

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 907**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5513 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 451/10 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/46 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011 E 17206278 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3363439**

54 Título: **Composiciones terapéuticas para la polineuropatía simétrica diabética**

30 Prioridad:

25.10.2010 US 406502 P
07.09.2011 US 201161531803 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MANITOBA (100.00%)
Partnerships Knowledge Mobilization &
Innovation 410 - 100 Innovation Drive
Winnipeg, Manitoba R3T 6G2, CA

72 Inventor/es:

FERNYHOUGH, PAUL;
CALCUTT, NIGEL A. y
KOTRA, LAKSHMI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 016 907 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

Composiciones terapéuticas para la polineuropatía simétrica diabética

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] Esta invención se refiere a una composición para su uso en un método de tratamiento de la neuropatía diabética mediante administración tópica o transdérmica, comprendiendo la composición: una cantidad eficaz de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo; uno o más agentes o codisolventes potenciadores de la penetración; y un vehículo o excipiente farmacológicamente aceptable o combinaciones de los mismos. Esta invención también se refiere a un compuesto antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo, para su uso en un método de tratamiento de la neuropatía diabética en un sujeto, en el que el sujeto es un ser humano, y el método comprende administrar una composición que comprende el compuesto mediante inyección.

15 ANTECEDENTES

20 [0002] La polineuropatía simétrica es un problema clínico que afecta aproximadamente al 50 % de las personas afectadas por diabetes. Los síntomas clínicos pueden incluir el desarrollo de dolor en la parte superior de la espalda y/o el abdomen (es decir, neuropatía toracoabdominal diabética), pérdida del control de los movimientos oculares (es decir, parálisis del tercer nervio) y pérdida progresiva de la función de los nervios que componen el sistema nervioso periférico (por ejemplo, polineuropatía, mononeuropatía, mononeuritis simple, neuropatía autonómica).

25 [0003] La forma dominante de la neuropatía diabética se presenta como una polineuropatía simétrica distal que afecta inicialmente los pies, las piernas y las manos de los sujetos. Los síntomas primarios incluyen pérdida de las sensaciones táctiles y/o sensoriales y pérdida de la capacidad para percibir los estímulos que causan dolor. Un subgrupo de pacientes con neuropatía diabética temprana también desarrolla síntomas positivos de dolor neuropático, como sensaciones inapropiadas de hormigueo, ardor, punzadas o dolor que pueden coexistir con otros síntomas negativos de pérdida sensorial. Este dolor neuropático se conoce comúnmente como alodinia táctil o mecanohiperalgia.

30 [0004] La neuropatía sensorial distal se puede medir utilizando biopsias de piel para determinar la pérdida de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENF). La pérdida de IENF representa la retracción de las terminaciones nerviosas de las neuronas sensoriales de la epidermis con la consiguiente pérdida sensorial que, en última instancia, contribuye a una alta incidencia de ulceración, gangrena y amputación en sujetos que sufren diabetes avanzada. Actualmente, no existen terapias aprobadas por las autoridades regulatorias disponibles en América del Norte para esta polineuropatía simétrica degenerativa. Los costos actuales para los sistemas de salud para proporcionar alivio de estos síntomas son enormes.

35 [0005] El uso de compuestos activos en el receptor sigma para la producción de un medicamento para el tratamiento del dolor asociado con la diabetes se analiza en WO 2007/025613 A2.

40 [0006] Lynch et al. analizan un estudio abierto de amitriptilina y ketamina tópicas en el síndrome de PAM neuropático en Journal of Pain, Saunders, Filadelfia, PA, EE. UU., vol. 6, no. 10, 1 de octubre de 2005 (2005-10-01), páginas 644-649, ISSN: 1626-5900.

45 [0007] Ulugol Ahmet et al. analizan la participación de la adenosina en el efecto antialodínico de ratas diabéticas inducidas por amitriptilina y estreptozotocina en Neuroscience Letters, vol. 328, no. 2, 9 de agosto de 2002, (2002-08-09), páginas 129-132, ISSN: 0304-3940.

50 [0008] R. Van der Ploeg et al. analizan la pirenzepina y un ensayo in vitro para evaluar el crecimiento axonal en la URL: <http://www.can-acn.org/meeting2008/abstracts/257.htm>.

55 [0009] En el documento US 2008/255062 A1 se analiza un método para la detección rápida de moléculas pequeñas con el fin de identificar moléculas pequeñas que estimulan la regeneración de axinas y el crecimiento a partir de neuronas sensoriales.

[0010] Jang SW et al. analizan la actividad agonista de los receptores TrkA y TrkB de la amitriptilina, la promoción de la heterodimerización TrkA/TrkB y la potente actividad neurotrófica en Chemistry and Biology, Current Biology, Londres, GB, vol. 16, n.º 6, 26 de junio de 2009 (26 de junio de 2009), páginas 644-656.

60 RESUMEN DE LA INVENCION:

65 [0011] Las composiciones terapéuticas para uso de acuerdo con la invención comprenden uno de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las composiciones son para uso como se reivindica, y son adecuadas para tratar tanto los síntomas negativos de la polineuropatía simétrica diabética ejemplificada por la ralentización de la conducción nerviosa y por la pérdida sensorial,

como los síntomas positivos de la polineuropatía simétrica diabética ejemplificada por la alodinia táctil y por la mecanohiperalgesia.

5 **[0012]** De acuerdo con un aspecto de la presente invención, las composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina para uso como se reivindica son inyectables. Las inyecciones pueden ser inyecciones subcutáneas en el cuerpo de un sujeto. Alternativamente, las inyecciones pueden ser inyecciones subepidérmicas. Los sitios de inyección objetivo adecuados incluyen, entre otros, los dedos de los pies, los pies, los tobillos, las rodillas y las piernas. Otros sitios de inyección adecuados incluyen, entre otros, dedos, manos, muñecas, brazos y hombros. Otros sitios de inyección adecuados incluyen la parte superior e inferior de la espalda, el pecho y el área abdominal.

10 **[0013]** Según otro aspecto de la presente invención, las composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina para uso según se reivindica son adecuadas para administraciones tópicas en sitios objetivo seleccionados en el cuerpo de un sujeto. Los sitios de aplicación tópica objetivo adecuados incluyen, entre otros, dedos de los pies, pies, tobillos, rodillas y piernas. Otros sitios de aplicación tópica objetivo adecuados incluyen, entre otros, dedos, manos, muñecas, brazos y hombros. Otros sitios de aplicación tópica objetivo adecuados incluyen la parte superior e inferior de la espalda, el pecho y el área abdominal. Alternativamente, las composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina pueden administrarse en sitios objetivo seleccionados en el cuerpo de un sujeto mediante parches transdérmicos.

15 **[0014]** Según un aspecto de la presente divulgación (no reivindicado), las composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina son adecuadas para administración oral en el cuerpo de un sujeto.

20 **[0015]** Si así se desea, las composiciones inyectables de la presente invención se pueden utilizar en combinación con, simultáneamente con o secuencialmente con las composiciones tópicas de la presente invención y/o en combinación con, simultáneamente con o secuencialmente con las composiciones orales de la presente divulgación (no reivindicadas).

25 **[0016]** Otras formas de realización ejemplares se refieren a las composiciones de la presente invención para su uso en la terapia de la polineuropatía diabética simétrica. El uso puede incluir inyecciones de dosis que comprenden cantidades eficaces de un antagonista muscarínico en sitios diana seleccionados en el cuerpo de un sujeto. Alternativamente, el uso de la invención puede incluir aplicaciones tópicas y/o aplicaciones de parches transdérmicos de composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina en sitios diana seleccionados en el cuerpo de un sujeto. Alternativamente, en un aspecto de la divulgación (no reivindicado), el uso puede incluir la administración oral de composiciones antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina en el cuerpo de un sujeto.

30 **[0017]** Otros métodos ejemplares de la divulgación (no reivindicados) se refieren a métodos para fabricar las composiciones inyectables de la presente divulgación.

35 **[0018]** Otros métodos ejemplares de la divulgación (no reivindicados) se refieren a métodos para fabricar las composiciones tópicas de la presente invención.

40 **[0019]** Otros métodos ejemplares de la divulgación (no reivindicados) se refieren a métodos para fabricar las composiciones orales de la presente divulgación.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 **[0020]** La presente invención se describirá junto con referencia a los siguientes dibujos en los que:

50 La Fig. 1 es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina, un antagonista específico del receptor de acetilcolina tipo 1 (MIR) muscanmc, sobre neuronas cultivadas de ratas diabéticas grasas de Zucker (modelo de diabetes tipo 2);

55 Las Figs. 2(A)-(C) son gráficos que muestran los efectos de los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina en el crecimiento de neuritas de neuronas cultivadas de ratas normales, 2(A) pirenzepina, 2(B) telenzepina y 2(C) atropina;

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los efectos de dosis bajas de antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina tipo 1 (MIR) en el crecimiento de neuritas de neuronas cultivadas de ratas normales;

60 Las Figs. 4(A) y 4(B) muestran los efectos de la pirenzepina en el crecimiento de neuritas de cultivos de neuronas sensoriales aisladas de: 4(A) ratones de tipo salvaje y 4(B) ratones knock out para MIR;

La Fig. 5 es un gráfico que compara la producción de acetilcolina en cultivos de ratones de tipo salvaje y en cultivos de ratones knock out para M1R;

65 La Fig. 6(A) es un análisis de inmunotransferencia Western que muestra los efectos de la pirenzepina en la fosforilación de la proteína quinasa regulada extracelularmente (ERK) en neuronas sensoriales cultivadas,

mientras que 6(B) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en la relación P-ERK/T-ERK;

La Fig. 7(A) es un análisis de inmunotransferencia Western que muestra los efectos de VU255035 en la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en neuronas sensoriales cultivadas, mientras que 7(B) es un gráfico que muestra los efectos de VU255035 en la relación P-AMPK/T-ERK;

Las Figs. 8(A)-8(C) son gráficos que muestran los efectos profilácticos de las inyecciones subcutáneas de pirenzepina en: 8(A) hipoalgesia térmica, 8(B) pérdida de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENF) y 8(C) déficits en la velocidad de conducción nerviosa motora en ratones C57Bl6J diabéticos tratados con estreptozotocina (STZ) (modelo de diabetes tipo 1);

Las Figs. 9(AB) son gráficos que muestran los efectos del antagonista específico de MIR VU255035 en la reversión de 9(A) hipoalgesia térmica y 9(B) pérdida de IENF en ratones Swiss Webster diabéticos inducidos por STZ;

Las Figs. 10(A)-10(C) son gráficos que muestran los efectos profilácticos de las aplicaciones tópicas de pirenzepina en: 10(A) hipoalgesia térmica, 10(B) pérdida de fibra nerviosa intraepidérmica (IENF), y 10(C) plexos nerviosos subepidérmicos (SNP) en ratones diabéticos STZ C57Bl6J;

Las Figs. 11(A) y 11(B) son gráficos que muestran los efectos de las inyecciones subcutáneas a largo plazo de pirenzepina para revertir: 11(A) hipoalgesia térmica, y 11(B) pérdida de IENF en ratones diabéticos Swiss-Webster exógenos;

La Figura 12 es un gráfico que muestra los efectos de la retirada de los tratamientos con pirenzepina en la reaparición de la neuropatía;

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los efectos de las inyecciones de pirenzepina en la reversión de la hipoalgesia térmica en ratas Sprague-Dawley diabéticas STZ;

La Fig. 14(A) es un gráfico que muestra que la administración subcutánea diaria de pirenzepina previene la alodinia táctil de la pata en ratas Sprague-Dawley diabéticas STZ después de 5 o 9 semanas de tratamiento y, por lo tanto, previene la aparición de neuropatía diabética dolorosa, y 14(B) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en el desarrollo de la velocidad de conducción nerviosa sensorial en los mismos animales, medida después de 8 semanas de diabetes;

