



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 040**

51 Int. Cl.:
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05777341 .8**
96 Fecha de presentación : **22.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781276**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Uso de compuestos peptídicos para tratar dolor relacionado con cáncer de huesos y dolor inducido por quimioterapia y por nucleósidos.**

30 Prioridad: **27.08.2004 US 604810 P**
27.08.2004 EP 04020402

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2010

73 Titular/es: **UCB Pharma GmbH**
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE

72 Inventor/es: **Stöhr, Thomas y**
Beyreuther, Bettina

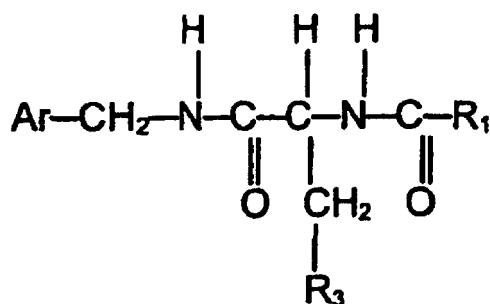
74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 348 040 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).

ES 2 348 040 T3

La patente U.S. n° 5.773.475 también describe compuestos adicionales útiles para tratamiento de trastornos del SNC. Estos compuestos son N-bencil-2-amino-3-metoxi-propionamida que tienen la Fórmula (IIa):



Fórmula (IIa)

en la que

Ar es arilo que está no sustituido o sustituido con halo; R₃ es alcoxi inferior; y R₁ es metilo.

Sin embargo, ninguna de estas patentes describe el uso de estos compuestos para tratar dolor tumoral, en particular dolor por cáncer de huesos, para tratar dolor inducido por quimioterapia ni para tratar dolor inducido por nucleósidos, como se especifica en las reivindicaciones.

El documento WO 02/074297 se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIa), en la que Ar es fenilo que puede estar sustituido con al menos un halo, R₃ es alcoxi inferior que contiene 1-3 átomos de carbono y R₁ es metilo, para la preparación de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de alodinia relacionada con el dolor neuropático periférico.

El documento WO 02/074784 se refiere al uso de un compuesto que tiene la Fórmula (Ia) y/o la Fórmula (IIa) que exhibe propiedades antinocirreceptivas para tratar diferentes tipos y síntomas de dolor agudo y crónico, especialmente dolor inflamatorio neuropático, v.g. dolor artrítico reumatoide y/o dolor osteo-artrítico inflamatorio secundario.

Actualmente no existe ningún analgésico que sea altamente potente en diversos síndromes de dolor. Diferentes mecanismos que conducen a dolor inflamatorio o neuropático hacen difícil identificar compuestos que tengan actividad analgésica general. Estamos sólo al comienzo de comprender los mecanismos detrás de los diferentes síndromes de dolor como dolor por cáncer (por ejemplo dolor por cáncer de huesos inducido por tumores), dolor inducido por quimioterapia o dolor inducido por nucleósidos, todos los cuales parecen tener diversos orígenes moleculares. Los antidepresivos, anticonvulsiantes u opioides que describen grupos de compuestos usados en el tratamiento del dolor no tienen un patrón común con respecto a su eficacia en el tratamiento de síndromes de dolor. Esto hace difícil predecir la actividad de nuevos compuestos en los diversos síndromes de dolor, y demanda una caracterización detallada en múltiples modelos de animales de dolor.

El dolor neuropático tras lesión o disfunción al sistema nervioso periférico o central sigue siendo un problema clínico difícil para el cual no hay tratamientos eficaces (Bennett, 1994; Murphy y Reid, 2001). Los anticonvulsiantes se usan para el manejo de algunas formas de dolor neuropático (Sindrup y Jenssen, 1999; Jensen, 2002). SPM 927 (R-2-acetamido-N-bencil-3-metoxipropionamida), también denominada harkoserida o ADD 234037, es un nuevo fármaco anticonvulsiante. Pertenece a una serie de aminoácidos funcionalizados que se han sintetizado como una nueva clase de agentes anticonvulsiantes (Kohn *et al.* 1991).

El documento WO 02/15922 describe el uso de SPM 927 para el tratamiento de dolor neuropático. Los presentes estudios muestran efectos analgésicos de SPM 927 en modelos de rata de dolor por cáncer, en particular dolor por cáncer de huesos, de dolor inducido por quimioterapia y de dolor inducido por análogos de nucleósidos.

El hueso es el tercer sitio más habitual de metástasis tras el pulmón y el hígado, y es el sitio principal de la enfermedad metastásica en pacientes con cáncer de mama, de próstata y de pulmón. Las lesiones óseas que resultan de la enfermedad metastásica también provocan un grave dolor óseo, que es un problema clínico importante en pacientes con cáncer. Este tipo de dolor es difícil de tratar debido a su naturaleza intermitente, progresiva, y a su agravamiento por el movimiento. El síntoma predominante en este modelo de dolor es la alodinia mecánica. También se ha demostrado hiperalgesia térmica e hiperalgesia mecánica según se mide por la diferencia de soporte de peso en los dos miembros posteriores (Medhurst *et al.*, 2002). El tratamiento de dolor óseo en pacientes humanos está muy limitado al uso de opioides; sin embargo, la eficacia de los opioides potentes es mínima, y las dosis eficaces producen un abanico de

efectos secundarios debilitantes. En consecuencia, existe una necesidad clínica de nuevas terapias que se puedan usar para prevenir, tratar y aliviar dolor óseo inducido por tumores. Las terapias candidatas para el tratamiento de dolor óseo inducido por tumores se pueden evaluar usando un modelo de rata puesto que la rata es superior para ensayar respuestas de comportamiento frente a estímulos de dolor. Un modelo implica la inyección de células de carcinoma de glándula mamaria de rata en el espacio medular de la tibia próxima usando un criterio de valoración de la evaluación del dolor (Medhurst *et al.*, 2002), que se llevó a cabo en los Días 7 a 15 tras el implante del tumor.

El dolor inducido por quimioterapia es una forma de dolor neuropático asociado con fármacos neurotóxicos tales como alcaloides de la vinca, por ejemplo vincristina, se caracteriza por parestesias y disestesias dolorosas. La eficacia antineoplásica clínica de vincristina está limitada por el desarrollo de una neuropatía sensorimotora mixta (Casey *et al.*, 1973, Tanner *et al.* 1998) que parece que ocurre en dos etapas principales (Weiss *et al.*, 1974). En la etapa temprana, los axones periféricos son dañados por vincristina y los síntomas principales son parestesias y disestesias. En la etapa tardía, que se produce más frecuentemente cuando se administran mayores dosis durante períodos de tiempo más prolongados, los axones se pierden y el hallazgo clínico principal es la pérdida de la función motora. El modelo de rata tratada con de vincristina descrito parece reflejar la etapa temprana de la neuropatía quimioterapéutica inducida por vincristina. Mientras que el mecanismo subyacente todavía no está completamente comprendido, se ha descrito que provoca una desorganización del citoesqueleto microtubular axonal, así como un incremento en el calibre de axones sensoriales no mielinizados (Quasthoff *et al.*, 2002). Estos resultados demostraron que los cambios en la estructura de los microtúbulos en neuronas sensoriales nocirreceptivas acompañan a la hiperalgesia inducida por vincristina.

Cada vez se reconoce más a la neuropatía periférica dolorosa, inducida por análogos de nucleósidos, como una fuente importante de morbilidad en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cohen, 2002). Este efecto secundario gravemente debilitante puede forzar el acortamiento o incluso la discontinuación de la terapia contra el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (Yatvin *et al.*, 1999). Esta neuropatía se caracteriza por un comienzo repentino de malestar de quemazón intensa en ambos pies, pasando a las manos en alrededor de la 10ª semana de tratamiento, que alcanzó una intensidad grave en un período de días (Dubinsky *et al.*, 1989). El mecanismo bioquímico que subyace a esta neuropatía sigue estando muy poco comprendida, aunque se ha informado de que la toxicidad mitocondrial contribuye al desarrollo de esta neuropatía. Recientemente, se ha dado a conocer que la intoxicación de ratas con fármacos antirretrovirales para la terapia contra el SIDA de tipo análogos nucleosídicos (ddC (2',3'-didesoxicidina), ddI (2',3'-didesoxinosina) o d4T (2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina)), produce una nocirrepción potenciada en la rata (Joseph *et al.*, 2004). El mecanismo implicado parece diferente del encontrado que contribuye en otros modelos de neuropatía periférica dolorosa metabólica o tóxica, como fármacos antihiperalgésicos eficaces en estos modelos. Los inhibidores de la proteína cinasa A, proteína cinasa C, proteína cinasa G, proteína cinasa activada por mitógenos p42/p44 (ERK1/2) y óxido nítrico sintetasa no tienen efecto sobre neuropatías periféricas, y no tuvieron efecto sobre hipersensibilidad inducida por inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa. Los moduladores de calcio intracelular (TMB-8 y Quin-2) son los únicos agentes capaces de invertir esta hipersensibilidad de animales intoxicados, lo que sugiere fuertemente el papel de calcio intracelular en este tipo de dolor neuropático.

La quimioterapia, por ejemplo el tratamiento con alcaloides de la vinca como vincristina o con taxol, suramina, cisplatino, carboplatino u oxaliplatino, se usa para el tratamiento de pacientes con cáncer y con VIH. Adicionalmente, los pacientes con VIH o/y tumores también son tratados con antirretrovirales o antivirales.

