(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
2 de febrero de 2017 (02.02.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/015774 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/195 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2016/050042

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de julio de 2016 (29.07.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2114-2015 29 de julio de 2015 (29.07.2015) CL

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE** [CL/CL]; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago (CL).

(72) Inventores: **CONSTANDIL CORDOVA, Luis**; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago (CL). **BRAVO LOPEZ, David**; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago (CL). **HERNANDEZ KUNSTMANN, Alejandro**; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago (CL). **PELISSIER SERRANO, Teresa**; Av. Libertador Bernardo O'Higgins 3363, Estacion Central, Santiago (CL).

(74) Mandatario: **ESTUDIO FEDERICO VILLASECA Y CIA**; Alonso De Cordova 5151, Piso 8, Las Condes, Santiago, 7560873 (CL).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciónes según la Regla 4.17:

— *sobre divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad (Regla 4.17(v))*

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

WO 2017/015774 A1

(54) **Title**: PAIN TREATMENT METHOD INVOLVING THE USE OF SPINAL PANNEXINS

(54) **Título** : METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR MEDIANTE LA INTERVENCION DE PANEXINAS ESPINALES

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for treating pain in mammals, in which pannexin function-inhibitor compounds, including carbenoxolone, probenecid and 10panx, are administered to an individual suffering from pain. The invention also relates to a method for inhibiting the transmission of chronic pain and acute pain, involving the interaction of neuronal, microglial, astrocyte or oligodendrocyte pannexins with compounds that inhibit the activity of this channel, including carbenoxolone, probenecid and 10panx.

(57) **Resumen**: La presente invención proporciona un método de tratamiento del dolor en mamíferos, que comprende administrar a un individuo que sufre dolor compuestos inhibidores de la función de panexina incluyendo carbenoxolona, probenecid y 10panx. Por otra parte, la presente invención proporciona un método para inhibir la transmisión del dolor 5 agudo y crónico mediante la interacción de panexinas neuronales, microgliales, astrocitarias o de los oligodendrocitas, con compuestos inhibidores de la actividad de este canal incluyendo carbenoxolona, probenecid y 10panx.

METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR MEDIANTE LA INTERVENCION DE PANEXINAS ESPINALES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona, en general, con un método de tratamiento útil para el manejo del dolor en animales y humanos y, en particular, con la intervención de panexinas neuronales, microgliales o astrocitarias de la médula espinal, como estrategia terapéutica para la prevención y/o tratamiento del dolor agudo y crónico, en animales y humanos.

ANTECEDENTES

De acuerdo con International Asociation for the Study of Pain (IASP), el dolor es una experiencia sensorial y emocional de carácter desagradable que se desencadena por un daño tisular actual o potencial o descrito en términos de dicho daño. A consecuencia de esta lesión, ocurrirán una serie de eventos consecutivos que serán capaces de alertar al cerebro de que cierta zona corporal ha sido dañada. En efecto, frente a una lesión, se liberan localmente diversas moléculas provenientes de las células lisadas, así como nuevas sustancias sintetizadas en el sitio de la lesión, y algunas de estas moléculas (globulinas, ácido araquidónico, histamina, serotonina, sustancia P, H+, entre otras) interactúan directamente con proteínas de membrana expresadas en terminaciones nerviosas libres presentes virtualmente en todos los tejidos (Woolf C. J. & Ma, Q. Nociceptors – noxious stimulus detectors. Neuron, 2007; 55:353-364). El potencial de acción generado se conduce a través de fibras nerviosas de mediano y pequeño calibre (fibras Aδ y C, respectivamente) hasta el asta dorsal de la médula espinal. En esta zona hacen sinapsis con neuronas de segundo orden, las cuales proyectan a diversos núcleos del tálamo a través de dos vías diferentes, una directa al tálamo (tracto espinotalámico) y otra indirecta (tracto espinoreticulotalámico) que incluye sinapsis en la formación reticular del tronco encefálico. Desde el tálamo se originan axones hacia la corteza somatosensorial primaria y a la corteza insular,

generándose la sensación consciente del daño (Basbaum A. L. Bustista, D. M., Scherrer, G. & Julius D. Cellular and molecular mechanism of pain. Cell. 2009:139:267-284).

El rol fisiológico de estos mecanismos es alertar al individuo frente a un daño real o potencial de los tejidos y alejarlo del foco que genera la noxa y, una vez que el daño tisular ha sido reparado, el dolor desaparece.

Este tipo de dolor, transitorio y dependiente de la lesión inicial, se conoce como dolor agudo. Por otro lado, cuando el dolor se prolonga en el tiempo aún después de que la lesión que lo originó ya ha sido reparada, o el dolor se genera sin un daño tisular aparente, o cuando un cuadro doloroso se mantiene insidiosamente en el tiempo, este tipo de dolor se denomina dolor crónico y es considerado como patológico (Sandkühler J. Models and mechanisms of hiperalgesia and allodynia, Physiological reviews. 2009; 89:707-758), 2009). El dolor crónico no posee una función protectora y más que un síntoma es, en sí mismo, una patología. Este tipo de dolor, suele ser refractario a los tratamientos utilizados en el dolor agudo y presenta síntomas psicológicos asociados tales como ansiedad, agresividad y depresión (Korff M. V. & Simon G., The relationship between pain and depression. British Journal of Psychiatry. 1996; 168:101-108). En las últimas dos décadas se ha descrito que tanto los astrocitos como microglia participan en la transmisión sináptica nociceptiva espinal, adquiriendo relevancia principalmente en la modulación de la información nociceptiva en el estado de dolor crónico (Cao H y Zhang Y Spinal glial activation contributes to pathological pain states. Neurosci Biobehav Rev. 2008; 32:972-983; O'Callagham y Miller, 2010).

Actualmente el dolor crónico es un problema de salud pública, por afectar por ejemplo alrededor de 100 millones de ciudadanos estadounidenses cada año, con un costo asociado de USD $ 635 mil millones al año (IOM, 2011). Para enfrentarlo, existen diversas estrategias terapéuticas, (farmacología, cirugías, células madres, etc.); sin embargo, estas presentan una efectividad limitada y diversos efectos

colaterales. Además, muchos de los cambios adaptativos que ocurren en los substratos neurales y gliales del sistema nociceptivo en respuesta a episodios de dolor crónico aún son desconocidos. Esto hace imprescindible investigar nuevos componentes de las vías de conducción del dolor que expliquen al dolor crónico desde nuevos puntos de vista. En este sentido, el canal panexina y cualquiera de sus isoformas, surge como un interesante candidato, principalmente porque ha sido descrito como un elemento central dentro de la instauración de plasticidad neuronal patológica en procesos como la epilepsia, isquemia y neuroinflamación.

Panexina es una glicoproteína de membrana expresado en diversos tipos celulares en cordados e invertebrados, perteneciente a la familia de las uniones en hendidura (o gap junctions), que presenta 3 isoformas: panexina 1, panexina 2 y panexina 3 (Bruzzone R., Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003; 100:13644-13649). Inicialmente, estas proteínas fueron clasificadas como uniones en hendidura en vertebrados, por presentar homología de secuencia y similitudes estructurales con las inexinas, las cuales funcionan como uniones en hendidura en invertebrados (Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A uniquitous family of putative gap injuction molecules. Curr Biol, 2000. 10:473-474). Sin embargo, la evidencia disponible sugiere fuertemente que panexina no forma uniones en hendidura in vivo (Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laind DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G. Pannexin channels are not gap junction hemichannels, Channels (Austin), 2011; 5:193-197; Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erytrocites: function without a gap. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006ª; 103:7655-7659; Dahl y Locovei, 2006), sino que su rol funcional en la membrana es el de un canal iónico. Se ha predicho una conformación hexamérica, con cuatro segmentos transmembrana, dos loops extracelulares y uno intracelular; con sus extremos N y C terminales intracelulares

(Boassa D., Ambrosi C, Qiu F., Dahl G., Sosinsky G. Pannexin 1 channels contain a gkycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane,. J. Biol. Chem. 2007; 282:31733-31743; Panchin Y , Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A uniquitous family of putative gap injuction molecules. Curr Biol, 2000. 10:473-474; Yen M R & Saier Jr M H Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. Progress in biophysics and molecular biology. 2007; 94:5-14).

Esta proteína se expresa en una gran cantidad de tejidos. Particularmente interesante resulta su expresión en el sistema nervioso central (SNC), por localizarse en todos sus tipos celulares (microglia, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas) (Huang Y, Grinspan J B Abraham C K & Scherer S S. Pannexin 1 is expressed by neurons and glía but does not form functiuonal gap junctions Glia 2007; 55:46-56; Ray A G Zoidl, s Weickert, P Wahle, R Dermietzel Site-specific and developmental expression of pannexin 1 in the mouse nervous system Eur. J. Neurosci. 2005; 21:3277-3290). Específicamente, se han encontrado transcritos de panexina en el cerebelo, corteza cerebral, retina, interneuronas de la corteza cerebral; en hipocampo, amígdala, sustancia negra, bulbo olfatorio, entre otras muchas estructuras (Bruzzone R, Hormuzdi Sg, Barbe Mt, Herb A, Monyer H. Pannexin a family of gap junction protins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci 2003; 100.13644-13649; Dvoriantchikova D, Ivanov Y, Panchin V J, Shestopalov Expression of pannexin family of protein in the retin. FEBS Lett 2006:580:2178-2182; Ray et al, 2005; Ray A G Zoidl, S Weickert, P Wable, R Derietzel. Site-specific and developmental expression of pannexin in the mouse nervous system Eur J. Neurosci. 2005:21:3277-3290; Ray A G Zoidl, P Wable, R. Dermietzel Pannexin Expression on the cerebellum. Cerebellum 2006; 5:189-192; Vogt A, Hormuzdi S G, Monyer H Pannexin 1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. Fronteirs in physiology. 2014:5-96).