Las Figs. 15(AB) son gráficos que muestran los efectos de la dosificación oral de pirenzepina en la reversión de: (A) hipoalgesia térmica de la pata, y (B) pérdida de IENF en ratones Swiss Webster diabéticos STZ;

La Fig. 16(A) es un análisis de inmunotransferencia Western que muestra los efectos de la pirenzepina en la preservación de la expresión de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y el receptor/coactivador activado por el proliferador de peroxisomas- α (PGC- α), 16(B) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en la expresión de P-AMPK, 16(C) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en los niveles de T-AMPK, y 16(D) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en la expresión de PGC- α en ratones diabéticos STZ;

La Fig. 17(A) es un análisis de inmunotransferencia Western que muestra los efectos de la pirenzepina en la reversión de los déficits en la expresión de las proteínas mitocondriales NDUFS3 y COX IV (T-ERK se mide como un control de carga), la Fig. 17(B) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en la expresión de la proteína NDUFS3, y la Fig. 17(C) es un gráfico que muestra los efectos de la pirenzepina en la expresión de la proteína COX IV en ratones diabéticos STZ;

Las Fig. 18(A), 18(B) y 18(C) son gráficos que muestran los efectos de la pirenzepina en la reversión de los déficits en las actividades del complejo respiratorio mitocondrial I (A), el complejo respiratorio mitocondrial IV (B) y la citrato sintasa mitocondrial (C) en ratones diabéticos STZ; y

La Fig. 19 es un gráfico que muestra los efectos de las inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina sobre la restauración de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en ganglios de la raíz dorsal lumbar recién homogeneizados de ratas diabéticas por STZ.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0021] Antes de describir con más detalle la presente invención, debe entenderse que esta invención no está limitada a las formas de realización particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir formas de realización particulares únicamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0022] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los significados que comprendería comúnmente un experto en la materia en el contexto de la presente especificación. Aunque también se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

[0023] Se debe tener en cuenta que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina" incluye una pluralidad de tales antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina y la referencia al "agente" incluye la referencia a uno o más agentes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

[0024] "Opcional" u "opcionalmente" o "alternativamente" significa que el evento, circunstancia o material descrito posteriormente puede o no ocurrir o estar presente, y que la descripción incluye casos en los que el evento, circunstancia o material ocurre o está presente y casos en los que no ocurre o no está presente.

[0025] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese rango indicado, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

[0026] "Inhibir", "inhibido" e "inhibición" significan disminuir una actividad, respuesta, condición, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir, entre otros, la ablación completa de la actividad, respuesta, condición o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10 % en la actividad, respuesta, condición o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por lo tanto, la reducción puede ser de un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, o cualquier cantidad de reducción entre los porcentajes específicamente enumerados, en comparación con los niveles nativos o de control.

[0027] "Promover", "promoción" y "promocionar" se refieren a un aumento en una actividad, respuesta, condición, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir, entre otros, el inicio de la actividad, respuesta, condición o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, un aumento del 10 % en la actividad, respuesta, condición o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por lo tanto, el aumento de una actividad, respuesta, condición, enfermedad u otro parámetro biológico puede ser de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % o más, incluyendo cualquier cantidad de aumento entre los porcentajes específicamente citados, en comparación con los niveles nativos o de control.

[0028] Como se utiliza en este documento, el término "sujeto" significa cualquier objetivo de administración. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por lo tanto, el sujeto puede ser un ser humano. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende cubrir sujetos adultos, jóvenes y recién nacidos, ya sean hombres o mujeres. Un paciente se refiere a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

[0029] El término "receptores muscarínicos de acetilcolina" significa receptores terminales principales acoplados a proteína G que son estimulados por la acetilcolina liberada por varios tipos de células, incluyendo neuronas sensoriales, queratinocitos y fibras posganglionares en el sistema nervioso parasimpático, y funcionan como moléculas de señalización que inician cascadas de señales dentro de las células en sus regiones inmediatas

[0030] El término "antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina", como se usa en este documento, significa uno o más agentes extraídos de origen natural, agentes purificados de origen natural, agentes sintetizados químicamente, sus sales, sus derivados y sus homólogos, que reducen las actividades y/o la función de los receptores muscarínicos de acetilcolina que se encuentran en neuronas y otras células.

[0031] Como se usa en este documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se utiliza en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se presente en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado como portador de la misma; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

[0032] El término "terapéuticamente eficaz" significa que la cantidad de la composición utilizada es suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Tal mejora solo requiere una reducción o alteración,

no necesariamente la eliminación. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, etc., del sujeto a tratar.

5 **[0033]** Tal como se utiliza en el presente documento, "composición farmacéutica" incluye cualquier composición para: (i) administración tópica, o (ii) administración transdérmica o (iii) administración parenteral, o (iv) administración oral, de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina a un sujeto que necesita terapia para la polineuropatía simétrica distal. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares, además de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

15 **[0034]** El término "forma de dosificación unitaria", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.

20 **[0035]** El término "portador" significa un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando se combina con un antagonista o composición del receptor muscarínico de acetilcolina, ayuda o facilita la preparación, el almacenamiento, la administración, el suministro, la eficacia, la selectividad o cualquier otra característica del antagonista o composición del receptor muscarínico de acetilcolina para su uso o propósito previstos. Por ejemplo, se puede seleccionar un portador para minimizar cualquier degradación de los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

25 **[0036]** Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen composiciones farmacéuticas esencialmente químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19.^a ed.) ed. AR Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. 1995. Normalmente, se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Entre los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se incluyen, entre otros, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidiletanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones farmacéuticas deben contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para una administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. Por ejemplo, la administración oral requiere recubrimientos entéricos para proteger a los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina de la degradación dentro del tracto gastrointestinal. En otro ejemplo, los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina se pueden administrar en una formulación liposomal para facilitar el transporte a lo largo del sistema vascular de un sujeto y efectuar la administración a través de las membranas celulares a sitios intracelulares.

40 **[0037]** El término "excipiente" en el presente documento significa cualquier sustancia, que no sea en sí misma un agente terapéutico, que se puede utilizar en una composición para la administración de antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina a un sujeto o, alternativamente, combinada con un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina (por ejemplo, para crear una composición farmacéutica) para mejorar sus propiedades de manipulación o almacenamiento o para permitir o facilitar la formación de una unidad de dosis de la composición (por ejemplo, la formación de un hidrogel tópico que puede incorporarse opcionalmente a continuación en un parche transdérmico). Los excipientes incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, aglutinantes, desintegrantes, potenciadores del sabor, disolventes, agentes espesantes o gelificantes (y cualquier agente neutralizante, si es necesario), potenciadores de la penetración, agentes solubilizantes, agentes humectantes, antioxidantes, lubricantes, emolientes, sustancias añadidas para enmascarar o contrarrestar un olor, fragancias o sabor desagradables, sustancias añadidas para mejorar la apariencia o la textura de la composición y sustancias utilizadas para formar las composiciones farmacéuticas. Cualquiera de dichos excipientes se puede utilizar en cualquier forma de dosificación de acuerdo con la presente divulgación. Las clases de excipientes anteriores no pretenden ser exhaustivas, sino meramente ilustrativas, ya que una persona con conocimientos ordinarios en la materia reconocería que se podrían utilizar tipos y combinaciones adicionales de excipientes para lograr los objetivos deseados para la administración del antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina.

55 **[0038]** La pirenzepina es un medicamento bien conocido que se utiliza para tratar úlceras duodenales, úlceras de estómago y problemas intestinales, ya sea solo o en combinación con antiácidos u otros medicamentos como la ranitidina. La pirenzepina se ha utilizado para aliviar calambres y/o espasmos en el estómago, los intestinos y la vejiga. Además, la pirenzepina se puede utilizar como profiláctico para prevenir náuseas, vómitos y mareos. La pirenzepina pertenece a las siguientes categorías de fármacos: (a) agentes antiulcerosos, (b) antimuscarínicos, (c) antiespasmódicos y (d) antagonistas muscarínicos.

60 **[0039]** Los efectos primarios de la pirenzepina son consecuencia de su unión y modulación del receptor muscarínico de acetilcolina. El receptor muscarínico de acetilcolina media en respuestas celulares diversas, incluyendo la inhibición de la adenilato ciclasa, la descomposición de los fosfoinosítidos y la modulación de los canales de potasio a través de la acción de las proteínas G. Los usos terapéuticos actuales de la pirenzepina se basan en composiciones administradas por vía

oral. La pirenzepina se absorbe en el tracto gastrodigestivo y después de la asimilación, modula la secreción de ácidos gástricos, las secreciones salivales, el sistema nervioso central, las funciones cardiovascular, ocular y urinaria. Las dosis efectivas en composiciones de pirenzepina administradas por vía oral para estas indicaciones están en el rango de aproximadamente 50 a 300 mg/día, aproximadamente 75 a 225 mg/día, aproximadamente 100 a 150 mg/día.

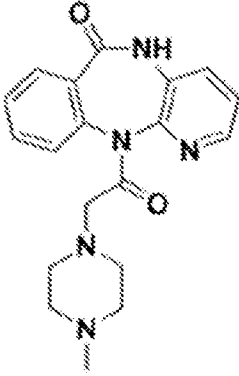
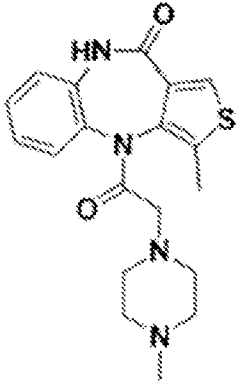
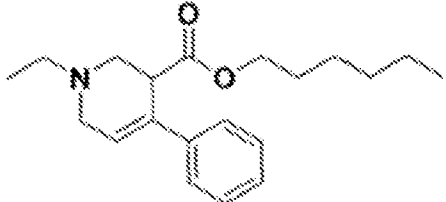
[0040] La fórmula molecular de la pirenzepina es $C_{19}H_{21}N_5O_2$ con un peso molecular de 351,402. El nombre IUPAC de la pirenzepina es 11-[2-(4-metilpiperazin-1-il)acetil]-5H-pirido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-1. La pirenzepina está disponible como sal o hidrato de HCL.

[0041] Sorprendentemente, hemos descubierto que el cultivo de neuronas adultas y juveniles extirpadas de ratas diabéticas en medios de cultivo que contienen pirenzepina estimula el crecimiento de neuritas a partir de las neuronas extirpadas. Además, descubrimos que todas las aplicaciones tópicas, inyecciones subcutáneas e inyecciones de pirenzepina en y a varios objetivos de la piel en ratones diabéticos: (i) previnieron déficits en la velocidad de conducción nerviosa motora, (ii) previnieron y revirtieron la pérdida de fibras nerviosas intraepidérmicas, (iii) previnieron la pérdida de plexos nerviosos subepidérmicos, (iv) previnieron la alodinia táctil y (v) previnieron y revirtieron el desarrollo de hipoalgesia térmica. Además, hemos descubierto que la administración oral de pirenzepina revirtió la neuropatía sensorial.

[0042] En vista de estos resultados notables, evaluamos otros antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina por su potencial para revertir la pérdida de fibras nerviosas intraepidérmicas y la hipoalgesia térmica asociadas con la diabetes. Los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina son agentes que reducen las actividades y/o la función de los receptores muscarínicos de acetilcolina que se encuentran en las membranas plasmáticas de las neuronas y otras células. Los receptores muscarínicos de acetilcolina son receptores terminales principales acoplados a la proteína G que son estimulados por la acetilcolina liberada por varios tipos de células, incluidas las neuronas sensoriales, los queratinocitos y las fibras posganglionares del sistema nervioso parasimpático, y funcionan como moléculas de señalización que inician cascadas de señales dentro de las células en sus regiones inmediatas. Los antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina conocidos y útiles para el tratamiento de enfermedades como el mal funcionamiento del sistema nervioso central, enfermedades pulmonares y dolencias gástricas se ejemplifican con atropina, escopolamina, telenzepina, hioscina, ipratropio tropicamida, ciclopentolato, glicopirrolato, 4-difenilacetoxi-1,1-dimetilpiperidinio, quinidina, orfenadrina, oxifenonio, emepromum, prociclidina, propantelina, 4-fluorhexahidrosiladifenidol, octilonio, quinuclidinil bencilato, tolterodina, benactizina, bipreiden, dicitlomina, benzotropina, dexetimida, hexahidrosiladifenidol, entre otros.