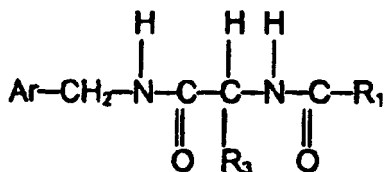
No se ha dado a conocer el uso de compuestos de Fórmula (IIb) para el tratamiento del dolor relacionado con cáncer de huesos, para tratar dolor inducido por quimioterapia y para tratar dolor inducido por nucleósidos, como se especifica en las reivindicaciones. Así pues, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos de Fórmula (IIb) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, alivio o/y el tratamiento de dolor relacionado con cáncer de huesos. La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de Fórmula (IIb) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor inducido por quimioterapia, tal como dolor neuropático inducido por quimioterapia, dolor inducido por alcaloides de la vinca, dolor inducido por vincristina o/y dolor inducido por taxol, suramina, cisplatino, carboplatino o/y oxaliplatino. La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de Fórmula (IIb) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor inducido por nucleósidos o/y análogos nucleosídicos, seleccionado de dolor inducido por análogos nucleosídicos antitumorales o/y antivirales, o/y dolor inducido por análogos nucleosídicos antivirales, en terapia contra el SIDA, o/y dolor inducido por AZT (3'-azidotimidina), ddC, ddI o/y d4T.

La invención también se refiere al uso de los compuestos de Fórmula (IIb) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor relacionado con cáncer de huesos, dolor inducido por quimioterapia, o/y dolor inducido por al menos un nucleósido o/y al menos un análogo nucleosídico como se especifica en las reivindicaciones.

Sorprendentemente, la aplicación de los compuestos (IIb), particularmente (R)-2-acetamida-N-bencil-3-metoxipropionamida (SPM 927) redujo la hiperalgesia mecánica y térmica así como la alodinia mecánica y térmica en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos inducido por tumores, en un modelo de dolor inducido por quimioterapia y de dolor neuropático inducido por análogos nucleosídicos.

ES 2 348 040 T3

El compuesto para uso de acuerdo con la presente invención tiene la Fórmula general (IIb):



Fórmula (IIb)

en la que

Ar es fenilo, que está no sustituido o sustituido con al menos un grupo halo;

R₃ es -CH₂-Q, en el que Q es alcoxi inferior que contiene 1-3 átomos de carbono, y R₁ es alquilo inferior que contiene 1-3 átomos de carbono.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIb) para uso en la prevención, alivio o/y el tratamiento de dolor relacionado con cáncer de huesos. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIb) para uso en la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor inducido por quimioterapia, tal como dolor neuropático inducido por quimioterapia, dolor inducido por alcaloides de la vinca, dolor inducido por vincristina o/y dolor inducido por taxol, suramina, cisplatino, carboplatino o/y oxaliplatino. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIb) para uso en la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor inducido por nucleósidos o/y análogos nucleosídicos, seleccionado de dolor inducido por análogos nucleosídicos antitumorales o/y antivirales, o/y dolor inducido por análogos nucleosídicos antivirales, en terapia contra el SIDA, o/y dolor inducido por AZT, ddC, ddI o/y d4T.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIb) para uso en la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor relacionado con cáncer de huesos, dolor inducido por quimioterapia, o/y dolor inducido por al menos un nucleósido o/y al menos un análogo nucleosídico como se especifica en las reivindicaciones.

Los grupos "alquilo inferior" cuando se utilizan solos o en combinación con otros grupos son alquilo inferior que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, y pueden ser de cadena lineal o ramificados. Estos grupos incluyen metilo, etilo, propilo e isopropilo.

Los grupos "alcoxi inferior" son alcoxi inferior que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, y pueden ser de cadena lineal o ramificada. Estos grupos incluyen metoxi, epoxi y propoxi.

El término "halo" incluye fluoro, cloro, bromo y yodo.

R₁ es alquilo inferior. El grupo R₁ más preferido es metilo.

El R₃ más preferido es CH₂-Q, en el que Q es metoxi.

Los compuestos más preferidos son:

(R)-2-acetamido-N-bencil-3-metoxi-propionamida;

O-metil-N-acetil-D-serin-m-fluorobencil-amida;

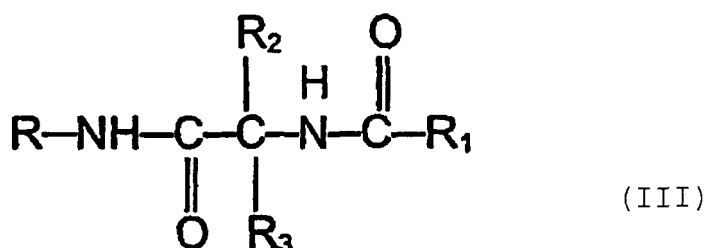
O-metil-N-acetil-D-serin-p-fluorobencil-amida;

Debe entenderse que las diversas combinaciones y permutaciones de los grupos Markush de R₁, R₂, R₃, R y n descritos en esta memoria se consideran dentro del alcance de la presente invención. Además, la presente invención también abarca compuestos y composiciones que contienen uno o más elementos de cada uno de los agrupamientos de Markush en R₁, R₂, R₃, y R y las diversas combinaciones de los mismos. Así, por ejemplo, la presente invención contempla que R₁ puede ser uno o más de los sustituyentes enumerados anteriormente en esta memoria en combinación con cualquiera y la totalidad de los sustituyentes de R₂, R₃, y R.

ES 2 348 040 T3

Los compuestos utilizados en la presente invención pueden contener uno o más carbonos asimétricos, y pueden existir en formas racémicas y ópticamente activas. La configuración alrededor de cada carbono asimétrico puede ser la forma D o L. Es bien conocido en la técnica que la configuración alrededor de un átomo de carbono quiral se puede describir también como R o S en el sistema de nomenclatura de Cahn-Prelog-Ingold. La totalidad de las diversas configuraciones alrededor de cada carbono asimétrico, incluyendo los diversos enantiómeros y diastereómeros, así como mezclas racémicas y mezclas de enantiómeros, diastereómeros o ambos, están contempladas por la presente invención.

En la cadena principal existe asimetría en el átomo de carbono al que están unidos los grupos R_2 y R_3 . Los compuestos de la presente invención tienen la fórmula



en la que R , R_1 , R_2 , R_3 son como se define aquí. R_2 es hidrógeno. R es bencilo, en el que el anillo fenílico del mismo está no sustituido o está sustituido con al menos un halo.

Como se utiliza en esta memoria, el término configuración hará referencia a la configuración alrededor del átomo de carbono al cual están unidos R_2 y R_3 , aun cuando pueden estar presentes en la molécula otros centros quirales. Por esta razón, cuando se hace referencia a una configuración particular, tal como D o L, debe entenderse que significa el estereoisómero D o L en el átomo de carbono al cual están unidos R_2 y R_3 . Sin embargo, también incluye todos los enantiómeros y diastereómeros posibles en otros centros quirales, si los hay, presentes en el compuesto.

Los compuestos de la presente invención están dirigidos a todos los isómeros ópticos, es decir, los compuestos de la presente invención son el estereoisómero L o el estereoisómero D (en el átomo de carbono al cual están unidos R_2 y R_3). Estos estereoisómeros se pueden encontrar en mezclas del estereoisómero L y D, v.g., mezclas racémicas. Se prefiere el estereoisómero D.

Es más preferido un compuesto de Fórmula (III) en la configuración R, con preferencia sustancialmente puro desde el punto de vista enantiomérico, en el que el sustituyente R es bencilo que está no sustituido o sustituido con al menos un grupo halo, en el que R_3 es CH_2-Q , en el que Q es alcoxi inferior que contiene 1-3 átomos de carbono y en el que R_1 es metilo y en el que R_2 es H. Preferiblemente, R es bencilo no sustituido o bencilo sustituido con al menos un grupo halo que es un grupo fluoro.

Dependiendo de los sustituyentes, los presentes compuestos pueden formar también sales de adición. Se considera que todas estas formas están dentro del alcance de esta invención, incluyendo mezclas de las formas estereoisómeras.

La preparación de los compuestos utilizados se describe en las Patentes U.S. Núms. 5.378.729 y 5.773.475.

Los compuestos utilizados en la presente invención son útiles como tales como se representan en la Fórmula (IIb), y se pueden emplear en forma de sales teniendo en cuenta su naturaleza básica por la presencia del grupo amino libre. Así, los compuestos de Fórmula (IIb) forman sales con una gran diversidad de ácidos, inorgánicos y orgánicos, incluyendo ácidos farmacéuticamente aceptables. Las sales con ácidos terapéuticamente aceptables son útiles, por supuesto, en la preparación de formulaciones en las que es muy ventajosa una solubilidad incrementada en agua.

Estas sales farmacéuticamente aceptables también tienen eficacia terapéutica. Estas sales incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, yodhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, así como sales de ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, benzoico, perclórico, glicólico, glucónico, succínico, arilsulfónico (v.g., ácidos p-toluenosulfónico, bencenosulfónico), fosfórico y malónico.

Se prefiere que el compuesto utilizado en la presente invención se utilice en cantidades terapéuticamente eficaces.

El médico determinará la dosificación de los presentes agentes terapéuticos que sea la más adecuada, y la misma variará con la forma de administración y el compuesto particular seleccionado, y adicionalmente variará con el paciente objeto de tratamiento, la edad del paciente, y el tipo de enfermedad que se esté tratando. Generalmente se deseará iniciar el tratamiento con dosis pequeñas sustancialmente menores que la dosis óptima del compuesto, y se aumentará la dosis en pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo en las circunstancias del caso. Cuando la composición se administra por vía oral, serán necesarias mayores cantidades del agente activo para producir el mismo

ES 2 348 040 T3

efecto que una cantidad menor administrada por vía parenteral. Los compuestos son útiles del mismo modo que agentes terapéuticos comparables, y el nivel de dosificación es del mismo orden de magnitud que el empleado generalmente con estos otros agentes terapéuticos.

