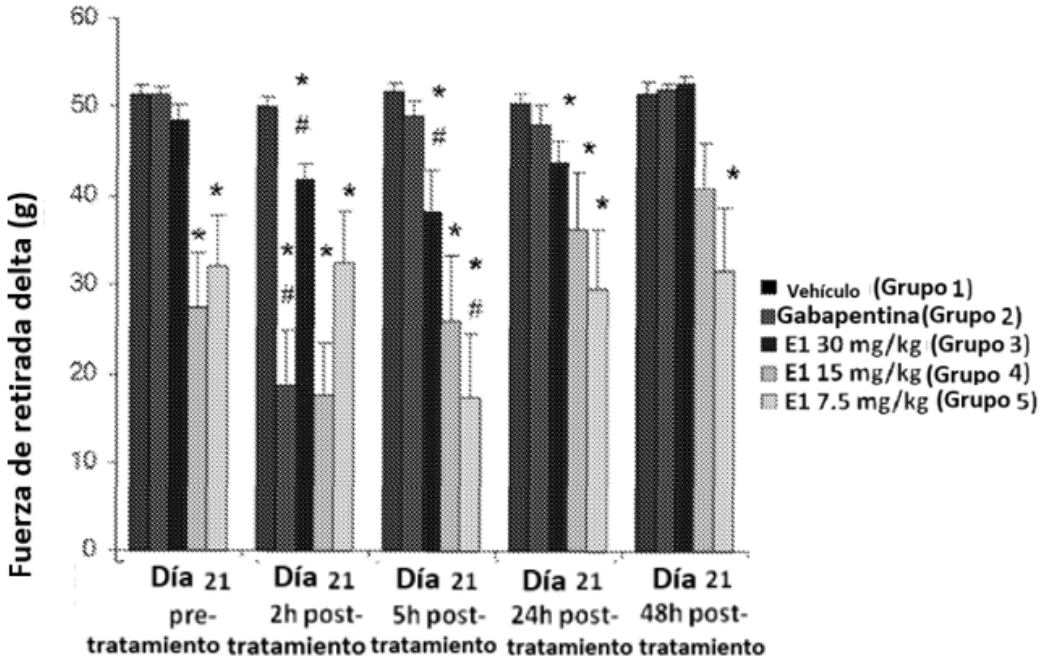


Figura 5B

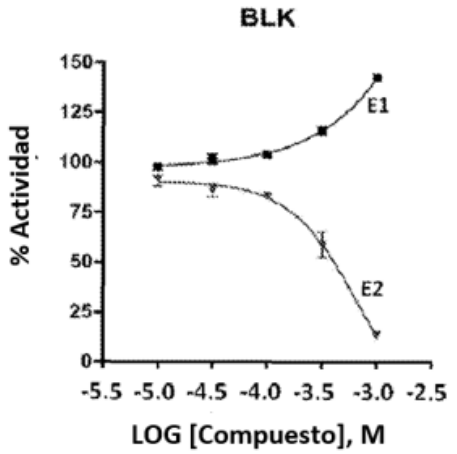


Figura 6A

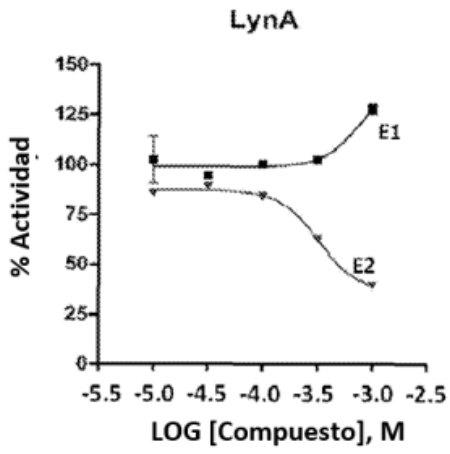


Figura 6B

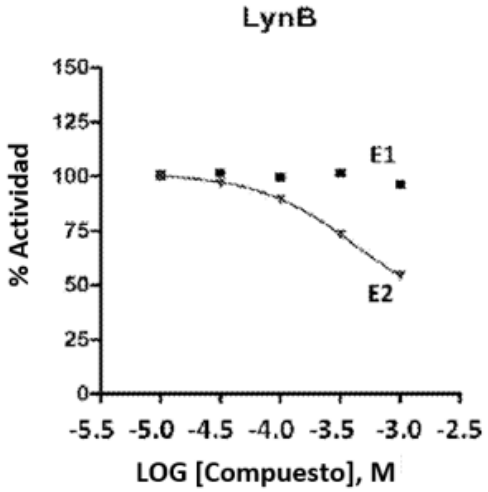


Figura 6C

