

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 059**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/497** (2006.01)  
**A61K 31/416** (2006.01)  
**A61K 31/675** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2018** **PCT/US2018/031688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2018** **WO18208848**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2018** **E 18727546 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023** **EP 3621619**

54 Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento del dolor visceral**

30 Prioridad:

**08.05.2017 US 201762503280 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**12.12.2023**

73 Titular/es:

**ARENA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**LASSEN, CHERYL GERALDINE y**  
**PICCIRILLO, MARCELO FABIAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 956 059 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para el tratamiento del dolor visceral

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al Compuesto A y sus composiciones farmacéuticas y su uso en métodos para el alivio y/o tratamiento del dolor visceral, en particular: el dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn; o el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide. En algunas realizaciones, el dolor visceral surge o está relacionado con la enfermedad de Crohn.

**Antecedentes**

15 El dolor visceral es generalmente el resultado de un daño o lesión en los órganos internos y es una de las formas más comunes de dolor. El dolor visceral es causado por la activación de los receptores del dolor en el pecho, abdomen o las áreas pélvicas, y puede ser causado por lesiones o cuadros clínicos que involucran los órganos internos, tales como estómago, riñón, vesícula biliar, vejiga urinaria e intestinos. El dolor visceral también puede ser causado por problemas con los músculos y la pared abdominal, tales como espasmo. El dolor visceral es distinto del dolor somático, que es causado por la activación de los receptores del dolor en la superficie del cuerpo o en los tejidos musculoesqueléticos (por ejemplo, el dolor posquirúrgico de una incisión quirúrgica) y por el dolor neuropático, que es causado por una lesión o el mal funcionamiento de la médula espinal y los nervios periféricos.

25 Ejemplos de dolor visceral incluyen dolor abdominal; dolor pélvico; dolor de un órgano interno; y dolor que surge de o está relacionado con pancreatitis (por ejemplo, pancreatitis crónica), enfermedad inflamatoria intestinal, endometriosis, cistitis intersticial, prostatitis (por ejemplo, prostatitis crónica) o lesiones abdominales posquirúrgicas.

Los dos tipos principales de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) son la colitis ulcerosa (CU), que se limita al colon, y la enfermedad de Crohn (EC), que puede afectar cualquier segmento del tracto gastrointestinal. En ambos tipos, los síntomas más comunes son diarrea y dolor abdominal. Los tratamientos para el dolor asociado a la EII que están actualmente disponibles se han tomado de otras condiciones de dolor y no son específicos para el dolor abdominal. Incluyen opiáceos que tienen el potencial de desarrollar tolerancia/taquifilaxia, adicción y abuso, y depresión respiratoria potencialmente mortal; gabapentinoides que son más seguros que los opiáceos pero que también producen efectos cognitivos adversos; antidepresivos tricíclicos que muestran cierta eficacia, pero también pueden producir somnolencia, hipotensión y arritmias; y antiinflamatorios no esteroideos (AINE; medicamentos tales como el ibuprofeno y el naproxeno) que, cuando se administran a largo plazo, pueden estar asociados a un mayor riesgo de lesión/sangrado gastrointestinal, acontecimientos cardíacos, hipertensión, lesión renal y muerte.

Los cannabinoides son un grupo de moléculas de señalización extracelular. En animales las señales de estas moléculas están mediadas por dos receptores acoplados a proteína G, el receptor cannabinoide 1 (CB<sub>1</sub>) y el receptor cannabinoide 2 (CB<sub>2</sub>). El CB<sub>1</sub> se expresa en mayor medida en las neuronas del SNC, pero también está presente en concentraciones menores en diferentes tejidos y células periféricos (Matsuda, L. A. et al. (1990) *Nature* 346:561-564). Por el contrario, el CB<sub>2</sub> se expresa principalmente, aunque no exclusivamente, en tejidos no neuronales, por ejemplo, en células hematopoyéticas, células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos, el páncreas endocrino y las líneas celulares cancerosas (Munro, S. et al. (1993) *Nature* 365:61-65; y según se revisa en Pacher, P. et al. (2006) *Pharmacol. Rev.* 58(3): 389-462). De esta manera, se cree que el CB<sub>1</sub> es el principal responsable en la mediación de los efectos psicotrópicos de los cannabinoides en el cuerpo, mientras que se cree que el CB<sub>2</sub> es el principal responsable de la mayoría de sus efectos no neurológicos.

50 La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO2011/025541 informa sobre determinados compuestos y composiciones farmacéuticas de los mismos que modulan la actividad del CB<sub>2</sub> receptor.

Existe la necesidad de enfoques alternativos para el manejo dirigido del dolor para el dolor visceral, especialmente para el dolor abdominal mal manejado en la EII debido a opciones específicas limitadas.

55 El documento WO 2012/116276 A1 (30 de agosto de 2012) describe formas cristalinas de ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diazapropilpentalen-4-carboxílico y su uso en el tratamiento de trastornos mediados por el receptor CB<sub>2</sub>.

Han et al., *J. Med. Chem.*, agosto de 2013, vol. 56, n.º 21 págs. 8824-8256 describe agonistas selectivos del receptor cannabinoide tipo 2 (CB<sub>2</sub>) y su uso terapéutico en el tratamiento del dolor y otros cuadros clínicos.

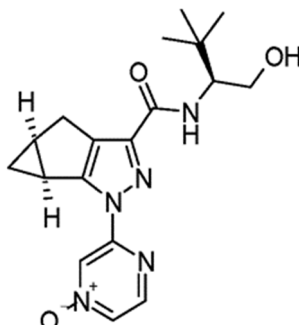
60 Izzo et al., *Pharmacological Research*, agosto de 2009, vol. 60, n.º 2, págs. 117-125 describe el uso de cannabinoides para contrarrestar la inflamación intestinal y el cáncer.

Kikuchi et al., *J. Pharmacol. Sci.*, enero de 2008, vol. 106 n.º 2, págs. 219-224 describe un ligando del receptor cannabinoide tipo 2 (CB<sub>2</sub>) y su evaluación farmacológica en modelos de rata de hipersensibilidad visceral.

65 El documento WO 2017/180528 A1 (19 de octubre de 2017) describe métodos para tratar un trastorno del receptor CB<sub>2</sub>, tal como dolor o fibrosis, con un compuesto agonista del receptor CB<sub>2</sub>.

**Sumario de la invención**

La invención es un compuesto que es ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetilpropil)-amida del ácido ((1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico, (Compuesto A) que tiene la estructura:



o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para tratar o aliviar el dolor visceral en un paciente que necesita dicho tratamiento, en donde:

el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn; o  
el dolor visceral es el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide.

En una realización, el dolor visceral es el dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn.

En una realización, el dolor visceral es el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide.

En una realización, al paciente se le administra una dosis de 10 mg a 400 mg del Compuesto A.

En una realización, al paciente se le administra una dosis de 25 mg, 50 mg o 100 mg del Compuesto A.

En una realización, la dosis se administra una vez, dos veces o tres veces al día.

En una realización, el Compuesto A se administra en forma cristalina anhidra no solvatada.

En una realización, el Compuesto A muestra:

(i) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $160,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $168,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,25 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ ;

o

(ii) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $162,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $166,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ ;

o

(iii) un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $163,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $165,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por

debajo de aproximadamente 135 °C.

o

(iv) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente 163,6 °C y aproximadamente 165,6 °C; y/o

un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente 135 °C.

o

(v) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $22,1^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $16,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada de aproximadamente 164,6 °C; y/o

un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente 135 °C.

En una realización, el Compuesto A se administra en una composición farmacéutica que comprende el Compuesto A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica comprende de 10 mg a 400 mg del Compuesto A.

En una realización, la composición farmacéutica comprende 25 mg, 50 mg o 100 mg del Compuesto A.

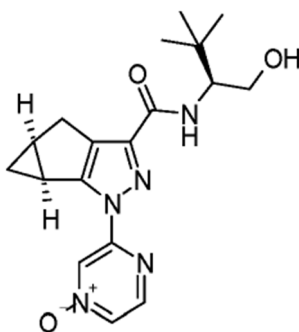
En una realización, la composición farmacéutica se administra una vez, dos veces o tres veces al día.

## Breve descripción

Las referencias a los métodos de tratamiento por terapia o cirugía o métodos de diagnóstico *in vivo* en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos para su uso en esos métodos.

Se ha descubierto de acuerdo con la presente divulgación que el Compuesto A, también denominado en el presente documento Compuesto 699, es particularmente útil para el tratamiento del dolor visceral, en particular: el dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn; o el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide.

Por tanto, en el presente documento se describen métodos para tratar o aliviar el dolor visceral en un paciente que necesita dicho tratamiento, en donde el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn, o el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico, (Compuesto A, también denominado en el presente documento Compuesto 699) que tiene la estructura:



**Compuesto A**

o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo; por ejemplo, una forma cristalina anhidra no solvatada.

El dolor visceral puede ser un dolor que surge de la enfermedad de Crohn.

El paciente puede estar en remisión de la enfermedad de Crohn, por ejemplo, cuando el paciente está en remisión de la enfermedad de Crohn y tiene dolor visceral crónico.

El paciente puede haber sido tratado previamente con un analgésico opiáceo para el dolor que surge o está relacionado con la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, la enfermedad de Crohn.

Al paciente se le puede administrar una dosis diaria del Compuesto A de 10 mg a 400 mg, de una a tres veces al día.

Debe comprenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indiquen la realización preferida de la divulgación, están destinados únicamente a fines ilustrativos.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra el efecto del Compuesto de referencia **493** en el modelo de hiperalgesia inducida por FCA de dolor inflamatorio en ratas 1 h después de la dosificación. Véase el Ejemplo 7.

La **Figura 2** muestra el efecto del Compuesto de referencia **493** en el modelo de osteoartritis de yodoacetato monosódico (MIA) en ratas 1 h después de la dosificación. Véase el Ejemplo 5.

La **Figura 3** muestra el efecto de 10 mg/kg del Compuesto de referencia **493** sobre la alodinia inducida por paclitaxel en ratas. Véase el Ejemplo 8.

La **Figura 4** muestra el efecto del Compuesto de referencia **493** en el modelo de incisión en la piel de dolor postoperatorio en ratas. Véase el Ejemplo 6.

La **Figura 5** muestra el efecto del compuesto de referencia **455** sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas. Véase el Ejemplo 9.

La **Figura 6** muestra el efecto del compuesto de referencia **660** sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas. Véase el Ejemplo 9.

La **Figura 7** muestra el efecto del compuesto de referencia **700** sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas. Véase el Ejemplo 9.

La **Figura 8** muestra el efecto del compuesto de referencia **667** sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas. Véase el Ejemplo 9.

La **Figura 9** muestra el efecto del Compuesto **699**/Compuesto **A** (10 mpk) en comparación con el vehículo (metilcelulosa) en el Modelo de NDPD inducida por STZ. Véase el Ejemplo 12.

La **Figura 10** muestra el efecto del Compuesto de referencia **919** (10 mpk) en comparación con el vehículo (metilcelulosa) en el Modelo de NDPD inducido por STZ. Véase el Ejemplo 12.

La **Figura 11** muestra el efecto del Compuesto **699** en un modelo de contorsión inducida por ácido acético de dolor visceral. Véase el Ejemplo 13.

La **Figura 12** muestra el efecto del Compuesto **699** en un modelo de contorsión inducida por ácido acético de dolor visceral. Véase el Ejemplo 13.

La **Figura 13** muestra el efecto del Compuesto **699** en un modelo de dolor visceral de colitis. Más específicamente, la Figura 13 muestra la respuesta visceromotora (RVM) a la distensión colorrectal (DCR) que demuestra mejores respuestas de dolor en ratas con colitis en relación con ratas de control sanas sin tratar (es decir, Control Sano, CS); donde los círculos en blanco son el CS + vehículo (n=11), los cuadrados rellenos son el TNBS agudo + vehículo (n=12), los círculos rellenos son el TNBS agudo + Compuesto **699** 30 g/kg (n=9), los cuadrados en blanco son CS + Compuesto **699** 30 mg/kg (n=8), y los triángulos cerrados son TNBS agudo + Compuesto **699** 10 mg/kg (n=9). Véase el Ejemplo 14.

### Descripción detallada

De nuevo, las referencias a los métodos de tratamiento por terapia o cirugía o métodos de diagnóstico *in vivo* en esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos para su uso en esos métodos.

La siguiente descripción de la(s) realización(es) preferida(s) es meramente de naturaleza ilustrativa y de ninguna manera pretende limitar la divulgación, su aplicación o usos.

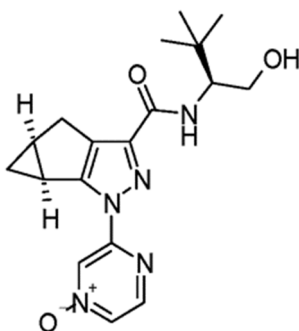
Como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, los intervalos se usan como abreviatura para describir todos y cada uno de los valores que se encuentran dentro del intervalo. Cualquier valor dentro del intervalo se puede seleccionar como el término del intervalo.

A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes y cantidades expresados en el presente documento y en otras partes de la memoria descriptiva deben entenderse como porcentajes en peso. Las cantidades dadas se basan en el peso activo del material.

Los términos "tratamiento" y "tratar" deben entenderse, en consecuencia, como el tratamiento o la mejora de los síntomas de la enfermedad, así como el tratamiento de la causa de la enfermedad.

El término "paciente" puede incluir un paciente humano o no humano.

Se ha descubierto de acuerdo con la presente divulgación que el Compuesto A es útil para tratar o aliviar el dolor visceral en un paciente que necesita dicho tratamiento. Por tanto, en el presente documento, también se describe un método (Método 1) para tratar o aliviar el dolor visceral en un paciente que necesita dicho tratamiento, en donde el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn; o el dolor visceral es el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, el parche de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide; comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico, (Compuesto A) que tiene la estructura:



**Compuesto A**

o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo.

En el presente documento, también se describe un método (Método 2) para activar selectivamente un receptor CB2 en un paciente que experimenta dolor visceral, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En el presente documento, también se describe el uso (Uso 1) del Compuesto A, o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o alivio del dolor visceral (por ejemplo, en un paciente).

En el presente documento, también se describe una composición farmacéutica para el alivio del dolor visceral (Composición 1), la composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A, o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo.

En el presente documento, también se describe un método (Método 3) para producir una composición farmacéutica para el alivio del dolor visceral, como se describe en el presente documento, que comprende mezclar el Compuesto A, o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el dolor es un dolor leve.

En una realización, el dolor es un dolor moderado.

En una realización, el dolor es un dolor intenso.

En una realización, el dolor es de moderado a moderadamente intenso.

En una realización, el dolor es de moderado a intenso.

En una realización, el paciente tiene una puntuación de dolor en la escala analógica visual de  $\geq 40$  mm.

En una realización, el paciente tiene una puntuación de dolor en la escala de calificación numérica de Likert de  $\geq 4$ .

En una realización, el dolor es un dolor moderado a intenso que requiere terapia continua con opiáceos las 24 horas del día durante un período de tiempo prolongado.

En una realización, el dolor es dolor agudo.

En una realización, el método es para uso a corto plazo (cinco días o menos).

En una realización, el dolor es dolor visceral crónico.

En una realización, el compuesto A se proporciona en una forma farmacéutica con recubrimiento entérico; una forma farmacéutica de liberación retardada o una forma farmacéutica de liberación pulsátil.

En una realización, el dolor es el dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn.

En una realización, el compuesto se administra en una o más dosis iniciales que tienen una cantidad de dosis inicial del compuesto y, a continuación, se administra posteriormente en una o más dosis sucesivas que tienen una cantidad de dosis más baja del compuesto. En algunas realizaciones, la dosis inicial es de 100 mg TID y la dosis reducida es de 50 mg TID; o la dosis inicial es de 25 mg TID y la dosis reducida es de 25 mg BID.

### Preparación de los compuestos

La preparación del Compuesto A, se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2010/002360, publicada como publicación internacional N.º WO/2011/025541.

La preparación de formas cristalinas del Compuesto A, incluyendo la forma cristalina anhidra no solvatada, se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2012/026506, publicada como publicación internacional N.º WO/2012/116276.