5 En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se administran en cantidades que oscilan desde 1 mg hasta 100 mg por kilogramo de peso corporal por día, más preferiblemente en cantidades que oscilan desde 1 mg hasta 10 mg por kilogramo de peso corporal por día. Este régimen de dosificación puede ser ajustado por el médico para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Los pacientes que lo necesiten se pueden tratar con dosis del compuesto de la presente invención de al menos 50 mg/día, preferiblemente de al menos 200 mg/día, más
10 preferiblemente de al menos 300 mg/día y muy preferiblemente de al menos 400 mg/día. Generalmente, un paciente que lo necesite se puede tratar con dosis que llegan hasta un máximo de 6 g/día, más preferiblemente un máximo de 1 g/día y muy preferiblemente un máximo de 600 mg/día. En algunos casos, sin embargo, pueden ser necesarias dosis mayores o menores.

15 En otra realización preferida, las dosis diarias se incrementan hasta que se alcanza una dosis diaria predeterminada que se mantiene durante el tratamiento ulterior.

Todavía en otra realización preferida, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas. Por ejemplo, se pueden administrar tres dosis por día, preferiblemente dos dosis por día. Es más preferido administrar una sola dosis
20 por día.

Todavía en otra realización preferida, se puede administrar una cantidad de los compuestos de la presente invención que dé como resultado una concentración en plasma de 0,1 a 15 $\mu\text{g/ml}$ (valle) y 5 a 18,5 $\mu\text{g/ml}$ (pico), calculada como un promedio en una pluralidad de individuos tratados.

25 Los compuestos de Fórmula (Iib) se pueden administrar de manera conveniente, por ejemplo por ruta oral, intravenosa (en caso de ser solubles en agua), intramuscular, intratecal o subcutánea. Se prefiere la administración oral y/o i.v.

30 La composición farmacéutica para uso en la presente invención se puede preparar para el régimen de tratamiento como se ha descrito arriba, en particular para el tratamiento con dosis como se han descrito arriba, a fin de alcanzar concentraciones en plasma como las arriba descritas, durante periodos de administración y/o rutas de administración como se especifican en las realizaciones de la presente invención que se han descrito arriba.

35 El compuesto para uso en la presente invención se puede administrar en combinación con la administración de un agente activo adicional para la prevención, alivio o/y tratamiento de una infección vírica, tal como infección retroviral, infección por VIH, incluyendo SIDA, de cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, enfermedad metastásica, o/y de la progresión tumoral mediante infiltración en o presión sobre
40 hueso, vísceras, tejido blando o nervios. El compuesto para uso en la presente invención y el agente activo adicional se pueden administrar juntos, es decir, en una forma de dosificación única, o se pueden administrarse por separado, a saber, en una forma de dosificación separada. Así pues, la composición farmacéutica para uso en la presente invención puede comprender un compuesto de la presente invención como se define arriba y puede comprender adicionalmente otro agente activo para la prevención, alivio y/o tratamiento de una infección vírica, tal como infección retroviral, infección por VIH, incluyendo SIDA, de cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón,
45 cáncer de huesos, enfermedad metastásica, o/y de la progresión tumoral mediante infiltración en o presión sobre hueso, vísceras, tejido blando o nervios. La composición farmacéutica puede comprender una forma de dosificación única, o puede comprender una forma de dosificación separada que comprende una primera composición que comprende un compuesto de la presente invención como se define arriba y una segunda composición que comprende el agente activo adicional.

50 Los compuestos para uso en la presente invención se pueden usar para la preparación de una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

55 Los compuestos de Fórmula (Iib) se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden confinarse en cápsulas de gelatina con envoltura dura o blanda, o se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente en el puré de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo de Fórmula (Iib) se puede incorporar con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y obleas. Tales composiciones y preparaciones deberían contener al menos 1% de compuesto activo de Fórmula (Iib). El porcentaje
60 de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, modificarse y puede estar comprendido convenientemente entre 5 y 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo de Fórmula (Iib) en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada. Composiciones o preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención contienen entre 10 mg y 6 g de compuesto activo de Fórmula (Iib).

65 Los comprimidos, trociscos, píldoras y cápsulas pueden contener también lo siguiente: un aglutinante, tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata y ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saborizante tal como

ES 2 348 040 T3

menta piperita, aceite de gaulteria, o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido.

5 Pueden estar presentes otros diversos materiales, como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como esencia de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéu-
10 ticamente puro y ser sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Adicionalmente, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación prolongada. Por ejemplo, se contemplan formas de dosificación de liberación prolongada en las cuales el ingrediente activo está unido a una resina cambiadora de iones que, opcionalmente, puede recubrirse con un revestimiento de barrera de difusión para modificar las propiedades de liberación de la resina.

15 El compuesto activo se puede administrar también por vía parenteral o intraperitoneal. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (en caso de ser solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en un grado tal que exista una facilidad en la aplicación con jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y deben estar protegidas frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, pro-
25 pilenglicol, y polietilenglicol líquido, y análogos), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede llevarse a cabo por diversos agentes antibacterianos y anti-
30 fúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío, la técnica de liofilización más cualquier ingrediente deseado
40 adicional procedente de la disolución del mismo previamente filtrada en condiciones estériles.

45 Como se usa en esta memoria, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y la totalidad de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agente antibacteriano y antifúngico, agentes isotónicos y retardantes de la absorción para sustancias farmacéuticas activas, como se conoce bien en la técnica. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

50 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosis unitaria como se utiliza en esta memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los individuos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las características específicas para las nuevas formas de dosis unitaria de la invención vienen dictadas por y son dependientes directamente de (a) las características singulares del material activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de
55 composiciones, tales como material activo para el tratamiento de la enfermedad entre los individuos vivos que tienen una condición de enfermedad en la cual la salud corporal se deteriora como se describe en detalle en esta memoria.

60 El ingrediente activo principal se dispone en forma de composición para administración conveniente y eficaz en cantidades efectivas con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de dosificación unitaria como se describe anteriormente en esta memoria. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en cantidades comprendidas entre 10 mg y 6 g. Expresado en proporciones, el compuesto activo está presente generalmente en una proporción comprendida entre 1 y 750 mg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contengan ingredientes activos suplementarios, las dosis se determinan con referencia a la dosis usual y modalidad de administración de dichos ingredientes.

65 Como se utiliza en esta memoria, el término “paciente” o “individuo” hace referencia a un animal de sangre caliente, y preferiblemente mamíferos, tales como, por ejemplo, gatos, perros, caballos, vacas, cerdos, ratones, ratas y primates, incluyendo seres humanos. El paciente preferido es un ser humano.

ES 2 348 040 T3

El término “tratar” hace referencia a aliviar el dolor asociado con una enfermedad o afección, a curar o aliviar la enfermedad o afección del paciente.

5 Los compuestos para uso en la presente invención se administran a un paciente que sufre el tipo de trastorno mencionado anteriormente en una cantidad eficaz. Estas cantidades son equivalentes a las cantidades terapéuticamente eficaces descritas anteriormente en esta memoria.

10 El ejemplo siguiente muestra las propiedades de SPM 927 reduciendo la hiperalgesia mecánica y térmica, así como la alodinia mecánica y térmica en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos inducido por tumor, en un modelo de dolor neuropático inducido por quimioterapia y un modelo de dolor neuropático inducido por análogos nucleosídicos.

15 La sustancia usada fue SPM 927, que es el sinónimo de Harkoserida. La nomenclatura química estándar es (R)-2-acetamida-N-bencil-3-metoxipropionamida.

Leyenda de las figuras

20 La Figura 1 describe el ensayo de alodinia mecánica en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos (ratas). Las ratas con cáncer de huesos se trataron con concentraciones crecientes de SPM 927 (10 mg, 20 mg y 40 mg) y se compararon con ratas con cáncer de huesos tratadas con morfina, ratas con cáncer de huesos sin tratamiento (células solamente) y ratas de control.

25 La Figura 2 describe el ensayo de la estimulación térmica de la pata en los días 14 y 15 en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos (ratas). Las ratas con cáncer de huesos se trataron con concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) y se compararon con ratas con cáncer de huesos tratadas con morfina, ratas con cáncer de huesos sin tratamiento (células solamente) y ratas de control.

30 La Figura 3 describe el ensayo de diferencias de soporte de peso en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos (ratas). Las ratas con cáncer de huesos se trataron con concentraciones crecientes de SPM 927 (10 mg, 20 mg y 40 mg) y se compararon con ratas con cáncer de huesos tratadas con morfina, ratas con cáncer de huesos sin tratamiento (células solamente) y ratas de control.

35 La Figura 4 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) sobre la alodinia térmica del ensayo del baño frío en un modelo de dolor inducido por quimioterapia (ratas tratadas con vincristina), en comparación con morfina (3 mg/kg).

40 La Figura 5 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) sobre la alodinia térmica del ensayo de plancha caliente a 38°C en un modelo de dolor inducido por quimioterapia (ratas tratadas con vincristina), en comparación con morfina (3 mg/kg).

45 La Figura 6 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) sobre hiperalgesia térmica del ensayo de plancha caliente a 52°C en un modelo de dolor inducido por quimioterapia (ratas tratadas con vincristina), en comparación con morfina (3 mg/kg).

La Figura 7 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) sobre la hiperalgesia mecánica del ensayo de presión de la pata en un modelo de dolor inducido por quimioterapia (ratas tratadas con vincristina), en comparación con morfina (3 mg/kg).

50 La Figura 8 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) sobre la alodinia mecánica de los ensayos de estimulación con la cerda de Frey en un modelo de dolor inducido por quimioterapia (ratas tratadas con vincristina), en comparación con morfina (3 mg/kg).

55 La Figura 9 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) administrado i.p. en un ensayo de alodinia térmica (baño frío) en un modelo de dolor inducido por nucleósidos (ratas tratadas con ddC), en comparación con el efecto de morfina (3 mg/kg administrados s.c.).