[0043] Además de la pirenzepina, hay varios antagonistas selectivos del receptor muscarínico tipo 1 (MIR) y otros subtipos de receptores muscarínicos que se prevé que exhiban actividades beneficiosas similares a las demostradas por la pirenzepina en el crecimiento de las neuritas neuronales. Algunos de estos compuestos tienen una actividad selectiva del MIR muy superior. Por ejemplo, la telenzepina, un análogo de la pirenzepina con una estructura tricíclica alterada pero una cadena lateral de piperazina no modificada, es de 4 a 10 veces más potente que la pirenzepina. VU0255035, un derivado de tiadiazol, es 75 veces más selectivo para el MIR en relación con los receptores M2, M3, M4 y M5. Entre la nueva generación de antagonistas del MIR, hay tres antagonistas prometedores de MIR con actividad central, PD150714, y 77-LH-28-1 y espirotramina. En la Tabla 1 se muestran listados de antagonistas del receptor de acetilcolina muscarínico adecuados para su incorporación en composiciones terapéuticas de la invención. En las Tablas 2-4 se describen otros compuestos para la polineuropatía simétrica distal y/o la alodinia táctil como referencia.

Tabla 1: Clasificación química de los antagonistas de M1R y sus estructuras representativas.

S. N.º	Estructura	Nombre
Toxina muscarínica		
1)	<p>LTCVKNSNSIWFPTSEDCPDGGQLCFKRWQYISPRMY</p> <p>DFTRGCAATCPKAEYRDVINCCGTDKCNK</p>	MT7 (veneno)
Derivados de benzodiazepinona tricíclica		
2)		Pirenzepina
3)		Telenzepina
Ácidos carboxílicos de tetrahidropiridina 1,4-disustituída:		
4)		PD150714

(continuación)

S. N.º	Estructura	Nombre
Análogos de trihexifenidilo		
5)		Trihexifenidilo
6)		p-fluorotrihexifenidilo
Derivados de sulfonamida de tiadiazol		
7)		VU0255035
Hexocíclico y sila-hexocíclico		
8)		O-metoxi-sila-hexocíclico
Tetraamina de polimetileno o espiro-4-DAMP(4-difenil-acetoxi-n-metilpiperidina)		
9)		Espiratramina

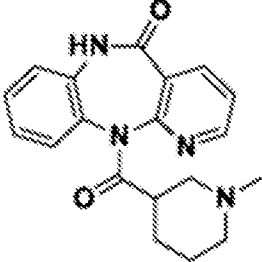
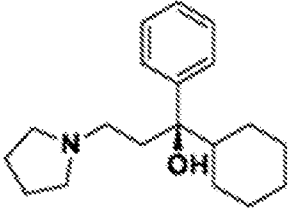
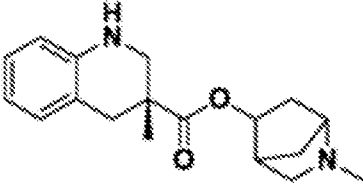
(continuación)

S. N.º	Estructura	Nombre
Análogos de amida N-(4-(4-etilpiperazin-1-il)fenilo)		
10)		
Análogos de McN-A-343		
11)		McN-A-343
12)		Análogo de McN-A-343
Alcoxi-oxadiazoliltetrahidropiridinas		
13)		MB-OXTP
Caramifeno, aprofeno y derivados relacionados		
14)		Nitrocaramifeno
15)		Aprofeno

(continuación)

S. N.º	Estructura	Nombre
Varios		
16)		(-)-S-ETI26
17)		N-desmetilclozapina
18)		MDL74019DG
19)		Bromuro de glicopirronio
20)		Diciclomina

Tabla 2 (compuestos de referencia): Antagonistas mixtos de MIR, es decir, compuestos que muestran efectos antagonistas en más de un subtipo de receptor muscarínico, incluido M1.

5	S. N.º	Estructura	Nombre	Subtipo de receptor
10	1)		Rispenzepina	Antagonista M1/M3
25	2)		R-Prociclidina	Antagonista M1/M4
30	3)		DAU 5750	Antagonista M1/M3

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 3 (compuestos de referencia): Antagonistas muscarínicos no M1 selectivos (es decir, selectivos a M2, M3, M4 o M5)

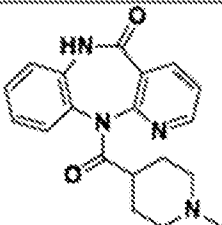
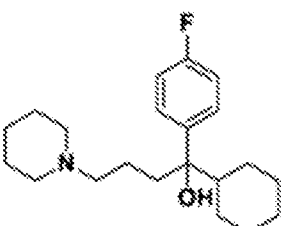
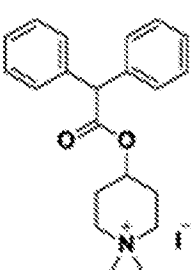
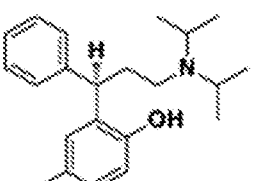
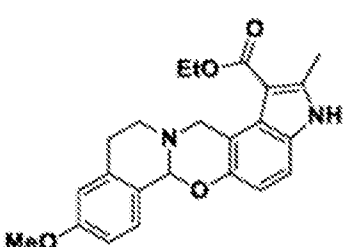
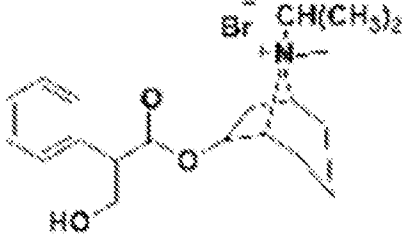
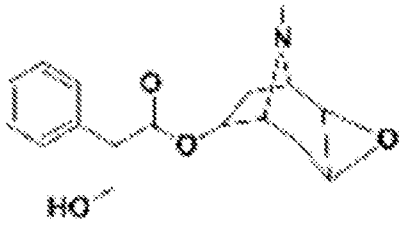
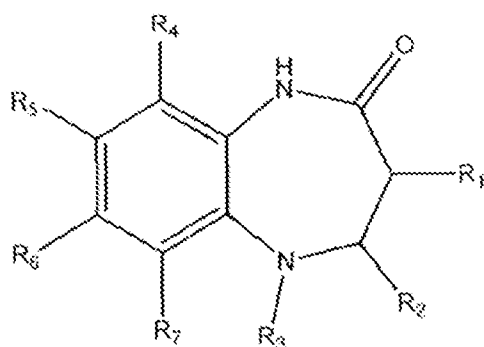
S. N.º	Estructura	Nombre	Subtipo de receptor
1)		Nuvenzepina	Antagonista M3
2)		4-Fluorohexahidro siladifenidol	Antagonista M3
3)		4-Difenilacetoxi-N-metil-piperidina metyoduro	Antagonista M3
4)		Tolterodina	Antagonista M2/M3
5)		PD102807	Antagonista M4

Tabla 4 (compuestos de referencia): Antagonistas muscarínicos no selectivos (estructuras a base de escopolamina)

S. N.º	Estructura	Nombre	Indicación clínica	Vía de administración
1		Bromuro de ipratropio	Asma agudo COPD	Inhalación
2		Escopolamina	Mareo Dolor intestinal	Oral, IV, transdérmico

[0044] Las descripciones anteriores de las estructuras químicas en las Tablas 1 a 4 indican que los compuestos que exhiben actividad selectiva de MIR requieren características definidas y los cambios en las estructuras podrían hacer que un antagonista selectivo de MIR sea selectivo de M3R o selectivo de M2R, y viceversa. Por ejemplo, el compuesto 1 en la Tabla 2 y el compuesto I en la Tabla 3 pertenecen a la misma clase de fármacos, pero el cambio en el patrón de sustitución en la cadena lateral de piperazina determina la selectividad M1 vs M1/M3. Por lo tanto, los compuestos químicos que pertenecen a las estructuras químicas generales anteriores, pero con variaciones estructurales, aún podrían poseer actividad antagonista selectiva de M1, lo que permite su uso en la polineuropatía diabética simétrica. En consecuencia, se pueden diseñar fórmulas genéricas que abarquen las características estructurales de los antagonistas, incluidos aquellos que son selectivos de MIR (para uso de acuerdo con la invención) y compuestos no selectivos de MIR (no reivindicados). Las fórmulas adecuadas se ejemplifican con la Fórmula I y la Fórmula II.

Fórmula I



R₁ puede ser uno de un anillo insaturado de 5 miembros, un anillo insaturado de 6 miembros o un anillo que contiene heteroátomos.

R₂ puede ser uno de un anillo insaturado de 5 miembros, un anillo insaturado de 6 miembros o un anillo que contiene heteroátomos.

R₃ puede ser un grupo H-piperidinilo, un grupo 2-piperidinilo, un grupo 3-piperidinilo, un grupo 4-piperidinilo, un grupo 2-piperazinilo o un grupo 3-piperazinilo, unidos a través de un grupo metilo o un grupo etilo o un grupo propilo o un grupo butilo. Los grupos piperidinilo o piperazinilo pueden estar unidos adicionalmente a grupos metilo, trifluorometilo o etilo.

R₄ puede ser un ion hidrógeno o un ion cloruro.

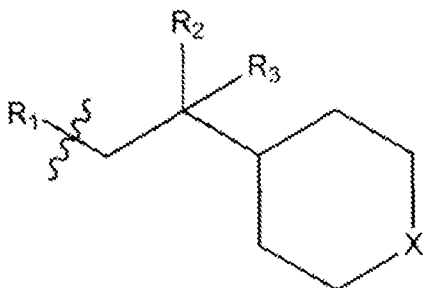
R₅ puede ser un ion hidrógeno o un ion cloruro.

R₆ puede ser un ion hidrógeno o un ion cloruro.

5 R₇ puede ser un ion hidrógeno o un ion cloruro.

Fórmula II

10

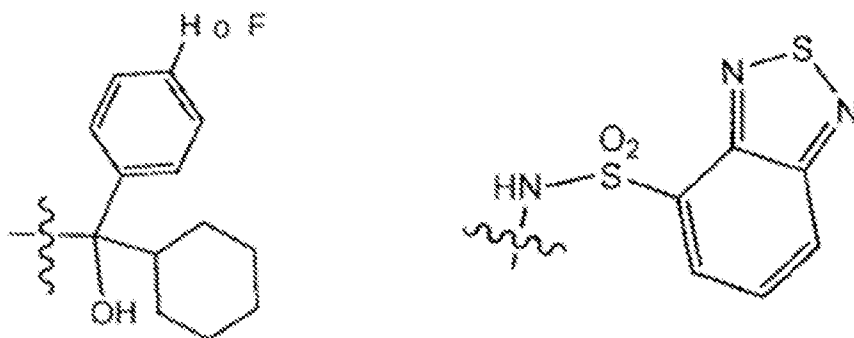


15

20 X puede ser un grupo metilo o un grupo "NR", es decir, un grupo amina primaria, un grupo amina secundaria o un grupo amina terciaria.

R₁ puede ser

25



30

35

40 donde



indica el punto de conexión de R₁ con la estructura superior en la Fórmula II.

45 R₂ puede ser un ion hidroxilo o un ion hidrógeno o una cetona.

R₃ puede ser un ion hidroxilo o un ion hidrógeno o una cetona.