También se describen en el presente documento los siguientes compuestos de referencia, en donde el número del compuesto en negrita inmediatamente antes del nombre químico se usa en cualquier lugar en esta divulgación:

**Compuesto de referencia 64:** (1-fenil-ciclopropil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(2,4-difluoro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 151:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(5-cloro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 174:** (1-hidroximetil-ciclopropil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(2,4-dicloro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 264:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(5-ciano-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 269:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-piridin-3-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 309:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(5-fluoro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 332:** (1-metil-1-fenil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(5-cloro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 340:** (1-metil-1-piridin-4-etil)-amida del ácido 1-(2,4-difluoro-fenil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carboxílico;

**Compuesto de referencia 368:** ((1S,2S)-2-hidroxi-indan-1-il)-amida del ácido (3bS,4aR,5R)-1-(2,4-difluoro-fenil)-3b-isopropil-5-metil-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carboxílico;

**Compuesto de referencia 408:** (tetrahidro-piran-4-ilmetil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(2,4-difluoro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 455:** (4-hidroximetil-tetrahidro-piran-4-il)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(2,4-difluoro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 493:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(2,4-difluoro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 515:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido 1-(2,4-difluoro-fenil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-3-carboxílico;

**Compuesto de referencia 593:** *terc*-butilamida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 625:** (ciano-dimetil-metil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-cloro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 629:** ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 631:** *N-terc*-butilhidrazida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 632:** *terc*-butilamida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-trifluorometil-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 633:** (2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 634:** ((S)-2,2-dimetil-1-metilcarbamoil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(2,4-difluoro-fenil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 642:** ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-

1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 644:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-ciano-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 646:** Mono-((1aR,5aR)-2-(4-ciano-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino)-2-metilpropil) éster del ácido fosfórico;

**Compuesto de referencia 660:** *terc*-butilamida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 667:** [2,2-dimetil-1-((S)-metilcarbamoil)-propil]-amida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 673:** *terc*-butilamida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-bromo-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 683:** Mono-((S)-3,3-dimetil-2-(((1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino)-butil)éster del ácido fosfórico;

**Compuesto de referencia 684:** ((S)-2-hidroxi-1-tetrahidro-piran-4-il-etil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 690:** ((S)-1-hidroximetil-2-metil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 696:** ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 698:** (1-hidroximetil-ciclobutil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto 699:** ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 700:** (1-piridin-2-il-ciclobutil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 701:** ((S)-2,2-dimetil-1-metilcarbamoil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 703:** Mono-((S)-3,3-dimetil-2-(((1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino)-butil)éster del ácido fosfórico;

**Compuesto de referencia 704:** ((S)-2,2-dimetil-1-metilcarbamoil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 711:** éster metílico del ácido (((1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino)-piridin-2-il-acético;

**Compuesto de referencia 722:** ((S)-metilcarbamoil-fenil-metil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 728:** ((S)-1-etilcarbamoil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 746:** Éster metílico del ácido (S)-3,3-dimetil-2-(((1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino)-butírico;

**Compuesto de referencia 752:** (1-piridin-2-il-ciclobutil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(tetrahidro-piran-4-ilmetil)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 755:** ((S)-1-metoxicarbamoil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 764:** (1-trifluorometil-ciclopropil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 765:** (1-trifluorometil-ciclobutil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 766:** ((R)-2,2-dimetil-1-piridin-2-il-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 767:** ((S)-2,2-dimetil-1-piridin-2-il-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 820:** (2-hidroxi-1-hidroximetil-1-metiletil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-ciano-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 821:** (1-metil-ciclobutil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 828:** ((R)-1,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 841:** [(S)-2-hidroxi-1-(tetrahidro-piran-4-il)-etil]-amida del ácido (1aR,5aR)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 848:** (S)-3,3-dimetil-2-[[2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carbonil]-amino]-butiléster del ácido (1aS,5aS)-(S)-2-amino-3-metil-butírico;

**Compuesto de referencia 889:** (2-fluoro-1-fluorometil-1-hidroximetil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-cloro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 891:** ((S)-3,3,3-trifluoro-1-hidroximetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-ciano-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 896:** ((S)-1-hidroximetil-2-metil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-



1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 897:** (2-fluoro-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-cloro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 902:** *N*-*terc*-butil-hidrazida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 904:** (2-fluoro-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 912:** ((*R*)-1,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 913:** ((*S*)-2-hidroxi-1-fenil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 918:** ((*S*)-1-fluorometil-2,2-dimetil-propil)-amida del ácido (1a*R*,5a*R*)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 919:** (2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 920:** ((1*S*,2*S*)-2-hidroxi-indan-1-il)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 921:** ((1*S*,2*R*)-2-hidroxi-indan-1-il)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 924:** (1-fluorometil-ciclobutil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 926:** (1-trifluorometil-ciclobutil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 927:** (2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico;

**Compuesto de referencia 930:** (1-trifluorometil-ciclopropil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-pirazin-2-il-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico; y

**Compuesto de referencia 931:** (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-amida del ácido (1a*R*,5a*R*)-2-(4-fluoro-piridin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico.

Estos compuestos se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos en la bibliografía publicada relevante que usa un experto en la materia. Los reactivos y procedimientos ilustrativos para estas reacciones, y los procedimientos específicos de la preparación de numerosos compuestos se pueden encontrar en la publicación internacional N.º WO2011/025541. La protección y desprotección se pueden llevar a cabo mediante procedimientos generalmente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Greene, T. W. y Wuts, P. G. M., *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, 1999 [Wiley]).

La separación de los isómeros individuales (tal como, por HPLC quiral, recristalización de mezclas diastereoméricas y similares) o la síntesis selectiva (tal como, mediante síntesis enantioméricamente selectiva y similares) de los isómeros individuales se lleva a cabo mediante la aplicación de diferentes métodos que conocen bien los expertos en la materia.

## INDICACIONES Y MÉTODOS PARA PROFILAXIS Y/O TRATAMIENTO: DOLOR VISCERAL

Las propiedades analgésicas de los cannabinoides han sido reconocidas durante muchos años. Por ejemplo, los estudios en animales han demostrado que los agonistas de CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> anandamida, THC, CP55,940 y WIN 55212-2 son efectivos contra el dolor agudo y crónico causado por estímulos dolorosos químicos, mecánicos y térmicos (revisado en Walker y Huang (2002) *Pharmacol. Ther.* 95:127-135; revisado en Pacher, P et al. (2006) *Pharmacol. Rev.* 58(3): 389-462). En los seres humanos, la administración tópica del agonista de CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> HU-210 atenúa la hiperalgesia y la alodinia inducidas por capsaicina (Rukwied, R. et al. (2003) *Pain* 102: 283-288) y la coadministración del agonista de CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> THC y cannabidiol (nabiximols, marca registrada Sativex®) proporciona alivio del dolor asociado al cáncer (comunicado de prensa de GW Pharmaceuticals del 19 de enero de 2005, 19 de junio de 2007) y dolor y espasticidad asociados a la esclerosis múltiple (comunicado de prensa de GW Pharmaceuticals del 27 de septiembre de 2005, 11 de marzo de 2009).

El papel de CB<sub>1</sub> en la mediación de estos efectos analgésicos está bien documentado (revisado en Manzanares, J. et al. (2006) *Current Neuropharmacology* 4:239-57; revisado en Pacher, P. et al. (2006) *Pharmacol. Rev.* 58(3): 389-462). Por ejemplo, el bloqueo de CB<sub>1</sub> periférico o central conduce a la hiperalgesia (Richardson, J. D. et al. (1997) *Eur. J. Pharmacol.* 345:145-153; Calignano, A. et al. (1998) *Nature* 394:277-281), mientras que la activación del CB<sub>1</sub> mediante la administración exógena de un agonista de CB<sub>1</sub> araquidonil-2-cloroetilamida reduce el dolor (Furuse, S. et al. (2009) *Anesthesiology* 111(1):173-86).

Aunque menos documentado, el CB<sub>2</sub> también desempeña un papel en la mediación de los efectos analgésicos de los cannabinoides (revisado en Guindon y Hohmann (2008) *Br. J. Pharmacol.* 153:319-334). Por ejemplo, la administración sistémica del agonista selectivo de CB<sub>2</sub> AM1241 suprime la hiperalgesia inducida en los modelos de carragenano, capsaicina y formalina de dolor inflamatorio en roedores (revisado en Guindon y Hohmann (2008) *Br. J.*

*Pharmacol.* 153:319-334). La administración local (subcutánea) o sistémica de AM1241 también revierte la hipersensibilidad táctil y térmica en ratas después de la ligadura de los nervios espinales en el modelo de lesión por constricción crónica del dolor neuropático (Malan, T. P. et al. (2001) *Pain* 93: 239-245; Ibrahim, M. M. et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(18): 10529-10533), un efecto que es inhibido por el tratamiento con el antagonista selectivo de CB<sub>2</sub> AM630 (Ibrahim, M. M. et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(8):3093-8). El agonista selectivo de CB<sub>2</sub> GW405833 administrado sistémicamente revierte significativamente la hipersensibilidad a los estímulos mecánicos en ratas después de la ligadura de los nervios espinales (Hu, B. et al. (2009) *Pain* 143: 206-212). Por tanto, también se ha demostrado que los agonistas selectivos de CB<sub>2</sub> atenúan el dolor en modelos experimentales de dolor agudo, inflamatorio, neuropático e hiperalgesia.

En consecuencia, los agonistas específicos de CB<sub>2</sub> y/o los agonistas de CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> encuentran uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la nocicepción aguda y la hiperalgesia inflamatoria, así como la alodinia y la hiperalgesia producidas por el dolor neuropático. Por ejemplo, estos agonistas son útiles como analgésicos para tratar el dolor que surge de afecciones autoinmunitarias; reacciones alérgicas; dolor óseo y articular; dolor muscular; dolor dental; síndrome nefrítico; esclerodermia; tiroiditis; migraña y otros dolores de cabeza; dolor asociado a neuropatía diabética; fibromialgia, neuropatía relacionada con el VIH, ciática y neuralgias; dolor como resultado del cáncer; y dolor que se produce como reacción adversa de la terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

Por otra parte, aunque los cannabinoides ejercen sus efectos antinociceptivos mediante mecanismos complejos que implican efectos sobre el sistema nervioso central, la médula espinal y los nervios sensoriales periféricos (revisado en Pacher, P. et al. (2006) *Pharmacol. Rev.* 58(3): 389-462), un análisis de modelos de dolor inflamatorio y neuropático en ratones que son deficientes para CB<sub>1</sub> solo en neuronas nociceptivas localizadas en el sistema nervioso periférico demuestra que la contribución de los receptores de tipo CB<sub>1</sub> expresados en los terminales periféricos de los nociceptores para la analgesia inducida por cannabinoides es primordial (Agarwal, N. et al. (2007) *Nat. Neurosci.* 10(7): 870-879). En consecuencia, los agonistas de CB<sub>1</sub> que son incapaces de cruzar la barrera hematoencefálica todavía encuentran uso en el tratamiento y/o profilaxis de dolor agudo, dolor inflamatorio, dolor neuropático e hiperalgesia.

El sistema cannabinoide en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) está desregulado y las enzimas que descomponen los endocannabinoides (por ejemplo, amida hidrolasa de ácidos grasos -FAAH) aumentan en la enfermedad de Crohn inflamatoria activa. Las enzimas que sintetizan endocannabinoides (por ejemplo, *N*-fosfolipasa específica de acil-fosfatidiletanolamina -NAPE-PLD) están disminuidos en la enfermedad de Crohn inflamatoria activa y algunos endocannabinoides están disminuidos en la enfermedad inflamatoria intestinal activa.

Los receptores CB<sub>2</sub> se encuentran en las células gastrointestinales (GI) del tejido diana y en las células inmunitarias locales tanto en humanos como en roedores, y se encuentran en células epiteliales, células inmunitarias, y en neuronas entéricas donde se observa sensibilidad mediada por CB<sub>2</sub> en las terminaciones nerviosas aferentes viscerales.

El receptor CB<sub>2</sub> aumenta en el margen ulceroso en la enfermedad de Crohn, y se ha demostrado que los cannabinoides son efectivos en ensayos clínicos para el dolor de Crohn. Por ejemplo, se ha demostrado que el cannabis induce una respuesta clínica en pacientes con enfermedad de Crohn en un estudio prospectivo controlado con placebo, y el tratamiento de la enfermedad de Crohn con cannabis en un estudio observacional mostró mejoras en la puntuación del dolor.

Varios estudios preclínicos en animales respaldan estas observaciones que sugieren que la activación de CB<sub>2</sub> puede aliviar el dolor abdominal sin los efectos cognitivos no deseados de activación de receptores CB<sub>1</sub>. Se ha demostrado que el agonista de CB<sub>2</sub> bloquea la activación del nervio mesentérico y este efecto se bloquea en desactivaciones de CB<sub>2</sub>. De manera similar, una reducción del dolor intestinal por probiótico *Lactobacillus acidophophilis* (LCFM) en un modelo de hipersensibilidad colónica inducida por butirato es bloqueada por un antagonista de los receptores CB<sub>2</sub>. Por tanto, la unión selectiva de un agonista al receptor CB<sub>2</sub> sobre el receptor CB<sub>1</sub> es de importancia para el alivio potencial del dolor, sin los efectos cognitivos no deseados de la activación de receptores CB<sub>1</sub>.

La afinidad de unión, la potencia y la selectividad del Compuesto A para los receptores CB<sub>2</sub> recombinantes se determinaron usando ensayos de unión de radioligandos y ensayos de señalización de GPCR. Se demostró que el compuesto A es un agonista completo del receptor CB<sub>2</sub> con una Ki de 6 nM para CB<sub>2</sub> humana y valores CE<sub>50</sub> entre 6 nM y 8 nM para el ser humano, receptores de ratas y perros. En concentraciones de prueba de hasta 10 µM, el Compuesto A no interactuó con receptores CB<sub>1</sub> humanos, rata o perro recombinantes, lo que indica una selectividad de >1.000 veces entre estas especies.

Por tanto, de acuerdo con la presente divulgación, el compuesto A es particularmente útil para el tratamiento del dolor visceral, en donde el dolor visceral surge de la enfermedad de Crohn o está relacionado con la misma. El compuesto A también es particularmente útil para el tratamiento del dolor visceral en un órgano o tejido que expresa el receptor CB<sub>2</sub>, en particular, dolor visceral que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide. Se ha informado de la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, por ejemplo, en el bazo, apéndice vermiforme, pulmón, íleon terminal del intestino delgado, placa de Peyer del intestino delgado, ganglios linfáticos, vejiga urinaria, estómago, timo y colon sigmoide (EMBL-EBI Expression Atlas, consultado el 22 de febrero de 2017).

La gravedad del dolor puede evaluarse con medidas autoinformadas como se conoce en la técnica. Generalmente, el dolor se evalúa en reposo, con la actividad apropiada (por ejemplo, deambulación, tos), al valor de referencia (antes de la administración del Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato y/o hidrato del mismo y posteriormente a intervalos regulares). Algunos de los instrumentos de evaluación del dolor más usados incluyen la escala analógica visual (VAS), la escala de calificación numérica (NRS) y la escala de Likert categórica. La VAS es una evaluación escrita que normalmente usa una línea sin marcar de 100 mm con el extremo izquierdo marcado como "sin dolor" y el extremo derecho marcado como "el peor dolor imaginable". Los sujetos ponen una marca en la línea correspondiente a su nivel de dolor. La NRS puede aplicarse en forma escrita o verbal y normalmente usa una calificación de 0 (que corresponde a "sin dolor") a 10 (que corresponde al "peor dolor imaginable"). Las escalas de Likert son normalmente instrumentos de cuatro o cinco artículos (por ejemplo, calificaciones de "ninguno", "leve", "moderado", "intenso") que intentan cuantificar el dolor.

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En el presente documento, también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el Compuesto A y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Algunas realizaciones se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden el Compuesto A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento, también se describe un método para producir una composición farmacéutica para el alivio del dolor visceral, como se describe en el presente documento, que comprende mezclar el Compuesto A, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones se pueden preparar por cualquier método apropiado, normalmente mezclando uniformemente el compuesto activo con líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, en las proporciones requeridas y, a continuación, si es necesario, dando forma a la mezcla resultante en una forma deseada.

Los excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, rellenos, agentes humectantes aceptables, lubricantes para la formación de comprimidos y disgregantes se pueden usar en comprimidos y cápsulas para administración oral. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de soluciones, emulsiones, suspensiones acuosas y oleosas y jarabes. Alternativamente, las preparaciones orales pueden estar en forma de polvo seco que se puede reconstituir con agua u otro vehículo líquido adecuado antes de su uso. Otros aditivos tales como agentes de suspensión o emulsión, vehículos no acuosos (incluidos los aceites comestibles), conservantes y saborizantes y colorantes se pueden añadir a las preparaciones líquidas. Las formas farmacéuticas parenterales se pueden preparar disolviendo el Compuesto A en un vehículo líquido adecuado y esterilizando por filtrado la solución antes de llenar y sellar herméticamente un vial o ampolla apropiada. Estos son solo algunos ejemplos de los muchos métodos apropiados bien conocidos en la técnica para preparar formas farmacéuticas.

El compuesto A puede formularse en composiciones farmacéuticas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, además de aquellos mencionados en el presente documento, se conocen en la técnica; por ejemplo, véase Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, (Editores: Gennaro et. al.).

Aunque es posible que, para su uso en la profilaxis o el tratamiento, el Compuesto A, en un uso alternativo, se administre como un producto químico a granel o puro, sin embargo, es preferible presentar el compuesto o principio activo como una formulación farmacéutica o composición que comprenda además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas incluyen las que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración por inhalación, insuflación o mediante un parche transdérmico. Los parches transdérmicos dispensan un fármaco a una velocidad controlada presentando el fármaco por absorción de una manera eficaz con una degradación mínima del fármaco. Normalmente, los parches transdérmicos comprenden una capa de respaldo impermeable, un adhesivo sencillo sensible a la presión y una capa protectora extraíble con un revestimiento antiadherente. Un experto habitual en la materia entenderá y apreciará que las técnicas apropiadas para fabricar los parches transdérmicos eficaces deseados basándose en las necesidades del experto.

El Compuesto A, junto con un adyuvante convencional, vehículo o diluyente, puede, por tanto, formarse en la forma de formas farmacéuticas y dosis unitarias de las mismas y en dicha forma se pueden emplear como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas rellenas, o líquidos tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, geles o cápsulas rellenas con los mismos, todos para uso oral, en forma de supositorios para administración rectal; o en forma de soluciones inyectables estériles para uso parenteral (incluyendo subcutáneo). Dichas composiciones farmacéuticas y formas en dosis unitaria de los mismos pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin los compuestos o principios activos adicionales y dichas forma en dosis unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz de principio activo proporcional al intervalo de dosis diaria que se pretende emplear.

Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una suspensión o un líquido. La composición farmacéutica se prepara preferentemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del principio activo. Los ejemplos de dichas unidades de dosificación son cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o una suspensión, con aditivos convencionales tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; y con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio. El principio activo también se puede administrar mediante inyección como una composición en donde, por ejemplo, solución salina, dextrosa o agua se pueden usar en forma de un portador farmacéuticamente aceptable adecuado.