60 La Figura 10 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) administrado i.p. en un ensayo de alodinia mecánica (cepillado a D20) en un modelo de dolor inducido por nucleósidos (ratas tratadas con ddC), en comparación con el efecto de morfina (3 mg/kg administrada s.c.).

La Figura 11 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) administrado i.p. en un ensayo de alodinia mecánica (cerda de von Frey) en un modelo de dolor inducido por nucleósidos (ratas tratadas con ddC), en comparación con el efecto de morfina (3 mg/kg administrada s.c.).

65 La Figura 12 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) administrado i.p. en un ensayo de hiperalgesia térmica (plancha caliente a 52°C) en un modelo de dolor inducido por nucleósidos (ratas tratadas con ddC), en comparación con el efecto de morfina (3 mg/kg administrada s.c.).

La Figura 13 describe el efecto de concentraciones crecientes de SPM 927 (3 mg, 10 mg y 30 mg) administrado i.p. en un ensayo de hiperalgesia mecánica (presión de la pata) en un modelo de dolor inducido por nucleósidos (ratas tratadas con ddC), en comparación con el efecto de morfina (3 mg/kg administrada s.c.).

5

Ejemplo

El efecto de la administración sistémica de SPM 927 se examinó en ratas en un modelo de dolor relacionado con cáncer de huesos inducido por tumor, en un modelo de dolor neuropático inducido por quimioterapia y en un modelo de dolor neuropático inducido por análogos nucleosídicos. SPM 927 redujo en estos modelos la hiperalgesia mecánica y térmica así como la alodinia mecánica y térmica. Se demostró que SPM 927 es útil como un analgésico para tratar dolor relacionado con cáncer de huesos, neuropatía inducida por quimioterapia y por nucleósidos, y es en conjunto más activo que la morfina.

15

Materiales y métodos

Modelo de rata con cáncer de huesos

20 *Cultivo celular*

Las células se cultivaron en medio que contiene RPMI-1640 (Gibco, 500 ml), suero fetal bovino al 10% inactivado por calor (Hyclone), L-glutamina (concentración final 2 mM, de Gibco) y disolución de antibiótico (concentración final 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de sulfato de estreptomycin, de Gibco). Las células se liberaron del matraz del cultivo tisular mediante una exposición breve a tripsina al 0,1% (Gibco), y después se prepararon para inyección según lo siguiente: las células se centrifugaron durante 10 minutos a aproximadamente 1.200 rpm. El pelete resultante se lavó dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Mediatech) que no contiene calcio ni magnesio. El pelete final se resuspendió en PBS, y se contó el número de células usando un hemocitómetro. Las células se diluyeron para lograr concentraciones finales para inyección, y se mantuvieron en hielo hasta que se llevó a cabo la inyección.

30

Cirugía

Después de una semana de cuarentena, en la cavidad medular de la tibia proximal de cada rata se inyectó medio de cultivo o 3×10^4 células de carcinoma de glándula mamaria de rata MRMT-1 singénicas. Según procedimiento, el animal se anestesió en primer lugar con cetamina/xilazina, y el área de la pata derecha se afeitó y se trató con una disolución de yodo y se limpió con una disolución de etanol al 70%. Se realizó una incisión rostral-caudal de 1 cm en la piel sobre la mitad superior de la tibia. Se llevó a cabo una disección sin cortes para exponer la tibia, asegurando un daño mínimo a los músculos o a los vasos sanguíneos. Usando una aguja de calibre 23, la tibia se perforó 1-3 mm por debajo de la articulación de la rodilla. La aguja se insertó con un ángulo que permitiese empujarla dentro del canal intramedular del hueso. Una vez se abrió un camino al canal intramedular, la aguja de calibre 23 se retiró y se substituyó por una aguja roma unida a una jeringuilla de Hamilton de 5 μ l. Se inyectó un volumen de 3 μ l de medio de cultivo + vehículo o de células tumorales + vehículo en la cavidad intramedular. Las células cancerígenas se inyectaron lentamente mientras se retiraba simultáneamente la jeringuilla, permitiendo que las células llenasen el espacio en la cavidad. Tras la inyección, el sitio de la inyección se cerró usando cera para huesos. La herida se cerró entonces usando grapas quirúrgicas. Se llevó a cabo el cuidado y la observación postoperatoria hasta que el animal recuperó la conciencia.

50 *Medidas del comportamiento*

Dosificación

En el día 8 ó 15, a las ratas se les dosificó con una única inyección de vehículo, compuesto de referencia o artículo de ensayo 20 minutos antes del inicio del ensayo para determinar la alodinia mecánica, y aproximadamente 40 minutos antes del inicio del ensayo para determinar la hiperalgesia térmica. Basándose en la actividad farmacológica de SPM 927, no fue necesario realizar los ensayos más allá de 90 minutos después del tratamiento con el fármaco. En el 9º día, a las ratas se les dosificó el compuesto de referencia o el artículo de ensayo 20 minutos antes del inicio del ensayo para el soporte de peso.

60

Evaluaciones nocirreceptivas

En los días 7, 8, 14 y 15, se llevaron a cabo los ensayos de evaluación del dolor. En el día 7, 14, se llevaron a cabo evaluaciones del valor de referencia. Todos los animales recibieron una inyección i.p. de disolución salina aproximadamente 20 minutos antes del ensayo del valor de referencia. En el día 8, 15, comenzando aproximadamente 20 minutos después de la inyección del artículo de ensayo/de referencia, a los animales se les sometió a una serie de evaluaciones nocirreceptivas. El orden del ensayo se mantuvo igual para todos los animales. Los animales se evaluaron

ES 2 348 040 T3

en primer lugar para determinar la alodinia mecánica y después la hiperalgesia térmica. A los animales se les sometió al ensayo de soporte de peso en el día 9 y 15. Los animales se evaluaron en primer lugar para determinar las respuestas del valor de referencia al soporte de peso. Tras las medidas del valor de referencia, a las ratas se les inyectó con el artículo de ensayo/de referencia, y, al menos 20 minutos más tarde, a los animales se les sometió a otro análisis de soporte de peso.

Alodinia mecánica

Se llevó a cabo un ensayo de Von Frey de alodinia mecánica sobre el miembro posterior (derecho) afectado de todos los animales en el día del valor de referencia (día 7) y en el día 8. En este ensayo, las ratas se colocaron en una pequeña caja de plexiglás con un suelo de malla de alambre. Después de habituarse durante aproximadamente 10 minutos, se aplicó una serie de fibras de nailon delgadas desde la parte inferior, a través del suelo de la jaula, y se presionaron contra la superficie plantar de la pata trasera. Durante el ensayo, las ratas tenían libertad de movimiento y no estaban manipuladas. Los diámetros de los filamentos proporcionaron una escala logarítmica de fuerza ejercida, y de este modo una escala lineal y de intervalos de la intensidad percibida. La fibra con la fuerza más débil se ensayó en primer lugar, y está por debajo del umbral normal de detección para la mayoría de las ratas. Se ensayó cada fibra sucesivamente más fuerte, en cada caso usando una fuerza requerida para comenzar justamente a flexionar el monofilamento. Cuando la rata levantó su pata en respuesta a la presión, se registró el tamaño del filamento y a continuación se usó un filamento más débil. El umbral de retirada se determinó según el método de "arriba-abajo" de Chapman, que implica el uso de fibras sucesivamente más grandes y más pequeñas para centrarse en el umbral de la retirada. El incremento significativo en la alodinia se basó en la comparación de valores medios de los grupos.

Ensayo de hiperalgesia térmica

A los animales se les sometió al ensayo para determinar la hiperalgesia térmica el día del valor de referencia (día 7, 14) y en el día 8, 15. Cada rata se colocó en una cámara de plexiglás individual sobre una superficie de vidrio calentada elevada durante aproximadamente 10 minutos para que se habituara. Cuando el animal estaba descansando, se hizo pasar por debajo del vidrio una fuente térmica de fibra óptica y se le dirigió a la pata trasera derecha del animal. El haz de infrarrojos se encendió y, cuando la rata levantó o movió su pata, el haz se apagó automáticamente. Un cronómetro en la máquina registró la latencia para retirar la pata, que se tomó para indicar el tiempo para que el animal detectase el dolor resultante del calor. Si la rata no se movió en 25 segundos, la fuente térmica se apagó automáticamente, asegurando de que no había daño en la pata. Sólo se ensayó la pata trasera afectada. Este proceso se repitió al menos dos veces para cada rata, separado alrededor de 3 minutos. Si las latencias estaban dentro de 2 segundos entre sí, se promediaban. Si las latencias diferían en más de 2 segundos, la rata se ensayaba hasta que hubiese 2 latencias en 2 segundos, y estos dos números se promediaban. Las medias de los grupos para la latencia para retirar la pata se compararon entre grupos, indicando una menor latencia una mayor sensibilidad al dolor.

Soporte de peso

Después de que los animales en los grupos 4-6 se volvieron a distribuir al azar en grupos de tratamiento con fármaco, en el día 9, 15 a todos los animales se les sometió a un ensayo de soporte de peso. El soporte de peso de los miembros posteriores afectados se evaluó como la diferencia en el transporte de peso por el miembro ipsilateral en comparación con el miembro contralateral. De forma experimental, las ratas se colocaron en una cámara de plexiglás diseñada de forma que cada pata trasera está en reposo en una almohadilla de un transductor separada que registra la distribución del peso corporal del animal sobre cada pata. Se adquirieron cinco lecturas de cada pata y después se promediaron, con los resultados expresados como diferencia de soporte de peso (WBD; lectura contralateral-lectura ipsilateral). Las ratas se asignaron ocho (8) animales por grupo basándose en el peso corporal en el día después de la llegada. Los pesos corporales medios para cada grupo se repasaron para asegurarse de que los valores medios y la desviación estándar satisfacían la suposición de homogeneidad. Basándose en los resultados del ensayo de Von Frey en el día 8, los animales en los grupos 4-6 se volvieron a distribuir al azar en los nuevos grupos de tratamiento para el ensayo de soporte de peso, para prevenir cualquier desviación de su asignación previa de grupo. Los animales en los grupos 1-3 permanecieron en sus grupos designados, puesto que estos animales no estuvieron sometidos previamente al tratamiento con SPM 927.