Existe en la literatura abundante evidencia respecto a las funciones fisiológicas y fisiopatológicas de este canal. La función de Panexina1 más ampliamente descrita en la literatura es la liberación de ATP al medio extracelular a favor de su gradiente de concentración, en astrocitos y microglias (Garré J M, Retamal M A, Cassina P, Barbeito L, Bukauskas F, Saez J C, Abudara V FGF-1 nduces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. Proceedings of the National Academy of Sciencies. 2010:107:22659-22664; Iglesias R, Dahl G, Qiu F, Spray D C & Scemes E Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels" The Journal of Neuroscience, 2009a: 29:7092-7097; Samuels S E, Lipitz J B, Dahl G & Muller K J, Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. The Journal of general physiology. 2010:136:425-442; Dalh G y Keane, R W Pannexin: from discovery to bedside in 11+4 years? Brain Res 2012:1487:150-159; Prochnow, N Relevance of gap injunction and large pore channels in traumatic brain injury. Front Physiol 2014;11:5-31). Además, participa en la regulación del inflamosoma (Silverman W R de Rivero Vaccari J P, Locovei S, Qiu F Carlsson SK, Scemes E, Keane R W, Dahl G. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. J Biol Chem, 2009; 284:18143-19151) y ha sido vinculada al complejo de muerte neuronal asociado al receptor P2X7 (Gulbransen B D, Bashashati M, Hirota S A, Giu X, Roberts J A, Mac Donald J A, Sharkey K A Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. Nature Medicine, 2012: 18:600-604; Weilinger NL, Maslieieva V, Bialecki J Sridharan S S, Tang P L, Thompson R J, Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. Acta Pharmacol Sin 2013; 34:39-48). Adicionalmente, diversas investigaciones sugieren que panexina es un componente importante en diversos estados patológicos del cerebro, como la potenciación de la señal en las sinapsis glutamatérgicas hipocampales en epilepsia, en la fisiopatología de la muerte neuronal en isquemia, en

procesos de neuroinflamación y en disfunciones de la excitabilidad neuronal en general (Burnstock G, Krügel U, Abbracchio M P & Illes P Purinergic signalling: from normal behavoir to pathologial brain function. Progress in neurobiology, 2011; 96:229-274; Velasquez S & Eugenin E A Role of Pannexin-1 hemichannels and purigenic receptors in teh pathogenesis of human diseases. Frontiers in physiology 2014; 5-96). Estas funciones fisiológicas y patológicas han sido recientemente recopiladas por Isakson B E, Thompson R J, Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signalling Channels (Austin) 2014; 27:8-22). Estos autores plantean que Panexina1 funciona como un canal amplificador de la señal de otros receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Al acoplarse, el canal funciona como una potenciador de la actividad de dichos receptores, contribuyendo así a diversos y abundantes procesos patológicos en el SNC, muchos de ellos aún no descritos (Isakson B E, Thompson R J, Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signalling Channels (Austin) 2014; 27:8-22).

Existen diversas formas de manejar el dolor en la actualidad, dados por métodos que interfieren algún procesos de la señalización del dolor, desde el sitio de la lesión hasta el cerebro. En este proceso intervienen diversas moléculas, señales intra y extracelulares, células, tejidos y estructuras nerviosas y del sistema inmunológico. A estos elementos, relacionadas con la transmisión de la señal del dolor, se denominarán por simplicidad de aquí en adelante “blancos farmacológicos”. Estos blancos farmacológicos específicos, en sí mismos, no están afectos a ser protegidos mediante patentes. Sin embargo, los métodos y compuestos que manipulan la actividad de estos blancos, sí. En este contexto, la presente invención proporciona un método para tratar el dolor en humanos y animales mediante la manipulación del canal panexina en la médula espinal. Más particularmente, esta invención presenta y reivindica al canal panexina como un blanco farmacológico y procura proteger el concepto de intervenir a este blanco, con diversos agentes de bloqueo.

Tal como ha sido ampliamente descrito en la literatura, existen una infinidad de fármacos que intervienen en el manejo del dolor, apuntando a blancos farmacológicos específicos y están protegidos por patentes. Algunos serán mencionados en esta breve revisión del estado del arte.

Uno de los blancos farmacológicos más intervenidos en el manejo del dolor son las moléculas que se generan periféricamente, en el sitio de la lesión. Un ejemplo de estos son los medicamentos de tipo antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como ibuprofeno. Los AINEs pueden ser muy eficaces en el tratamiento del dolor muscular y óseo agudo, así como algunos tipos de síndromes de dolor crónico. De hecho, son la primera línea de elección cuando se inicia un tratamiento de este tipo de dolor. Uno de ellos es el 2-(4-isobutilfenil) propiónico, cuya denominación común internacional es ibuprofeno, un inhibidor de la enzima cicloxigenasa II. Originalmente patentado en los años 1960, el ibuprofeno tiene muchas ventajas sobre otros analgésicos tales como la aspirina y el paracetamol, pero es muy poco soluble en agua y por esta razón, diversas patentes han abordado este problema. Por ejemplo, la US4309421 describe complejos solubles en agua de ibuprofeno y fosfolípidos adecuados para la administración parenteral, mientras que las US4859704 y US4861797 describen la síntesis de sales de metal alcalino de ibuprofeno para preparar una formulación de ibuprofeno líquido.

Otras patentes abordan este problema mediante la preparación de una sal de ibuprofeno con un aminoácido como ingrediente farmacéutico activo básico, como US5200558, US4279926 y US5463117. Sin embargo, independiente de su vía de administración y forma farmacológica, cuando se ingiere este y otros AINES por un período prolongado de tiempo o en grandes cantidades, pueden presentarse efectos colaterales nocivos en los riñones, en la coagulación de la sangre y el en sistema gastrointestinal, úlceras en la mucosa gástrica y un aumento del riesgo cardiovascular. Además, ha demostrado baja efectividad en el tratamiento del dolor crónico.

Un blanco farmacológico utilizado para manejar el dolor crónico y la actividad nociceptiva espontánea del dolor crónico, son los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina. Anestésicos locales como la lidocaína (protegida en la patente EP1291039), antiepilépticos como la carbamacepina (protegida en CA 1328219 C), antidepresivos tricíclicos, protegidos inicialmente bajo la patente US5086063; los anticomiciales como la fenitoína, bajo la solicitud WO 1989005641 A1.

Otro blanco farmacológico utilizado ampliamente en la actualidad, son los compuestos que modulan la actividad del receptor de GABA (ácido gama-aminobutírico), un elemento fundamental en los mecanismos de inhibición de la señal dolorosa. Entre estos compuestos, se utilizan con frecuencia la gabapentina y pregabalina (los cuales también intercatúan con otro blanco farmacológico, los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N, protegidos por la patente US4024175), el topiramato (Solicitud EP1364649A1) y el levetiracepam (US4943639).

Una molécula importante en la circuitería del dolor es la serotonina. En cuadros de dolor, la serotonina permite modular la hiperactividad de las neuronas. En este sentido, el blanco farmacológico es el transportador de serotonina y los compuestos que lo inhiben y se utilizan en cuadros depresivos y en dolor neuropático. De ente ellos, los antidepresivos tricíclicos son los más eficaces, como la venlafaxina, la bicidafine y la duloxetina (US5362886).

Los antagonistas del receptor de membrana NMDA (ketamina, nemantina) no han mostrado una mayor eficacia analgésica, seguramente porque sus efectos secundarios han representado un factor limitante. Existen algunas patentes relacionadas con su intervención en el contexto del dolor, como US5095009, WO1986003489A1, US5051442, entre otros).

Un blanco farmacológico novedoso son los canales calcio tipo N y sus bloqueadores, los cuales producen analgesia en modelos de dolor neuropático. Uno

de los fármacos más utilizados, aprobados por la FDA, es el ziconotide intradural para uso compasivo en pacientes refractarios a otros tratamientos (US6054429).

De esta forma, existen diversos blancos farmacológicos intervenidos en la literatura, como los bloqueadores de α2 adrenérgicos (clonidina), los inhibidores de la acción de la sustancia P (lanepitante y capsaicina) y otros relacionados con la colecistokinina, la nociceptina y la bradikinina. También tienen cabida los agonistas cannabinoides, los corticoides y los antagonistas de factores neurotróficos como el factor de crecimiento tumoral (NGF). Sin embargo, en su conjunto, todos estos fármacos fallan en completar un alivio duradero. La eficacia de los fármacos previamente mencionados es cercana al 70% y el remanente carece de alivio. Por lo tanto, descubrir nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento del dolor es esencial.

La participación de panexinas en el dolor crónico no ha sido patentada ni como blanco ni como estrategia farmacológica. De hecho, no existen patentes concedidas relacionadas con la intervención, bloqueo, manipulación, modulación o modificación de la actividad de panexina en ningún contexto fisiológico, patológico o aplicación farmacológica. Sin embargo, existen diversas solicitudes de patentes que revindican la intervención de panexina como estrategia farmacológica para diversas condiciones que varían desde el HIV (EP2603587A1), isquemia cerebral (WO2011054820A1), enfermedad inflamatoria intestinal (WO 2013111014 A2), hasta el cáncer (WO2012013609A1), entre otras. Pero más relevante aún, es el hecho que no existen patentes ni solicitudes que reivindiquen la intervención de panexina para estrategias terapéuticas relacionadas con el control y manejo del dolor, ni compuestos específicos.

Cabe destacar a la solicitud de patente EP1516625A1, también encontrada con los números de solicitud US20080132446, WO2005026170A2 y WO2005026170A3, perteneciente a la Universidad de Heidelberg y al Instituto Pasteur, la cual se relaciona con el uso de panexinas neuronales para la fabricación de medicamentos para la

prevención y/o tratamiento de trastornos neurológicos en general y, en particular, con los trastornos neurológicos que implican a las panexinas de las células piramidales del hipocampo en mamíferos.