El Compuesto A o un solvato, hidrato o derivado fisiológicamente funcional del mismo se puede usar como principio activo en composiciones farmacéuticas, específicamente como moduladores del receptor cannabinoide. Se pretende que la expresión "principio activo" como se define en el contexto de una "composición farmacéutica" signifique un componente de una composición farmacéutica que proporciona el efecto farmacológico primario, al contrario que un "principio inactivo" que se reconocerá generalmente que no proporciona ningún beneficio terapéutico.

La dosis, cuando se usa el Compuesto A puede variar en amplios límites y como es habitual y es conocido por el médico, se debe adaptar a las condiciones del individuo en cada caso individual. Depende, por ejemplo, de la naturaleza y de la gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar, de la dolencia del paciente, del compuesto empleado o de si se trata un cuadro clínico agudo o crónico o se lleva a cabo la profilaxis o de si se administran compuestos activos adicionales además del Compuesto A. Algunas dosis preferidas no limitantes para la inclusión en las composiciones y métodos de la presente descripción incluyen: 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 110 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 140 mg, 150 mg, 160 mg, 170 mg, 175 mg, 180 mg, 190 mg, 200 mg, 210 mg, 220 mg, 225 mg, 230 mg, 240 mg, 250 mg, 260 mg, 275 mg, 280 mg, 290 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg y 400 mg. Se pueden administrar dosis múltiples durante el día, especialmente cuando se consideran necesarias cantidades relativamente grandes, por ejemplo 2, 3 o 4 dosis. Dependiendo del individuo y de lo que considera adecuado el médico a cargo del tratamiento del paciente o el cuidador puede ser necesario desviar hacia arriba o hacia abajo las dosis descritas en el presente documento.

La cantidad de un principio activo o una sal activa o derivado del mismo, necesaria para su uso en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando, y la edad y condición del paciente, y quedará en última instancia a discreción de un médico o clínico asistente. En general, un experto en la materia entiende cómo extrapolar datos *in vivo* obtenidos en un sistema modelo, normalmente un modelo animal, a otro, tal como un ser humano. En algunas circunstancias, estas extrapolaciones pueden basarse simplemente en el peso del modelo animal en comparación con otro, tal como un mamífero, preferentemente un ser humano, sin embargo, con mayor frecuencia, estas extrapolaciones no se basan simplemente en pesos, sino que incorporan una diversidad de factores. Los factores representativos incluyen el tipo, la edad, el peso, el sexo, la dieta y la condición médica del paciente, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, las consideraciones farmacológicas tales como la actividad, la eficacia, la farmacocinética y los perfiles toxicológicos del compuesto empleado en particular, si se usa un sistema de suministro de fármacos, o si se está tratando un cuadro clínico agudo o crónico o se lleva a cabo profilaxis o si se administran otros compuestos activos además del Compuesto A y como parte de una combinación de fármacos. La pauta posológica para tratar una afección con el Compuesto A y/o composiciones descritas en el presente documento se selecciona de acuerdo con diversos factores según se ha citado anteriormente. Por tanto, la pauta posológica real empleada puede variar ampliamente y, por lo tanto, puede desviarse de una pauta posológica preferida y un experto en la materia reconocerá que se pueden probar la dosis y la pauta posológica fuera de estos intervalos habituales y, cuando sea apropiado, pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

La dosis deseada se puede presentar de manera conveniente en una única dosis o en dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis puede dividirse además, por ejemplo, en una serie de administraciones discretas y poco espaciadas. La dosis diaria puede dividirse, especialmente cuando se administran cantidades relativamente grandes según se considere apropiado, en varias, por ejemplo, administraciones de 2, 3 o 4 partes. Si procede, dependiendo del comportamiento individual, puede ser necesario desviarse hacia arriba o hacia abajo de la dosis diaria indicada.

El Compuesto A puede administrarse en una amplia diversidad de formas farmacéuticas orales y parenterales. Será obvio para los expertos en la materia que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender, como componente activo, el Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del Compuesto A.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir del Compuesto A, la selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado puede ser sólido, líquido o una mezcla de ambos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también actúan como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material de encapsulación.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el compuesto activo finamente dividido.

En los comprimidos, el componente activo está mezclado con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en porciones adecuadas y compactado hasta la forma y tamaño deseados.

Los polvos y los comprimidos pueden contener cantidades en porcentaje variable del compuesto activo. Una cantidad representativa en un polvo o comprimido puede contener del 0,5 a aproximadamente el 90 por ciento del compuesto activo; sin embargo, un experto en la materia sabría cuando son necesarias cantidades fuera de este intervalo. Los vehículos adecuados para polvos y comprimidos son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con el material de encapsulado como vehículo que proporciona una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículos, está rodeado por un vehículo, que de esta manera está asociado al mismo. De manera similar, se incluyen obleas y pastillas para chupar. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, las obleas y las pastillas pueden usarse como formas sólidas adecuadas para administración oral.

Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, se mezcla primero y el componente activo se dispersa de forma homogénea con la misma, por agitación. A continuación, la mezcla homogénea fundida se vierte en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y, de este modo, solidificar.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del principio activo dichos vehículos que se sabe en la técnica que son apropiados.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones acuosas de propilenglicol. Por ejemplo, las preparaciones líquidas para inyección parenteral se pueden formular como soluciones en solución acuosa de polietilenglicol acuoso. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se usan convenientemente aceites no volátiles, estériles como un disolvente o un medio de suspensión. Con este fin, puede usarse cualquier aceite no volátil suave incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico son útiles en la preparación de inyectables.

Por tanto, el Compuesto A puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua), y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, recipientes de infusión de pequeños volúmenes o en envases multidosis con un conservante añadido. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de una solución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua pirogénica estéril, antes de su uso.

Las formulaciones acuosas adecuadas para uso oral pueden prepararse disolviendo o suspendiendo el principio activo en agua y añadiendo colorantes, aromas, estabilizantes y agentes espesantes, según se desee.

Las suspensiones acuosas adecuadas para uso oral pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica u otros agentes de suspensión bien conocidos.

También se incluyen preparaciones en forma sólida que se pretende que se conviertan, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para su administración oral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromas, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

Las preparaciones farmacéuticas están preferentemente en formas en dosis unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma en dosis unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. También, la forma en dosis unitaria puede ser una cápsula, comprimido, oblea o pastilla para chupar en sí misma, o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstas en forma envasada.

Los comprimidos o cápsulas para administración oral son composiciones preferidas.

El Compuesto A puede existir opcionalmente como sales farmacéuticamente aceptables incluyendo sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables preparadas a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos representativos incluyen, pero sin limitación, acético, bencensulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, dicloroacético, fórmico, fumárico, glucónico, glutámico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, oxálico, p-toluenosulfónico y similares. Determinadas sales farmacéuticamente aceptables se enumeran en Berge, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19 (1977).

Las sales de adición de ácidos se pueden obtener como productos directos de la síntesis de compuestos. Como alternativa, la base libre se puede disolver en un disolvente adecuado que contiene el ácido apropiado y aislar la sal por evaporación del disolvente o separar de otro modo la sal y el disolvente. El Compuesto A puede formar solvatos con disolventes convencionales de bajo peso molecular usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

El Compuesto A se puede convertir en "profármacos". El término "profármacos" se refiere a compuestos que han sido modificados con grupos químicos específicos conocidos en la materia y, cuando se administran a un individuo, estos grupos experimentan biotransformación para dar el compuesto precursor. Por tanto, los profármacos pueden considerarse compuestos que contienen uno o varios grupos protectores especializados no tóxicos usados de forma transitoria para alterar o eliminar una propiedad del compuesto. En un aspecto general, el enfoque del "profármaco" se usa para facilitar la absorción oral. Se proporciona un análisis minucioso en T. Higuchi y V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems* vol. 14 de A.C.S. Symposium Series; y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

En el presente documento, también se describe un método para producir una composición farmacéutica para la "terapia de combinación" que comprende mezclar al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones del compuesto divulgadas en el presente documento, junto con al menos un agente farmacéutico conocido como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## HIDRATOS y SOLVATOS

Se entiende que cuando la expresión "sales farmacéuticamente aceptables, solvatos e hidratos" se usa cuando se hace referencia a una fórmula particular en el presente documento, se pretende incluir los solvatos y/o hidratos de los compuestos de la fórmula particular, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula particular, así como los solvatos y/o hidratos de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula particular.

El Compuesto A puede administrarse en una amplia diversidad de formas farmacéuticas orales y parenterales. Será evidente para los expertos en la materia que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender, como componente activo, el Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato o hidrato del mismo. Asimismo, diferentes hidratos y solvatos del Compuesto A y sus sales encontrarán uso como productos intermedios en la fabricación de las composiciones farmacéuticas. Los procedimientos habituales para fabricar e identificar solvatos e hidratos adecuados, además de aquellos mencionados en el presente documento, serán bien conocidos por los expertos en la materia; véase, por ejemplo, páginas 202-209 de K.J. Guillory, "Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids", en: *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, ed. Harry G. Brittan, vol. 95, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1999. En consecuencia, el Compuesto A y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en el presente documento, que se pueden aislar y caracterizar mediante métodos conocidos en la materia, tales como, análisis termogravimétrico (TGA), TGA-espectroscopía de masas, TGA-espectroscopía de infrarrojos, difracción de rayos X de polvo (XRPD), titulación de Karl-Fisher, difracción de rayos X de alta resolución y similares. Existen varias entidades comerciales que proporcionan servicios rápidos y eficaces para identificar solvatos e hidratos sobre un sistema habitual. Las compañías a modo de ejemplo que ofrecen estos servicios incluyen Wilmington PharmaTech (Wilmington, DE), Avantium Technologies (Ámsterdam) y Aptuit (Greenwich, CT).

## POLIMORFOS Y PSEUDOPOLIMORFOS

El polimorfismo es la capacidad de una sustancia de existir como dos o más fases cristalinas que tienen diferentes disposiciones y/o conformaciones de las moléculas en la red cristalina. Los polimorfismos muestran las mismas propiedades en estado líquido o gaseoso, pero se comportan de forma diferente en estado sólido.

Además de polimorfos monocompetentes, los fármacos pueden existir también como sales y otras fases cristalinas multicomponentes. Por ejemplo, los solvatos e hidratos pueden contener un hospedador de API y cualquier molécula de disolvente o agua, respectivamente, como invitados. De manera análoga, cuando el compuesto invitado es un sólido a temperatura ambiente, la forma resultante se denomina con frecuencia un cocrystal. Las sales, solvatos, hidratos y cocristales también pueden mostrar polimorfismo. Las fases cristalinas que comparten el mismo hospedador

de API, pero que difieren con respecto a sus invitados, pueden denominarse pseudopolimorfos entre sí.

Los solvatos contienen moléculas del disolvente de cristalización en una red cristalina clara. Los solvatos, en los que el disolvente de cristalización es agua, se denominan hidratos. Debido a que el agua es un constituyente de la atmósfera, los hidratos de fármacos se pueden formar con bastante facilidad.

A modo de ejemplo, Stahly publicó recientemente cribado de polimorfos de 245 compuestos que consisten en una "amplia diversidad de tipos estructurales" que reveló que aproximadamente el 90 % de ellos exhibían múltiples formas sólidas. En conjunto, aproximadamente la mitad de los compuestos eran polimórficos, teniendo con frecuencia de una a tres formas. Aproximadamente un tercio de los compuestos formaron hidratos, y aproximadamente un tercio formaron solvatos. Los datos de los cribados de cocristales de 64 compuestos mostraron que el 60 % formaron cocristales distintos a hidratos o solvatos. (G. P. Stahly, *Crystal Growth & Design* (2007), 7(6), 1007-1026).

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de los compuestos

La preparación del Compuesto A, se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2010/002360, publicada como publicación internacional N.º WO2011/025541.

La preparación de formas cristalinas del Compuesto A, incluyendo la forma cristalina anhidra no solvatada, se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2012/026506, publicada como publicación internacional N.º WO2012/116276.

### Ejemplo 2: Fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF®) Ensayo para medición directa de AMPc

#### A: Ensayo de CB<sub>2</sub>

Se cribaron compuestos para agonistas y agonistas inversos del receptor CB<sub>2</sub> (por ejemplo, el receptor CB<sub>2</sub> humano) usando el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc (Gabriel et al., *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1:291-303, 2003) en células CHO-K1 recombinantes transfectadas de forma estable con el receptor CB<sub>2</sub>. Las células CHO-K1 se adquirieron en la ATCC® (Manassas, VA; N.º de catálogo CCL-61). Se detectó un agonista del receptor CB<sub>2</sub> en el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc como un compuesto que disminuyó la concentración de AMPc. Se detectó un agonista inverso del receptor CB<sub>2</sub> en el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc como un compuesto que aumentó la concentración de AMPc. El ensayo HTRF® también se usó para determinar los valores de CE<sub>50</sub> para los agonistas y los agonistas inversos del receptor CB<sub>2</sub>.

#### B: Ensayo de CB<sub>1</sub>

También se cribaron compuestos para agonistas y agonistas inversos del receptor CB<sub>1</sub> (por ejemplo, el receptor CB<sub>1</sub> humano) usando el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc (Gabriel et al., *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1:291-303, 2003) en células CHO-K1 recombinantes transfectadas de forma estable con el receptor CB<sub>1</sub>. Las células CHO-K1 se adquirieron en la ATCC® (Manassas, VA; N.º de catálogo CCL-61). Se detectó un agonista del receptor CB<sub>1</sub> en el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc como un compuesto que disminuyó la concentración de AMPc. Se detectó un agonista inverso del receptor CB<sub>1</sub> en el ensayo HTRF® para la medición directa de AMPc como un compuesto que aumentó la concentración de AMPc. El ensayo HTRF® también se usó para determinar los valores de CE<sub>50</sub> para los agonistas y los agonistas inversos del receptor CB<sub>1</sub>.

**Principio del ensayo:** El kit de ensayo HTRF® se adquirió de Cisbio-US, Inc. (Bedford, MA; N.º de catálogo 62AM4PEC). El ensayo HTRF® respaldado por el kit es un inmunoensayo competitivo entre el AMPc endógeno producido por las células CHO-K1 y el marcador AMPc marcado con el tinte d2. La unión del marcador se visualiza mediante un anticuerpo monoclonal anti-AMPc marcado con Criptato. La señal específica (es decir, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, FRET) es inversamente proporcional a la concentración de AMPc sin marcar en el patrón o la muestra.

**Curva patrón:** La relación de fluorescencia (665 nm/620 nm) de los patrones (AMPc de 0,17 a 712 nM) incluidos en el ensayo se calculó y se usó para generar una curva patrón de AMPc de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. La relación de fluorescencia de las muestras (compuesto de ensayo o tampón de compuesto) se calculó y se usó para deducir las concentraciones respectivas de AMPc por referencia a la curva patrón de AMPc.

**Configuración del ensayo:** El ensayo HTRF® se llevó a cabo usando un protocolo de dos pasos esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit, en 20 µl de volumen total por pocillo en formato de placa de 384 pocillos (ProxiPlates; PerkinElmer, Fremont, CA; n.º de catálogo 6008280). A cada uno de los pocillos experimentales se transfirieron 1.500 células CHO-K1 recombinantes en 5 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía cloruro cálcico y cloruro de magnesio (PBS+; Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de catálogo 14040) seguido del compuesto de prueba en 5 µl de tampón de ensayo (PBS+ suplementado con BSA al 0,2 %, forskolina 4 µM e

IBMX 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; n.º de catálogo A8806, F6886 y I5879, respectivamente). A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadieron a cada pocillo 5 µl de cAMP-d2 conjugado en tampón de lisis y 5 µl de conjugado de criptato en tampón de lisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. A continuación, la placa se incubó además a temperatura ambiente durante 1 h, después de lo cual se leyó la placa de ensayo.

**Lectura del ensayo:** La lectura de HTRF® se consiguió usando un lector de microplacas PHERAstar (BMG Labtech Inc., Durham, NC) o EnVision™ (Perkin Elmer, Fremont CA).

- 10 Determinados compuestos descritos en el presente documento y sus correspondientes valores de CE<sub>50</sub> se muestran en la **Tabla A-1**.

**Tabla A-1**  
(Un asterisco (\*) denota un compuesto de referencia.)

N.º de Compuesto	CE <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> (nM)
269*	NR	809
332*	NR	2,0
340*	NR	6,28
368*	354,4	35,04
408*	26.900	75,8
632*	NR	0,966
634*	1,1	0,170
NR = No respuesta		

- 15 Determinados otros compuestos descritos en el presente documento tenían valores de CE<sub>50</sub> de hCB<sub>1</sub> que variaban entre aproximadamente 279 pM y aproximadamente 76,47 µM en este ensayo y valores de CE<sub>50</sub> de hCB<sub>2</sub> que variaban entre aproximadamente 170 pM y aproximadamente 44,72 µM en este ensayo. Determinados otros compuestos descritos en el presente documento tenían valores de CE<sub>50</sub> de hCB<sub>2</sub> que variaban entre aproximadamente 94 pM y aproximadamente 2,7 nM en este ensayo.

- 20 Determinados compuestos descritos en el presente documento y sus correspondientes valores de CE<sub>50</sub> se muestran en la **Tabla A-2**.