50 **[0045]** En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden uno o más antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina, en una cantidad total en peso de la composición de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 95 %. Por ejemplo, la cantidad de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina, en peso de la composición farmacéutica puede ser de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 2,1 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,3 %, aproximadamente 2,4 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,6 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 2,8 %, aproximadamente 2,9 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 3,1 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,3 %, aproximadamente 3,4 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,6 %, aproximadamente 3,7 %, aproximadamente 3,8 %, aproximadamente 3,9 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 4,1 %, aproximadamente 4,2 %, aproximadamente 4,3 %, aproximadamente 4,4 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 4,6 %, aproximadamente 4,7 %, aproximadamente 4,8 %, aproximadamente 4,9 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 5,1 %, aproximadamente 5,2 %, aproximadamente 5,3 %, aproximadamente 5,4 %, aproximadamente 5,5 %, aproximadamente 5,6 %, aproximadamente 5,7 %, aproximadamente 5,8 %, aproximadamente 5,9 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 6,1 %, aproximadamente 6,2 %, aproximadamente 6,3 %, aproximadamente 6,4 %,

65

aproximadamente 6,5 %, aproximadamente 6,6 %, aproximadamente 6,7 %, aproximadamente 6,8 %, aproximadamente 6,9 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 7,1 %, aproximadamente 7,2 %, aproximadamente 7,3 %, aproximadamente 7,4 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 7,6 %, aproximadamente 7,7 %, aproximadamente 7,8 %, aproximadamente 7,9 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 8,1 %, aproximadamente 8,2 %, aproximadamente 8,3 %, aproximadamente 8,4 %, aproximadamente 8,5 %, aproximadamente 8,6 %, aproximadamente 8,7 %, aproximadamente 8,8 %, aproximadamente 8,9 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 9,1 %, aproximadamente 9,2 %, aproximadamente 9,3 %, aproximadamente 9,4 %, aproximadamente 9,5 %, aproximadamente 9,6 %, aproximadamente 9,7 %, aproximadamente 9,8 %, aproximadamente 9,9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 %.

[0046] Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención que comprenden un antagonista(s) del receptor muscarínico de acetilcolina pueden formularse para administración tópica o, alternativamente, para administración transdérmica, como se define en las cláusulas adjuntas.

[0047] Una composición farmacéutica para administración tópica puede proporcionarse como, por ejemplo, ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, hidrogeles, aerosoles, aerosoles o aceites. Cuando se formula en forma de ungüento, el ingrediente activo puede emplearse con una base de ungüento parafínico o miscible en agua. Alternativamente, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite.

[0048] Una composición farmacéutica para administración transdérmica puede proporcionarse como, por ejemplo, un hidrogel que comprende uno o más antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina incorporados en una composición de parche adhesivo destinada a permanecer en contacto íntimo con la epidermis de un sujeto durante un período prolongado de tiempo. Una composición de parche adhesivo ejemplar puede comprender una capa monolítica producida mezclando uno o más antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina con un adhesivo de tipo silicona o alternativamente un adhesivo de acrilato-acetato de vinilo en un disolvente ejemplificado por cloruro de metileno, acetato de etilo, miristato de isopropilo y propilenglicol. La mezcla se extruiría entonces sobre una película de poliéster con un espesor uniforme de aproximadamente 100 micrones o más con un aplicador de película húmeda de precisión. Se deja que el solvente se evapore en un horno de secado y el "parche" resultante se recorta al tamaño apropiado.

[0049] El producto farmacéutico para administración tópica o alternativamente para administración transdérmica de un antagonista(s) del receptor de acetilcolina muscarínico de la invención incorpora adicionalmente uno o más potenciadores de la penetración o cosolventes y puede incorporar opcionalmente un agente espesante o gelificante y/o un emoliente y/o un antioxidante y/o un conservante antimicrobiano y/o un agente emulsionante y/o un solvente miscible en agua y/o un alcohol y/o agua.

[0050] Según la invención, la composición farmacéutica para administración tópica o transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina según se define en las reivindicaciones adjuntas comprende uno o más agentes potenciadores de la penetración o codisolventes para administración transdérmica o tópica. Un potenciador de la penetración es un excipiente que ayuda a la difusión del principio activo a través del estrato córneo. Muchos potenciadores de la penetración también funcionan como codisolventes que se cree que aumentan la actividad termodinámica o la solubilidad del antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina en la composición. Los potenciadores de la penetración también se conocen como aceleradores, adyuvantes o promotores de sorción. Un potenciador de la penetración adecuado para su uso en las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos en el presente documento debe: (i) ser muy potente, con un mecanismo de acción específico; (ii) exhibir un inicio rápido tras la administración; (iii) tener una duración de acción predecible; (iv) tener solo efectos no permanentes o reversibles sobre la piel; (v) ser químicamente estable; (vi) no tener efectos farmacológicos o tener efectos farmacológicos mínimos; (vii) ser física y químicamente compatible con otros componentes de la composición; (viii) ser inodoro; (ix) ser incoloro; (x) ser hipoalergénico; (xi) no ser irritante; (xii) no ser fototóxico; (xiii) no ser comedogénico; (xiv) tener un parámetro de solubilidad que se aproxime al de la piel (10,5 cal/cm³); (xv) estar fácilmente disponible; (xvi) ser económico; y (xvii) poder formularse en composiciones farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de un agente farmacéutico activo.

[0051] Varias clases de compuestos químicos, con varios mecanismos de acción, pueden usarse como potenciadores de la penetración. A continuación, se exponen ejemplos no limitativos de agentes potenciadores de la penetración, muchos de los cuales también son codisolventes adecuados. Los sulfóxidos, como el dimetilsulfóxido y el decilmetilsulfóxido, pueden usarse como agentes potenciadores de la penetración. El dimetilsulfóxido mejora la penetración en parte al aumentar la fluidez de los lípidos y promover la partición del fármaco. Por el contrario, el decilmetilsulfóxido mejora la penetración al reaccionar con las proteínas de la piel que cambian la conformación de las proteínas, lo que da como resultado la creación de canales acuosos.

[0052] Otra clase de potenciadores de la penetración son las alcanonas, como N-heptano, N-octano, N-nonano, N-decano, N-undecano, N-dodecano, N-tridecano, N-tetradecano y N-hexadecano. Se cree que las alcanonas mejoran la penetración de un agente activo al alterar el estrato córneo. Otra clase de potenciadores de la penetración son los alcoholes alcanoles, como el etanol, el propanol, el butanol, el 2-butanol, el pentanol, el 2-pentanol, el hexanol, el octanol, el nonanol, el decanol y el alcohol bencílico. Los alcoholes alcanoles de bajo peso molecular, es decir, aquellos con 6 carbonos o menos, pueden mejorar la penetración en parte al actuar como agentes solubilizantes, mientras que los alcoholes más hidrófobos pueden aumentar la difusión al extraer lípidos del estrato córneo. Otra clase de potenciadores de la penetración son los alcoholes grasos, como el alcohol oleílico, el alcohol caprílico, el alcohol decílico, el alcohol laurílico, el alcohol 2-laurílico, el alcohol miristílico, el alcohol cetílico, el alcohol estearílico, el alcohol oleílico, el alcohol linoleílico y el alcohol linolenílico. Los polioles, incluidos el propilenglicol, el polietilenglicol, el etilenglicol, el dietilenglicol, el trietilenglicol, el dipropilenglicol, el glicerol, el propanodiol, el butanodiol, el pentanodiol, el hexanotriol, el monolaurato de propilenglicol y el éter monometílico de dietilenglicol (transcutol), también pueden mejorar la penetración. Algunos polioles, como el propilenglicol, pueden funcionar como potenciadores de la penetración solvatando la alfa-queratina y ocupando los sitios de unión de hidrógeno, reduciendo así la cantidad de unión al tejido activo.

[0053] Otra clase de potenciadores de la penetración son las amidas, que incluyen urea, dimetilacetamida, dietiltoluamida, dimetilformamida, dimetiloctamida, dimetildecamida y urea cíclica biodegradable (p. ej., 1-alquil-4-imidazolin-2-ona). Las amidas tienen varios mecanismos para potenciar la penetración. Por ejemplo, algunas amidas, como la urea, aumentan la hidratación del estrato córneo, actúan como queratolíticos y crean canales de difusión hidrófilos. Por el contrario, otras amidas, como la dimetilacetamida y la dimetilformamida, aumentan la partición de la queratina a bajas concentraciones, mientras que aumentan la fluidez de los lípidos y alteran el empaquetamiento de los lípidos a concentraciones más altas. Otra clase de agentes potenciadores de la penetración son los derivados de pirrolidona, tales como 1-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, 1-lauril-2-pirrolidona, 1-metil-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-hexil-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-lauril-4-carboxi-2-pirrolidona, 1-metil-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, 1-hexil-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, 1-lauril-4-metoxicarbonil-2-pirrolidona, N-metil-pirrolidona, N-ciclohexilpirrolidona, N-dimetilaminopropil-pirrolidona, N-cocoalquilpirrolidona y N-seboalquilpirrolidona, así como los derivados biodegradables de pirrolidona, incluyendo ésteres de ácidos grasos de N-(2-hidroxietil)-2-pirrolidona. En parte, los derivados de pirrolidona mejoran la penetración a través de interacciones con la queratina en el estrato córneo y los lípidos en la estructura de la piel. Una clase adicional de potenciadores de la penetración son las amidas cíclicas, incluyendo 1-dodecilazacicloheptano-2-ona también conocida como Azone[®] (Azone es una marca registrada de Echo Therapeutics Inc., Franklin, MA, EE. UU.), 1-geranilazacicloheptan-2-ona, 1-farnesilazacicloheptan-2-ona, 1-geranilgeranilazacicloheptan-2-ona, 1-(3,7-dimetiloctil)-azacicloheptan-2-ona, 1-(3,7,11-trimetildodecil)azacicloheptan-2-ona, 1-geranilazaciclohexano-2-ona, 1-geranilazaciclohexano-2,5-diona y 1-farnesilazaciclohexano-2-ona. Las amidas cíclicas, como Azone[®], mejoran la penetración de los agentes activos en parte al afectar la estructura lipídica del estrato córneo, aumentando la partición y aumentando la fluidez de la membrana. Las clases adicionales de potenciadores de la penetración incluyen dietanolamina, trietanolamina y hexametilenlauramida y sus derivados.

[0054] Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen ácidos grasos lineales, como ácido octanoico, ácido linoleico, ácido valérico, ácido heptanoico, ácido pelagónico, ácido caproico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido caprílico. Los ácidos grasos lineales mejoran la penetración en parte a través de la perturbación selectiva de las bicapas lipídicas intercelulares. Además, algunos ácidos grasos lineales, como el ácido oleico, mejoran la penetración al disminuir las temperaturas de transición de fase del lípido, aumentando así la libertad de movimiento o la fluidez de los lípidos. Los ácidos grasos ramificados, que incluyen ácido isovalérico, ácido neopentanoico, ácido neoheptanoico, ácido nonanoico, ácido trimetilhexanoico, ácido neodecanoico y ácido isoesteárico, son otra clase de potenciadores de la penetración. Otra clase de potenciadores de la penetración son los ésteres de ácidos grasos alifáticos, como oleato de etilo, n-butilato de isopropilo, n-hexanoato de isopropilo, n-decanoato de isopropilo, miristato de isopropilo ("MIP"), palmitato de isopropilo y miristato de octildodecilo. Los ésteres de ácidos grasos alifáticos mejoran la penetración al aumentar la difusividad en el estrato córneo y/o el coeficiente de partición. Además, ciertos ésteres de ácidos grasos alifáticos, como MIP, mejoran la penetración al actuar directamente sobre el estrato córneo y penetrar en las bicapas de liposomas, aumentando así la fluidez. Los ésteres de ácidos grasos de alquilo, como el acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de metilo, valerato de metilo, propionato de metilo, sebacato de dietilo, oleato de etilo, estearato de butilo y laurato de metilo, pueden actuar como potenciadores de la penetración. Los ésteres de ácidos grasos de alquilo mejoran la penetración en parte al aumentar la fluidez de los lípidos.