Modelo de dolor inducido por vincristina

Tratamiento de los animales

Para este estudio, se usaron 86 ratas Dark Agouti hembras (150-200 g) (Harlan, Gannat, Francia). Se enjaularon por grupos (3 animales por jaula), y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo de luz-oscuridad inverso (12 h/12 h) con comida y agua disponible a voluntad. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las directrices institucionales. La intoxicación con vincristina se logró mediante inyección diaria de vincristina (0,15 mg/kg/d, i.p.) desde el día 1 al 5, desde el día 8 al 12 y los días 15 a 16. En el día 17, los animales se sometieron a un ensayo de comportamiento y recibieron tratamiento farmacológico. Las ratas intoxicadas con

ES 2 348 040 T3

vincristina se distribuyeron al azar en 5 grupos experimentales (11 ratas por grupo): 1. vincristina/vehículo, i.p.; 2. vincristina/SPM 297 (3 mg/kg), i.p.; 3. vincristina/SPM 927 (10 mg/kg), i.p.; 4. vincristina/SPM 927 (30 mg/kg), i.p.; 5. vincristina/morfina (3 mg/kg), s.c. SPM 927 y la morfina se inyectaron respectivamente 30 y 45 minutos antes de la implementación de los ensayos de comportamiento.

5

Ensayo de baño frío (alodinia térmica)

Los animales se colocaron en una plataforma de hielo sumergida aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie de agua fría (4°C), de forma que la piel pilosa y lampiña de las patas de los animales estaba en contacto con el agua fría. Se registró la latencia antes de la primera reacción (lamida, movimiento de las patas, pequeños brincos), con un tiempo de corte de 30 s.

10

Ensayo de plancha caliente (alodinia/hiperalgesia térmica)

Los animales se colocaron en un cilindro de vidrio sobre una plancha caliente (Bioblock, Francia) ajustada a 38°C o 52°C. Se registró la latencia antes de la primera reacción (lamida, movimiento de las patas, pequeños brincos o un salto para escapar del calor), con un tiempo de corte de 30 s.

20

Ensayo de estimulación con la cerda de Von Frey (alodinia mecánica)

Las ratas se colocaron en un suelo de rejilla metálica. El ensayo nocirreceptivo se realizó insertando el filamento de von Frey (Bioseb, Francia) a través del suelo de rejilla y aplicándolo a la superficie plantar de la pata trasera. Un ensayo consistió en varias aplicaciones de los diferentes filamentos de von Frey (a una frecuencia de 1-1,5 s). Los filamentos de von Frey se aplicaron a partir del filamento de 10 g hasta el filamento de 100 g. El umbral de la alodinia mecánica se registró tan pronto como el animal retiró su pata trasera; el ensayo se detuvo, y se registró el número del filamento.

30

Ensayo de presión de la pata (hiperalgesia mecánica)

El reflejo de flexión nocirreceptivo se cuantificó usando el dispositivo de presión de la pata de Randall-Selitto (Bioseb, Francia), que aplica una fuerza mecánica linealmente creciente al dorso de la pata trasera de la pata. El umbral nocirreceptivo mecánico se definió como la fuerza en gramos a la cual la rata retiró su pata. La presión de corte se ajustó a 250 g.

35

Análisis de los datos

Se usó ANOVA seguido de un análisis *post-hoc* (prueba de Dunnett) para comparar grupos de datos de comportamiento en cada uno de los puntos de tiempo individuales.

40

Dolor inducido por nucleósidos

Animales, intoxicación con ddC y grupos experimentales

Para este estudio, se usaron 50 ratas macho Sprague Dawley (-220 g) (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Las ratas se enjaularon por grupos (3 animales por jaula) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo inverso de luz-oscuridad (12 h/12 h) con agua y comida disponibles a voluntad. Todos los experimentos se llevaron a cabo según las directrices institucionales. La intoxicación se logró mediante una única inyección de ddC (50 mg/kg, I.V. en la vena de la cola). En el día 10 y en el día 20, a los animales se les sometió al ensayo de comportamiento y recibieron tratamiento farmacológico. Las ratas intoxicadas con ddC se distribuyeron al azar en 5 grupos experimentales (10 ratas por grupo): 1. control/vehículo, i.p.; 2. ddC/vehículo, i.p.; 3. ddC/SPM 927 (3 mg/kg), i.p.; 4. ddC/SPM 927 (10 mg/kg), i.p.; 5. ddC/SPM 927 (30 mg/kg), i.p.; 6. ddC/morfina (3 mg/kg), s.c. SPM 927 y la morfina se inyectaron respectivamente 30 y 45 minutos antes de la implementación de los ensayos de comportamiento.

55

60

Ensayo de cepillado del día 20

El pelo en las patas, flancos, y espalda inferior se cepilló secuencialmente con un aplicador con punta de algodón usando un movimiento oscilante (velocidad 1-2/s; 30 s). El cepillado se realizó con una fuerza no mayor que la requerida para mover el aplicador a lo largo del pelo, de forma que sólo se perturbaba el pelaje. Se contó la vocalización y los efectos moderados para evitar el cepillado.

65

Resultados

Modelo de rata con cáncer de huesos

5 *Alodinia mecánica*

La Fig. 1 representa las respuestas de los grupos a los filamentos de von Frey tras el ensayo del valor de referencia y tras el tratamiento con el fármaco. El análisis estadístico realizado usando un ANOVA de 2 vías global fue significativamente diferente para el grupo de tratamiento ($p < 0,01$), pero no para el valor de referencia frente a los efectos de tratamiento. Los ensayos de ANOVA de una vía, que comparan el grupo de “células solamente” tras el “tratamiento” con cada uno de los grupos de tratamiento, revelaron diferencias significativas en el nivel de alodinia mecánica para el grupo de morfina ($p < 0,01$) y el grupo de SPM 927 20 y 40 mg/kg ($p < 0,05$). El tratamiento con 5 mg/kg de morfina invirtió completamente la alodinia, que se reveló en el momento del ensayo del valor de referencia. Además, se demostró una diferencia muy significativa entre los datos del “post-tratamiento” para el grupo de “células solamente” sano e inyectado con el tumor ($p < 0,01$). También existen diferencias estadísticas entre los valores de referencia y los valores post-dosis para el grupo de “células solamente” y el grupo de morfina ($p < 0,01$).

20 *Hiperalgia térmica*

Los datos para el ensayo térmico de la pata (Fig. 2) en los Días 14 y 15 muestran que las latencias de los valores de referencia para retirar sus patas para todos los grupos a los que se les inyectó el tumor fueron. Se confirmó que esto es muy significativo con un ANOVA de dos vías, en el que el efecto del fármaco fue $p < 0,0001$, y el efecto del tratamiento fue significativo a $p < 0,05$. Los datos del valor de referencia o del pretratamiento fueron significativamente diferentes para los grupos “sin células” frente a “células solamente” (ensayo *post-hoc* de Dunnett; $p < 0,001$), no mostrando los otros grupos diferencias entre sí. Además, los grupos post-tratamiento fueron diferentes para “sin células” frente a “células solamente” (prueba de Dunnett; $p < 0,001$) y “células solamente” frente a dosis de 30 mg/kg de SPM 927 (prueba de Dunnett; $p < 0,001$). El grupo de control de morfina no mostró significancia estadística, aunque hubo una tendencia que indica que la morfina incrementó la latencia a la retirada de la pata.

30 *Hiperalgia mecánica*

La gráfica (Figura 3) muestra un ANOVA de 2 vías global que mostró diferencias de grupo significativas, $p < 0,001$. Puesto que las diferencias de soporte de peso se definieron como el transporte de peso por la pata contralateral menos el transporte de peso por la pata ipsilateral (a la que se le inyectó el tumor), un número más elevado indicaría más peso en la pata no afectada, significando 0 una distribución de peso igual en ambas patas. Los datos del valor de referencia recogidos mostraron un número positivo, revelando que estos animales colocaron todos más peso en sus patas no afectadas. En comparación con el grupo de “células solamente”, el grupo de la morfina y los grupos de 40 mg/kg de SPM 927 mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$) en la cantidad de peso colocado sobre sus patas contralaterales tras el tratamiento, en comparación con el grupo de “células solamente”.

Dolor inducido por vincristina

45 *Ensayo de baño frío*

Como se muestra en la figura 4, se observa una diferencia estadística significativa entre los 6 grupos ($p < 0,05$, ensayo de Anova). Los animales tratados con vincristina presentaron una latencia del umbral muy corta en el ensayo del baño frío (alrededor de 9 s), en contraste con los animales del control, que muestran una puntuación de tiempo de alrededor de 14 s. El tratamiento de los animales tratados con vincristina con SPM 927 indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia del umbral, que de hecho se hizo comparable a la de los animales del control, especialmente para las dosis de tratamiento de 10 y 30 mg/kg. Sin embargo, a 3 mg/kg, la latencia del umbral fue ligeramente mayor que la de los animales tratados con vincristina, aunque no se alcanzó una diferencia estadística. El tratamiento con morfina prolongó la latencia del umbral de los animales tratados con vincristina hasta un nivel más allá del obtenido de las ratas del control.