**Tabla A-2**  
(Un asterisco (\*) denota un compuesto de referencia.)

N.º de Compuesto	CE <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> (nM)	N.º de Compuesto	CE <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> (nM)
151*	72.500	3,83	698*	NR	10,2
174*	NR	38,2	699	9.770	0,4
264*	NR	10,1	700*	NP	3,14
309*	NR	19	704*	NP	0,2
493*	NR	3,98	764*	NP	0,5
515*	NR	4,32	765*	NP	0,1
593*	NR	7,15	820*	NP	2,62
625*	NR	4,45	821*	NP	0,6
642*	NR	4,38	841*	NP	1,4
644*	NR	0,7	919*	NP	0,2
667*	195	0,3	921*	NP	0,2
684*	NR	7,08	924*	NP	0,8
690*	NR	1,79			
696*	NR	6,89	926*	NP	0,2
NR = No respuesta; NP = No probado					

### Ejemplo 3: Ensayo PathHunter de β-arrestina

#### A: Ensayo de CB<sub>2</sub>

- 30 Los compuestos se cribaron en busca de agonistas del receptor CB<sub>2</sub> humano usando el ensayo PathHunter de DiscoverRx de β-arrestina que mide la unión de β-arrestina al receptor CB<sub>2</sub> tras su activación. CB<sub>2</sub> se clonó en el vector pCMV-PK (DiscoverRx, Fremont, CA; n.º de catálogo 93-0167) y se transfectó en la línea celular parental CHO-K1 EA-Arrestina (DiscoverRx, Fremont, CA; n.º de catálogo 93-0164). Los clones positivos CHO-K1 que expresan establemente la proteína de fusión CB<sub>2</sub>-ProLink se identificaron por sus respuestas al agonista de CB<sub>2</sub> CP55.940. El clon n.º 61 se eligió por su gran ventana de agonistas y su expresión homogénea detectada por citometría de flujo anti-HA.



**Principio del ensayo:** El ensayo PathHunter de arrestina mide la interacción de la  $\beta$ -arrestina con los GPCR activados mediante la complementación de fragmentos enzimáticos (Yan et al., *J. Biomol. Screen.* 7: 451-459, 2002). Un pequeño fragmento de  $\beta$ -galactosidasa de 42 aminoácidos, Prolink, se fusiona con el extremo c de un GPCR y la  $\beta$ -arrestina se fusiona con el fragmento más grande de  $\beta$ -galactosidasa, EA (Aceptor enzimático). La unión de la  $\beta$ -arrestina al GPCR activado provoca la complementación de los dos fragmentos enzimáticos, formando una enzima  $\beta$ -galactosidasa activa que puede medirse usando el kit quimioluminiscente PathHunter Flash Detection (DiscoverRx, Fremont, CA: n.º de catálogo 93-0001).

**El ensayo:** Las células CHO-K1 estables que expresan la proteína de fusión CB<sub>2</sub>-Prolink se sembraron durante la noche en placas de 384 pocillos (Optiplate 384-Plus, PerkinElmer, Fremont CA; n.º de catálogo 6007299) a 5.000 células/5  $\mu$ l/pocillo en el medio Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de catálogo 31985088) con FBS al 1 %. Se transfirieron 5  $\mu$ l del compuesto de prueba diluido en Opti-MEM suplementado con BSA al 1 % a cada pocillo de la Optiplate. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante dos horas. 12  $\mu$ l de sustrato preparado a partir del Kit de detección PathHunter Flash (DiscoverRx, Fremont, CA: n.º de catálogo 93-0001) se transfirieron a cada pocillo del Optiplate. A continuación, la placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h, después de lo cual se leyó la placa de ensayo.

**Lectura del ensayo:** La lectura del ensayo de  $\beta$ -arrestina se realizó usando un lector de microplacas PHERAstar (BMG Labtech Inc., Durham, NC) o un EnVision™ (PerkinElmer, Fremont CA).

#### B: Ensayo de CB<sub>1</sub>

Los compuestos se cribaron en busca de agonistas del receptor CB<sub>1</sub> humano usando el ensayo PathHunter de DiscoverRx de  $\beta$ -arrestina que mide la unión de  $\beta$ -arrestina al receptor CB<sub>1</sub> tras su activación. CB<sub>1</sub> se clonó en el vector pCMV-PK (DiscoverRx, Fremont, CA; n.º de catálogo 93-0167) y se transfectó en la línea celular parental CHO-K1 EA-Arrestina (DiscoverRx, Fremont, CA; n.º de catálogo 93-0164). Los clones positivos CHO-K1 que expresan establemente la proteína de fusión CB<sub>1</sub>-ProLink se identificaron por sus respuestas al agonista de CB<sub>1</sub> CP55.940. El clon n.º 3 se eligió por su gran ventana de agonistas y su expresión homogénea detectada por citometría de flujo anti-HA

**Principio del ensayo:** El ensayo PathHunter de  $\beta$ -arrestina mide la interacción de la  $\beta$ -arrestina con los GPCR activados usando la complementación de fragmentos enzimáticos (Yan et al., *J. Biomol. Screen.* 7: 451-459, 2002). Un pequeño fragmento de  $\beta$ -galactosidasa de 42 aminoácidos, Prolink, se fusiona con el extremo c de un GPCR y la  $\beta$ -arrestina se fusiona con el fragmento más grande de  $\beta$ -galactosidasa, EA (Aceptor enzimático). La unión de la  $\beta$ -arrestina al GPCR activado provoca la complementación de los dos fragmentos enzimáticos, formando una enzima  $\beta$ -galactosidasa activa que puede medirse usando el kit quimioluminiscente PathHunter Flash Detection (DiscoverRx, Fremont, CA: n.º de catálogo 93-0001).

**El ensayo:** Las células CHO-K1 estables que expresan la proteína de fusión CB<sub>1</sub>-Prolink se sembraron durante la noche en placas de 384 pocillos (Optiplate 384-Plus, PerkinElmer, Fremont CA; n.º de catálogo 6007299) a 5.000 células/5  $\mu$ l/pocillo en el medio Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA; n.º de catálogo 31985088) con FBS al 1 %. Se transfirieron 5  $\mu$ l del compuesto de prueba diluido en Opti-MEM suplementado con BSA al 1 % a cada pocillo de la Optiplate. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante dos h. 12  $\mu$ l de sustrato preparado con el Kit de detección PathHunter Flash (DiscoverRx, Fremont, CA: n.º de catálogo 93-0001) se transfirieron a cada pocillo del Optiplate. A continuación, la placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h, después de lo cual se leyó la placa de ensayo.

**Lectura del ensayo:** La lectura del ensayo de  $\beta$ -arrestina se realizó usando un lector de microplacas PHERAstar (BMG LABTECH Inc., Durham, NC) o EnVision™ (PerkinElmer, Fremont CA).

Determinados compuestos descritos en el presente documento y sus correspondientes valores de CE<sub>50</sub> se muestran en la **Tabla B-1**.

**Tabla B-1**

(Un asterisco (*) denota un compuesto de referencia.)		
N.º de Compuesto	CE <sub>50</sub> hCB <sub>1</sub> (nM)	CE <sub>50</sub> hCB <sub>2</sub> (nM)
631*	NR	107,7
633*	NR	3,20
673*	1.009	0,6437
711*	NR	28,1
728*	251,1	1,1
NR = No respuesta		

Determinados otros compuestos descritos en el presente documento tenían valores de CE<sub>50</sub> de hCB<sub>1</sub> que variaban

entre aproximadamente 2,6 nM y aproximadamente 89,06  $\mu$ M en este ensayo y valores de  $CE_{50}$  de  $hCB_2$  que variaban entre aproximadamente 643 pM y aproximadamente 7  $\mu$ M en este ensayo. Determinados otros compuestos descritos en el presente documento tenían valores de  $CE_{50}$  de  $hCB_1$  que variaban entre aproximadamente 10,9 nM y aproximadamente 100  $\mu$ M en este ensayo y valores de  $CE_{50}$  de  $hCB_2$  que variaban entre aproximadamente 384 pM y aproximadamente 100  $\mu$ M en este ensayo.

Determinados compuestos descritos en el presente documento y sus correspondientes valores de  $CE_{50}$  se muestran en la **Tabla B-2**.

**Tabla B-2**

(Un asterisco (\*) denota un compuesto de referencia.)

N.º de Compuesto	$CE_{50}$ $hCB_1$ (nM)	$CE_{50}$ $hCB_2$ (nM)	N.º de Compuesto	$CE_{50}$ $hCB_1$ (nM)	$CE_{50}$ $hCB_2$ (nM)
151"	NR	92,1	767*	NR	66,6
174"	NR	167	820*	NR	38,4
309"	NP	136	821*	NR	7,12
493"	NR	63,6	828*	NP	4,14
593"	1.330	34,6	841*	1.140	17,5
625*	NR	11,8	848*	NR	50
642*	NR	26,4	889*	4.070	8,6
644*	4.470	4,69	891*	11.800	16,2
646*	NR	925	896*	NR	43,5
667*	145	1,53	897*	951	3,79
683*	NR	3.000	902*	NR	77,5
684*	NR	59	904*	NR	31,4
690*	NR	31	912*	NP	9,49
696*	NR	49,4	913*	NR	105
698*	NR	27,9	918*	437	1,01
699	NR	6,36	919*	NR	2,35
700*	NR	31,5	920*	NP	4,6
703*	NR	603	921*	NR	2,59
704*	228	0,8	924*	NR	10,5
722*	NR	34	926*	NR	4,43
746*	142	0,7	927*	NR	9,39
764*	NR	5,92	930*	NR	17
765*	NR	1,16	931*	NR	20,8
766*	NR	4,57			

NR = No respuesta; NP = No probado

#### Ejemplo Comparativo 4: Ensayo de unión a radioligandos

**Preparación de membranas:** Las células HEK293 que expresan establemente el receptor  $CB_2$  humano se recogieron, se lavaron en PBS enfriado con hielo y se centrifugaron a 48.000 xg durante 20 min a 4 °C. A continuación, se recogió el sedimento, se resuspendió en tampón de lavado (HEPES 20 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM), se homogeneizó en hielo usando un Brinkman Polytron y se centrifugó a 48.000 x g durante 20 min a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en HEPES 20 mM enfriado con hielo, pH 7,4, se homogeneizó de nuevo en hielo, se recentrifugó durante 20 min a 4 °C y, a continuación, los gránulos de membrana se almacenaron a -80 °C hasta que se necesitaron.

**Ensayos de unión a radioligandos [ $^3H$ ]CP55.940 y [ $^3H$ ]WIN55.212-2:** Los ensayos de unión a radioligandos para los receptores  $CB_2$  humanos se realizaron usando dos radioligandos agonistas diferentes, [ $^3H$ ]CP55.940 y [ $^3H$ ]WIN55.212-2 y condiciones de ensayo similares. Para ambos ensayos, la unión no específica se determinó en presencia de compuesto sin marcar 10 mM. Los experimentos de competición consistieron en la adición de 20 ml de tampón de ensayo (Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 2,5 mM,  $MgCl_2$  5 mM y 0,5 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos) que contiene el compuesto de prueba (concentraciones que van de 1 pM a 100  $\mu$ M), 25  $\mu$ l de radioligando (concentración de ensayo final 1 nM para [ $^3H$ ]CP55.904 y [ $^3H$ ]WIN55.212-2) y 50 ml de membranas (20 mg/ml de proteína final para ambos ensayos). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas de ensayo se filtraron a presión reducida sobre filtros GF/B, se lavaron con tampón de ensayo y se secaron durante la noche en un horno a 50 °C. A continuación, se añadieron 25  $\mu$ l de cóctel de centelleo BetaScint a cada pocillo y las placas se leyeron en un contador de centelleo Packard TopCount.

Determinados compuestos descritos en el presente documento y sus correspondientes valores  $K_i$  se muestran en la **Tabla C**.

Tabla C

(Un asterisco (*) denota un compuesto de referencia.)		
N.º de Compuesto	K <sub>i</sub> hCB <sub>1</sub> (nM)	K <sub>i</sub> hCB <sub>2</sub> (nM)
64*	207	97,6
629*	NR	97,7
701*	105,1	1,45
752*	568,4	58,7
755*	1.200	3,8
NR = No respuesta		

Determinados otros compuestos descritos en el presente documento tenían valores de K<sub>i</sub> de hCB<sub>1</sub> que variaban entre aproximadamente 124 nM y aproximadamente 19,36 µM en este ensayo y valores de K<sub>i</sub> de hCB<sub>2</sub> que variaban entre aproximadamente 3,22 nM y aproximadamente 4,69 µM en este ensayo.

#### Ejemplo Comparativo 5: Efecto de los compuestos sobre el dolor de la osteoartritis

La inyección de yodoacetato monosódico (MIA) en una articulación (Kalbhen, 1987) inhibe la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en los condrocitos, dando como resultado la interrupción de la glucólisis y finalmente la muerte celular. La pérdida progresiva de condrocitos da como resultado cambios histológicos y morfológicos del cartílago articular, muy parecidos a los observados en pacientes con osteoartritis.

La osteoartritis se indujo en ratas macho Sprague Dawley de 200 g. Después de una breve anestesia con isoflurano, las ratas recibieron una única inyección intraarticular de MIA (2 mg) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.; n.º de cat 19148) disuelto en solución salina estéril al 0,9 % en un volumen de 50 µl administrado a través del ligamento de la rótula en el espacio articular de la rodilla izquierda con una aguja de 30G. Después de la inyección, se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia antes de ser devueltos al vivero del alojamiento principal.

Normalmente, durante la progresión de la enfermedad, hubo un período de inflamación de 0-7 días después de la inyección intraarticular seguido de una degeneración progresiva del cartílago y del hueso subcondral desde los días 14-55. Los estudios de eficacia con un compuesto descrito en el presente documento para el desarrollo del dolor se realizaron a partir del día 14 y se realizaron dos veces por semana con al menos 3 días de lavado entre cada ensayo. Se usaron tres ensayos diferentes para medir el dolor. La alodinia táctil se midió mediante el ensayo de von Frey, la distribución del peso de las patas traseras se monitorizó usando un probador de incapacidad (Columbus Instruments, Columbus, OH, EE. UU.) y la fuerza de agarre de las patas traseras se midió con un medidor de fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH, EE. UU.). Brevemente, el ensayo de von Frey se realizó usando el método convencional de arriba hacia abajo con filamentos de von-Frey. La distribución del peso de las patas traseras se determinó colocando ratas en una cámara de modo que cada pata trasera descansase sobre una placa de fuerza separada del probador de incapacidad. La fuerza ejercida por cada pata trasera (medida en gramos) se promedia durante un período de 3 segundos. Se tomaron tres medidas para cada rata y se calculó el cambio en la distribución del peso de las patas traseras. La fuerza máxima de agarre de las patas traseras se realizó registrando la fuerza de compresión máxima ejercida en el conjunto de manómetro de malla de las patas traseras establecido en el medidor de fuerza de agarre. Durante la prueba, se inmovilizó cada rata y se dejó que la pata de la rodilla inyectada agarrara la malla. A continuación, se empujó al animal en un movimiento hacia arriba hasta que se rompió su agarre. Cada rata se prueba 3 veces, usando la pata contralateral como control.

Los animales se sometieron a línea de base antes del tratamiento del compuesto de ensayo. A continuación, a los grupos de ratas tratados con MIA (6 por grupo) se les administró una dosis de cualquier vehículo (PEG400, por vía oral), Compuesto de referencia **493** (a 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, por vía oral) o con morfina (3 mg/kg, por vía subcutánea). El volumen de dosis fue de 500 µl. Una hora después de la dosificación, se realizaron un ensayo de von Frey, un análisis de la distribución del peso de las patas traseras y/o de agarre de las patas traseras, para medir la eficacia del compuesto de prueba. El aumento del umbral de retirada de la pata (PWT) por el Compuesto de referencia **493** en comparación con el vehículo que se muestra en la Figura 2 era indicativo de que el compuesto de prueba mostraba eficacia terapéutica en el modelo MIA de osteoartritis.

#### Ejemplo Comparativo 6: Efectos de los compuestos en el modelo de incisión en la piel en ratas

El dolor postoperatorio se produjo por una incisión de 1 cm de la piel y el músculo de la superficie plantar de la pata trasera de la rata como se describe (Brennan et al., 1996), con modificaciones menores. Para la cirugía, se anestesiaron ratas que pesaban entre 200 y 300 g con isoflurano al 2 %. La superficie plantar de la pata trasera derecha se preparó de forma estéril con una solución de povidona yodada al 10 %. Se realizó una incisión longitudinal de 1 cm con un bisturí del número 11, a través de la piel y la fascia de la faceta plantar de la pata, comenzando en el medio de la pata y extendiéndose hacia el talón. El músculo plantar se elevó y se incidió longitudinalmente. Después de la hemostasia con presión suave, la piel se volvió a unir con 2 suturas de nylon 5-0. Se dejó que los animales se recuperaran individualmente en sus jaulas con lecho limpio.

Dos o tres horas después de la cirugía, los animales fueron tratados con el compuesto de ensayo. El Compuesto de referencia **493** se dosificó por vía oral a 30 mg/kg. La alodinia táctil se evaluó con cabello de von Frey calibrado para doblarse a pesos específicos (0,4, 1, 2, 4, 6, 8, 15 g para animales que pesaban menos de 250 g; 1, 2, 4, 6, 8, 15, 26 g para animales que pesaban 250 g o más en algunos experimentos). Las regiones adyacentes a la incisión en la superficie plantar media se probaron primero para evaluar los puntos sensibles con una fuerza de von Frey de 8 g. Si no hubo respuesta de retirada, se usó la siguiente fuerza más alta (15 g) hasta que no hubo respuesta a la fuerza más alta (26 g para ratas que pesaban 250 g o más, 15 g para ratas que pesaban menos de 250 gramos). Una vez que se identificó el punto de respuesta, a continuación, se determinó el umbral de retirada del 50 % usando el método arriba/abajo (Chaplan et al., 1994). Cada prueba comenzaba con una fuerza de von Frey de 2 g, si no había respuesta de retirada, se suministraba la siguiente fuerza superior. Si había una respuesta, se suministraba la siguiente fuerza inferior. Este procedimiento se realizó hasta que no hubo respuesta a la fuerza más alta (15 g o 26 g dependiendo del tamaño del animal) o hasta que se administraron cuatro estímulos después de la respuesta inicial. A continuación, se calculó el umbral de retirada de la pata (PWT) del 50 % como se describe en Chaplan et al., 1994 (Chaplan S. R., Bach F. W., Pogrel J. W., Chung J. M., Yaksh T. L.: Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neuroscience Methods* 1994, 531(1):1022-1027). La Figura 4 muestra la respuesta al dolor de los animales tratados con el Compuesto de referencia **493** (dosis oral de 30 mg/kg) en comparación con el vehículo y la indometacina (dosis de 30 mg/kg).