[0055] Una clase adicional de potenciadores de la penetración son los surfactantes aniónicos, que incluyen el laurato de sodio, el lauril sulfato de sodio y el octil sulfato de sodio. Los surfactantes aniónicos mejoran la penetración de los agentes activos al alterar la función de barrera del estrato córneo y permitir la eliminación de los agentes solubles en agua que normalmente actúan como plastificantes. Otra clase de potenciadores de la penetración son los surfactantes catiónicos, como el bromuro de cetiltrimetilamonio, el bromuro de tetradeciltrimetilamonio, el bromuro de octiltrimetilamonio, el cloruro de benzalconio, el cloruro de octadeciltrimetilamonio, el cloruro de cetilpiridinio, el cloruro de dodeciltrimetilamonio y el cloruro de hexadeciltrimetilamonio. Los surfactantes catiónicos mejoran la penetración al adsorberse en las interfases de las membranas biológicas e interactuar con ellas, lo que provoca daños en la piel. Otra clase de potenciadores de la penetración son los surfactantes zwitteriónicos, como el sulfonato de hexadeciltrimetilamonio, la oleil betaína, la cocamidopropilhidroxisultaína y la cocamidopropil betaína. Surfactantes no iónicos ejemplificados por Polixámero 231, Polixámero 182, Polixámero 184, Polisorbato 20, Polisorbato 60, Brij[®] 30, Brij[®] 93, Brij[®] 96, Brij[®] 99 (Brij es una marca registrada de Uniqema Americas LLC, Wilmington, DE, EE. UU.),

Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 80, Span® 85 (Span es una marca registrada de Uniqema Americas LLC, Wilmington, DE, EE. UU.), Tween® 20, Tween® 40, Tween® 60, Tween® 80 (Tween es una marca registrada de Uniqema Americas LLC, Wilmington, DE, EE. UU.), Myrj 45, Myrj 51, Myrj 52 y Miglyol® 840 (Miglyol es una marca registrada de Sasol Germany GMBH Corp, Hamburg, Fed. Rep. Alemania), y similares. Los surfactantes no iónicos mejoran la penetración en parte emulsionando el sebo y mejorando la actividad termodinámica o solubilidad del activo.

5

[0056] Otra clase de potenciador de la penetración aumenta la actividad termodinámica o solubilidad del activo, que incluye, pero no se limita a, n-octanol, oleato de sodio, D-limoneno, monooleína, cineol, oleato de oleilo y miristato de isopropilo.

10

[0057] Otros potenciadores de la penetración son las sales biliares, como el colato de sodio, las sales de sodio del ácido taurocólico, los ácidos glicólicos y los ácidos desoxicólicos. También se ha descubierto que la lecitina tiene características de mejora de la penetración. Una clase adicional de potenciadores de la penetración son los terpenos, que incluyen hidrocarburos, como d-limoneno, alfa-pineno y beta-careno; alcoholes, como alfa-terpineol, terpinen-4-ol y carvol; cetonas, como la carvona, la pulegona, la piperitona y la mentona; óxidos, como el óxido de ciclohexeno, el óxido de limoneno, el óxido de alfa-pineno, el óxido de ciclopenteno y el 1,8-cineol; y aceites como el ylang ylang, el anís, el quenopodio y el eucalipto. Los terpenos mejoran la penetración en parte alterando la bicapa lipídica intercelular para aumentar la difusividad de las vías polares activas y de apertura dentro y a través del estrato córneo. Los ácidos orgánicos, como el ácido salicílico y los salicilatos (incluidos sus derivados de metil, etil y propilglicol), el ácido cítrico y el ácido succínico, son potenciadores de la penetración. Otra clase de potenciadores de la penetración son las ciclodextrinas, incluidas la 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina y la 2,6-dimetil-beta-ciclodextrina. Las ciclodextrinas mejoran la permeabilidad de los agentes activos mediante la formación de complejos de inclusión con los activos lipófilos y el aumento de su solubilidad en soluciones acuosas.

15

20

[0058] El agente o los agentes que mejoran la penetración y/o el codisolvente o los codisolventes están presentes en la composición farmacéutica para la administración tópica o transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina en una cantidad suficiente para proporcionar el nivel deseado de transporte del fármaco a través del estrato córneo y la epidermis o para aumentar la actividad termodinámica o la solubilidad del antagonista o antagonistas del receptor de acetilcolina. El uno o más potenciadores de penetración y/o codisolventes farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en una cantidad total en peso de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,1 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,3 %, aproximadamente 2,4 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,6 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 2,8 %, aproximadamente 2,9 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,1 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,3 %, aproximadamente 3,4 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,6 %, aproximadamente 3,7 %, aproximadamente 3,8 %, aproximadamente 3,9 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 4,1 %, aproximadamente 4,2 %, aproximadamente 4,3 %, aproximadamente 4,4 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 4,6 %, aproximadamente 4,7 %, aproximadamente 4,8 %, aproximadamente 4,9 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 5,1 %, aproximadamente 5,2 %, aproximadamente 5,3 %, aproximadamente 5,4 %, aproximadamente 5,5 %, aproximadamente 5,6 %, aproximadamente 5,7 %, aproximadamente 5,8 %, aproximadamente 5,9 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 6,1 %, aproximadamente 6,2 %, aproximadamente 6,3 %, aproximadamente 6,4 %, aproximadamente 6,5 %, aproximadamente 6,6 %, aproximadamente 6,7 %, aproximadamente 6,8 %, aproximadamente 6,9 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 7,1 %, aproximadamente 7,2 %, aproximadamente 7,3 %, aproximadamente 7,4 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 7,6 %, aproximadamente 7,7 %, aproximadamente 7,8 %, aproximadamente 7,9 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 8,1 %, aproximadamente 8,2 %, aproximadamente 8,3 %, aproximadamente 8,4 %, aproximadamente 8,5 %, aproximadamente 8,6 %, aproximadamente 8,7 %, aproximadamente 8,8 %, aproximadamente 8,9 %, aproximadamente 9,0 %, aproximadamente 9,1 %, aproximadamente 9,2 %, aproximadamente 9,3 %, aproximadamente 9,4 %, aproximadamente 9,5 %, aproximadamente 9,6 %, aproximadamente 9,7 %, aproximadamente 9,8 %, aproximadamente 9,9 % o aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 52 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 54 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 56 %, aproximadamente 57 %, aproximadamente 58 %, aproximadamente 59 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 61 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 63 %, aproximadamente 64 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 66 %, aproximadamente 67 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 69 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %.

55

60

65

aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 % o aproximadamente 95 %.

[0059] Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina puede comprender un agente espesante o gelificante adecuado para su uso en las composiciones y métodos descritos en el presente documento para aumentar la viscosidad de la composición. Los agentes adecuados (también conocidos como agentes gelificantes) son, por ejemplo, polímeros aniónicos neutralizados o carbómeros neutralizados, tales como ácido poliacrílico, carboxipolimetileno, carboximetilcelulosa y similares, incluidos derivados de Ultrez 10, polímeros Carbopol®, tales como Carbopol® Carbopol® 940, Carbopol® 941, Carbopol® 954, Carbopol® 980, Carbopol® 981, Carbopol® ETD 2001, Carbopol® EZ-2 y Carbopol® EZ-3. (Carbopol es una marca registrada de Lubrizol Advanced Materials Inc., Cleveland, OH, EE. UU.). Tal como se utiliza en el presente documento, un "carbómero neutralizado" es un polímero sintético de alto peso molecular, compuesto principalmente de un ácido poliacrílico neutralizado. Además, cuando se añade una base para neutralizar una solución de carbómero, la viscosidad de la solución aumenta. También son adecuados otros agentes espesantes poliméricos conocidos, como los emulsionantes poliméricos Pemulen®, los policarbófilos Noveon® (Pemulen y Noveon son marcas registradas de Lubrizol Advanced Materials Inc.) y Klucel® (Klucel es una marca registrada de Hercules Inc., Wilmington, DE, EE. UU.). En general, se pueden encontrar agentes espesantes, potenciadores y adyuvantes adicionales en The Science and Practice of Pharmacy de Remington, así como en Handbook of Pharmaceutical Excipients, Arthur H. Kibbe ed. 2000. La composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista(s) del receptor muscarínico de acetilcolina puede comprender un precursor de agente espesante de polímero aniónico, tal como un carbómero, que se ha combinado con un neutralizador en una cantidad suficiente para formar un gel o una composición similar a un gel con una viscosidad mayor que 1000 cps medida con un viscosímetro Brookfield RV DVII+ con husillo CPE-52, un torque mayor que 10 % y la temperatura mantenida a 25 °C. Alternativamente, el precursor de agente espesante de polímero aniónico se puede combinar con un neutralizador seleccionado del grupo que consiste en: hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, arginina, aminometilpropanol, tetrahidroxipropil etilendiamina, trietanolamina ("TEA"), trometamina, PEG-15 cocamina, diisopropanolamina y triisopropanolamina, o combinaciones de los mismos en una cantidad suficiente para neutralizar el precursor de agente espesante de polímero aniónico para formar un gel o una composición similar a un gel en la proceso de formación de la composición. Los agentes espesantes o gelificantes están presentes en una cantidad suficiente para proporcionar las propiedades reológicas deseadas de la composición, que incluyen tener una viscosidad suficiente para formar un gel o una composición similar a un gel que se pueda aplicar a la piel de un mamífero. El agente espesante o gelificante está presente en una cantidad total en peso de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,25 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,75 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 1,25 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,75 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,25 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,75 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,25 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,75 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 4,25 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 4,75 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 5,25 %, aproximadamente 5,5 %, aproximadamente 5,75 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 6,25 %, aproximadamente 6,5 %, aproximadamente 6,75 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 7,25 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 7,75 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 8,25 %, aproximadamente 8,5 %, aproximadamente 8,75 %, aproximadamente 9,0 %, aproximadamente 9,25 %, aproximadamente 9,5 %, aproximadamente 9,75 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 11,5 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 12,5 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 13,5 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 14,5 % o aproximadamente 15 %.

[0060] Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente un emoliente. Los emolientes adecuados se ejemplifican con aceite mineral, mezclas de aceite mineral y alcoholes de lanolina, alcohol cetílico, alcohol cetosteárico, vaselina, vaselina y alcoholes de lanolina, cera de ésteres de cetilo, colesterol, glicerina, monoestearato de glicerilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, lecitina, caproato de alilo, extracto de althea officinalis, alcohol araquidílico, argobase EUC, butilenglicol, dicaprilato/dicaprato, goma arábiga, alantoína, carragenina, cetildimeticona, ciclometicona, succinato de dietilo, behenato de dihidroabietilo, adipato de dioctilo, laurato de etilo, palmitato de etilo, estearato de etilo, laurato de isoamilo, octanoato, PEG-75, lanolina, laurato de sorbitán, aceite de nuez, aceite de germen de trigo, super almendra refinada, sésamo superrefinado, soja superrefinada, palmitato de octilo, triglicérido caprílico/cáprico y cocoato de glicerilo. Un emoliente, si está presente, está presente en las composiciones descritas en este documento en una cantidad en peso de la composición de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 25 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 %. A modo de ejemplo, uno o más emolientes están presentes en una cantidad total de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente

23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 % o aproximadamente 30 % en peso.

5 **[0061]** Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente un antioxidante. Los antioxidantes adecuados se ejemplifican con ácido cítrico, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido ascórbico, glutatión, retinal, α -tocoferol, β -caroteno, α -caroteno, ubiquinona, hidroxianisol butilado, ácido etilendiaminotetraacético, selenio, zinc, lignano, ácido úrico, ácido lipoico y N-acetilcisteína. Un antioxidante, si está presente, está presente en las composiciones descritas en este documento en una cantidad total seleccionada del intervalo de aproximadamente 0,025 % a aproximadamente 1,0 % en peso.