60 *Ensayo de la plancha caliente a 38°C*

La figura 5 muestra que la latencia del umbral de los animales tratados con vincristina en el ensayo de la plancha caliente (38°C) fue significativamente más corta que la de los animales del control ($p < 0,05$, prueba de Dunnett). El tratamiento de las ratas tratadas con vincristina con SPM 927, a 3, 10 y 30 mg/kg, indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia del umbral. Con las dosis de tratamiento de 10 y 30 mg/kg, el comportamiento de las ratas STZ se hizo comparable al de los animales del control. De forma similar a SPM 927 a 10 y 30 mg/kg, la morfina a 3 mg/kg prolongó la latencia del umbral de los animales STZ hasta un nivel comparable al de las ratas del control.

ES 2 348 040 T3

Ensayo de plancha caliente a 52°C

Como se ilustra en la figura 6, la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con vincristina fue significativamente más corta que la de los animales del control ($p < 0,05$, prueba de Dunnett). El tratamiento de ratas tratadas con vincristina con SPM 927 indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia para la retirada de la pata en comparación con los animales tratados con el vehículo. El efecto obtenido con las dosis de 3 y 10, 30 mg/kg fue comparable al del control.

10 *Ensayo de presión de la pata*

Usando el medidor de analgesia de Randall y Selitto, los animales tratados con vincristina demostraron una disminución notable en la latencia para la retirada de la pata, en comparación con el comportamiento de los animales del control (figura 7). El tratamiento de las ratas tratadas con vincristina con SPM 927 a las dosis de 10 y 30 mg/kg, pero no a 3 mg/kg, indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con vincristina. En este ensayo, el tratamiento con morfina no modificó el comportamiento de las ratas tratadas con vincristina ($p > 0,05$, prueba de Dunnett).

20 *Ensayo con el filamento de von Frey*

En este ensayo (figura 8), la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con vincristina se redujo significativamente (alrededor de 20 g) en comparación con la de las ratas del control (alrededor de 60 g). El tratamiento con SPM 927 prolongó la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con vincristina. La diferencia con el grupo tratado con vehículo alcanzó el nivel de significancia con las dosis de tratamiento de 10 y 30 mg/kg ($p < 0,05$, prueba de Dunnett). El tratamiento con morfina restauró el comportamiento de las ratas tratadas con vincristina hasta un nivel comparable al del grupo del control.

30 *Modelo de rata de dolor inducido por nucleósidos*

Alodinia térmica

Como se muestra en la figura 9, se observó una diferencia estadística significativa entre los 6 grupos ($p < 0,05$, ensayo de Anova). Los animales de ddC tratados con el vehículo presentaron una latencia del umbral muy corta en el ensayo del baño frío (alrededor de 11 s), en contraste con los animales del control que muestran una puntuación de tiempo de alrededor de 20 s. El tratamiento de los animales de ddC con SPM 927 indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia del umbral, que de hecho se hizo comparable a la de los animales del control para las 3 dosis del ensayo, 3, 10 y 30 mg/kg. El tratamiento con morfina prolongó la latencia del umbral de los animales tratados con ddC hasta un nivel comparable al obtenido de las ratas del control.

Ensayo de cepillado en el día 20

La figura 10 muestra los resultados del ensayo de cepillado realizado el D 20. Los animales tratados con SPM 927 (a 3, 10 y 30 mg/kg) presentaron una disminución significativa en el número total de llantos ($p < 0,05$, prueba de Dunnett). Nuevamente aquí, la morfina a 3 mg/kg fue capaz de disminuir significativamente el número total de llantos en los animales de ddC.

50 *Ensayo con el filamento de von Frey en el D 10*

En este ensayo (figura 11), la latencia para la retirada de la pata de las ratas tratadas con ddC se redujo significativamente (alrededor de 50 g) en comparación con la de las ratas del control (alrededor de 85 g). El tratamiento con SPM 927 prolongó la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con ddC. La diferencia con el grupo tratado con vehículo alcanzó el nivel de significancia con las dosis de tratamiento de 3, 10 y 30 mg/kg ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) hasta un nivel comparable al grupo de control. El tratamiento con morfina a 3 mg/kg restauró el comportamiento de las ratas tratadas con ddC hasta un nivel similar al grupo de control.

60 *Ensayo de la plancha caliente a 52°C en el D 20*

Como se ilustra en la figura 12, la latencia para la retirada de la pata de las ratas tratadas con ddC fue significativamente más corta que la de los animales del control ($p < 0,05$, prueba de Dunnett). El tratamiento de las ratas tratadas con ddC con SPM 927 solamente, a la dosis de 30 mg/kg, indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia para la retirada de la pata, en comparación con los animales tratados con el vehículo. El efecto obtenido con las dosis de 3 y 10 mg/kg fue comparable al del grupo del vehículo no tratado. Tras el tratamiento con morfina, el comportamiento de las ratas tratadas con ddC se hizo similar al de los animales del control.

Ensayo de presión de la pata en el D 10

Usando el medidor de analgesia de Randall y Selitto, los animales tratados con ddC demostraron una disminución notable en la latencia para la retirada de la pata en comparación con el comportamiento de los animales del control (figura 13). El tratamiento de las ratas tratadas con ddC con SPM 927, en las 3 dosis de 3, 10 y 30 mg/kg, indujo un incremento significativo ($p < 0,05$, prueba de Dunnett) en la latencia para la retirada de la pata de ratas tratadas con ddC. Nuevamente, el tratamiento con morfina incrementó el comportamiento de ratas tratadas con ddC ($p < 0,05$, prueba de Dunnett).

Conclusión

SPM 927 sistémico produjo un efecto antialodínico y antihiperalgésico dependiente de la dosis en un modelo de rata de dolor por cáncer de huesos, dolor inducido por quimioterapia y dolor inducido por nucleósidos, tras la administración de una sola dosis. De este modo, SPM 927 y compuestos relacionados como se describen en las fórmulas (Ib) o/y (IIb) son útiles para el tratamiento de dolor durante el cáncer, por ejemplo dolor por cáncer de huesos, tras el tratamiento con quimioterapia y nucleósidos en seres humanos.

Referencias

Medhurst, S.J., Walker, K., Bowes, M., Kidd, B.L., Glatt, M., Muller, M., Hattenberger, M., Vaxelaire, J., O'Reilly, T.O., Wotherspoon, G., Winter, J., Green, J., y Urban, L. A rat model of bone cancer pain. *Pain*, 96: 129-140, 2002.

Casey EB, Jelliffe AM, Le Quesne PM, Millett YL. Vincristine neuropathy. Clinical and electrophysiological observations. *Brain* 1973; 96: 69-86. Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH. Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents (segunda de dos partes). *N Engl J Med.* 1974; 291(3): 127-33.

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

Kimberly D. Tanner, David B. Reichling, y Jon D. Levine. Nociceptor Hyper-Responsiveness during Vincristine-Induced Painful Peripheral Neuropathy in the Rat. *J Neurosci* (1998) 18(16):6480-6491. Kaplan RS, Wiernik PH Neurotoxicity of antineoplastic drugs. (1982) *Semin Oncol* 9:103-130.

Owllen RJ, Hartke CA, Dickerson RM, Hains FO (1976) Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the vinca alkaloid class. *Cancer Res* 36:1499-1502.

Sandler SG, Tobin W, Henderson ES (1969) Vincristine-induced neuropathy. Aclinical study of fifty leukemic patients. *Neurology* 19:367-374.

Holland JF, Scharlau C, Gailani S, Krant MJ, Olson KB, Shnider BI, Lynch JJ, Owens A, Carbone PP, Colsky J, Grob SP, Hall TC (1973) Vincristine treatment of advanced cancer: cooperative study of 392 cases. *Cancer Res* 33:1258-1264.

McCarthy GM, Skillings JR (1992) Jaw and other orofacial pain in patients receiving vincristine for the treatment of cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 74:299-304.

Aley KO, Levine JD. Different mechanisms mediate development and expression of tolerance and dependence for peripheral mu-opioid antinociception in rat. *J Neurosci* 1997; 17:8018-23.

Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 1999; 19:2181-6.

Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience* 2002; 111:389-97.

Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 1998; 18:7008 Kaplan RS, Wiernik PH Neurotoxicity of antineoplastic drugs. (1982) *Semin Oncol* 9:103-130.

Cohen J. Therapies. Confronting the limits of success. *Science* 2002; 296: 2320-4.

Dalakas MC. Peripheral neuropathy and antiretroviral drugs. *J Peripher New Syst* 2001; 6:14-20.

Dalakas MC, Semino-Mora C, Leon-Monzon M. Mitochondrial alterations with mitochondrial DNA depletion in the nerves of AIDS patients with peripheral neuropathy induced by 2030-dideoxycytidine (ddC). *Lab Invest* 2001; 81: 1537-44.

ES 2 348 040 T3

Dina OA, Barletta J, Chen X, Mutero A, Martin A, Messing RO, Levine JD. Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat. *J Neurosci* 2000; 20:8614-9.

5 **Dubinsky RM, Yarchoan R, Dalakas M, Broder S.** Reversible axonal neuropathy from the treatment of AIDS and related disorders with 20,30-dideoxycytidine (ddC). *Muscle Nerve* 1989; 12:856-60.

Josepha EK, Chena X, Khasara SG, Levinea JD. Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Pain* 107 (2004) 147-158.

10 **Williams D, Geraci A, Simpson DM.** AIDS and AIDS-treatment neuropathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001; 1:533-8.

15 **Yatvin MB, Li W, Meredith MJ, Shenoy MA.** Improved uptake and retention of lipophilic prodrug to improve treatment of HIV. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 39:165-8.