#### **Ejemplo Comparativo 7: Efecto de los compuestos sobre la hiperalgesia inducida por FCA en ratas**

**Información de animales:** Se usaron ratas macho Sprague Dawley de Harlan (200-225 g cuando se recibieron). A la llegada, las ratas se alojaron 4 por jaula en jaulas de policarbonato de caja de zapatos con tapas de alambre, lechos de astillas de madera y botellas de agua y comida suspendidas. Los animales se aclimataron durante 5 a 7 días antes de inyectarlos con adyuvante completo de Freund (FCA) (Sigma; n.º de catálogo 5881).

**Procedimiento experimental:** 2 días (48 h) antes de probar los compuestos, las lecturas de referencia de todas las ratas se tomaron justo antes de la inyección de FCA. A continuación, las ratas se inyectaron con 50 µl de FCA que contenía 1 mg/ml de Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) en la almohadilla de la pata trasera derecha bajo anestesia por inhalación (isoflurano). 48 horas después de la inyección de FCA, las lecturas se tomaron como valor de referencia de predosificación y después se dosificó a las ratas por vía oral con 0,5 ml de vehículo o compuesto (0,5 ml por rata de 250 g). Las lecturas se tomaron de nuevo 1 h después de la dosificación. Todas las lecturas se tomaron con un medidor de analgesia (Ugo Basile) que mide la hiperalgesia mecánica a través de la presión de la pata.

**Puntuación clínica:** La hiperalgesia inducida por FCA se probó con un medidor de analgesia. Brevemente, el medidor de analgesia aplicó una presión creciente a la pata trasera derecha. El umbral de retirada de la pata era la presión que conducía a la retirada.

**Tratamiento farmacológico:** 48 horas después de la inyección de FCA, se tomaron las lecturas del valor de referencia antes de la dosificación de los compuestos y, a continuación, se dosificó a las ratas por vía oral con vehículo (PEG400) o Compuesto de referencia **493** a 0,1, 1, 3, 10 y 30 mg/kg. Mientras tanto, a un grupo de ratas se les dosificó por vía oral 50 mg/kg de diclofenaco como control positivo. Las lecturas se tomaron de nuevo 1 h después de la dosificación. El volumen de dosificación fue de 500 µl por rata de 250 g. Como es evidente a partir de la Figura 1, un aumento en el umbral de retirada de pata (PWT) para el Compuesto de referencia **493** en comparación con el vehículo indica que el Compuesto de referencia **493** presentó eficacia terapéutica en el modelo de hiperalgesia inducida por FCA de dolor inflamatorio 1 hora después de la dosificación.

#### **Ejemplo Comparativo 8: Alodinia inducida por paclitaxel en ratas Sprague Dawley**

El inhibidor mitótico, paclitaxel (Taxol®) es uno de los agentes quimioterapéuticos más eficaces y de uso frecuente para el tratamiento de tumores sólidos, así como de cáncer de ovario y de mama. Sin embargo, la terapia a menudo se asocia a los efectos secundarios no deseados de la neuropatía periférica dolorosa.

**Animales:** Ratas macho Sprague Dawley [200-250 g] (Harlan Laboratories Inc., Livermore, CA) se alojaron tres por jaula y se mantuvieron en una instalación con control de humedad (40-60 %) y temperatura controlada (20-22,22 °C [68-72 °F]) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h:12 h (luces encendidas a las 6:30 am) con libre acceso a alimentos (Harlan Teklad, Orange, CA, Dieta para roedores 8604) y agua. A las ratas se les dejó una semana de aclimatación a las instalaciones para animales antes de comenzar el tratamiento.

**Inducción de alodinia:** Las ratas se trataron por vía intraperitoneal, con 2 mg/kg de paclitaxel (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) en vehículo Cremophor al 10 % (500 µl) los días 0, 2, 4 y 6.

**Puntuación clínica:** La alodinia táctil se probó usando filamentos de von Frey. Brevemente, el ensayo de von Frey se realizó usando el método estandarizado de arriba hacia abajo con filamentos de von Frey, que determina la sensibilidad táctil de la pata. Aplicando los filamentos cada vez más o menos gruesos a la pata en una escala logarítmica de fuerza real, se determina una escala lineal de intensidad percibida.

**Tratamiento farmacológico:** Ocho días después del inicio de la dosificación de paclitaxel, se realizó una medición de referencia (ensayo de von Frey) antes de la dosificación de los compuestos. Los grupos de ratas tratados con paclitaxel (6 por grupo) se dosificaron por vía oral, con vehículo (PEG400) o 10 mg/kg de Compuesto de referencia **493**. Como control positivo, a las ratas se les dosificó por vía intraperitoneal 100 mg/kg de gabapentina en agua. El volumen de dosificación para el tratamiento oral y peritoneal fue de 500 µl. Se realizó el ensayo de von Frey para medir la eficacia del compuesto de prueba 30, 60 y 180 minutos después de la dosificación. Un aumento en el umbral de retirada de pata (PWT) mediante el tratamiento con el Compuesto de referencia **493** en comparación con el vehículo y la gabapentina era indicativo de que el compuesto de prueba mostraba eficacia terapéutica en el modelo de paclitaxel de dolor por cáncer. El transcurso del tiempo muestra la máxima eficacia 1 hora después de la dosificación. Véase la Figura 3.

#### **Ejemplo Comparativo 9: Efectos de los compuestos sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas**

**Animales:** Se alojaron tres ratas Sprague-Dawley macho (300-400 g) por jaula y se mantuvieron en una instalación con control de humedad (30-70 %) y temperatura controlada (20-22 °C) durante 12 h: ciclo de luz/oscuridad de 12 h (encendido de luces a las 7:00 am) con libre acceso a la comida (Harlan-Teklad, Orange, CA, Dieta para roedores 8604) y agua. A las ratas se les dejó una semana de aclimatación a las instalaciones para animales antes de la prueba.

**Medición de la temperatura corporal y la actividad locomotora:** La temperatura corporal se midió usando una sonda de temperatura de rata de acero inoxidable conectada a un dispositivo de visualización de temperatura (Physitemp TH-5). La sonda se insertó por vía rectal a una profundidad de 2,54 centímetros (1 pulgada) y la lectura se registró aproximadamente 10 s después de la inserción, cuando la lectura se había estabilizado. La temperatura corporal se midió inmediatamente antes (tiempo 0) y 60 min después de la administración de los compuestos. La actividad locomotora se midió usando el sistema Hamilton-Kinder Motor Monitor, que detectó el bloqueo de los haces de las fotocélulas en una jaula de ratas estándar y transfiere estos datos a un ordenador. La actividad motora se midió durante 30 minutos comenzando inmediatamente después de la segunda medición de la temperatura corporal, de 60 a 90 min después de la administración. Los compuestos se dosificaron por vía oral en un volumen de 2 a 6 ml/kg, suspendidos o disueltos en PEG 400 al 100 %.

Las Figuras 5 a 8 mostraron los efectos de 4 compuestos diferentes sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas. Los compuestos representados en la Figura 6 y las Figuras 7 estaban inactivos en estas pruebas a dosis que oscilaban entre 1 y 100 mg/kg de PO. En la Figura 5, el compuesto disminuyó la temperatura corporal a la dosis más alta probada (100 mg/kg), no obstante, este efecto no fue estadísticamente significativo; el compuesto, sin embargo, redujo significativamente la actividad motora. En la Figura 8, el compuesto disminuyó significativamente tanto la temperatura corporal como la actividad locomotora a la dosis más alta probada (100 mg/kg).

#### **Ejemplo Comparativo 10: Efectos de los compuestos en la cirugía de ligadura del nervio espinal**

Las ratas reciben lesión nerviosa mediante ligadura estrecha de los nervios espinales L5 y L6 cerca de la columna vertebral, antes de unirse (junto con L4) para formar el nervio ciático. Para esta cirugía, los animales se colocan en anestesia general usando inhalación continua de isoflurano. La cirugía se realiza en una sala de cirugía destinada, usando instrumentos estériles, guantes quirúrgicos y procedimientos asépticos para prevenir infecciones clínicas. El sitio quirúrgico se rasura y se desinfecta con solución de yodo y alcohol. Los animales se observan continuamente para su nivel de anestesia, probando la respuesta refleja del animal al pellizco de la cola o la pata. Se usa una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal durante el procedimiento y mientras los animales se recuperan de la anestesia. Para este procedimiento, se hace una incisión en la piel sobre la espalda baja a nivel de L4-L6, y el músculo, los ligamentos y las articulaciones facetarias se separan de la columna vertebral. La ubicación correcta se confirma mediante la identificación de la pelvis y el proceso transversal L5. El transversal L5 se extrae cuidadosamente para exponer los nervios L4 y L5. L5 se engancha con cuidado (con un gancho de vidrio tirado) sin dañar L4 y se liga firmemente (sutura de seda 6-0). A continuación, L6 se ubica justo debajo del hueso pélvico, se engancha y se liga también. La herida se limpia y se cierra con suturas internas y grapas externas. A los animales se les administra una inyección postoperatoria de solución de Ringer lactado y se les devuelve a sus jaulas de origen. Se monitorizan cuidadosamente hasta que se recuperan por completo de la anestesia (definido como la capacidad de moverse sin ataxia significativa), normalmente menos de 10 min. Cualquier animal con pérdida del control motor de la pata trasera afectada (daño motor L4) se sacrifica. Los animales neuropáticos se prueban por primera vez 7-10 días después de la cirugía para detectar el comienzo de la alodinia táctil. La alodinia se observa aproximadamente 14 días después de la cirugía y persiste durante 45 a 50 días después de la cirugía. Durante este tiempo, los compuestos analgésicos se prueban para determinar su capacidad para reducir o eliminar este síntoma de dolor crónico.

#### **Ejemplo Comparativo 11: Efectos de los compuestos en la cirugía de lesión por constricción crónica**

La lesión del nervio se induce por la ligadura floja del nervio ciático. Para esta cirugía, los animales se colocan en anestesia general usando inhalación continua de isoflurano. La cirugía se realiza en una sala de cirugía destinada, usando instrumentos estériles, guantes quirúrgicos y procedimientos asépticos para prevenir infecciones clínicas. El sitio quirúrgico se rasura y se desinfecta con solución de yodo y alcohol. Los animales se observan continuamente

para su nivel de anestesia, probando la respuesta refleja del animal al pellizco de la cola o la pata y monitorizando de cerca la respiración del animal. Se usa una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal mientras los animales se recuperan de la anestesia. Para este procedimiento, se hace una incisión en la piel sobre el fémur y directamente se disecciona el músculo para exponer el nervio ciático. Se colocan cuatro ligaduras sueltas (sutura absorbible de catgut crómico) alrededor del nervio y se cierra la herida con suturas internas y grapas externas. A los animales se les administra una inyección postoperatoria de solución de Ringer lactado y se les devuelve a sus jaulas de origen. Se monitorizan cuidadosamente hasta que se recuperan por completo de la anestesia (definido como la capacidad de moverse sin ataxia significativa), normalmente menos de 10 min. Los animales neuropáticos se prueban por primera vez 7-15 días después de la cirugía para detectar alodinia táctil. Durante este período de tiempo, los compuestos analgésicos se prueban en cuanto a su capacidad para reducir o eliminar estos síntomas de dolor crónico.

#### **Ejemplo Comparativo 12: Modelo de neuropatía diabética periférica dolorosa (NDPD) inducida por estreptozotocina**

A ratas Sprague-Dawley macho se les inyectó por vía intraperitoneal 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en tampón citrato sódico. Se suministró agua con sacarosa al 10 % a discreción durante las primeras 48 horas posteriores a la STZ, seguida de agua potable regular. Las ratas se monitorearon una vez por semana para determinar los niveles de glucosa en sangre y los pesos corporales. Se analizó el desarrollo de alodinia táctil a lo largo del tiempo usando filamentos de Von Frey y se determinó un umbral de retirada del 50 % mediante el procedimiento de arriba hacia abajo de Dixon. El efecto de los agonistas de CB<sub>2</sub> Compuesto **699** y Compuesto de referencia **919** sobre el umbral del dolor se evaluó en ratas diabéticas y alodínicas administrando dosis de 10 mg/kg de cualquier compuesto por vía oral en vehículo de metilcelulosa al 0,5 %. La alodinia táctil se evaluó 1, 4 y 6 horas después de la dosificación. Como se muestra en la Figura **9** y en la Figura **10**, ambos agonistas de CB<sub>2</sub> Compuesto **699** y compuesto de referencia **919** mostraron una eficacia analgésica sólida y sostenida durante 6 horas en este modelo.

#### **Ejemplo 13: Modelo de dolor visceral - Contorsión**

En los ensayos de dolor en roedores, la eficacia de algunos agonistas CB<sub>2</sub> disminuye con la administración repetida. Se usa un modelo de contorsiones para evaluar la eficacia del Compuesto **699**.

Se induce la contorsión en ratas macho Sprague Dawley mediante la administración de ácido acético glacial (1,5 %) por vía intraperitoneal (IP). A las ratas se les administra vehículo (PO o IP), Compuesto **699** (3, 10 o 30 mg/kg) (0,5 % MC) (PO), rimonabant (10 mg/kg) (PO) (un antagonista del receptor CB<sub>1</sub>), AM630 (10 mg/kg) (VO) o morfina (1 mg/kg) (IP) durante cuatro días. El día de la prueba, las ratas se colocan en jaulas de observación y se les administra el compuesto de acuerdo con los programas de las Tablas D, F, H y J. Los grupos de tratamiento se proporcionan en las tablas E, G, I y K.

Se realizan estudios para evaluar la evaluación de la dosis única (Tablas D y E), el mantenimiento de la eficacia después de la administración repetida (Tablas F y G), las interacciones antagonistas (Tablas H e I), y la respuesta a la dosis (Tablas J y K).

**Tabla D**

Tiempo (min)	Actividad
0	Ratas colocadas en jaulas de observación
60	Vehículo, morfina o Compuesto <b>699</b> administrado
80	Vehículo o ácido acético administrado (1,5 %, 2 ml/kg)
100-130	Observación de contorsiones y puntuación

**Tabla E**

<b>Grupo 1 (n = 4)</b>
Vehículo IP
Ácido acético 0,5 %
Ácido acético 1 %
Ácido acético 2 %
<b>Grupo 2 (n = 4)</b>
Vehículo IP/Vehículo IP
Ácido acético (1,5 %)/Vehículo IP
Ácido acético (1,5 %)/Morfina (1 mg/kg)
<b>Grupo 3 (n = 4)</b>
Ácido acético (1,5 %)/Vehículo PO
Ácido acético (1,5 %)/Compuesto <b>699</b> (30 mg/kg)
Ácido acético (1,5 %)/Morfina (1 mg/kg)

Tabla F

Tiempo (min)	Actividad
0	Ratas colocadas en jaulas de observación
60	Vehículo, morfina o compuesto 699 administrado
80	Vehículo o ácido acético administrado (1,5 %, 2 ml/kg)
100-130	Observación de contorsiones y puntuación

Tabla G

Grupo (n = 4)	Subcrónica (4 días BID)	Agudo 1	Agudo 2
1	Vehículo PO	Vehículo IP	Vehículo PO
2	Vehículo PO	Ácido acético	Vehículo PO
3	Vehículo PO	Ácido acético	Compuesto 699
4	Vehículo PO	Ácido acético	Morfina
5	Compuesto 699	Ácido acético	Vehículo PO
6	Compuesto 699	Ácido acético	Compuesto 699
7	Morfina	Ácido acético	Vehículo PO
8	Morfina	Ácido acético	Morfina

Tabla H

Tiempo (min)	Actividad
0	Ratas colocadas en jaulas de observación
60	Vehículo o antagonistas administrados
90	Vehículo, morfina o compuesto <b>699</b> administrado
110	Vehículo o ácido acético administrado (1,5 %, 2 ml/kg)
130-160	Observación de contorsiones y puntuación

Tabla I

Grupo (n = 6)			
1	Vehículo PO	Vehículo PO	Vehículo IP
2	Vehículo PO	Vehículo PO	Ácido acético
3	Vehículo PO	Morfina	Ácido acético
4	Vehículo PO	Compuesto <b>699</b> (10 mg/kg)	Ácido acético
5	Vehículo PO	Compuesto <b>699</b> (30 mg/kg)	Ácido acético
6	Rimonabant	Vehículo PO	Ácido acético
7	Rimonabant	Compuesto <b>699</b> (10 mg/kg)	Ácido acético
8	Rimonabant	Compuesto <b>699</b> (30 mg/kg)	Ácido acético
9	AM630	Vehículo PO	Ácido acético
10	AM630	Compuesto <b>699</b> (10 mg/kg)	Ácido acético
11	AM630	Compuesto <b>699</b> (30 mg/kg)	Ácido acético

Tabla J

Tiempo (min)	Actividad
0	Ratas colocadas en jaulas de observación
60	Vehículo, morfina o compuesto <b>699</b> administrado
80	Solución salina o ácido acético administrado (1,5 %, 2 ml/kg)
100-130	Observación de contorsiones y puntuación

Tabla K

Grupo (n = 4)		
1	Vehículo (0,5 % MC, PO)	Solución salina
2	Vehículo (0,5 % MC, PO)	Ácido acético
3	Morfina (1 mg/kg)	Ácido acético
4	Compuesto <b>699</b> (3 mg/kg)	Ácido acético
5	Compuesto <b>699</b> (10 mg/kg)	Ácido acético
6	Compuesto <b>699</b> (30 mg/kg)	Ácido acético

El comportamiento de contorsión se puntúa cuando una rata presenta un arqueamiento de la espalda, abducción abdominal, estiramientos del cuerpo y/o extensión de las extremidades anteriores. El comportamiento de contorsión se puntúa durante 30 minutos en intervalos de tiempo de cinco minutos.