15 **[0062]** De acuerdo con otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en este documento puede comprender adicionalmente un conservante antimicrobiano. Los conservantes antimicrobianos ilustrativos incluyen ácidos, incluidos, entre otros, ácido benzoico, ácido fenólico, ácidos sórbicos, alcoholes, cloruro de bencetonio, bronopol, butilparabeno, cetrimida, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cresol, etilparabeno, imidurea, metilparabeno, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, sorbato de potasio, propilparabeno, propionato de sodio o timerosal. El conservante antimicrobiano, si está presente, está presente en una cantidad en peso de la composición de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 3 %, o de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 2 %, por ejemplo aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,4 %, aproximadamente 2,6 %, aproximadamente 2,8 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,4 %, aproximadamente 3,6 %, aproximadamente 3,8 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 4,2 %, aproximadamente 4,4 %, aproximadamente 4,6 %, aproximadamente 4,8 %, o aproximadamente 5 %.

30 **[0063]** Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente uno o más agentes emulsionantes. El término "agente emulsionante" se refiere a un agente capaz de reducir la tensión superficial entre una fase no polar y una polar e incluye agentes autoemulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados pueden proceder de cualquier clase de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables ejemplificados por carbohidratos, proteínas, alcoholes de alto peso molecular, agentes humectantes, ceras y sólidos finamente divididos. El agente emulsionante opcional, si está presente, está presente en una composición en una cantidad total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 % en peso de la composición. A modo de ejemplo, uno o más agentes emulsionantes están presentes en una cantidad total en peso de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 % o aproximadamente 25 %.

45 **[0064]** Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente un disolvente miscible en agua ejemplificado por propilenglicol. Un disolvente miscible en agua adecuado se refiere a cualquier disolvente que sea aceptable para su uso en una composición farmacéutica y que sea miscible con agua. Si está presente, el disolvente miscible en agua está presente en una composición en una cantidad total de aproximadamente 1 % a aproximadamente 95 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 75 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 50 %, aproximadamente 4 % a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en peso de la composición.

55 **[0065]** Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente uno o más alcoholes. En una forma de realización adicional, el alcohol es un alcohol inferior. Como se usa en el presente documento, el término "alcohol inferior", solo o en combinación, significa una fracción de alcohol de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene de uno a aproximadamente seis átomos de carbono. En una forma de realización, el alcohol inferior contiene de uno a aproximadamente cuatro átomos de carbono, y en otra forma de realización el alcohol inferior contiene dos o tres átomos de carbono. Entre los ejemplos de dichas fracciones de alcohol se incluyen metanol, etanol, etanol USP (es decir, 95 % v/v), n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol y terc-butanol. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "etanol" se refiere a C_2H_5OH . Puede utilizarse como alcohol deshidratado USP, alcohol USP o en cualquier forma común, incluso en combinación con diversas cantidades de agua. Si está presente, el alcohol está presente en una cantidad suficiente para formar una composición que sea adecuada para el contacto con un mamífero. Por ejemplo, en una cantidad total en peso de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente

11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %.

[0066] Según otro aspecto, la composición farmacéutica para administración tópica o para aplicación transdérmica de un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina como se define en el presente documento puede comprender adicionalmente agua por separado en una cantidad o cantidad suficiente para lograr el peso deseado de la composición farmacéutica.

[0067] El antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina comprenden aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 2,1 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,3 %, aproximadamente 2,4 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,6 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 2,8 %, aproximadamente 2,9 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 3,1 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,3 %, aproximadamente 3,4 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,6 %, aproximadamente 3,7 %, aproximadamente 3,8 %, aproximadamente 3,9 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 4,1 %, aproximadamente 4,2 %, aproximadamente 4,3 %, aproximadamente 4,4 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 4,6 %, aproximadamente 4,7 %, aproximadamente 4,8 %, aproximadamente 4,9 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 5,1 %, aproximadamente 5,2 %, aproximadamente 5,3 %, aproximadamente 5,4 %, aproximadamente 5,5 %, aproximadamente 5,6 %, aproximadamente 5,7 %, aproximadamente 5,8 %, aproximadamente 5,9 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 6,1 %, aproximadamente 6,2 %, aproximadamente 6,3 %, aproximadamente 6,4 %, aproximadamente 6,5 %, aproximadamente 6,6 %, aproximadamente 6,7 %, aproximadamente 6,8 %, aproximadamente 6,9 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 7,1 %, aproximadamente 7,2 %, aproximadamente 7,3 %, aproximadamente 7,4 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 7,6 %, aproximadamente 7,7 %, aproximadamente 7,8 %, aproximadamente 7,9 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 8,1 %, aproximadamente 8,2 %, aproximadamente 8,3 %, aproximadamente 8,4 %, aproximadamente 8,5 %, aproximadamente 8,6 %, aproximadamente 8,7 %, aproximadamente 8,8 %, aproximadamente 8,9 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 9,1 %, aproximadamente 9,2 %, aproximadamente 9,3 %, aproximadamente 9,4 %, aproximadamente 9,5 %, aproximadamente 9,6 %, aproximadamente 9,7 %, aproximadamente 9,8 %, aproximadamente 9,9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 28 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 32 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 34 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 36 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 38 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 42 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 44 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 46 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 48 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % en peso de la composición farmacéutica para aplicación tópica o para aplicación transdérmica.

[0068] Otra forma de realización se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina formulados para administración parenteral mediante inyección. Las composiciones farmacéuticas inyectables de la presente invención comprenden una solución portadora adecuada ejemplificada por agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las soluciones tamponadas adecuadas se ejemplifican por la solución de dextrosa de Ringer y las soluciones de lactato de Ringer. La solución portadora puede comprender una cantidad total en peso de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,1 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,3 %, aproximadamente 2,4 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,6 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 2,8 %, aproximadamente 2,9 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,1 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,3 %, aproximadamente 3,4 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,6 %, aproximadamente 3,7 %, aproximadamente 3,8 %, aproximadamente 3,9 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 4,1 %, aproximadamente 4,2 %, aproximadamente 4,3 %, aproximadamente 4,4 %, aproximadamente 4,5 %, aproximadamente 4,6 %, aproximadamente 4,7 %, aproximadamente 4,8 %, aproximadamente 4,9 %, aproximadamente 5,0 %, aproximadamente 5,1 %, aproximadamente 5,2 %, aproximadamente 5,3 %, aproximadamente 5,4 %, aproximadamente 5,5 %, aproximadamente 5,6 %, aproximadamente 5,7 %, aproximadamente 5,8 %, aproximadamente 5,9 %, aproximadamente 6,0 %, aproximadamente 6,1 %, aproximadamente 6,2 %, aproximadamente 6,3 %, aproximadamente 6,4 %, aproximadamente 6,5 %,

aproximadamente 6,6 %, aproximadamente 6,7 %, aproximadamente 6,8 %, aproximadamente 6,9 %, aproximadamente 7,0 %, aproximadamente 7,1 %, aproximadamente 7,2 %, aproximadamente 7,3 %, aproximadamente 7,4 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 7,6 %, aproximadamente 7,7 %, aproximadamente 7,8 %, aproximadamente 7,9 %, aproximadamente 8,0 %, aproximadamente 8,1 %, aproximadamente 8,2 %, aproximadamente 8,3 %, aproximadamente 8,4 %, aproximadamente 8,5 %, aproximadamente 8,6 %, aproximadamente 8,7 %, aproximadamente 8,8 %, aproximadamente 8,9 %, aproximadamente 9,0 %, aproximadamente 9,1 %, aproximadamente 9,2 %, aproximadamente 9,3 %, aproximadamente 9,4 %, aproximadamente 9,5 %, aproximadamente 9,6 %, aproximadamente 9,7 %, aproximadamente 9,8 %, aproximadamente 9,9 % o aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 41 %, aproximadamente el 42 %, aproximadamente el 43 %, aproximadamente el 44 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 46 %, aproximadamente el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 % o aproximadamente el 95 %.

[0069] Según un aspecto, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden incorporar adicionalmente uno o más disolventes no acuosos ejemplificados por propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables ejemplificados por oleato de etilo.

[0070] Según otro aspecto, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden incorporar adicionalmente uno o más de antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y similares.

[0071] Las composiciones farmacéuticas inyectables pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis ejemplificados por ampollas y viales sellados. Las composiciones farmacéuticas inyectables pueden almacenarse en un estado liofilizado (liofilizado) que requiere la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes de su uso.

[0072] Otro aspecto de la divulgación (no reivindicado) se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina formulados para administración oral. Las composiciones farmacéuticas orales pueden proporcionarse como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos). Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender, por ejemplo, lactosa, almidón o derivados de los mismos, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales de los mismos. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. El antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina pueden estar recubiertos o mezclados con un material (por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo) que retrase la desintegración o afecte la absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal. Así, por ejemplo, la liberación sostenida de un agente activo puede lograrse durante muchas horas y, si es necesario, el agente activo puede protegerse de su degradación dentro del tracto gastrointestinal. Aprovechando los distintos niveles de pH y condiciones enzimáticas a lo largo del tracto gastrointestinal, se pueden formular composiciones farmacéuticas para administración oral para facilitar la liberación de un agente activo en una ubicación gastrointestinal particular.

[0073] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se utilizan en una "cantidad farmacológicamente eficaz". Una "cantidad farmacológicamente eficaz" es la cantidad de antagonista(s) del receptor muscarínico de acetilcolina en la composición que es suficiente para administrar una cantidad terapéutica del agente activo durante el intervalo de dosificación en el que se administra la composición farmacéutica. Por consiguiente, la cantidad de la composición farmacéutica administrada para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista o antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina es de aproximadamente 0,01 g, aproximadamente 0,05 g, aproximadamente 0,1 g, aproximadamente 0,2 g, aproximadamente 0,3 g, aproximadamente 0,4 g, aproximadamente 0,5 g, aproximadamente 0,6 g, aproximadamente 0,7 g, aproximadamente 0,8 g, aproximadamente 0,9 g, aproximadamente 1 g, aproximadamente 1,1 g, aproximadamente 1,2 g, aproximadamente 1,3 g, aproximadamente

1,4 g, aproximadamente 1,5 g, aproximadamente 1,6 g, aproximadamente 1,7 g, aproximadamente 1,8 g, aproximadamente 1,9 g, aproximadamente 2 g, aproximadamente 2,1 g, aproximadamente 2,2 g, aproximadamente 2,3 g, aproximadamente 2,4 g, aproximadamente 2,5 g, aproximadamente 2,6 g, aproximadamente 2,7 g, aproximadamente 2,8 g, aproximadamente 2,9 g, aproximadamente 3 g, aproximadamente 3,1 g, aproximadamente 3,2 g, aproximadamente 3,3 g, aproximadamente 3,4 g, aproximadamente 3,5 g, aproximadamente 3,6 g, aproximadamente 3,7 g, aproximadamente 3,8 g, aproximadamente 3,9 g, aproximadamente 4 g, aproximadamente 4,1 g, aproximadamente 4,2 g, aproximadamente 4,3 g, aproximadamente 4,4 g, aproximadamente 4,5 g, aproximadamente 4,6 g, aproximadamente 4,7 g, aproximadamente 4,8 g, aproximadamente 4,9 g, aproximadamente 5 g, aproximadamente 5,1 g, aproximadamente 5,2 g, aproximadamente 5,3 g, aproximadamente 5,4 g, aproximadamente 5,5 g, aproximadamente 5,6 g, aproximadamente 5,7 g, aproximadamente 5,8 g, aproximadamente 5,9 g, aproximadamente 6 g, aproximadamente 6,1 g, aproximadamente 6,2 g, aproximadamente 6,3 g, aproximadamente 6,4 g, aproximadamente 6,5 g, aproximadamente 6,6 g, aproximadamente 6,7 g, aproximadamente 6,8 g, aproximadamente 6,9 g, aproximadamente 7 g, aproximadamente 7,1 g, aproximadamente 7,2 g, aproximadamente 7,3 g, aproximadamente 7,4 g, aproximadamente 7,5 g, aproximadamente 7,6 g, aproximadamente 7,7 g, aproximadamente 7,8 g, aproximadamente 7,9 g, aproximadamente 8 g, aproximadamente 8,1 g, aproximadamente 8,2 g, aproximadamente 8,3 g, aproximadamente 8,4 g, aproximadamente 8,5 g, aproximadamente 8,6 g, aproximadamente 8,7 g, aproximadamente 8,8 g, aproximadamente 8,9 g, aproximadamente 9 g, aproximadamente 9,1 g, aproximadamente 9,2 g, aproximadamente 9,3 g, aproximadamente 9,4 g, aproximadamente 9,5 g, aproximadamente 9,6 g, aproximadamente 9,7 g, aproximadamente 9,8 g, aproximadamente 9,9 g o aproximadamente 10 g.