Adicionalmente, esta solicitud procura proteger el uso de panexinas *in vitro* para el diagnóstico de estos trastornos neurológicos. Finalmente, esta solicitud procura proteger la intervención de panexinas y su capacidad de formar canales utilizando diversos compuestos capaces de intervenir. Por otro lado, la presente invención, a diferencia de la solicitud citada, reivindica el uso de panexinas neuronales, pero no del hipocampo sino de la médula espinal; además, reivindica el uso de panexinas en otros linajes celulares de la médula. Otra diferencia portentosa es el hecho que la solicitud citada reivindica el uso de panexinas neuronales en todos los trastornos neurológicos donde se encuentre esta proteína; sin embargo, la presente invención sólo se enfoca en el dolor agudo y crónico particularmente. Finalmente, la solicitud aquí citada también se dirige a métodos para seleccionar, *in vitro* o *in vivo* utilizando un modelo animal, compuestos útiles para la prevención y/o tratamiento, en los mamíferos, trastornos neurológicos mediante la modificación de la capacidad formadora de canales de panexinas pero, a diferencia de la solicitud analizada, esta invención reivindica el uso de panexinas de la médula espinal en el contexto del dolor agudo y crónico en todos los linajes celulares involucrados, esto es, neuronas, microglias, astrocitos y oligodendrocitos. Esta invención, por lo tanto, constituye una novedad potente y la primera aproximación a una nueva estrategia de alivio del dolor.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método de tratamiento del dolor en mamíferos, que comprende administrar a dicho individuo compuestos que actúen como un inhibidor de la función de panexina, incluyendo probenecid, carbenoxolona y 10panx. Por otra parte la presente invención proporciona un método para inhibir la transmisión del dolor agudo y crónico mediante la interacción de panexinas

neuronales, microgliales, astrocitarias o de los oligodendrocitas, con un compuesto que actúa como un inhibidor de la actividad de este canal, o como un modificador de su señalización, un inhibidor de su expresión o un bloqueador del tráfico de panexina a la membrana plasmática, incluyendo probenecid, carbenoxolona, probenecid y 10 panx. Particularmente, el inhibidor de la actividad de panexina puede ser una molécula farmacéutica orgánica o sintética, como carbenoxolona, probenecid, ácido flufenámico, mefloquina, entre otros, los cuales han sido descritos y agrupados en una reciente revisión bibliográfica (Dahl et al., 2013).

También, se entiende como compuesto inhibidor, aquel que interfiera en el proceso de expresión de panexina, como un siRNA o un miRNA. Además, el compuesto inhibidor de panexina puede ser un inhibidor de su función, mediante la unión de anticuerpos anti-panexina o sus fragmentos con la proteína, generando un impedimento alostérico. El inhibidor de la función de panexina también puede ser un compuesto que interactúe o interfiera con el acomplamiento entre panexinas vecinas o en su poro, tal como péptidos o secuencias de aminoácidos miméticos de la estructura de panexina, como el péptido 10panx, o aquellos que interfieran la función de otros receptores que interactúan con panexina, como los receptores purinérgicos o el receptor NMDA.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figuras 1A – 1C muestran el efecto de la administración intratecal (i.t) de 10panx o solución salina en actividad de Wind Up espinal en ratas neuropáticas y adulteradas control. La Figura 1A y 1B ilustra el procesamiento de datos para determinar los puntajes de Wind Up de médula espinal en animales inyectados i.t. con solución salina o 300 μmol/L 10panx. Las respuestas fueron provocadas en animales adulterados por estimulación eléctrica repetitiva (1Hz) del segundo y tercer dedo de la pata anterior (círculos) y T minutos después (cuadrados). Las respuestas fueron integradas y graficadas contra el número del estímulo y las curvas fueron

normalizadas de modo que antes de inyectar los animales, la ganancia de reflejo en el séptimo estimulo representó un incremento de 100%. Las pendientes de las líneas de regresión de cuadrados mínimos (líneas punteadas) representan los puntajes de Wind Up. Para los paneles izquierdo y derecho, T = 15 minutos; esto es, los datos fueron tomados antes y 15 minutos después de la inyección i.t. de la solución salina o 10 panx. Para el panel izquierdo, los promedios de las pendientes ± error estándar del promedio (SEM) de las curvas de regresión son 15,09 ± 0,043 (círculos) y 15,59 ± 0,44 (cuadrados), la diferencia entre las pendientes no es estadísticamente significativa (n=8, p<0,05, prueba t de Student de doble cola emparejada). Los datos de las ratas neuropáticas fueron procesadas de una forma similar a aquella de los animales adulterados. La Figura 1C muestra el curso en el tiempo de la actividad de Wind Up (cambio de porcentaje) después de la administración i.t. de la solución salina (círculos) o 300 μmol/L, 10panx (cuadrados) en ratas neuropáticas (símbolo cerrado) y adulteradas (símbolos abiertos). Los puntajes de Wind Up en el tiempo T son expresados como cambio porcentual de la pendiente en el tiempo T comparado a la pendiente antes de la inyección de 10panx al tiempo 0. Los valores son promedio ± SEM, n=8 ratas por grupo. El análisis de varianza de mediciones repetidas de dos vías (ANOVA) reveló un efecto "tiempo" (análisis intragrupo: $F_{9,45}$ = 4,16, ANOVA p = 0,0006) y un efecto "grupal" (análisis intergrupo: $F_{1,45}$=603,69, ANOVA p<0,0001: *p<0,05 con respecto a los valores de solución salina correspondiente, Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni).

Figuras 2A y 2B muestra el efecto de la administración intratecal de carbenoxolona (Cbx) o probenecid (Prb) en la actividad de Wind Up espinal en ratas de control adulteradas y neuropáticas. Los datos fueron procesados de una forma similar a aquellos de los animales inyectados con 10panx. Los puntajes de Wind Up en el tiempo T son expresados como cambio porcentual de la pendiente al tiempo T comparado a la pendiente antes de la inyección de la droga (o solución salina) en el

tiempo 0. Los valores son promedio ± SEM, n=8 ratas por grupo. La Figura 2A muestra el curso de tiempo de la actividad de Wind Up (cambio porcentual) después de la administración intratecal de la solución salina (cuadrados) o 100 μmol/L Cbx (triángulos hacia arriba) en ratas adulteradas (símbolos abiertos) y neuropáticos (símbolos cerrados). El análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para mediciones repetidas reveló un efecto "tiempo" (análisis intragrupo: $F_{9,36}$=4,17, ANOVA p < 0,001) y un efecto "grupo" (análisis intergrupo: $F_{1,36}$ = 60,09, ANOVA p < 0,0015, *p < 0,05 con respecto a los valores de la solución salina correspondiente, prueba de comparación múltiple de Bonferroni). La Figura 2B muestra el curso del tiempo de la actividad de Wind Up (cambio porcentual) después de la administración intratecal de la solución salina (cuadrados) o 150 mmol/L Prb (triángulos hacia abajo), en ratas adulteradas (símbolo abierto) y neuropáticas (símbolos cerrados). La ANOVA dos vías para mediciones repetidas revelaron un efecto "tiempo" (análisis intragrupo: $F_{9,36}$ = 2,25, ANOVA p = 0,0413) y un efecto "grupo" (análisis intergrupo: $F_{1,36}$ = 41,06, ANOVA p = 0,003; *p < 0,05 con respecto a valores de la solución salina correspondiente, prueba de comparaciones múltiple Bonferroni).

Figuras 3A-3E muestra el efecto de la administración intratecal de 10panx en el umbral de retiro de ratas de control neuropáticas y adulteradas. Las Figuras 3A-3C muestra el curso de tiempo de cambios en el umbral nociceptivo mecánico (g/cm^2) de ratas neuropáticas 10 días después de la cirugía. La cirugía fue realizadas en tiempo 0 (flecha hacia abajo). El análisis de varianza de mediciones repetidas de dos vías de (ANOVA) reveló un efecto "tiempo" (análisis entre grupos: $F_{4,100}$ = 85,67, ANOVA p < 0,0001; *p < 0,05 con respecto al umbral de retiro antes de la cirugía, pruebas de comparaciones múltiple Bonferroni) sino un efecto "grupo" (análisis intragrupos. $F_{4,100}$ = 0,13, ANOVA p = 0,9688). El curso de tiempo de los cambios en el umbral nociceptivo mecánico de ratas neuropáticas después de la inyección intratecal (flecha hacia arriba)

de la solución salina o 10, 30, 100 y 300 μmol/L, 10panx en el día 10 después de la cirugía. La ANOVA dos vías para mediciones repetidas reveló un efecto "tiempo" (análisis intergrupo = $F_{8,200}$ n = 32,49, ANOVA p = 0,0001) y un efecto "grupo" (análisis intergrupo: $F_{4,200}$ = 20,42, ANOVA p=0,0001; *p < 0,05 con respecto a los valores de soluciones salinas correspondientes, prueba de comparaciones múltiple Bonferroni). Área bajo la curva del gráfico del panel del medio: *p < 0,05, **p > 0,01 cuando se compara a la solución salina (ANOVA 1 vía seguido de prueba de comparación múltiple Dunnet). Las Figuras 3B-3E muestra el curso del tiempo de los cambios en el umbral nociceptivo mecánico (g/cm^2) de las ratas de control adulteradas luego de 10 días de la cirugía. La cirugía fue realizada en el tiempo 0 (flecha hacia abajo). La ANOVA de mediciones repetidas de dos vías no reveló ya sea un efecto "tiempo" (análisis en el grupo. $F_{5,50}$ 0 1,22 ANOVA p = 0,3152) o un efecto "grupo" (análisis entre grupos $F_{4,50}$ = 1,42, ANOVA p = 0,2959). Los cursos de tiempo de cambio en el umbral nociceptivo mecánico de las ratas control adulteradas después de la inyección intratecal (flecha hacia arriba) de la solución salina o 10, 30, 100 y 300 μmol/L, 10 panx en el día 10 después de la cirugía. La ANOVA de mediciones repetidas de dos vías no reveló ya sea un efecto "tiempo" (análisis intragrupo: $F_{8,80}$ = 0,87, ANOVA p = 0,5449) o un efecto "grupo" (análisis intergrupo: $F_{4,80}$ =0,12, ANOVA p=0,9702).