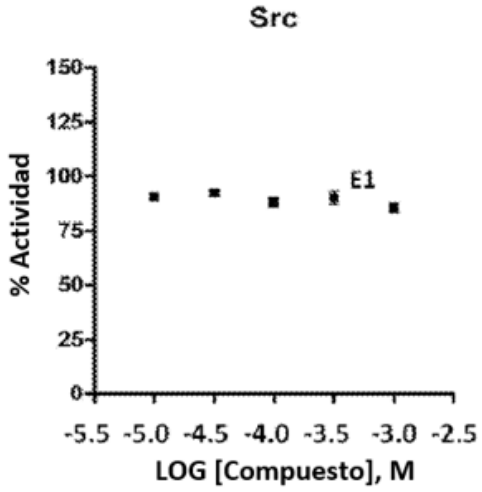


Figura 6D

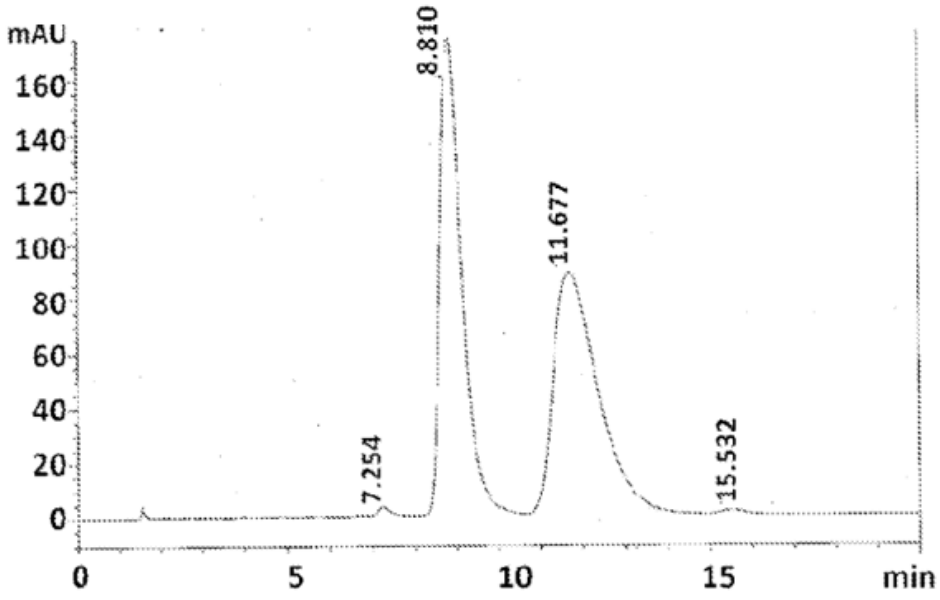


Figura 7A

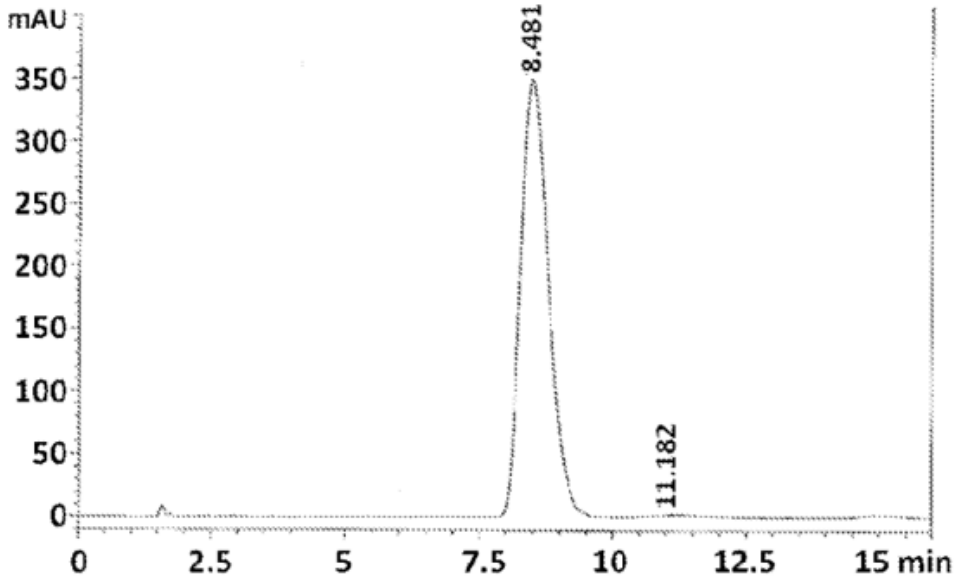


Figura 7B

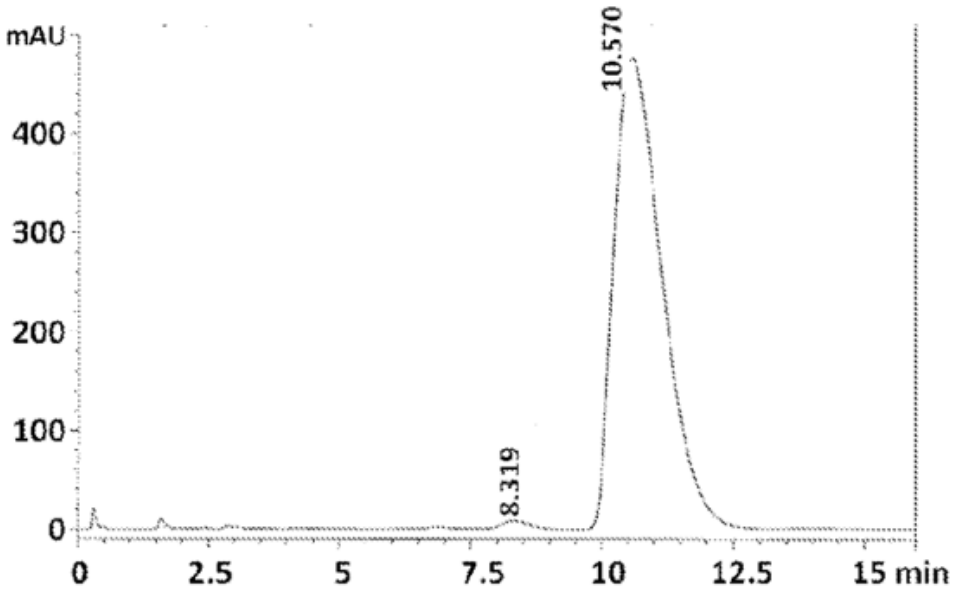


Figura 7C