[0074] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir más completamente la invención y se presentan con fines ilustrativos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Efectos de la pirenzepina sobre el crecimiento de neuritas de neuronas extirpadas en un modelo de rata con diabetes tipo 2

[0075] Las neuronas sensoriales del DRG cervical, torácico y lumbar de una rata diabética ZDF macho adulta de 3-4 meses de edad (modelo de diabetes tipo 2) se aislaron y disociaron utilizando un método basado en las enseñanzas de Femyhough et al. (1993, Brain Res. 607:117-124), Gardiner et al. (2005, Mol. Cell Neurosci. 28:229-240) y Huang et al. (2003, Diabetes 52:2129-2136). Brevemente, los DRG se extrajeron de todos los niveles espinales, se recortaron sus raíces y luego las células se disociaron químicamente en colagenasa al 0,125 % (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EE. UU.) en medio nutritivo F12 (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canadá) durante 1,5 h a 37 °C. A continuación, los ganglios se disociaron mecánicamente mediante tratamiento con tripsina al 0,05 % (Worthington Biochemical Corp.) en medio nutritivo F12, seguido de trituración con una pipeta de vidrio. A continuación, la suspensión celular resultante se centrifugó a 600 rpm durante 5 min a través de un colchón de albúmina de suero bovino al 15 % (BSA; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canadá); este procedimiento eliminó gran parte de los restos celulares y dio como resultado un pellet neuronalmente emiched de neuronas disociadas. Las células neuronales se sembraron en placas de plástico NUNC de 48 o 96 pocillos revestidas con poli-L-ornitina-laminina con fondo de vidrio ópticamente transparente en medio f 12 sin suero ni insulina en presencia de aditivos N2 modificados (que no contienen insulina) a 37 °C en una incubadora humidificada con 95 % aire/5 % CO₂. Los cultivos se expusieron a las siguientes condiciones adicionales: 10 mM de D-glucosa, 0,1 nM de insulina, 0,3 ng/ml de NGF, 1 ng/ml de NT-3 y 5 ng/ml de GDNF (todos obtenidos de Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Tras la siembra, las neuronas se trataron inmediatamente con dosis de pirenzepina-HCl que oscilaban entre 0 y 10 μM. A continuación, se evaluó el crecimiento de las neuritas a las 24 horas como describieron previamente Fernyhough et al. (1993) y Gardiner et al. (2005). Los datos de la Figura 1 muestran que el aumento de dosis de 0,1, 0,5, 1,0 y 10,0 μM de pirenzepina-HCl aumentó progresivamente el crecimiento de neuritas a partir de las neuronas extirpadas de un modelo de diabetes tipo 2.

Ejemplo 2: Efectos de antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina seleccionados sobre el crecimiento de neuritas a partir de neuronas extirpadas de una rata normal

[0076] Las neuronas sensoriales del DRG cervical, torácico y lumbar de una rata Sprague Dawley macho adulta no diabética de 3-4 meses de edad se aislaron y disociaron utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1. Las células neuronales extirpadas y disociadas se sembraron en placas de plástico NUNC de 48 o 96 pocillos revestidas con poli-L-ornitina-laminina con fondos de vidrio ópticamente transparentes en medio F12 sin suero y sin insulina en presencia de aditivos N2 modificados (que no contienen insulina) a 37 °C en una incubadora humidificada con 95 % aire/5 % CO₂. Todos los cultivos se expusieron a las siguientes condiciones adicionales: 10 mM de D-glucosa, 0,1 nM de insulina, 0,3 ng/ml de NGF, 1 g/ml de NT-3 y 5 ng/ml de GDNF (todos obtenidos de Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Tras la siembra, las neuronas se expusieron a estas condiciones y se trataron inmediatamente con uno de los siguientes tres antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina: (A) dosis de pirenzepina-HCl que oscilaban entre 0 y 10 μM, (B) dosis de telenzepina-2HCl que oscilaban entre 0 y 10 μM y (C) dosis de atropina que oscilaban entre 0 y 1,0 μM. A continuación, se evaluó el crecimiento de las neuritas a las 24 h. Los datos de la Fig. 2(A) muestran que la dosis más baja de pirenzepina de 0,01 μM más que triplicó el crecimiento de neuritas de las neuronas extirpadas de un modelo no diabético, y que el aumento de las dosis de pirenzepina de 0,1, 1,0 y 10,0 μM no aumentó aún más las tasas de crecimiento de neuritas. Los datos de la Fig. 2(B) muestran que la dosis más baja de telenzepina de 0,01 μM más que duplicó el crecimiento de neuritas de las

neuronas extirpadas de un modelo no diabético, y que las dosis de 0,1 μM y 10,0 μM triplicaron las tasas de crecimiento de neuritas. Los datos de la Fig. 2(C) muestran que la dosis más baja de atropina de 0,01 μM más que triplicó el crecimiento de neuritas de las neuronas extirpadas de un modelo no diabético, y que las dosis de 0,1 μM y 10,0 μM no aumentaron más las tasas de crecimiento de neuritas.

Ejemplo 3: Efectos de bajas concentraciones de dos antagonistas selectivos de MIR en el crecimiento de neuritas de neuronas extirpadas en una rata normal

[0077] Las neuronas sensoriales del DRG cervical, torácico y lumbar de una rata Sprague Dawley macho adulta de 3-4 meses de edad se aislaron y disociaron utilizando el método descrito en el Ejemplo 1, y luego se cultivaron durante 24 h en medio F12 sin suero y sin insulina en presencia de aditivos N2 modificados. Tras la siembra, las neuronas se trataron inmediatamente con: (A) dosis de pirenzepina-HCl que oscilaban entre 0 y 0,1 μM (rombos sólidos), o (B) un nuevo agente antimuscarínico con el nombre en código "VU255035" (cuadrados sólidos). VU255035 [N-(3-oxo-3-(4-(piridina-4-il)piperazin-1-il)propil)-benzo[c][1,2,5]tiadiazol-4 sulfonamida] es un nuevo antagonista específico de MIR (Sheffler et al., 2009, Molecular Pharmacology 76: 356-368). Los estudios funcionales y de unión de radioligandos en equilibrio demuestran una selectividad de VU255035 para MIR superior a 75 veces en relación con M(2)-M(5). Los estudios de farmacología molecular y mutagénesis indican que VU255035 es un antagonista ortostérico competitivo de MIR. VU255035 tiene una excelente penetración de la barrera hematoencefálica in vivo en ratones. A continuación, se evaluó el crecimiento de neuritas después de un período de cultivo de 24 horas.

[0078] Las longitudes totales de neuritas (es decir, la suma de la longitud de todas las neuritas producidas por una neurona individual) se evaluaron utilizando un método de inmunotinción. Una placa de cultivo de tejidos Greiner Bio-One μClear de 96 pocillos (Greiner Bio-One North America Inc., Munroe, NC, EE. UU.) con una superficie de crecimiento de plástico delgada y ópticamente transparente para optimizar las condiciones de crecimiento de neuritas. Se capturaron cuatro imágenes por pocillo y la frecuencia de pocillos replicados se estableció en $n = 6$. El marcador neuronal β -tubulina III (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) se aplicó a células fijadas con formalina. El marcador se etiquetó con el conjugado fluorescente Alexa Fluor 488 (Invitrogen Canada Ltd.). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron utilizando un microscopio invertido Olympus IX71 con un objetivo LUCPLANFLN de 20X/0,45 PHI que era adecuado para resolver imágenes en superficies de plástico. Este sistema estaba equipado con una lámpara de arco corto de xenón y un monocromador Delta Ram X (Photon Technology International, Birmingham, NJ, EE. UU.) para proporcionar una longitud de onda de excitación confiable. La fluorescencia de la imagen capturada se convirtió luego en una imagen de 8 bits en escala de grises para cuantificar el volumen total de píxeles. Específicamente, la imagen TIFF sin procesar se abrió utilizando el software de procesamiento de imágenes patrocinado por el NIH de dominio público Image J. La imagen se invirtió primero para crear una imagen de destino negra contra un fondo blanco y luego se minimizó el volumen de píxeles de fondo mediante un ajuste de umbral. Las imágenes posteriores se estandarizaron frente al valor de umbral ajustado para la continuidad. Se cuantificó el volumen total de píxeles de los cuerpos celulares específicos de las neuronas y las neuritas. El volumen de píxeles de los cuerpos celulares se eliminó para obtener un volumen de píxeles neto atribuido a las neuritas. El volumen de píxeles neto se normalizó frente al número de células neuronales por campo cuantificado. Los datos de la Figura 3 muestran que: (A) las concentraciones de pirenzepina de 0,003 μM y mayores aumentaron significativamente el crecimiento total de neuritas en neuronas aisladas de una rata diabética, y (B) las concentraciones de VU255035 de 0,03 μM y mayores aumentaron significativamente el crecimiento total de neuritas en neuronas aisladas de una rata diabética.

Ejemplo 4: Respuestas de cultivos de neuronas sensoriales derivadas de ratones knock out para MIR, a tratamientos con pirenzepina

[0079] Las neuronas sensoriales de las neuronas sensoriales DRG cervical, torácica y lumbar se aislaron de (A) ratones de tipo salvaje (en un fondo 129S6 x CF1), y de (B) ratones knock out para MIR 5 (de Taconic, Hudson, NY y mediado a través de una colaboración con el Laboratory of Bioorganic Chemistry, NIH-NIDDK, Bethesda, MD) generalmente siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1. El receptor muscarínico de acetilcolina M1 (MIR), también conocido como receptor colinérgico, ha sido inactivado en ratones knock out para MIR y, por lo tanto, la administración de antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina que inactivan específicamente el receptor muscarínico de acetilcolina M1 no será fisiológicamente eficaz en ratones knock out para MIR. Las neuronas sensoriales DRG aisladas de los ratones de tipo salvaje y de los ratones knock out para MIR se cultivaron por separado durante 24 horas en un rango de concentraciones de factores de crecimiento neurotróficos (NT) más 1 μM de pirenzepina. El cóctel de factores de crecimiento de dosis baja (LD) indujo un nivel significativamente más alto de crecimiento de neuritas en cultivos de ratones knockout para MIR 15 (Fig. 4(B)) en comparación con el observado en cultivos de ratones de tipo salvaje (Fig. 4(A)). Los niveles máximos de crecimiento de neuritas generados por factores de crecimiento de dosis alta (HD) fueron los mismos entre los cultivos de ratones de tipo salvaje (Fig. 4(A)) y ratones knock out (Fig. 4(B)). Los tratamientos con pirenzepina aumentaron el crecimiento de neuritas 2 veces en comparación con el control LD en cultivos de ratones de tipo salvaje (Fig. 4(A)). Sin embargo, los tratamientos con pirenzepina no mejoraron el crecimiento de neuritas en cultivos de ratones knock out de MIR (Fig. 4(B)). También se midieron las cantidades de acetilcolina producidas por los cultivos de neuronas sensoriales DRG. La Fig. 5 muestra que los cultivos de neuronas sensoriales de ratones knock out de MIR produjeron significativamente menos acetilcolina en comparación con los cultivos de tipo salvaje. Estos datos sugieren que, al menos en condiciones de cultivo celular agudo, las neuronas sensoriales autolimitan su crecimiento axonal a través de una vía colinérgica autocrina (presumiblemente a través de una vía dependiente de acetilcolina/MIR). La sorprendente capacidad

de los antagonistas de MIR o la eliminación genética del MIR para acelerar el crecimiento axonal ha impulsado la hipótesis de que las neuronas periféricas adultas están bajo una "restricción colinérgica" constante que evita el crecimiento excesivo una vez que han alcanzado el contacto con su objetivo. Con respecto a la inervación de la epidermis por fibras sensoriales, los queratinocitos secretan acetilcolina y se comunican a través de una red no neuronal de receptores colinérgicos que tiene importancia durante la reparación de heridas. La presencia de MIR en las neuronas sensoriales ofrece la intrigante posibilidad de que las propias neuronas y/o los queratinocitos utilicen la acetilcolina como señal de "parada" para prevenir el crecimiento descontrolado de las fibras.