FIGURAS 4A – 4E muestra el efecto de la administración de carbenoxolona (Cbx) o probenecid (Prb) en el umbral de retiro de las ratas neuropáticas o adulteradas de control. Las Figuras 4A-4C muestra el curso del tiempo de los cambios en el umbral nociceptivo mecánico (g/cm^2) de las ratas neuropáticas 10 días después de la cirugía. La cirugía fue realizada en el tiempo 0 (flechas hacia abajo). El análisis de varianza de mediciones repetidas en dos vías (ANOVA) reveló un efecto "tiempo" (análisis en el grupo: $F_{4,48}$ = 91,92, ANOVA p < 0,0001; *p < 0,05 con respecto al umbral de retiro antes de la cirugía. Pruebas de comparaciones múltiple Bonferroni) pero no un efecto

"grupo" (análisis intergrupo: $F_{2,48}$ = 1,27, ANOVA p = 0,3628). El curso de tiempo del cambio en el umbral nociceptivo mecánico de las ratas neuropáticas después de la inyección intratecal (flecha hacia abajo) de la solución salina, 100 mmol/L Cbx o 150 mmol/L Prb 10 días después de la cirugía. La ANOVA de mediciones repetidas de dos vías reveló un efecto "tiempo" (análisis entre grupos: $F_{2,72}$ = 16,83, ANOVA p < 0,0009; *p > 0,05 con respecto a los valores de la solución salina correspondiente. Prueba de comparación múltiple Bonferroni). El área bajo la curva del gráfico del panel medio: *p > 0,05 comparado con la solución salina (ANOVA 1 vía seguido por prueba de comparación múltiple Bonferroni). Figuras 4D y 4E. Cursos de tiempo de cambios en el umbral nociceptivo mecánico (g/cm^2) de ratas de control adulteradas 10 días después de la cirugía. La cirugía fue realizada en el tiempo 0 (flecha hacia abajo). La ANOVA de mediciones repetidas de dos vías no reveló ya sea un efecto "tiempo" (análisis en el grupo: $F_{5,30}$ = 0,37, ANOVA p = 0,8625) o un efecto "grupo" (análisis entre grupos: $F_{2,30}$ = 3,03, ANOVA p = 0,1234) (panel derecho). Los cursos de tiempo de los cambios en el umbral nociceptivo mecánico de las ratas control adulteradas después de la inyección intratecal (flecha hacia abajo) de 100 mmol/L Cbx 0 150 mmol/L Prb 10 días después de la cirugía. LA ANOVA de mediciones repetidas de dos vías no reveló ya sea un efecto "tiempo" (análisis intragrupo: $F_{8,64}$ = 2,72, ANOVA p=0,119) o un efecto "grupo" (análisis intergrupo: $F_{2,64}$ = 0,89, ANOVA p=0,4483)

Figura 5A-5C muestra una cuantificación de la proteína panexina mediante un westernblot, que evidencia los niveles de expresión de panexina en la médula espinal.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método de tratamiento del dolor en mamíferos, que comprende administrar a un individuo que sufre dolor compuestos inhibidores de la función de panexina incluyendo carbenoxolona, probenecid y 10panx. Por otra parte, la presente invención proporciona un método para inhibir la transmisión del dolor agudo y crónico mediante la interacción de panexinas neuronales,

microgliales, astrocitarias o de los oligodendrocitas, con compuestos inhibidores de la actividad de este canal incluyendo carbenoxolona, probenecid y 10panx.

En el estudio del rol de los canales de panx1 en dolor crónico, se usó un modelo de injuria de nervio escatimado de neuropatía de rata que involucra la lesión de 1 (el nervio sural) de las 3 ramas terminales del nervio ciático, dejando las otras dos ramas (nervios tibial y peroneal común) intactos. Tal modelo resultó en hiperalgesia mecánica como lo evidenció la reducción significativa del umbral de retiro de la pata a presión que estímulo perdurable por al menos 10 días. Junto con el umbral reducido de estímulo de presión observado en ratas neuropáticas, una corriente de estímulo disminuida se requirió para la activación umbral del reflejo C de regiones cutáneas (segundo y tercer dedo de la pata) el vencidario del área desnervada, que soporta resultados más tempranos mostraron que el umbral para activación eléctrica de fibras C fue significativamente reducida en ratas sometidas a injuria de nervio escatimado.

La presente invención muestra por primera vez que los canales panx1 juegan un rol significativo en dolor neuropático porque (i9 el bloqueo de los canales de panx1 con 10panx, CBx o Prb intratecal disminuyo significativamente la actividad Wind Up tanto en ratas neuropáticas como adulteradas; (ii) 10 panx, Cbx o Prb intratecal disminuyeron la hiperalgesia mecánica en ratas neuropáticas sin afectar la nocicepción mecánica e animales adulterados; y (iii) la proteína panx1 fue expresada en el la antena dorsal de la médula espinal lumbar de ratas neuropáticas y adulteradas. El efecto antihiperalgésico de 10panx, Cbx o Prb en el umbral de presión de la pata de ratas neuropáticas fue corta y reversible, lo que significa que la respuesta sensible se mantuvo, al menos en parte, por un mecanismo espinal que depende de panx-1 activo que fue transcientemente contraactuado por la inyección i.t. de bloqueador panx1.

El hecho que la inyección intratecal de cualquiera de los 3 bloqueadores de panx1 usados inhibieron el fenómeno Wind Up en ratas normales demuestra que los

canales panx1 juegan un rol en los mecanismos de amplificación del dolor espinal de las respuestas mediadas por fibras C.

Ejemplo

Se indujo neuropatía en ratas macho Sprague-Dawley de 225-250 gramos al usar una modificación del modelo de rata con injuria de nervio controlado de Decosterd and Woolf (Descosterd I, Woolf CJ, Spared nerve injury. An animal model of persistent peripheral neuropathic pain. PAIN 2006; 122:17-21), lo que resultó en cambios tempranos, prolongados y robustos en la sensibilidad mecánica y respuesta térmica de muchas características que se asemejan de cerca el dolor neuropático clínico. 2 de las 3 ramas distales terminales del nervio ciático fueron axotomizados (nervios tibial y perineal común), el control 1 (nervio sural) mientras en el modelo de este caso, sólo el nervio sural fue transectado, controlando los nervios tibial y perineal común. Este procedimiento permitió generar un modelo de dolor neuropático en que los reflejos nociceptivos a ser registrados son preservados (por ejemplo, actividad de reflejo C) ya que el nervio sural casi no contiene fibras motoras (Peyronnard J M, Charron L. Motor and sensory neurons of the rat sural nerve: a horseradish peroxidase study. Muscle Nerve 1982;5:654-60).

Los animales fueron anestesiados con 400 mg/kg i.p. de 7% solución de hidrato cloral (p/v), Después afeitada la pata trasera derecha al nivel del nervio ciático, una incisión en la piel de aproximadamente 10 mm de largo fue hecha. El tejido subcutáneo fue disectado el músculo bíceps femoris fue liberado desde las cabezas pélvica y vertebral para exponer el nervio ciático. La ruta nerviosa fue entonces seguida hasta su división en 3 ramas: los nervios sural, perineal común y tibial. El nervio sural fue cortado 2 mm desde su emergencia y los tejidos de superposición fueron suturados en capas. Durante dos días después de la cirugía, los animales fueron diariamente suministrados con 3 mg/kg del analgésico ketoprofeno y 5 mg/kg s.c. del agente antimicrobiano enrofloxacin. La lesión neural descrita antes resultó en

hiperalgesia mecánica de la pata que persistió por al menos 28 días. Las ratas control (adulteradas) recibieron cirugía similar sin ruptura del nervio sural.

Para estudiar el efecto de desbloqueo del canal panx1 en el mecanismo de hiperalgesia inducida por neuropatía, los canales panx1 de la médula espinal lumbar fueron desafiados con el péptido 10panx (Trp-Arg-Cln-Ala-Ala-Phe-Val, Asp-Ser-Tyr), un péptido mimético del primer dominio de bucle extracelular de panx1 (Pelegrin O, Supernant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor, EMBO J 2006;25:5071-82.) que parece actuar a través de una interferencia estérica con la función del canal, obtenido de Tocris (St Louis, MO). Las ratas neuropáticas y adulteradas recibieron una inyección única de 1 µl i.t. de 10, 30, 100 o 300 µmol/L de 10panx, mientras los grupos de control respectivos recibieron 10 µl de solución salina i.t.. Además, 2 drogas más descritas en la literatura como bloqueadores farmacológicos de panx1 fueron también usadas: carbenoxolona (Cbx), una droga sintética que bloquea los canales panx1 expresados en *Xenopus oocytes* (Bruzzone R., Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. J. Neurochem 2005;92:1033-43), que fueron inyectadas con una solución de 100 µmol/L; y probenecid (Prb), un agente que exhibió actividad inhibitoria contra panx1 (Silverman WR, Locovel S, Dahl G, Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels, Am J Physiol Cell Physiol 2008; 295-C761-7), que fue inyectada i.t. con una solución 150 µmol/L de solución. Ambos Cbx y Prb fueron obtenidos de Sigma (St Louis, MO).