20

25

30

35

40

45

50

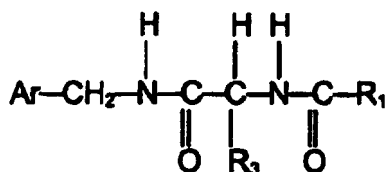
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que tiene la Fórmula (IIb)



Fórmula (IIb)

en la que

Ar es fenilo que está no sustituido o que está sustituido con al menos un grupo halo,

R₃ es CH₂-Q, en el que Q es alcoxi inferior que contiene 1-3 átomos de carbono, y R₁ es alquilo inferior que contiene 1-3 átomos de carbono,

o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, alivio o/y el tratamiento de dolor relacionado con cáncer de huesos, dolor inducido por quimioterapia, o/y dolor inducido por al menos un nucleósido o/y al menos un análogo nucleosídico, en el que el dolor inducido por nucleósido o/y al menos el análogo nucleosídico es dolor inducido por análogos nucleosídicos antitumorales o/y antivirales, dolor inducido por análogos nucleosídicos antivirales en terapia contra el SIDA, o/y dolor inducido por AZT, ddC, ddI o/y d4T.

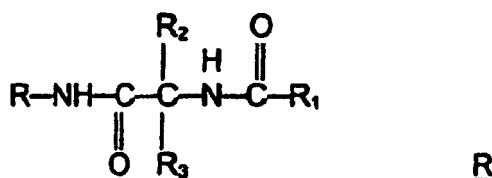
2. Uso según la reivindicación 1, en el que Ar es un fenilo no sustituido.

3. Uso según la reivindicación 1, en el que halo es fluoro.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R₃ es CH₂-Q, en el que Q es metoxi.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto es (R)-2-acetamido-N-bencil-3-metoxi-propionamida; O-metil-N-acetil-D-serina-m-fluorobencilamida; u O-metil-N-acetil-D-serina-p-fluorobencilamida.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el compuesto está en la configuración R, y tiene la fórmula



en la que

R es bencilo que está no sustituido o que está sustituido con al menos un grupo halo,

R₂ es hidrógeno,

R₃ es CH₂-Q, en el que Q es alcoxi inferior que contiene 1-3 átomos de carbono, y R₁ es metilo,

o es una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto es sustancialmente enantiopuro.

ES 2 348 040 T3

8. Uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que R es bencilo no sustituido.

9. Uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que halo es fluoro.

5 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que R₃ es CH₂-Q, en el que Q es metoxi.

11. Uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de Fórmula (IIb) es (R)-2-acetamido-N-bencil-3-metoxipropionamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 12. Uso según la reivindicación 11, en el que el compuesto es sustancialmente enantiopuro.

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para el tratamiento con dosis del compuesto de al menos 100 mg/día, preferiblemente de al menos 200 mg/día, más preferiblemente de al menos 300 mg/día y muy preferiblemente de al menos 400 mg/día.

15 14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para el tratamiento con dosis del compuesto de un máximo de 6 g/día, más preferiblemente de un máximo de 1 g/día y muy preferiblemente de un máximo de 600 mg/día.

20 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para el tratamiento con dosis diarias cada vez mayores hasta que se alcanza una dosis diaria predeterminada que se mantiene durante el tratamiento ulterior.

25 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para el tratamiento en tres dosis por día, preferiblemente dos dosis por día, más preferiblemente en una sola dosis por día.

30 17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para una administración que dé como resultado una concentración en plasma de 0,1 a 15 µg/ml (valle) y 5 a 18,5 µg/ml (pico), calculada como un promedio a lo largo de una pluralidad de individuos tratados.

18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para la administración oral o i.v.

35 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica comprende además un agente activo para la prevención, alivio o/y tratamiento de una infección vírica, tal como infección por VIH, incluyendo SIDA, de cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, enfermedad metastásica, o/y de la progresión tumoral mediante infiltración en o presión sobre hueso, vísceras, tejido blando o nervios, en el que dicho agente activo adicional se selecciona de los fármacos antirretrovirales para la terapia contra el SIDA de tipo análogos nucleosídicos (ddC (2',3'-didesoxicitidina), ddI (2',3'-didesoxiinosina) o d4T (2',3'-dideshidro-3'-desoxitimidina)), alcaloides de la vinca, taxol, suramina, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

40 20. Uso según la reivindicación 19, en el que la composición farmacéutica comprende una forma de dosificación individual, o comprende una forma de dosificación separada que comprende una primera composición que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una segunda composición que comprende el agente activo adicional.

45 21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición farmacéutica se prepara para administración en mamíferos.

50 22. Uso según la reivindicación 21, en el que la composición farmacéutica se prepara para administración en seres humanos.

55

60

65

Fig. 1

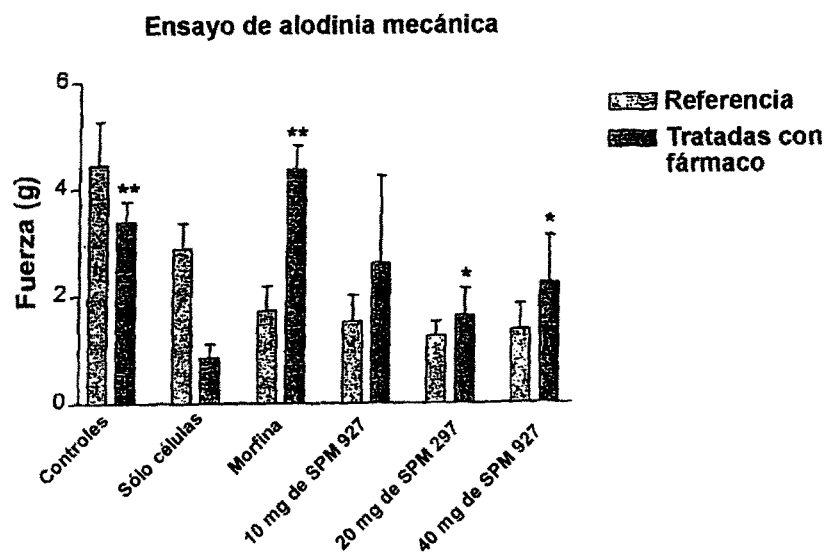


Fig. 2

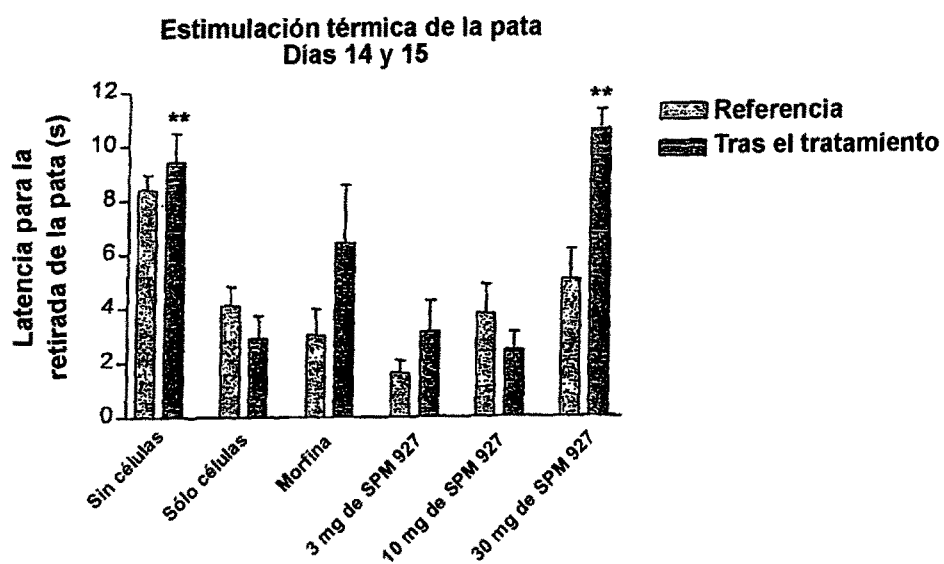


Fig. 3

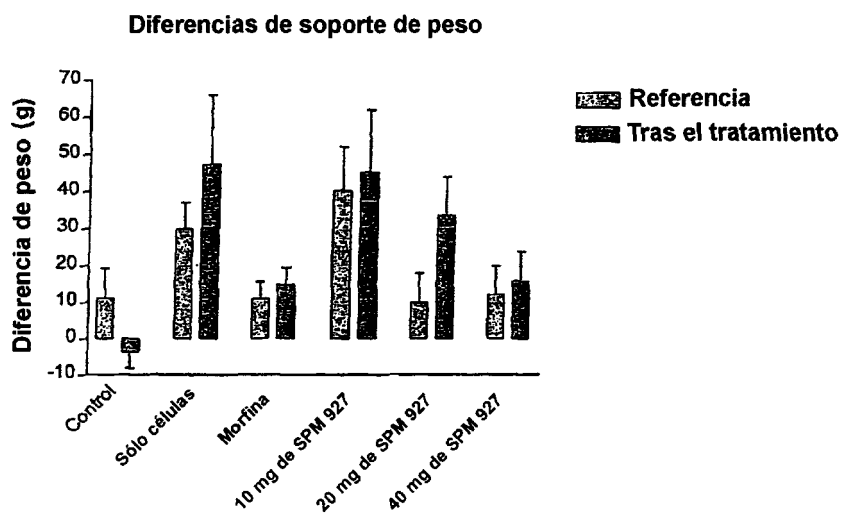
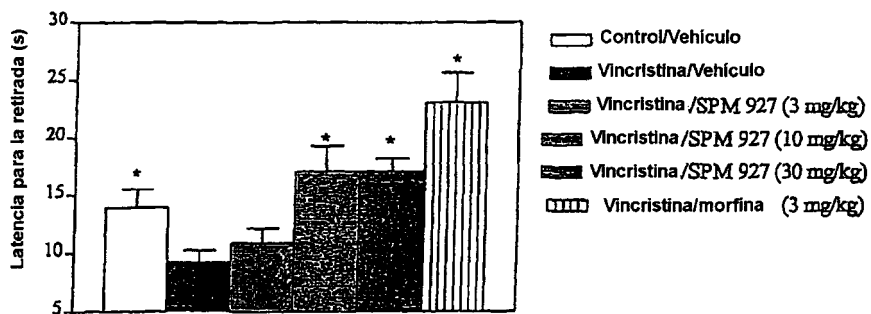
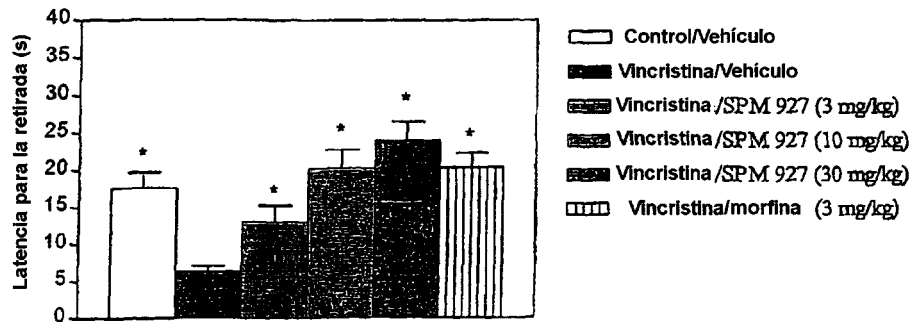