Para el estudio de la respuesta a la dosis, se colocaron ratas Sprague Dawley (350-430 g) en jaulas de observación individuales en el Tiempo 0 y se les inyectó vehículo, morfina (control positivo), o Compuesto **699** una hora después. A continuación, las ratas recibieron solución salina o ácido acético (IP) 20 minutos después de la dosis de vehículo, morfina o Compuesto **699** (Tablas J y K). El comportamiento de contorsión se evaluó 20 minutos más tarde y se registró durante 30 minutos (en intervalos de cinco minutos). Los resultados se muestran en Figuras 11 y 12.

Los datos muestran que el Compuesto **699** es eficaz en un modelo de contorsión para el dolor visceral.

#### Ejemplo 14: Modelo de dolor visceral - Colitis

Las ratas con colitis activa muestran alodinia e hiperalgesia a la distensión colorrectal después de la administración de ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS). A las ratas con colitis activa (4 días después de TNBS) inducida por TNBS intracolónico se les administra el Compuesto **699** para determinar si el Compuesto **699** reduce la respuesta al dolor visceral.

Se trataron ratas sanas dos veces al día con una sonda oral de uno de los siguientes durante cinco días: 1.) vehículo (n=11); o 2.) 30 mg/kg de Compuesto **699** (n=8). A la implantación de electrodos electromiográficos (EMG) abdominales le sigue la medición de la respuesta visceromotora (RVM) a 0, 20, 40, 60 y 80 mmHg de distensión colorrectal el día 4. También se determina el efecto de cada tratamiento sobre la conformidad colónica.

Las ratas con colitis inducida se trataron dos veces al día con una sonda oral de uno de los siguientes durante cinco días, comenzando 1 día antes de la administración de TNBS: 1.) vehículo (n=12); 2.) 10 mg/kg de Compuesto **699** (n=9); o 3.) 30 mg/kg de Compuesto **699** (n=9). A la implantación del electrodo de EMG abdominal le sigue la medición de RVM a 0, 20, 40, 60 y 80 mmHg de distensión colorrectal el día 4. También se determina el efecto de cada tratamiento sobre la conformidad colónica. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Estos datos muestran que el Compuesto **699** reduce la respuesta de dolor visceral en ratas con colitis inducida por TNBS, reduciendo la hipersensibilidad colónica de manera dependiente de la dosis sin cambiar la respuesta en ratas con colon sano.

#### Ejemplo 15: Ensayo clínico

Se realiza un estudio aleatorizado, sin enmascaramiento, paralelo de Fase 2a para determinar la tolerabilidad, la farmacocinética y la eficacia del Compuesto **699** en sujetos con enfermedad de Crohn (EC) que experimentan dolor abdominal. La población del estudio consta de sujetos adultos, hombres y mujeres, de 18 a 80 años de edad a quienes se le diagnostica dolor abdominal debido a la enfermedad de Crohn inflamatoria inactiva a levemente activa, según lo definido por una puntuación de dolor abdominal promedio semanal (AAPS)  $\geq 4$ , con mínima inflamación intestinal, confirmado con una puntuación endoscópica simple (-EC)  $< 10$  o calprotectina fecal  $< 500$  mcg/g. Se pueden usar los resultados de la endoscopia obtenidos hasta un mes antes del cribado.

Los sujetos elegibles entran en un período de cribado de hasta cuatro semanas y se aleatorizan en una proporción de 1:1 en el estudio, recibiendo el Compuesto **699** en dosis orales de 25 mg tres veces al día (TID) o cápsulas de 100 mg TID durante 8 semanas. Si los sujetos experimentan síntomas de hipotensión y/o cambios en la frecuencia cardíaca durante la prueba, pueden administrarse 50 mg TID (en lugar de 100 mg TID) o 25 mg BID (en lugar de 25 mg TID).

El efecto analgésico del Compuesto **699** sobre el dolor abdominal lo puntúan los sujetos en un diario dos veces al día durante el cribado y tres veces al día durante el tratamiento usando una escala de puntuación numérica de 11 puntos de 0 (sin dolor abdominal) a 10 (el peor dolor abdominal posible). Las evaluaciones de eficacia adicionales incluyen el logro de la mejoría clínica (definida como una puntuación PRO de dos componentes (frecuencia de deposiciones y dolor abdominal) de  $< 11$ ), la respuesta clínica desde el inicio hasta la semana 8 y el cambio desde el valor de referencia



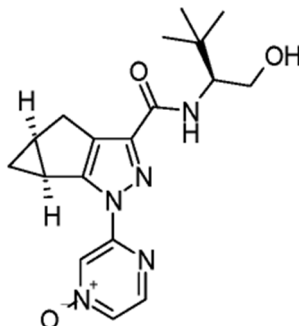
en la proteína C reactiva y la calprotectina fecal en las semanas 4 y 8.

Un objetivo clave del estudio es evaluar la tolerabilidad y la seguridad del Compuesto **699** en sujetos con enfermedad de Crohn que experimentan dolor abdominal. Los objetivos adicionales incluyen:

- 5
  - la determinación de los perfiles farmacocinéticos (PK) (incluidos los metabolitos) y los parámetros PK promedio (C<sub>max</sub>, T<sub>máx</sub>, AUC<sub>0-8</sub>);
  - el cambio en la puntuación de dolor abdominal (APS) desde antes de la dosis (mínimo) hasta 1,5 horas después de la dosis (máximo) después de la primera de las tres dosis diarias;
- 10
  - el cambio en la puntuación promedio de dolor abdominal (AAPS) desde el valor de referencia hasta la semana 8;
  - la proporción de sujetos que responden semanalmente;
  - la proporción de sujetos que responden al final del tratamiento;
  - el número de días sin dolor por semana según las respuestas a la APS;
- 15
  - el cambio en las puntuaciones del dominio de resultados comunicados por el paciente (PRO) de EC desde el valor de referencia hasta la semana 8;
  - el cambio en el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) desde el valor de referencia hasta la semana 8;
  - la frecuencia de uso de analgésicos;
  - la reducción de los niveles de proteína C reactiva (PCR) en las semanas 4 y 8;
- 20
  - el cambio en la puntuación del Cuestionario de salud del paciente-9 (PHQ-9) entre los cribados, semana 4 y semana 8; y
  - la reducción de los niveles de calprotectina fecal en la semana 4 y la semana 8.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es ((S)-1-hidroximetil-2,2-dimetilpropil)-amida del ácido (1aS,5aS)-2-(4-oxi-pirazin-2-il)-1a,2,5,5a-tetrahidro-1H-2,3-diaza-ciclopropa[a]pentalen-4-carboxílico, (Compuesto A) que tiene la estructura:



o una sal o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del mismo,

10 para su uso en un método para tratar o aliviar el dolor visceral en un paciente que necesita dicho tratamiento, en donde:

15 el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn; o  
el dolor visceral es el dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide.

2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dolor visceral es un dolor que surge de o está relacionado con la enfermedad de Crohn.

20 3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dolor visceral es un dolor que surge o está relacionado con el íleon terminal del intestino delgado, la placa de Peyer del intestino delgado o el colon sigmoide.

4. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al paciente se le administra una dosis de 10 mg a 400 mg del Compuesto A.

25 5. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al paciente se le administra una dosis de 25 mg, 50 mg o 100 mg del Compuesto A.

30 6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la dosis se administra una vez, dos veces o tres veces al día.

7. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el Compuesto A se administra en forma cristalina anhidra no solvatada.

35 8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Compuesto A muestra:

(i) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

40 un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $160,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $168,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,25 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ ;

o

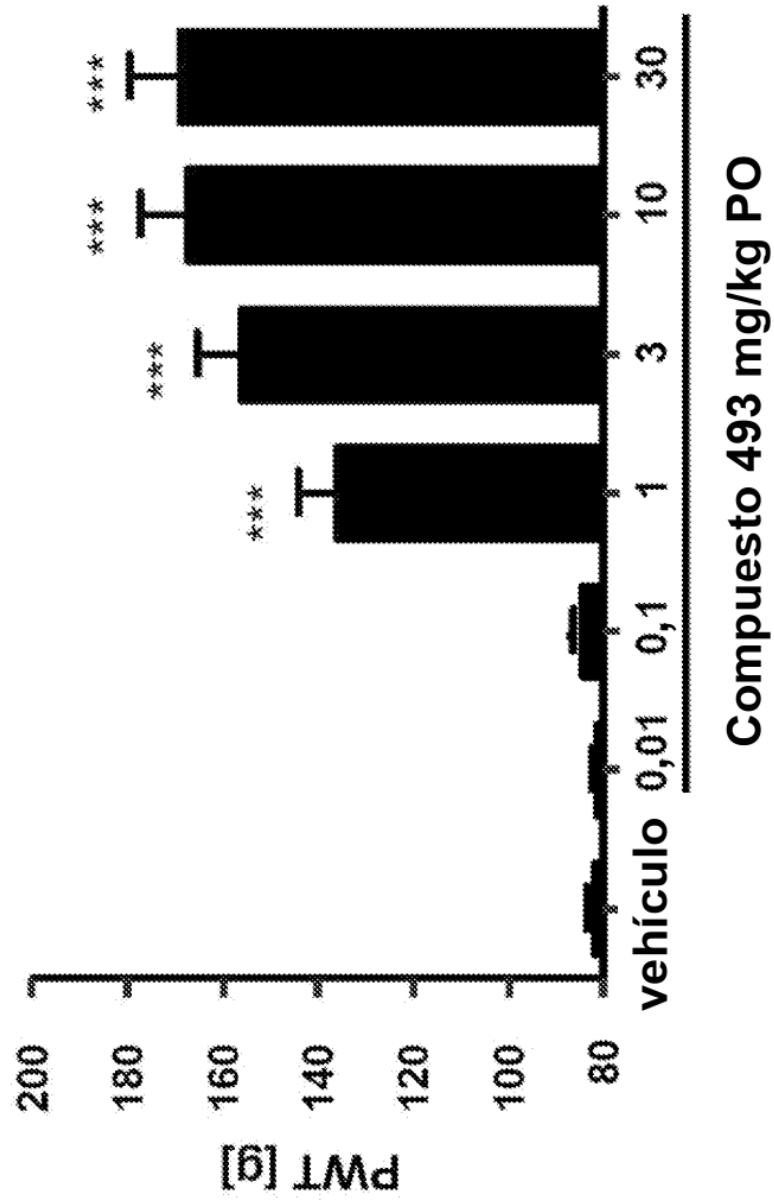
45 (ii) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ;

50 un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $162,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $166,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ ;

o

- (iii) un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ;
- 5 un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $163,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $165,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ .  
o
- 10 (iv) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ;
- 15 un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada entre aproximadamente  $163,6^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $165,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ .  
o
- 20 (v) un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos, en términos de  $2\Theta$ , a  $8,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $10,7^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $16,9^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $25,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $11,1^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $9,8^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $17,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ,  $22,1^\circ \pm 0,2^\circ$  y  $16,5^\circ \pm 0,2^\circ$ ;
- 25 un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende una endoterma con una temperatura de inicio extrapolada de aproximadamente  $164,6^\circ\text{C}$ ; y/o  
un perfil de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de aproximadamente el 0,05 % por debajo de aproximadamente  $135^\circ\text{C}$ .
9. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el Compuesto A se administra en una composición farmacéutica que comprende el Compuesto A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica comprende de 10 mg a 400 mg del Compuesto A.
- 35 11. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica comprende 25 mg, 50 mg o 100 mg del Compuesto A.
12. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la composición farmacéutica se administra una vez, dos veces o tres veces al día.

**Efecto del Compuesto 493 en el modelo de hiperalgesia inducida por FCA de dolor inflamatorio a 1 h después de la dosificación**



**Figura 1**

Efecto del Compuesto 493 en el dolor de osteoartritis inducido por MIA 1 h después de la dosificación

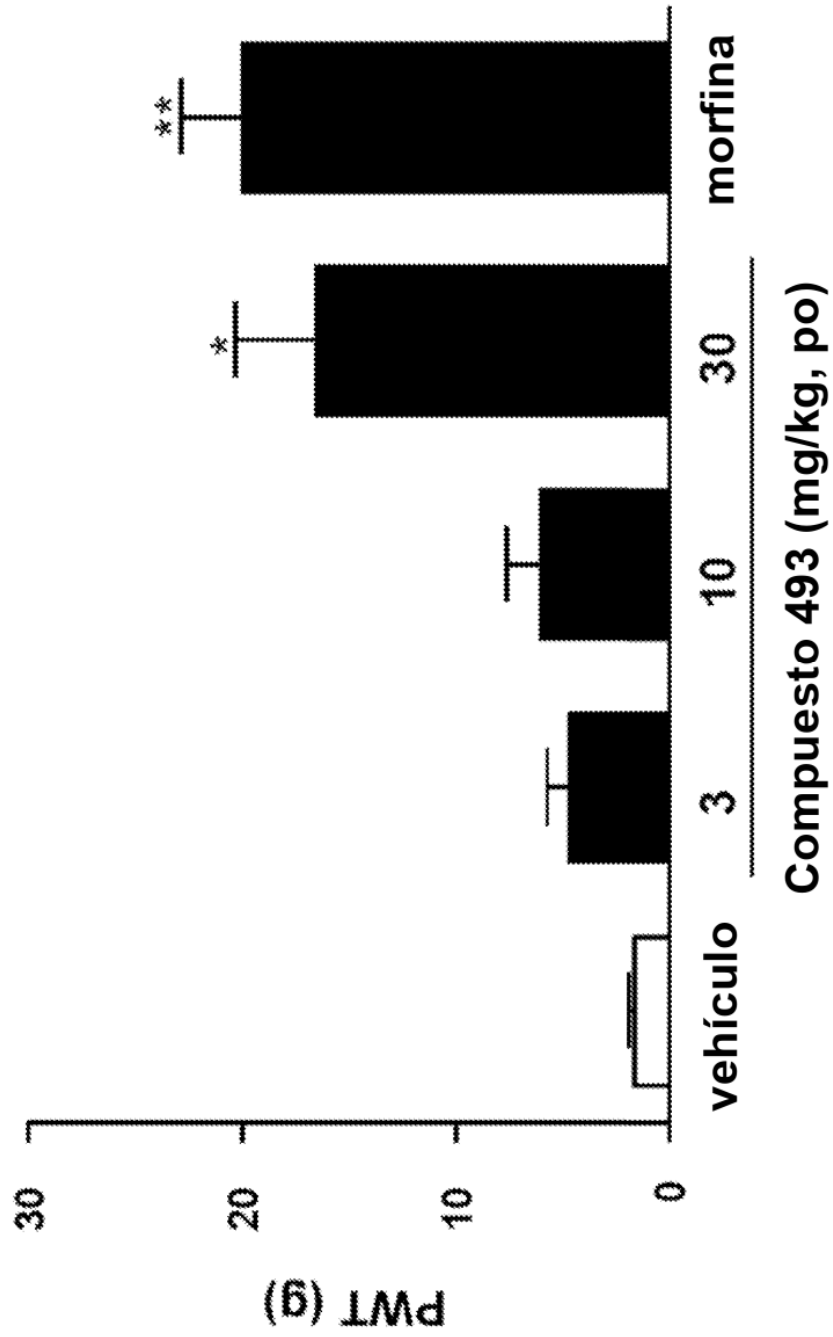


Figura 2

Secuencia temporal de 10 mpk del Compuesto 493 en alodinia inducida por Paclitaxel: Día 8