Para el estudio electrofisiológico del efecto de bloqueo de canal panx1 en la actividad refleja C Wind Up, una inyección única de 10 µl i.t. de 300 umol/L, 10 panx, 100 µmol/L Cbx y 150 µmol/L Prb o solución salina fueron administradas a animales neuropáticos adulterados control. Dosis únicas de 10 panx, Cbx y Prb fueron

adaptadas de los estudios de_Thompson R J, Jackson M F, Olah M E, Rungta R I, Hines D J, Beazely M A, MacDonald J F, MacVicar B A, Activation of pannexin-1 hemmichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. Science 2008; 322-1555-9, Bruzzone R., Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in Xenopus oocytes. J. Neurochem 2005;92:1033-43 y Ma W, Hui H, Pelegrin P. Supernant A. Pharmacological characterization of pannexin currents expressed in mammal cells. J. Pharmacol. Exp. Ther 2009; 328:409-18, respectivamente. Las inyecciones en el espacio subaracnoideo fueron hechas aplicando una anestesia breve con isoflurano (2 minutos), por inyección percutánea entre la vértebra lumbar L5 y L6, y evidenciada por el movimiento suave de la cola de la rata que resulta de estimulación mecánica cuando la aguja penetra las meninges de la médula espinal (Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A, A method ro perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 1994; 32:197-200). Al término de los experimentos de comportamiento y electrofisiológicos, las ratas fueron eutanizadas con una sobredosis de hidrato cloral (1g/kg i.p.).

El reflejo C fue provocado en la extremidad posterior derecha de las ratas anestesiadas con 1,5% a 1,8% isoflurano en oxígeno usando una máscara facial de roedor modificada en el diafragma de látex como se describe previamente en Smith J C, Bolon B, Isoflurano leakage from non-rebreathing rodent anaesthesia circuits: comparison of emissions from conventional and modified ports. Lab Anim 2006; 40:200-9. En resumen, los pulsos eléctricos rectangulares de resistencia supramaxima y la duración de 2 milisegundos fue aplicada cada 10 segundos al campo receptivo del nervio peroneal y tibial común por medio de 2 agujas de acero inoxidable insertadas en la piel del segundo y tercer dedo de la pata (Grass S11 estimulador equipado con una unidad aislada de estímulo SIU 5 y una unidad de corriente constante Grass CCU 1A; Astro-Med, West Warwick, RJ). La respuesta reflejo evocada de fibra C fue

registrada del musculo femoris bíceps ipsilateral al usar otro para de agujas de acero inoxidable. Después de la amplificación (Grass P511 preamplificador; Astro-Med, West Warwick, RI), las respuestas electromiograficas fueron digitalizadas en 100 KHz e integradas en una ventana de tiempo de 150 a 450 ms después del estímulo (Power-lab ML 820, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). Una vez obtenidas, respuestas de reflejo C estables, la resistencia de estímulo fue disminuida y la corriente requerida para la activación umbral del reflejo C fue determinada. Las respuestas reflejo C integradas, evocada por estímulo único con el doble de intensidad de la corriente de estímulo umbral, fueron entonces registradas. Después de ello, trenes de 15 estímulos cada uno, en 1 Hz y dos veces la intensidad umbral fueron liberados a los dedos de las patas para desarrollar actividad de Wind Up En el paradigma de reflejo C, el Wind Up consiste en un incremento notorio que depende de la frecuencia del estímulo de la respuesta electromiográfica integrada. Todas las respuestas fueron almacenadas en un disco duro para el análisis posterior. Las líneas de regresión de cuadrados mínimos fue fijada entre los puntos experimentales que muestran solo tendencia del incremento(antes de la saturación del Wind Up en el séptimo estímulo), descartando los puntos remanentes (Origin 6.0 software; Microcal Software, Northampton, MA) como se describe en Constandil L, Hernández A, Pelissier T, Arriagada O, Espinoza K, Burgos H, Laurido C. Effect of interleukin-1beta on spinal Cord nociceptive transmission of normal and monoarthritic rats after disruption of glial función. Arthritis Res Ther 2009; 11:R105. Las pendientes de las líneas de regresión representan puntajes de Wind Up (ver Fig. 1A).

La corriente de estimulación requerida para la activación umbral del reflejo C fue menor en ratas neuropáticas que en animales adulterados de control (3,8 ± 2,1 mA versus 8,3 ± 1,5 mA, respectivamente); en consecuencia, las series de Wind Up en ratas neuropáticas fue corrida con intensidades eléctricas menores que las series en animales adulterados de control, conforme al protocolo usado (2 veces la corriente de

estímulo umbral). Para ecualizar la respuesta en ambos grupos, las respuestas reflejo C integradas fueron expresadas en términos de la variación porcentual comparada con su condición previa (antes de la inyección i.t. del fármaco o solución salina) y normalizada de modo que las respuestas provocadas por el séptimo estimulo en animales inyectados con solución salina representa un incremento de 100% con respecto a las respuestas basales obtenidas antes de aplicar el protocolo de Wind Up (Fig. 1A). Los experimentos comenzaron con la medición del Wind Up basal previo a la administración i.t. 10panx, Cbx, Prb o solución salina. Luego de ello, 10 μmol/L de 300 μmol/L 10panx, 100 μmol/L Cbx, 150 μmol/L Prb o solución salina fueron inyectados i.t. por inyección percutánea directa en ambas ratas normales y neuropáticas como se describe previamente en Smith J C, Bolon B, Isoflurano leakage from non-rebreathing rodent anaesthesia circuits: comparison of emissions from conventional and modified ports. Lab Anim 2006; 40:200-9, y la determinación del Wind Up fue reanudada por 20 minutos cada 30 minutos. Los puntajes de Wind Up obtenidos fueron graficados como curvas de curso de tiempo.

La hiperalgesia mecánica en la extremidad posterior después de evaluada la neuropatía por medición del umbral de presión en la pata con una analgesimetro (Ugo Basile, Varese, Italia) como se describe originalmente en Randall I, Selitto J, A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther 1957; 111:409-19. En resumen, la prueba de comportamiento consistió en agregar una presión incremental gradualmente aplicada a la pata trasera derecha hasta que ocurrió, el retiro del reflejo de la pata. Para prevenir la injuria de la pata trasera, un valor de corte de 570 g fue usado (Pelissier T, Infante C, Constandil L, Esinosa J, Lapeyra CD, Hernández A. Antinociceptive effect and interaction of uncompetitive and competitive NMDA receptor antagonists upon capsaicin and paw pressure testing in normal and monoarthritic rats. PAIN* 2008; 134:113-27). La prueba de presión en la

pata trasera fue realizada en ratas neuropáticas y adulteradas antes (día 0), y los días 3, 7 y 10 después de la cirugía neuropática o de adulteración, respectivamente. Después de ello, en el día 10 después de la inducción de la neuropatía, las ratas recibieron una inyección única 10 µL i.t. de 10panx, Cbx, Prb o solución salina. El 10panx fue administrado como una solución de 10, 30, 100 o 300 µmol/L. Cbx y Prb fueron inyectados como soluciones 100 µmol/L y 150 µmol/L, respectivamente, y 10 mL de solución salina i.t, sirvieron como control y a 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos después de la inyección i.t. La expresión de la proteína Panx1 fue medida siguiendo el protocolo de Mylvaganam S, Zhang L, Wu C, Zhang Z J, Samoilova M, Eubanks J, Carlen PL, Poulter MO, Hippocampal seizures alter the expression of the pannexin and connexin transcriptome. J. Neurochem 2010; 112:92-102. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de hidrato cloral (1g/kg, intraperintoneal, i.p.). Para la extracción de la proteína, los cuadrantes posteriores de la médula espinal, los cuadrantes posteriores de la médula espinal lumbar (nivel de vertebras L1-L3) ipsilateral para la lesión, tomando 5 animales normales y 5 animales neuropáticos, fueron homogenizados en tampón de aglutinación de plaqueta inducida por ristocetin (RIPA) que contiene 50 mmol/L Tris (pH 8,0), 150 mmol NaCl, 1% sulfato de dodecil sódico (SDS), 1% Igepal CA_630, 0,5% deoxicolato de sodio, 1 mmol/L NaF, 10 IM/ml fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mmol/L Na_3VO_4 y coctel de inhibidor de proteasa. (Hoffmann-La Roche, Mississauga, ON, Canadá) en hielo. Los homogenatos fueron incubados en hielo 30 minutos y dos veces sonicados por 20 segundos en hielo. Las concentraciones de proteína fueron determinadas con el reactivo de ensayo de proteína de ácido nicinconinico (Pierce/thermo Fisher Scientific, Nepean, ON,Canadá). Las proteínas fueron separadas por electroforesis de gel sulfato-poliacrilamida dedecil sodio (SDS-PAGE). Una cantidad de 30 ⌊g de cada homogenato fue cargada en cada carril. Para el western blotting, el gel fue transferido

a la membrana de difluoruro de polivinildeno (PVDF, Biorad) y bloqueado en 5% (p/v) leche seca no grasa y 0,05% Tween 20, toda la noche. Las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo (Cerdalane, Burlington, ON, Canadá) conjugado con peroxidasa de rábano picante. La inmunoreacción fue detectada con un kit de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canadá). Después que las películas de rayos X fueron escaneadas, las intensidades de la señal en las bandas fueron analizadas con ImageJ Software (NIH, Bethdesda, MD).

Todos los datos fueron expresados como promedio ± error estándar del promedio (SEM) y los análisis estadísticos fueron hechos usando Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores P menores que 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis estadístico en el grupo y entre grupos de las curvas de curso de tiempo de electromiograficas y de comportamiento fue conducido usando análisis de varianza de mediciones repetidas dos vías (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple Bonferroni. El análisis estadístico del área bajo curva de respuesta de dosis obtenida desde la prueba de comportamiento fue realizado usando ANOVA 1 vía seguido por la prueba Dunnett. Los niveles de expresión de panx1 de animales neuropáticos y control fueron comparados por medio de la prueba t de Student despareada doble cola.