Figura 4: Baño frío (alodinia térmica)



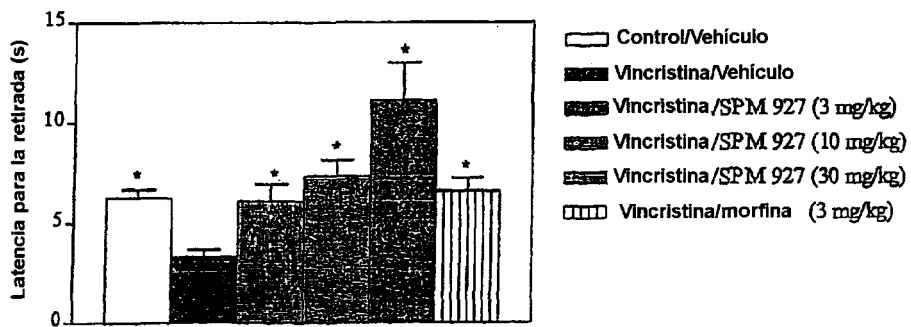
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a vincristina/vehículo

Figura 5: Plancha caliente 38°C (alodinia térmica)



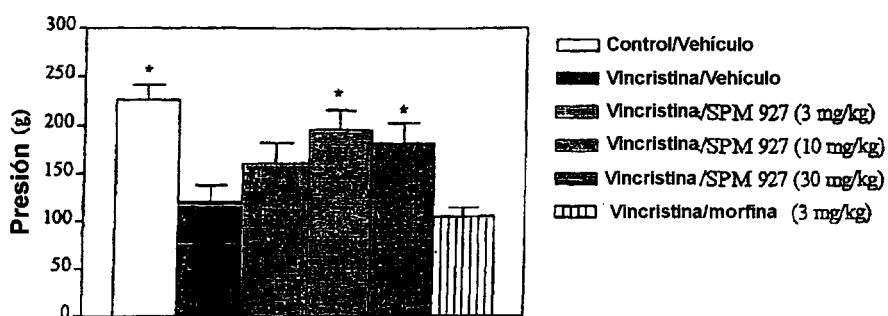
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a vincristina/vehículo

Figura 6: Plancha caliente 52°C (hiperalgesia térmica)



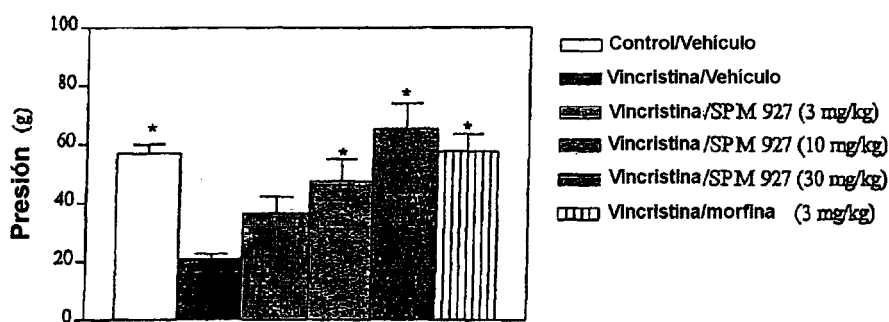
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a vincristina/vehículo

Figura 7: Ensayo de presión de la pata (hiperalgesia mecánica)



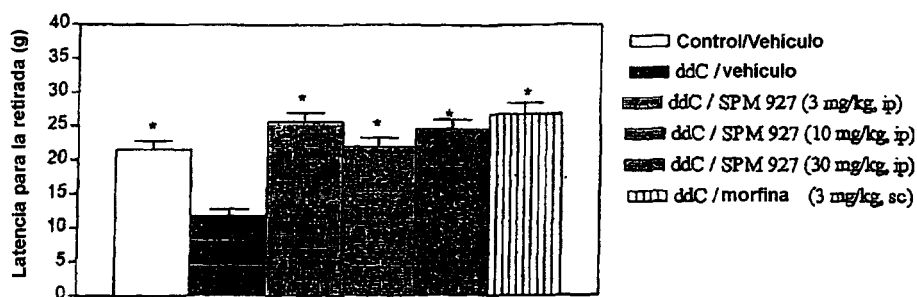
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a vincristina/vehículo

Figura 8: Ensayo de estimulación de la cerda de von Frey (alodinia mecánica)



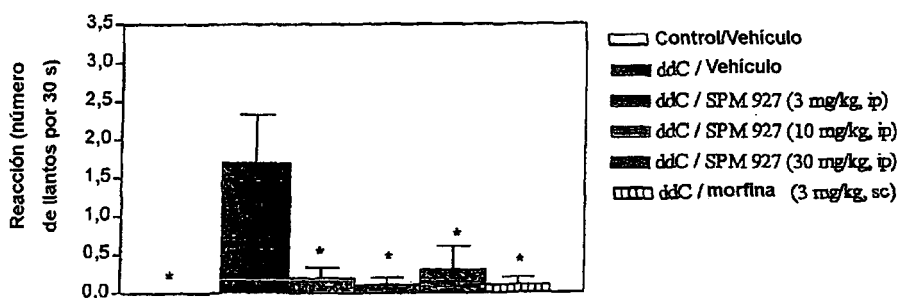
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a vincristina/vehículo

Figura 9: Baño frío (alodinia térmica)



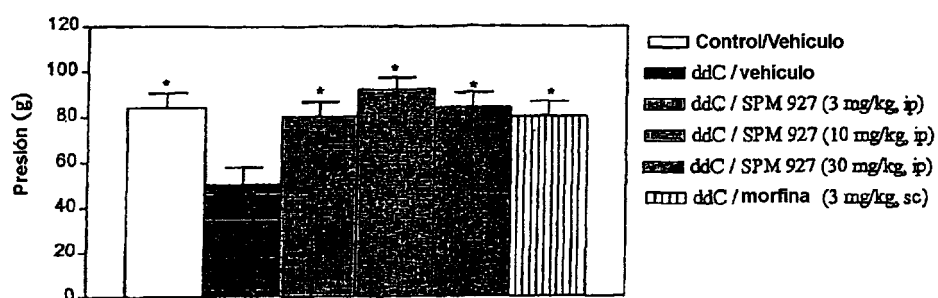
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a ddC/vehículo

Figura 10: Ensayo de cepillado (alodinia mecánica) D20



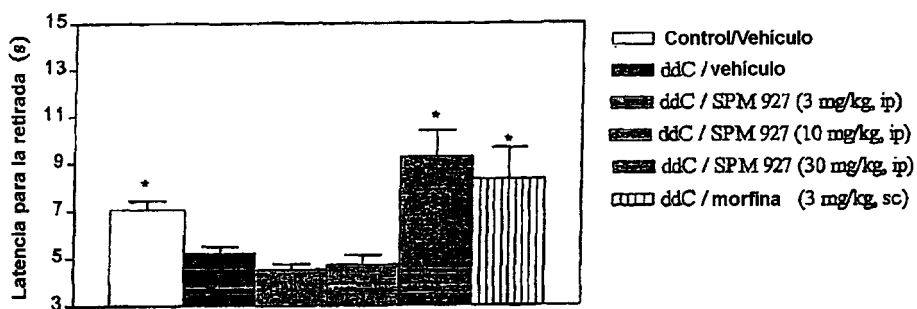
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a ddC/vehículo

Figura 11: Ensayo del filamento de von Frey (alodinia mecánica)



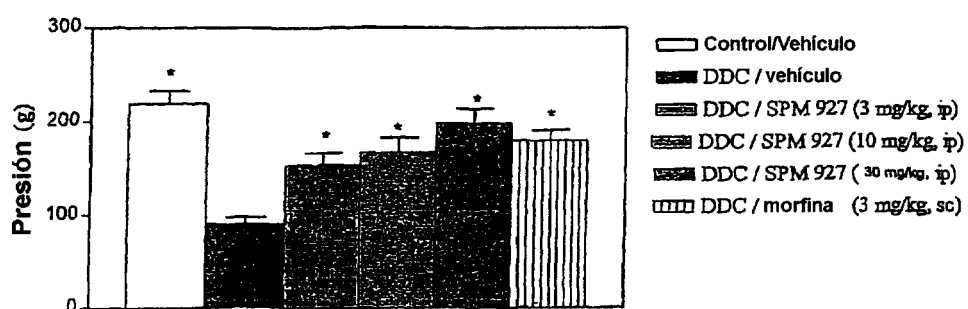
* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a ddC/vehículo

Figura 12: Ensayo de la plancha caliente 52°C (hiperalgesia térmica)



* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a ddC/vehículo

Figura 13: Ensayo de presión de la pata (hiperalgesia mecánica)



* $p < 0,05$, prueba de Dunnett frente a DDC/vehículo