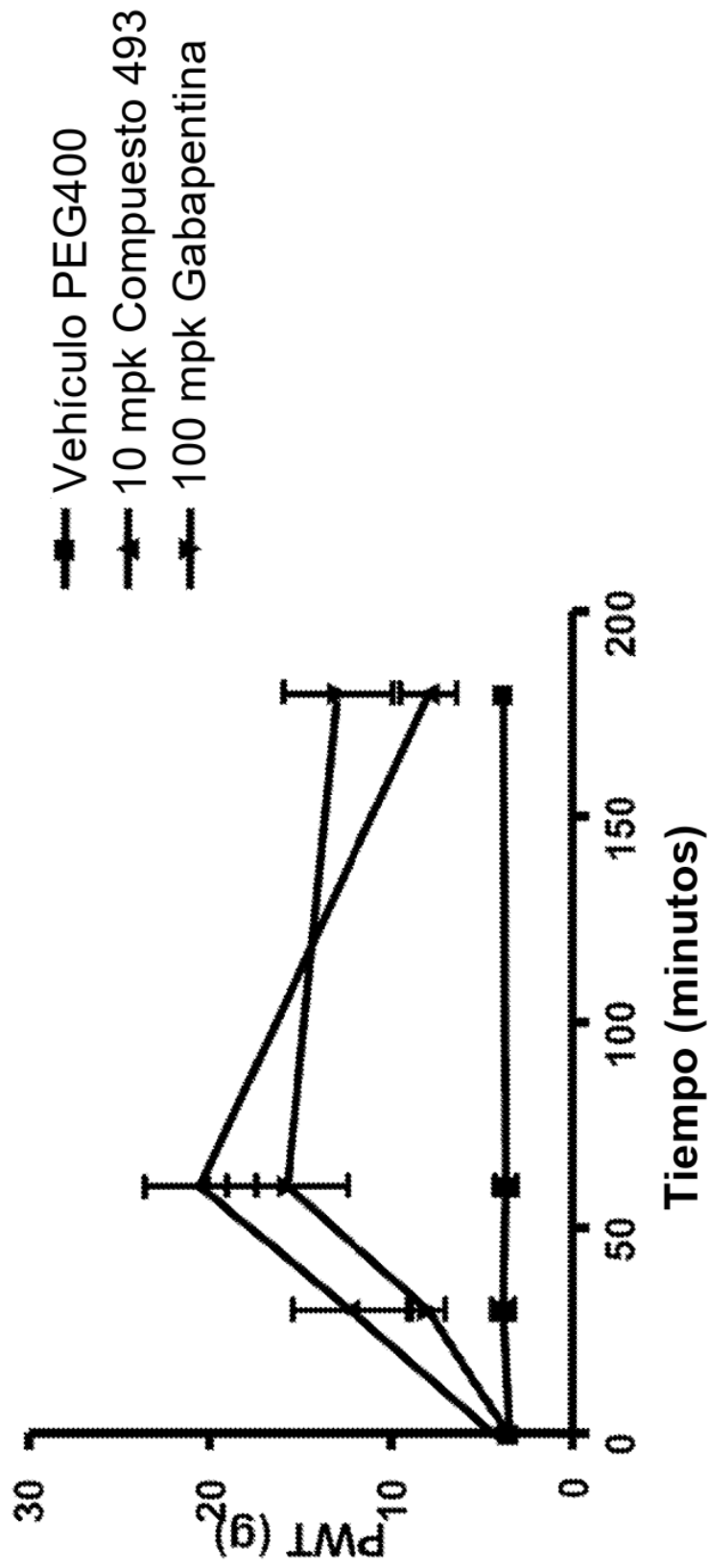
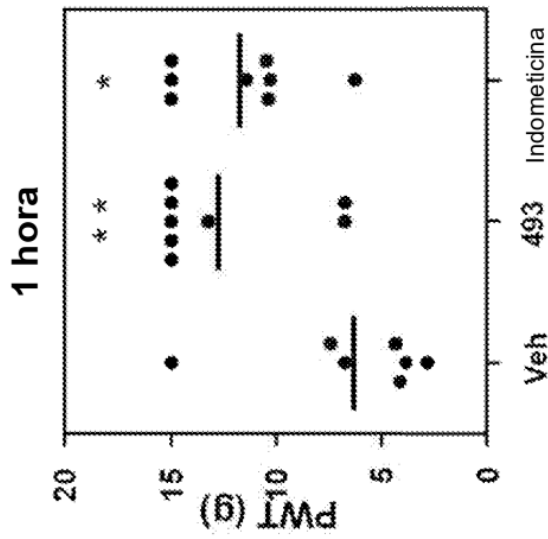


Figura 3

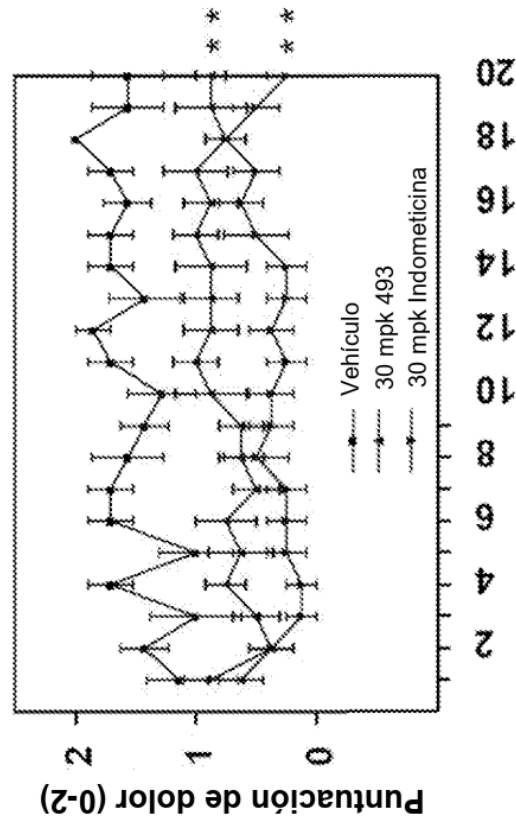
# Efecto del Compuesto 493 en el modelo de incisión en la piel

## Respuesta de dolor provocada



\*\* P<0,01; \*P<0,05 ANOVA seguida por el ensayo de comparación múltiple de Dunnett

## Observación del comportamiento

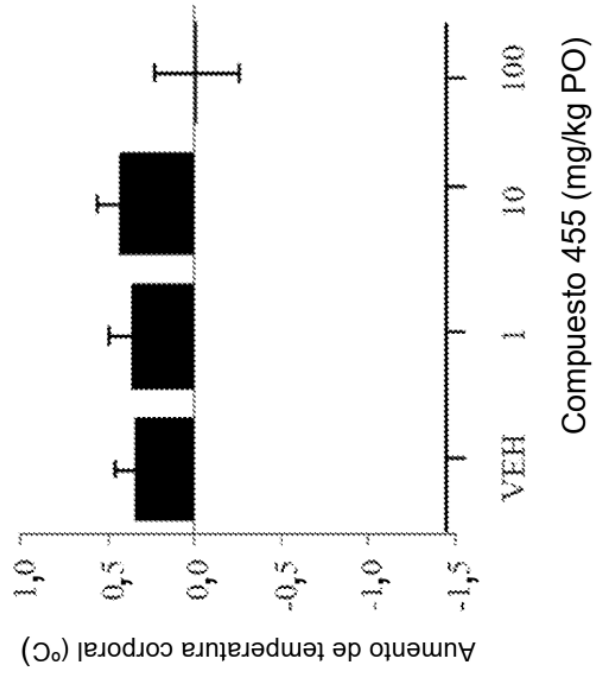


\*\* P<0,01 ANOVA seguida por el ensayo de comparación múltiple de Dunnett

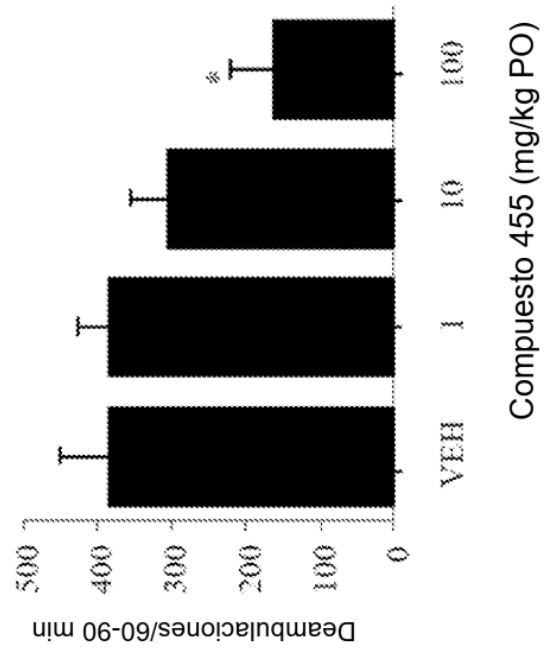
Figura 4

# Efectos del Compuesto 455 sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas

## Hipotermia



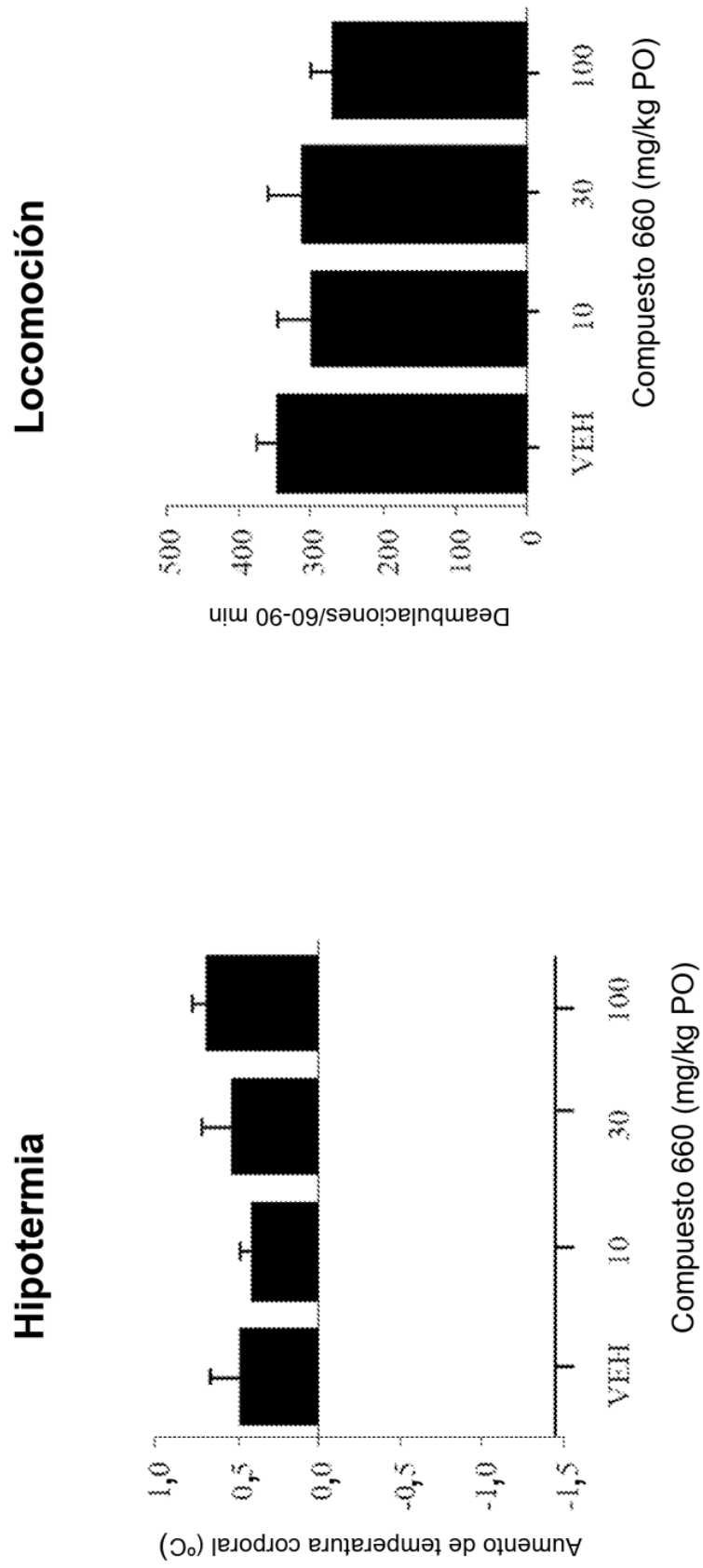
## Locomoción



**Figura 5**



# Efectos del Compuesto 660 sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas



**Figura 6**

Efectos del Compuesto 700 sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas

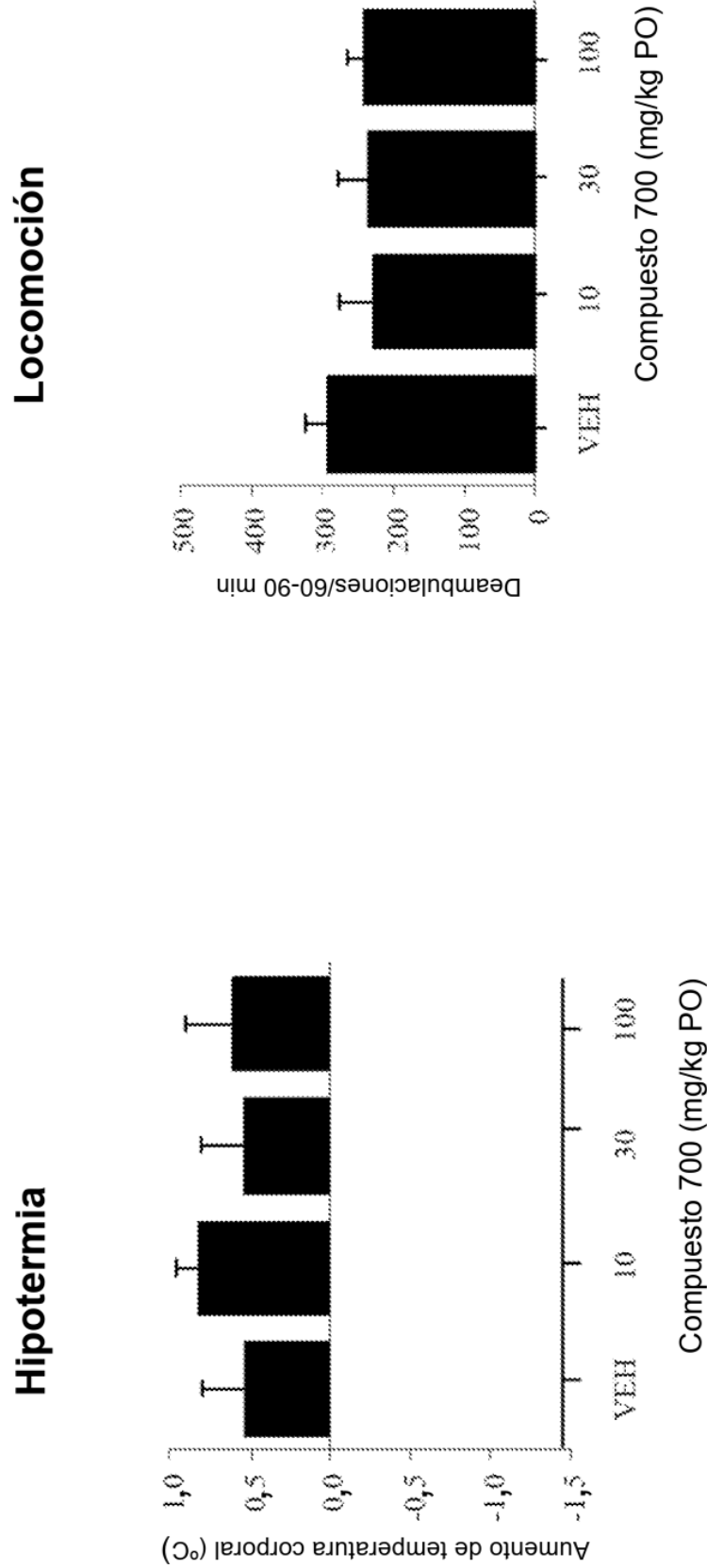
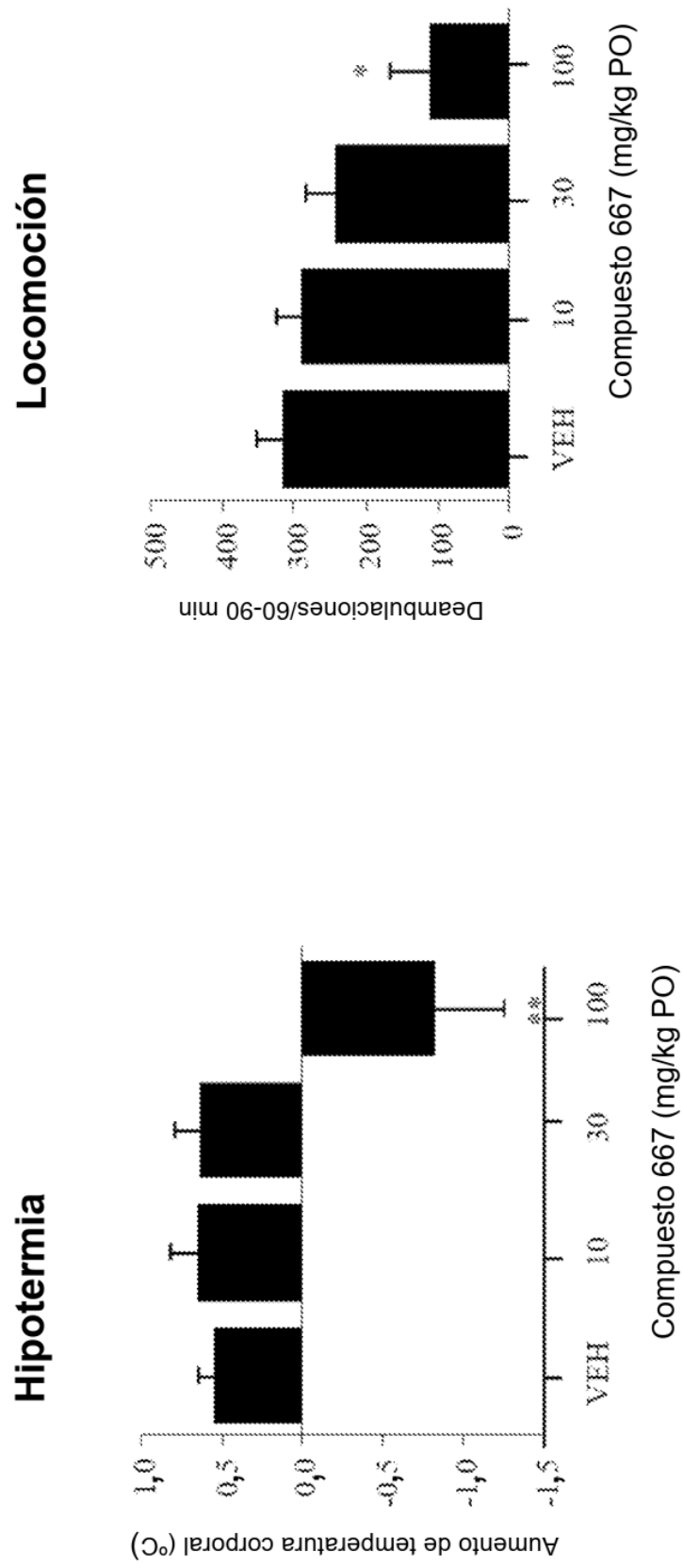