Debido a que los resultados de sensibilización central de cambios neuropáticos en la excitabilidad de neuronas que transmiten dolor en la médula espinal, fue probada electrofisológicamente, usando el paradigma del reflejo nociceptivo C, si bloqueadores diferentes a panx1 podrían inhibir la actividad de Wind Up espinal en ratas neuropaticas un forma de plasticidad en la antena dorsal espinal que se observa durante estimulación eléctrica de baja frecuencia (por ejemplo 1 Hz) de fibras C. Los resultados mostraron que la solicitud de un tren de pulsos eléctricos a los dedos de las patas, a 1 Hz, evocaba actividad de Wind Up en respuestas reflejas mediadas por fibra

c en el musculo femoris de bíceps ipsilateral, en ambos ratas de nervio sural transectado neuropáticas y adulteradas. La administración i.t. de cualquiera de las drogas de bloqueo de panx1, 10panx, Cbx y Prb, fueron capaces de deprimir la actividad de Wind Up en ambas ratas neuropáticas y adulteradas. La Figura 1B muestra que 300 μmol/L 10 panx pero no la solución salina, disminuyen significativamente los puntajes de Wind Up, en ambos grupos de animales (*p<0,05, ANOVA 2 vías seguido por prueba post hoc Bonferroni). La Figura 2 muestra que 100 μmol/L Cbx (A) y 150 μM Prb también resultaron en disminuciones significativas de los puntajes de Wind Up en ratas neuropáticas y adulteradas (para ambas drogas, *p>0,05, ANOVA de 2 vías seguido por prueba post hoc Bonferroni). El hecho que la inactivación farmacológica de los canales panx1 condujeron a una reducción significativa de la actividad de Wind Up en médula espinal de animales neuropáticos y adulterados sustenta la noción que los canales de panx1 están involucrados en los mecanismos que destacan el fenómeno de Wind Up bajo médula espinal no sensible y sensible, en ratas.

La transección del nervio sural resultó en hiperalgesia de larga duración para estimulo mecánico, como evidenció una reducción significativa del umbral de retiro de la para en los grupos experimentales. El estado de hiperalgesia comenzó 3 días después de la transección del nervio sural y duró por al menos 10 días (ver Figuras 3A y 4A, panel izquierdo, *p < 0,05, ANOVA dos vías seguido de prueba post hoc Bonferroni). Por el contrario, el retiro el umbral de retiro de la pata en los grupos adulterados permaneció sin cambio a lo largo de los 10 días de prueba (Figura 3B y 4B, panel izquierdo).

La inyección i.t. de dosis incrementada de 10panx (10, 30, 100 o 300 μmol/L 10panx), pero no la solución salina, indujo un efecto anti-hiperalgésico no dependiente de la dosis significativo en animales neuropáticos ya que ambos máximos del efecto y

la duración de la respuesta anti-hiperalgésica fueron directamente proporcional a la dosis (Figura 3A, panel medio, *p<0,05, ANOVA dos vías seguido por prueba post hoc Bonferroni). Además, el cálculo del área bajo la curva (AUC) como medida del efecto de 10panx durante el período completo de observación, también mostró que el efecto antihiperalgésico de 10panx se comporta de una manera dependiente de dosis (Figura 3A, panel derecho, *p<0,05, **p<0,01, ANOVA 1 vía seguido por prueba Dunnett post hoc). El efecto anti-hiperalgésico de 10panx i.t. fue transciente, y el umbral nociceptivo mecánico volvió al puntaje hiperalgésico inicial en alrededor de 3 a 4 horas. Por el contrario, para el efecto de 10panx en la ratas neuropáticas, la inyección i.t. de dosis similares de 10panx para ratas adulteradas no afectó el umbral de retiro de la pata en estos animales (Figura 3B, panel derecho). De forma similar a 10panx, las inyecciones i.t. de 100 μmol/L Cbx y 150 μmol/L Prb, pero no la solución salina, fueron capaces de inducir efectos antihiperalgésicos transcientes importantes en ratas neuropáticas como se puede observar en las curvas de curso del tiempo (Figura 4A, panel del medio, *p<0,05, ANOVA dos vías seguido de prueba post hoc Bonferroni) y AUCs (figura 4A, panel derecho, *p<0,05, ANOVA una vía seguido por prueba post hoc Dunnett). Sin embargo, dosis similares de Cbx y Prb fueron inefectivas en animales adulterados (Figura 4B, panel derecho). Como un todo, los resultados indican que panx1 participa en el proceso de sensibilización central que se desarrolló después de una injuria neuropática.

La expresión de la proteína panx1 en la medula espinal lumbar de ratas neuropaticas y de control fue caracterizadas por western blots con anticuerpos disponibles comercialmente y normalizada a β-actina. Panx1 corre como una banda de 48KDa. No se observó una diferencia significativa en los niveles de expresión para la proteína panx1 cuando se compara las densidades de banda normalizadas para

medula espinal lumbar de controles neuropaticos y adulterados, con ello, la injuria neuropática o afecta la regulación genética o postranslacional panx1.

Las figuras 5A y 5B muestran una cuantificación de la expresión de la proteína panexina mediante un western blot que evidencia los niveles de expresión de panexina en el cuadrante dorsal, ipsilateral a lalesión, de la médula espinal lumbar (segmentos L1-L5). En la figura de la izquierda (1) se muestran las bandas típicas para panexina (48 KDa) y para la actina β (42 KDa). Se observan las bandas de las ratas de control neuropático y normales, diez días después de la transección del nervio sural o una cirugía simulada. Los valores son la media ± SEM de muestras independientes tomadas de la médula espinal lumbar de cuatro ratas en cada grupo. El gráfico de la derecha (2) muestra los resultados de las densidades de las bandas normalizadas; las comparaciones de los datos de animales neuropático (N) y grupo de control (C) realizaron mediante la prueba t Student de dos colas para datos independientes NS: no significativo ($P<0,05$), en comparación con los animales control.

Las figuras 1A, 2A y 2B muestran el efecto de 3 bloqueadores de panexina en la actividad dolorosa espinal. Dado que la sensibilización central (modificación de las características de las neuronas que participan en la conducción de la información dolorosa, donde aumentan su sensibilidad) resulta de cambios neuroplásticos en la excitabilidad de las neuronas de transmisión del dolor en la médula espinal, se probó electrofisiológicamente, usando el paradigma del reflejo C nociceptivo, si diferentes bloqueadores panexina 1 podrían inhibir la actividad de la potenciación del dolor o Wind Up en ratas neuropáticas. Wind Up es un aumento de la excitabilidad de las neuronas de la médula espinal evocada por estímulos eléctricos sobre las fibras nerviosas que conducen la información dolorosa, las fibras tipo C. El wind up es un indicador de la actividad de las neuronas relacionadas con la transmisión del dolor. Cuando el wind up es alto significa que las neuronas del dolor están muy activas, indicando que el individuo padece dolor. Cuando se logra disminuir el wind up significa

que se está disminuyendo la actividad de las neuronas del dolor y, por lo tanto, aliviándolo.

Los resultados mostraron que la aplicación que la aplicación de una tren de pulsos eléctricos a la pata derecha de la rata a 1 Hz evocó la actividad wind up de las fibras C mediada por respuestas reflejas motoras en el músculo bíceps femoris ipsilatral del muslo, en ratas normales y neuropáticas. La administración por vía intratecal, indicada por una flecha, (esto es, directo sobre la médula espinal) de cualquiera delos bloqueadores de panexina, como 10 panx (un péptido mimético de una secuencia de amino ácidos de una porción extracelular de la proteína, que impide su apertura por bloqueo de su poro) (3), carbenoxolona (4) o probenecid (5), logró disminuir la actividad wind up espinal tanto en ratas neuropáticas como normales. 300 mM de 10panx (6) disminuyeron significativamente la actividad wind up en ambos grupos de animales (*=P<0,05, ANOVA de 2 vías, seguido por la prueba Bonferroni post hoc), a diferencia de aquellos a los cuales se les inyectó solución salina, sin cambios. Lo mismo ocurrió al administrar 100 μM de carbexonolona (7) y 150 μM de probenecid (8), significativa disminución de la actividad wind up fue observada (*P<0,05, ANOVA de dos vías seguido de prueba Bonferroni post hoc). El hecho de que la inactivación farmacológica de los canales de panexina haya conllevado a una reducción significativa de la actividad wind-up en la médula espinal de los animales neuropáticos, demuestra que panexina está involucrada fuertemente en los mecanismos subyacentes a la sensibilización central y los cambios en la excitabilidad neuronal observados en dolor.

Las figuras 3A-4B muestran cómo se alivia el dolor de un grupo de animales con daño de nervio periférico mediante el test de presión de la pata. La transección del nervio aural (9) resultó en una alodinia a los estímulos mecánicos, esto es, generación de dolor frente a un estímulo inocua, como al presionar la pata (gráfico a la izquierda). Esto se evidencia por una reducción significativa del umbral de retirada de la pata en

los grupos experimentales (10). La alodinia comenzó 3 días después de seccionar el nervio sural y se prolongó durante al menos 10 días (P<0,05, ANOVA de 2-vías seguido por la prueba Bonferronu post hoc). Por el contrario, el umbral de retirada de la pata en los grupos de animales normales se mantuvo sin cambios durante todo el período de prueba de 10 días (9a). La inyección de dosis crecientes de 10 panx (11) (10, 30, 100 o 300 μM), pero no una solución salina (12), indujo una significativa disminución, dosis dependiente, de la alodinia animales neuropáticos (P<0,05, ANOVA de 2 vías seguido de prueba Bonferroni post hoc). Además, el cálculo del área bajo la curva (AUC) (13) como una medida del efecto de 10panx durante el período de observación, también mostró que el efecto de 10 panx como analgésico de una manera dependiente de la dosis (P<0,05, //P<0,01, ANOVA de 1 vía seguido por prueba Dunnett post hoc). El efecto antihiperalgésico de 10panx fue transitorio, y el umbral nociceptivo mecánico volvió a la puntuación inicial en alrededor de 3 a 4 horas. En contraste al efecto de 10 panx en ratas neuropáticas, la inyección de dosis similares de 10 panx a ratas normales no afectó al umbral de retirada de la pata de estos animales (14). De manera similar a 10 panx, las inyecciones de 100 μM, de carbenoxolona (15) y 150 mM de probenecid (16) pero no la solución salina 817) fueron capaces de inducir una significativa y transitoria reversión de la alodinia mecánica ratas neuropáticas (P<0,05 de ANOVA de 2 vías seguido de prueba Benferroni post hoc) y AUC 18) (//P<0,05 Anova de 1 vía seguido por prueba Dunnett post hoc). Sin embargo, dosis similares de carbenoxolona y probenecid (19) no generaron cambios en animales normales, indicando que panexina participa en la sensibilización central que se desarrolla después de una lesión neuropática, porque al intervenirla, se genera un alivio del dolor.

REIVINDICACIONES

1. Método de tratamiento de dolor en mamíferos, caracterizado porque comprende administrar a dicho mamífero un compuesto inhibidor de la función de panexina que es seleccionado del grupo consistente de carbenoxolona, probenecid, 10panx, ácido flufenámico o mefloquina.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina es carbenoxolona, probenecid o 10panx.
3. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina es carbenoxolona.
4. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina es probenecid.
5. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina es 10panx.
6. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina inhibe la señalización de panexina en neuronas, microglias, astrocitos y oligodendrocitos de la médula espinal.
7. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina bloquea la actividad del canal de panexina.
8. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto inhibidor de la función de panexina es administrado por vía intratecal.
9. Uso de un compuesto inhibidor de la función de panexina que es seleccionado del grupo consistente de carbenoxolona, probenecid, 10panx, ácido flufenámico o mefloquina caracterizado porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.

10. El uso de la reivindicación 9, caracterizado porque dicho dolor se selecciona de dolor agudo o crónico.

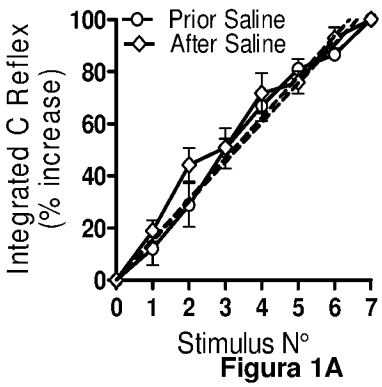


Figura 1A

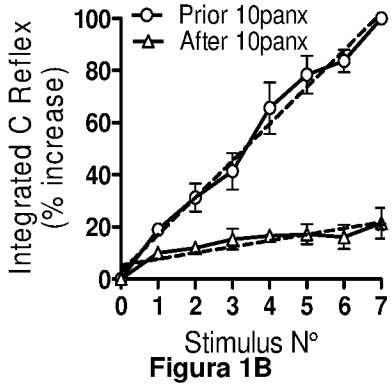


Figura 1B

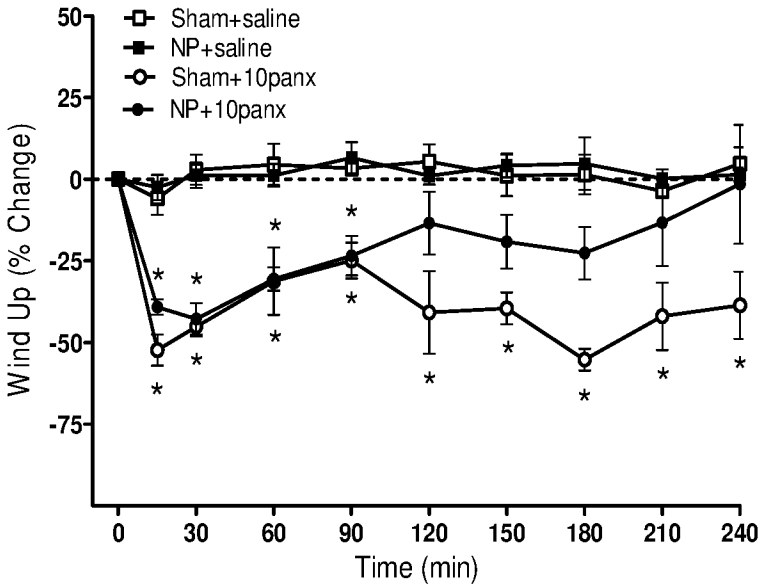
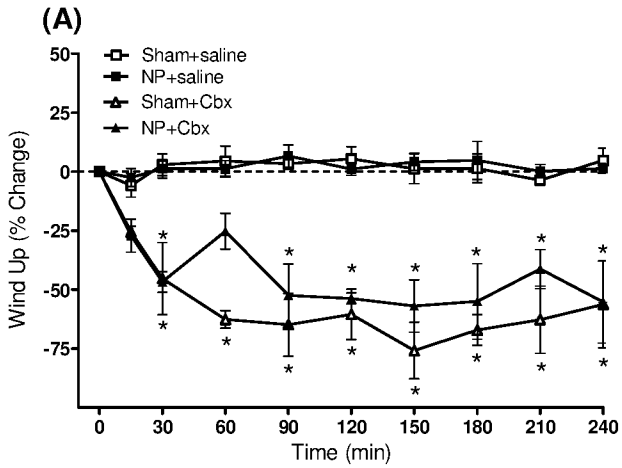


Figura 1C

Figura 2A



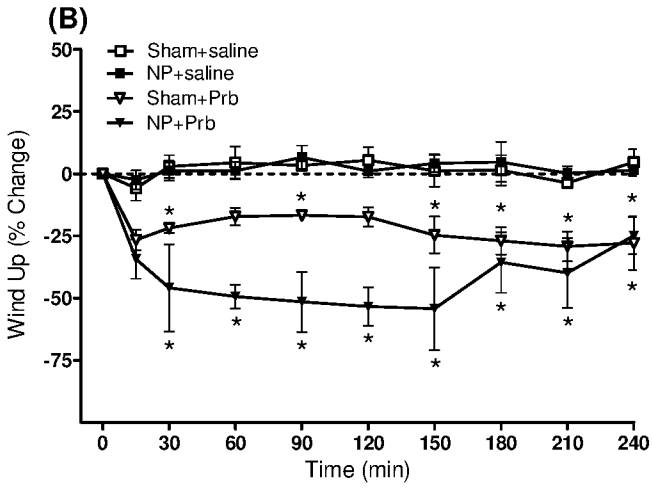
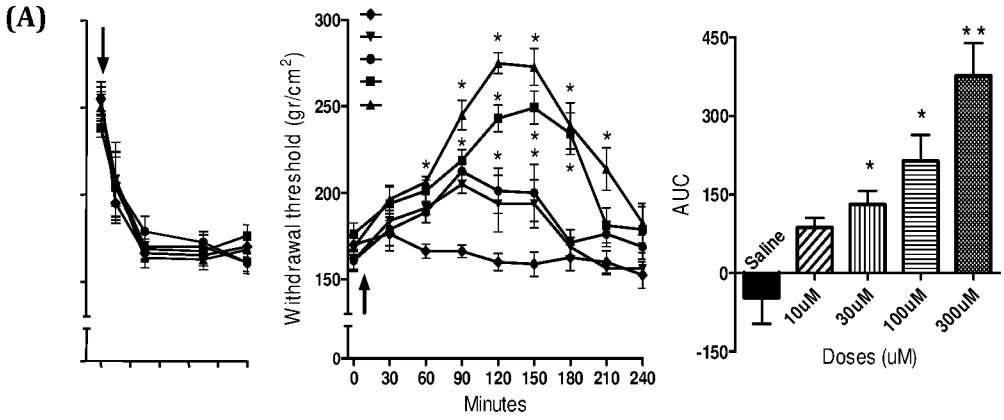


Figura 2B

Figura 3A Figura 3B Figura 3C



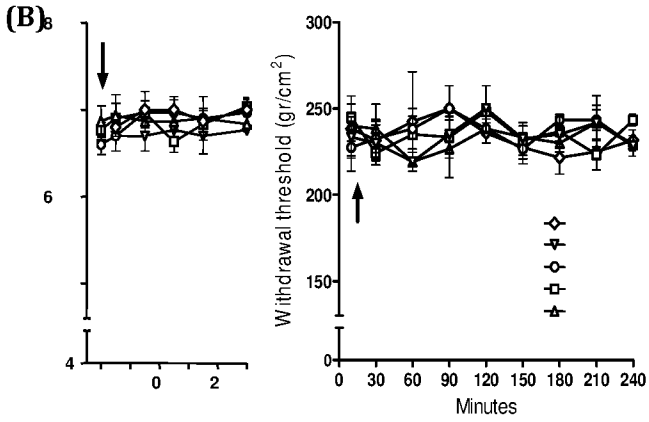


Figura 3D Figura 3E

Figura 4A

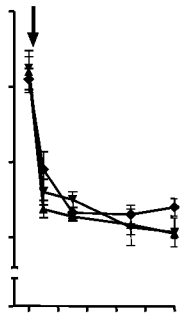


Figura 4B

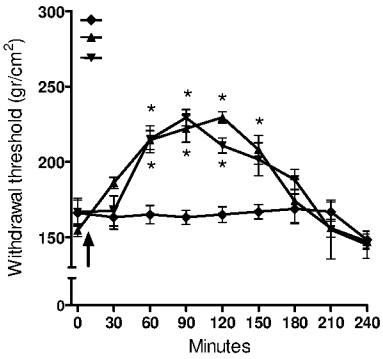
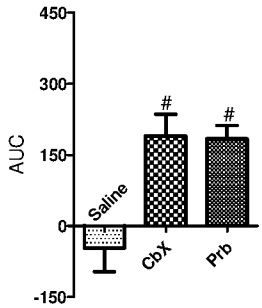