Figura 7

# Efectos del Compuesto 667 sobre la temperatura corporal y la actividad locomotora en ratas



**Figura 8**

Efecto del Compuesto 699 (Compuesto A) en el modelo de NDPD inducida por STZ

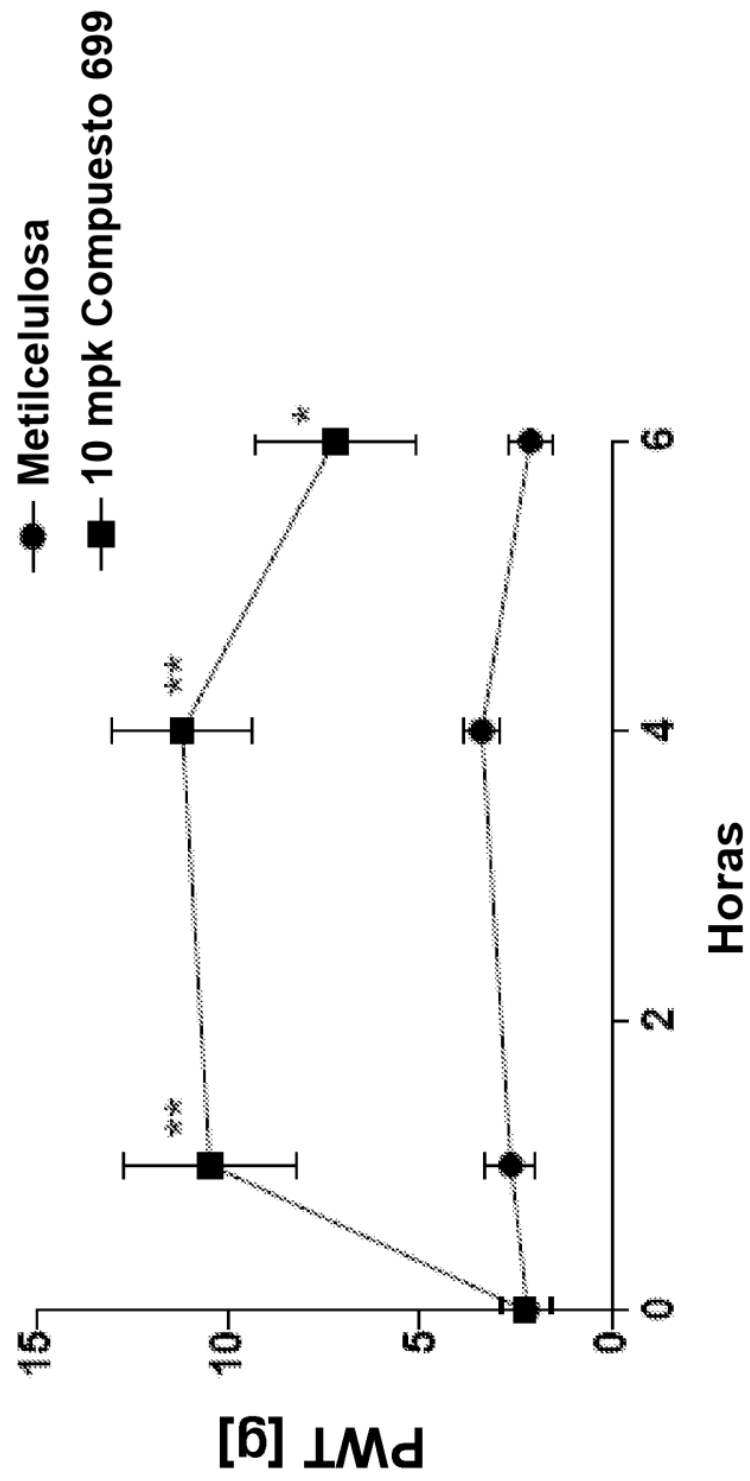


Figura 9

Efecto del Compuesto 919 en el modelo de NDPD inducida por STZ

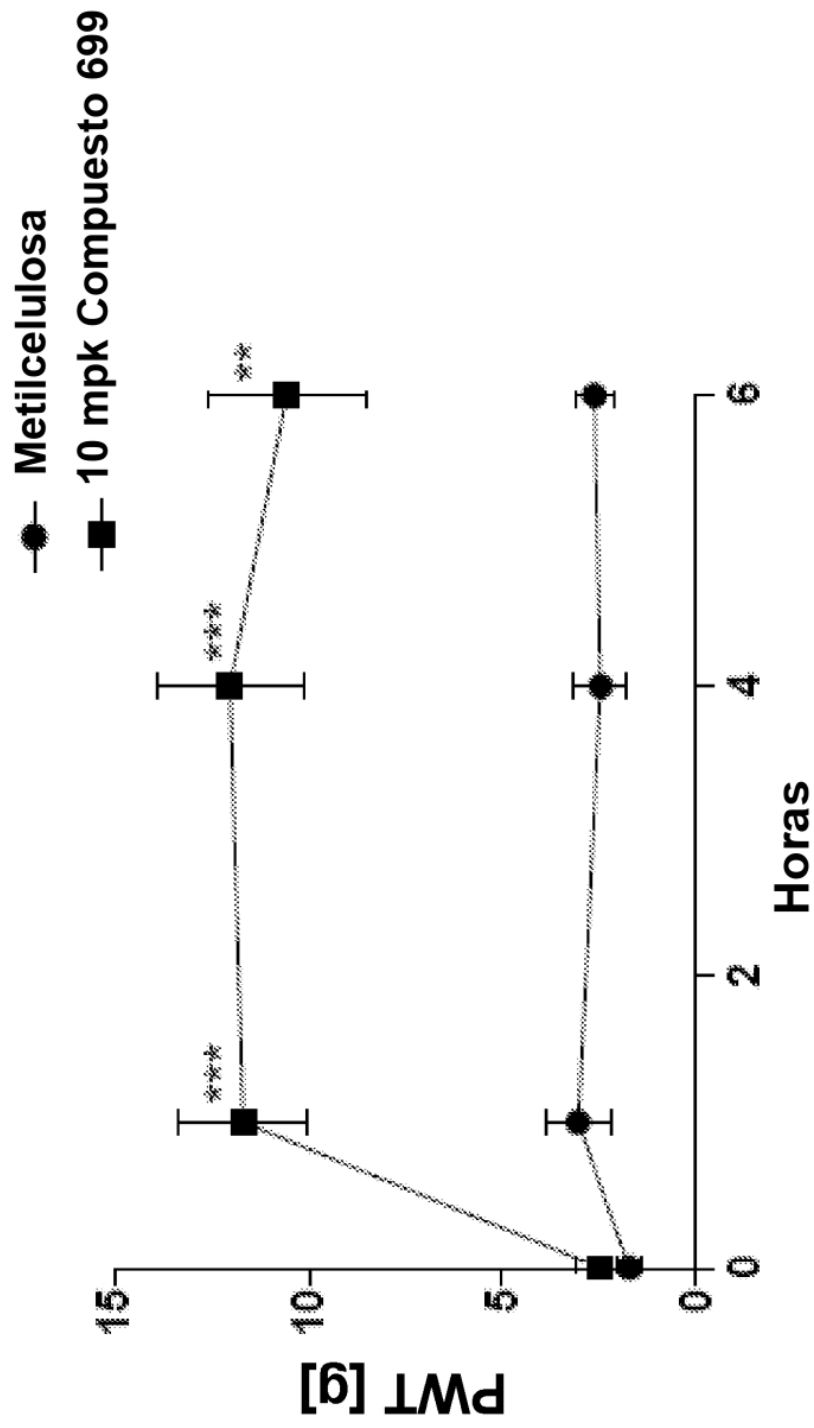


Figura 10

Efecto del Compuesto 699 (Compuesto A) en el modelo de contorsión inducida por ácido acético

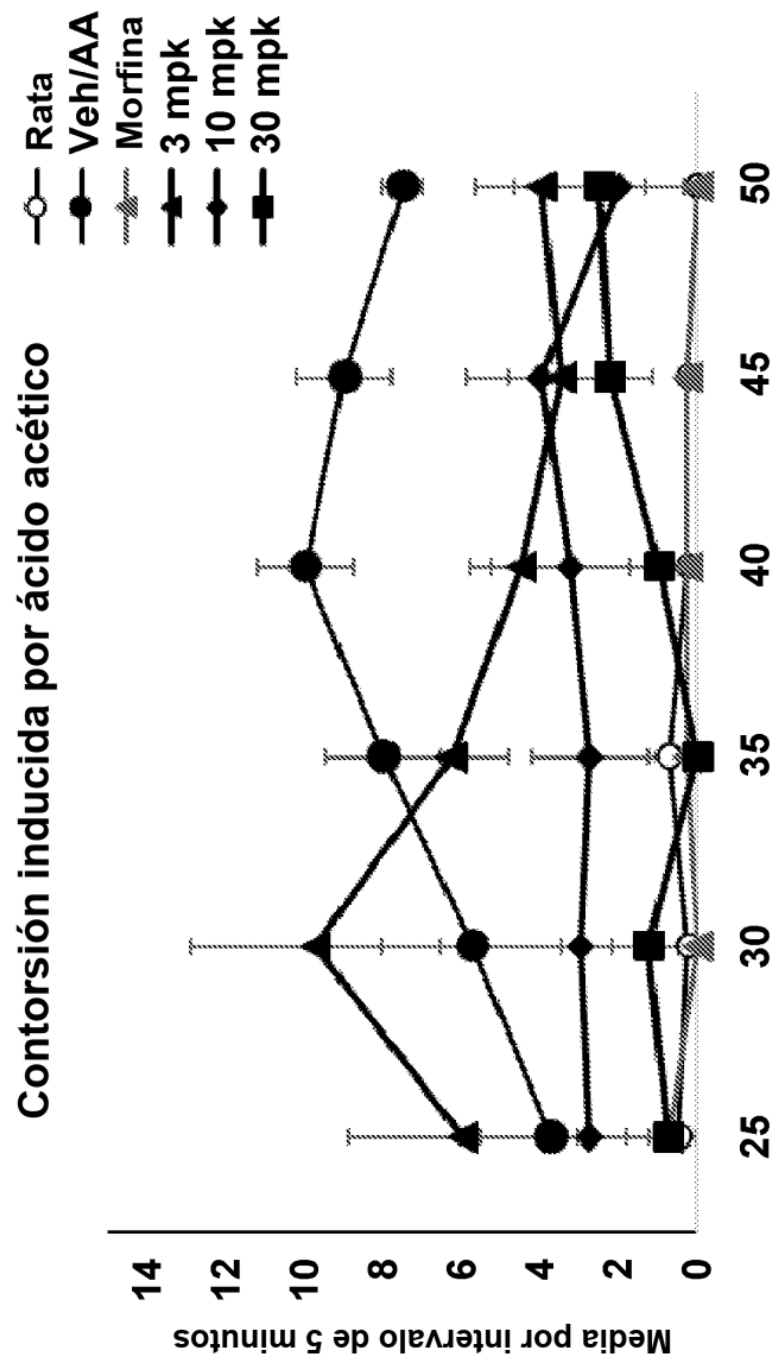


Figura 11

Efecto del Compuesto 699 (Compuesto A) en el modelo de contorsión inducida por ácido acético

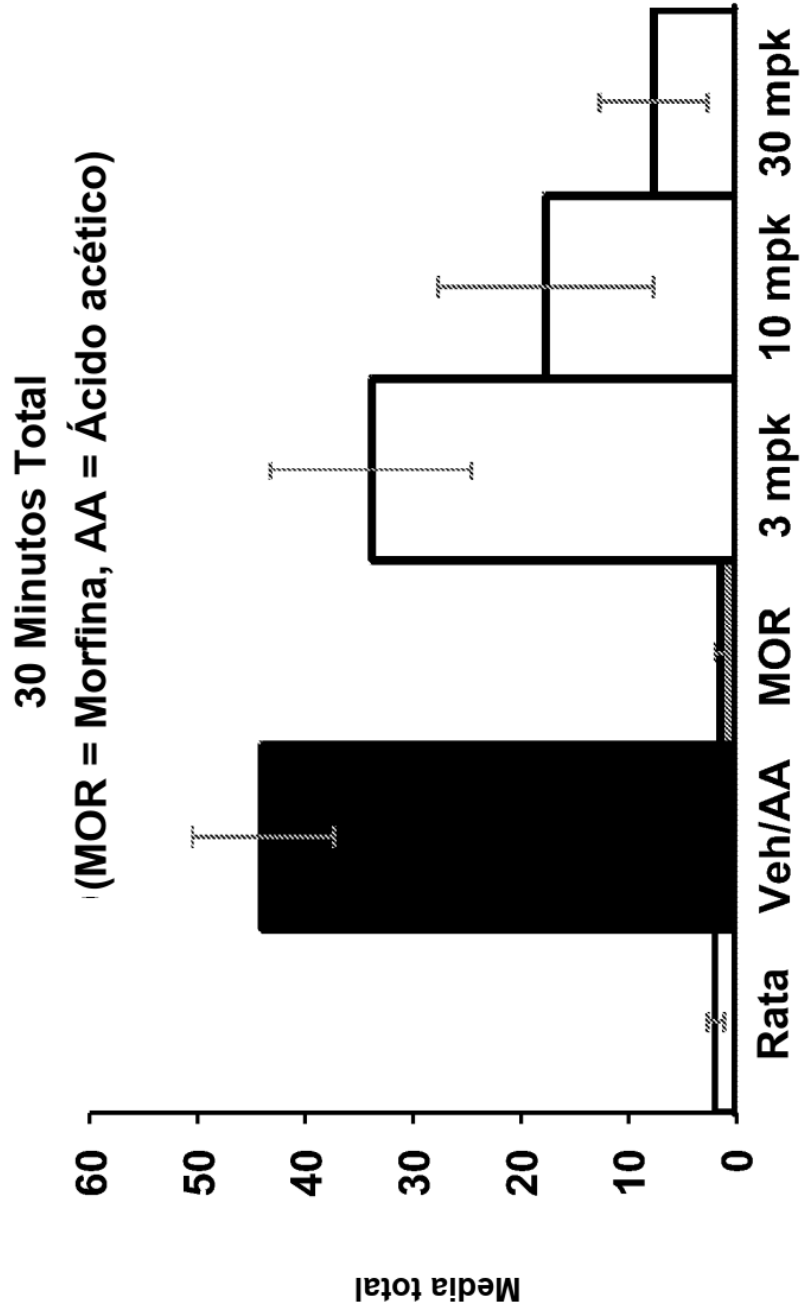


Figura 12

El efecto del Compuesto 699 en un modelo de dolor visceral de colitis

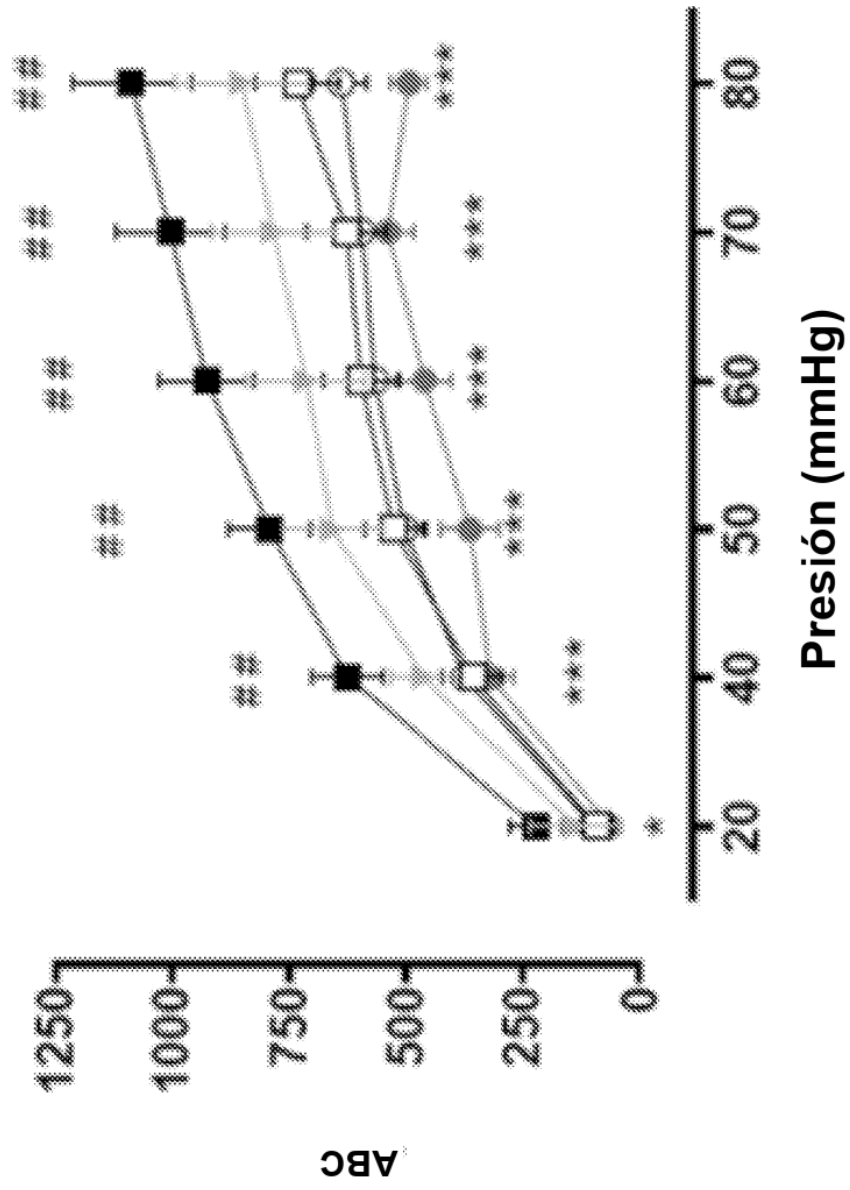


Figura 13