Figura 4C



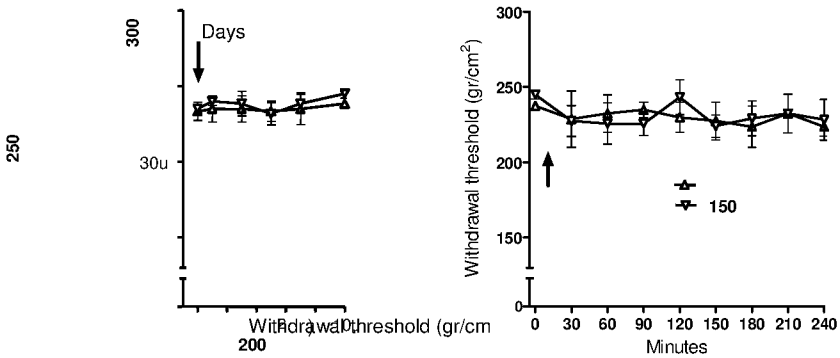


Figura D

Figura E

adulterados

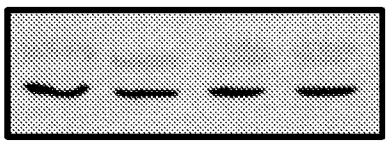


Figura 5A

Neuropáticos

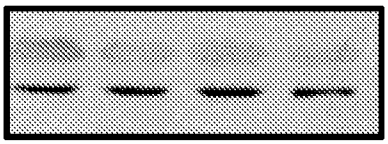


Figura 5B

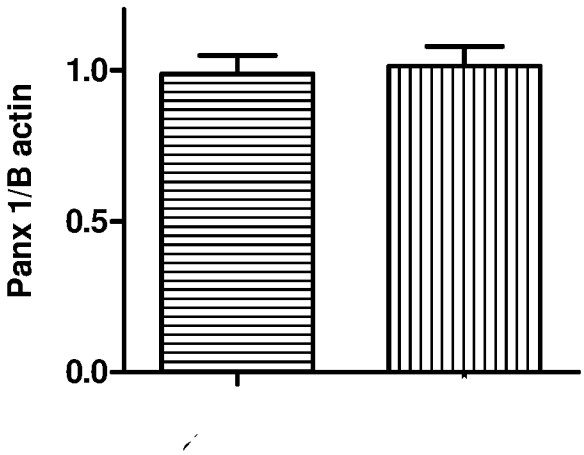


Figura 5C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2016/050042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP): A61K31/195, 31/4709, 31/56, 38/08, A61P25/04 (2016.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

(CIP): A61K31/195, 31/4709, 31/56, 38/08, A61P25/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GOOGLE PATENT, GOOGLE SCHOLAR, ESP@CENET, BEIC, INAPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRAVO, D. et al. Pannexin 1: a novel participant in neuropathic pain signaling in the rat spinal cord. Pain 2014; 155(10):2108-15. DOI: 10.1016/j.pain.2014.07.024. The whole document.	9, 10
X	BRAVO, D. et al. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. Pharmacological Research 101 (2015):86–93. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.07.016. The whole document.	9, 10
X	ZHANG, Y. et al. Pannexin-1 Up-regulation in the Dorsal Root Ganglion Contributes to Neuropathic Pain Development. J. Biol. Chem. 2015 Jun 5; 290(23):14647-55. DOI:10.1074/jbc.M115.650218. The whole document.	9, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11/10/2016 11/October/2016	10/11/2016 10/November/2016
Name and mailing address of the ISA/ INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile Facsimile No.	Authorized officer LEPE OGRODNIK, Ana Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2016/050042

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROH, DH., et al. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. Exp. Neurol. 2010 Jul; 224(1):123-32. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.03.002. The whole document.	9, 10
X	MARGINEANU D. g. et al. The connexin 36 blockers quinine, quinidine and mefloquine inhibit cortical spreading depression in a rat neocortical slice model in vitro. Brain Research Bulletin 71 (2006) 23–28. DOI:10.1016/j.brainresbull.2006.07.011 The whole document.	9, 10
X	KAGAN, G. et al. Flufenamic Acid and Placebo Compared in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. J. Int. Med. Res. (1981) 9 (4): 253-6. The whole document.	9, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2016/050042

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplementary sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box II.1

These claims relate to subject matter which this Authority considers falls under PCT Rules 39.1(iv) and 67.1(iv) relating to methods for the treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and to diagnostic methods. As a result, no written opinion will be established with regard to the novelty, inventive step and industrial applicability of these claims (PCT Article 17(2)(a)(b)).

Box III

Claim 9 relates to the use of a compound that inhibits the pannexin function, selected from the group consisting of carbenoxolone, probenecid, 10Panx, flufenamic acid or mefloquine, characterised in that it is useful for preparing a medicinal drug for the treatment of pain. All these compounds are related in that they are useful for the treatment of pain, and this is the common concept which they share. However, an analysis a posteriori leads to the conclusion that this shared feature is known from the prior art (documents D1-D6) and cannot be regarded as a common inventive concept; consequently, the application does not meet the requirement in respect of unity of invention.

As a result, the following inventions have been identified:

Invention 1 (claims 9 and 10, in part): Use of carbenoloxone, because of its usefulness for preparing a medicinal drug for the treatment of pain.

Invention 2 (claims 9 and 10, in part): Use of probenecid, because of its usefulness for preparing a medicinal drug for the treatment of pain.

Invention 3 (claims 9 and 10, in part): Use of 10Panx, because of its usefulness for preparing a medicinal drug for the treatment of pain.

Invention 4 (claims 9 and 10, in part): Use of flufenamic acid, because of its usefulness for preparing a medicinal drug for the treatment of pain.

Invention 5 (claims 9 and 10, in part): Use of mefloquine, because of its usefulness for preparing a medicinal drug for the treatment of pain.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CL2016/050042

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP): A61K31/195, 31/4709, 31/56, 38/08, A61P25/04 (2016.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

(CIP): A61K31/195, 31/4709, 31/56, 38/08, A61P25/04

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) GOOGLE PATENT, GOOGLE SCHOLAR, ESP@CENET, BEIC, INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	BRAVO, D. et al. Pannexin 1: a novel participant in neuropathic pain signaling in the rat spinal cord. Pain 2014; 155(10):2108-15. DOI: 10.1016/j.pain.2014.07.024. Todo el documento.	9, 10
X	BRAVO, D. et al. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. Pharmacological Research 101 (2015):86–93. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.07.016. Todo el documento.	9, 10
X	ZHANG, Y. et al. Pannexin-1 Up-regulation in the Dorsal Root Ganglion Contributes to Neuropathic Pain Development. J. Biol. Chem. 2015 Jun 5; 290(23):14647-55. DOI:10.1074/jbc.M115.650218. Todo el documento.	9, 10

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
11/10/2016 11/octubre/2016	10/11/2016 10/noviembre/2016
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile	Funcionario autorizado LEPE OGRODNIK, Ana
N° de fax	N° de teléfono 56-2-28870551 56-2-28870550

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/CL2016/050042

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X	ROH, DH., et al. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. Exp. Neurol. 2010 Jul; 224(1):123-32. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.03.002. Todo el documento.	9, 10
X	MARGINEANU D. g. et al. The connexin 36 blockers quinine, quinidine and mefloquine inhibit cortical spreading depression in a rat neocortical slice model in vitro. Brain Research Bulletin 71 (2006) 23–28. DOI:10.1016/j.brainresbull.2006.07.011 Todo el documento.	9, 10
X	KAGAN, G. et al. Flufenamic Acid and Placebo Compared in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. J. Int. Med. Res. (1981) 9 (4): 253-6. Todo el documento.	9, 10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2016/050042

Recuadro II **Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones N^{os}: 1-8
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Estas cláusulas se refieren a una materia que esta Administración considera afectada por las Reglas PCT 39.1(iv) y 67.1(iv), concernientes a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal, por cirugía o terapia, como también métodos de diagnóstico. En conclusión, ninguna opinión experta será establecida para novedad, nivel inventivo y aplicación industrial de dichas cláusulas (Art.17(2)(a)(b)).

2. ☐ Las reivindicaciones N^{os}:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones N^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III **Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja adicional

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N^{os}:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

(Continuación Recuadro III)

La reivindicación 9 se refiere al uso de un compuesto inhibidor de la función de panexina que es seleccionado del grupo consistente de carbenoxolona, probenecid, 10panx, ácido flufenámico o mefloquina caracterizado porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor. Todos los compuestos se relacionan entre sí por ser útiles en el tratamiento del dolor, siendo éste el concepto común que los agrupa. Luego de un análisis a posteriori, sin embargo, se concluye que dicha característica que comparten ya es conocida en el arte previo (Documentos D1 a D6), no siendo posible considerarla como concepto común inventivo y, en consecuencia, la solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención.

Como resultado, se han identificado las siguientes invenciones:

Invención 1 (cláusula 9 y 10 de manera parcial): Uso de carbenoloxona porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.

Invención 2 (cláusula 9 y 10 de manera parcial): Uso de probenecid porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.

Invención 3 (cláusula 9 y 10 de manera parcial): Uso de 10panx porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.

Invención 4 (cláusula 9 y 10 de manera parcial): Uso de ácido flufenámico porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.

Invención 5 (cláusula 9 y 10 de manera parcial): Uso de mefloquina porque sirve para preparar un medicamento útil para el tratamiento del dolor.