Ejemplo 5: Efectos de la pirenzepina en la fosforilación de la proteína quinasa regulada extracelularmente (ERK) en neuronas sensoriales cultivadas

[0080] Los DRG lumbares se aislaron de ratas Sprague Dawley macho exógamas siguiendo generalmente el método descrito en el Ejemplo 1, y luego se cultivaron durante 24 h en medio F12 sin suero y sin insulina en presencia de aditivos N2 modificados más 10 μ M de pirenzepina. Las muestras se tomaron inmediatamente (tiempo 0) y luego después de 15 min, 30 min, 6 h y 24 h de incubación. Se realizó Western blotting cuantitativo según lo enseñado por Chowdhury et al (2010) y Femyhough et al. (1999, Diabetes 48: 881-889). Los homogenizados de DRG de 5-10 μ g de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10 % y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las manchas se bloquearon luego en leche descremada al 5 % que contenía Tween-20 al 0,05 %, se enjuagaron en PBS (pH 7,4) y se incubaron con un reactivo de anticuerpo específico para quinasa regulada por señal extracelular fosforilada (Thr-202/Tyr-204) o total (P-ERK o T-ERK; 1:4000 y 1:2000, respectivamente; Covance, Princeton, NJ, EE. UU.). Las manchas se enjuagaron, se incubaron en reactivo Luminol para Western blotting (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.) y se obtuvieron imágenes utilizando un analizador de imágenes BioRad Fluor-S (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Los datos en las Figs. 6(A) y 6(B) muestran que la pirenzepina elevó la fosforilación de ERK (P-ERK) aproximadamente al doble después de 15 min con un retorno a la línea base a las 24 h (en relación con los niveles totales de ERK).

Ejemplo 6: Efectos de un antagonista muscarínico de MIR VU255035 sobre la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en neuronas sensoriales cultivadas

[0081] Se aislaron DRG lumbares de ratas Sprague Dawley macho exógamas generalmente siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, y luego se cultivaron durante 6 h en medio F12 sin suero y sin insulina en presencia de aditivos N2 modificados más 10 μ M de VU255035. Se tomaron muestras inmediatamente (tiempo 0) y luego después de 15 min, 30 min, 60 min y 6 h de incubación. Se realizó una transferencia Western cuantitativa siguiendo el procedimiento enseñado en el Ejemplo 5. Los homogenizados de DRG de 5-10 μ g de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10 % y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, las transferencias se bloquearon en leche descremada al 5 % 30 que contenía Tween-20 al 0,05 %, se enjuagaron en PBS (pH 7,4) y se incubaron con los siguientes anticuerpos: (i) AMPK antifosfo policlonal (en Thr-172, 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.) y (ii) quinasa regulada por señal extracelular (I-ERK; 1:2000, Covance, Princeton, NJ, EE. UU.). Las manchas se enjuagaron, se incubaron en reactivo de inmunotransferencia Luminol (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.) y se obtuvieron imágenes utilizando un analizador de imágenes BioRad Fluor-S (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Los datos de las figuras 7(A) y 7(B) muestran que VU255035 aumentó significativamente la fosforilación de AMPK (P-AMPK) a los 15 min y mantuvo la fosforilación a los 30-60 min con un retorno a la línea base a las 6 h (en relación con los niveles totales de ERK; los niveles totales de AMPK no se vieron afectados).

Ejemplo 7: Efectos profilácticos de las inyecciones subcutáneas de pirenzepina sobre el desarrollo de polineuropatía simétrica en un modelo de ratón de diabetes tipo 1

[0082] Se hizo diabéticos a ratones macho C57B16J con dos inyecciones de 90 mg/kg de STZ en días consecutivos y luego se los separó en cuatro grupos. Un quinto grupo fue el grupo de control (no diabético) y comprendió ratones que no recibieron las inyecciones de STZ. El primer grupo de ratones diabéticos no recibió ningún tratamiento con pirenzepina durante el transcurso del estudio de dos meses y sirve para ilustrar la neuropatía inducida por la diabetes. El primer grupo de ratones diabéticos STZ desarrolló signos de neuropatía, incluyendo enlentecimiento de la conducción nerviosa, hipoalgesia térmica y pérdida de IENF dentro de los 2 meses posteriores a los tratamientos con STZ. El segundo, tercer y cuarto grupos de ratones diabéticos STZ recibieron tratamientos diarios con pirenzepina administrados mediante inyección subcutánea en la nuca, comenzando una semana después de la segunda inyección de STZ. El segundo grupo de ratones diabéticos STZ recibió una dosis diaria de 0,1 mg de pirenzepina por kg de peso corporal. El tercer grupo de ratones diabéticos STZ recibió una dosis diaria de 1,0 mg de pirenzepina por kg de peso corporal. El cuarto grupo de ratones diabéticos STZ recibió una dosis diaria de 10,0 mg de pirenzepina por kg de peso corporal.

[0083] Dos meses después de la segunda inyección de STZ, se determinó la función de las neuronas sensoriales pequeñas en los cinco grupos de ratones midiendo la latencia de la respuesta térmica de la pata trasera utilizando un aparato Hargreaves modificado (UARD, San Diego, CA, EE. UU.) con una tasa de calentamiento de aproximadamente 1 °C/s desde una línea base de 30 °C y con un punto de corte a los 20 segundos, como enseñaron Calcutt et al. (2004, Diabetologia 47: 718-724). Los datos de la Fig. 8(A) muestran que el grupo de ratones diabéticos STZ que no recibieron tratamiento demostró un aumento significativo en la latencia térmica 30 en comparación con los ratones de control (no diabéticos). El grupo de ratones diabéticos que recibieron inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina a 10 mg/kg mostró una latencia de respuesta térmica que no fue significativamente diferente de la de los ratones de control no

diabéticos (Fig. 8(B)). El análisis estadístico se realizó utilizando el ANOVA unidireccional con comparación post-hoc utilizando la prueba de Tukey.

5 **[0084]** La integridad estructural de las neuronas sensoriales pequeñas se evaluó midiendo los perfiles de fibras nerviosas intraepidérmicas (IENF) en la piel plantar de la pata trasera que se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4 % y se procesó en bloques de parafina. Las secciones (6 µm) se tiñeron con el marcador panneuronal PGP9.5 (1:1000, Biogenesis Ltd., Poole, Reino Unido) y se observaron bajo un microscopio óptico para permitir el recuento de IENF y perfiles de nervios subepidérmicos (SNP) por unidad de longitud del borde dérmico:epidérmico utilizando la técnica enseñada por Beiswenger et al. (2008, Neurosci Lett. 442, 267-272). Los datos de la Fig. 8 muestran que los ratones diabéticos STZ que no habían recibido tratamiento demostraron una disminución significativa en los niveles de IENF en las patas en comparación con el control (ratones no diabéticos). El grupo de ratones diabéticos que recibieron inyecciones subcutáneas diarias de 10 mg/kg de pirenzepina no demostró cambios significativos en los niveles de IENF en las patas en comparación con los ratones de control (no diabéticos). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey.

15 **[0085]** La velocidad de conducción del nervio motor se midió bajo anestesia con isoflurano y la temperatura central y del nervio se mantuvo a 37 °C utilizando una almohadilla térmica y lámparas siguiendo las enseñanzas de Jolivalt et al. (2011, Diabetes Obesity and Metabolism, 2 de junio, publicación electrónica antes de la impresión). El nervio ciático se estimuló (pulso de 5 V, 0,05 ms, onda cuadrada) con electrodos de aguja en la escotadura ciática o el tobillo. Las respuestas tempranas evocadas (ondas M) se registraron de los músculos interóseos del pie con electrodos de aguja fina, se amplificaron y se mostraron en un osciloscopio. La diferencia en las latencias de respuesta de la onda M después de la estimulación en la escotadura ciática y el tobillo se registró como el tiempo necesario para la conducción del nervio motor entre los sitios de estimulación. La distancia entre los sitios de estimulación se midió en la superficie de la extremidad trasera completamente extendida y se dividió por la diferencia en las latencias de la onda M para calcular la velocidad de conducción del nervio motor ciático (MNCV). Las mediciones se realizaron por triplicado y el valor medio se utilizó para representar el MNCV para cada animal.

Ejemplo 8: Reversión de la hipoalgesia térmica y la pérdida de IENF en ratones diabéticos inducidos por STZ con VU255035

30 **[0086]** Se hizo diabéticos a ratones Swiss Webster (exogámicos) con dos inyecciones de 90 mg/kg de STZ en días consecutivos. Un grupo de control de ratones Swiss Webster de la misma edad no recibió las inyecciones de STZ. Los ratones se mantuvieron durante 8 semanas después de las inyecciones de STZ. La neuropatía diabética estaba bien establecida en los ratones que recibieron inyecciones de STZ como lo evidenciaron los signos de neuropatía (hipoalgesia térmica). A continuación, una cohorte recibió 10 mg/kg de VU255035 por inyección ip diariamente durante 4 semanas. Los datos en la Fig. 9(A) muestran que la hipoalgesia térmica (pérdida sensorial) se había desarrollado a las 8 semanas y el tratamiento con VU255035 causó una reversión significativa a los niveles de control de sensibilidad térmica. La Fig. 9(B) muestra que VU255035 también revirtió significativamente la pérdida de IENF y SNP.

40 Ejemplo 9: Efectos profilácticos de la aplicación tópica de pirenzepina sobre el desarrollo de neuropatía sensorial en un modelo de ratón de diabetes tipo 1

45 **[0087]** Se hizo diabético a ratones macho C57Bl6J con dos inyecciones de 90 mg/kg de STZ en días consecutivos y luego se los separó en tres grupos. También hubo dos grupos de ratones de control (no diabéticos). El primer grupo de ratones de control (no diabéticos) recibió un tratamiento tópico diario con 50 µl de hidrogel Intrasite® (Intrasite es una marca registrada de TJ Smith and Nephew, Hull, Inglaterra) en ambas patas traseras, con un tiempo de exposición controlado de 20 minutos. El segundo grupo de ratones de control (no diabéticos) recibió una aplicación tópica diaria de 50 µl de una composición de gel que comprendía un 10 % de pirenzepina en hidrogel en una pata trasera y 50 µl de hidrogel solo en la otra pata, comenzando cuando los ratones diabéticos recibieron sus tratamientos tópicos. El tercer grupo de ratones estaba formado por ratones diabéticos que recibieron un tratamiento tópico diario con 50 µl de hidrogel en ambas patas traseras. El cuarto grupo estaba formado por ratones diabéticos que recibieron una aplicación tópica diaria de 50 µl de hidrogel que comprendía un 2 % de pirenzepina en una pata trasera y 50 µl de hidrogel solo en la otra pata trasera, comenzando el tratamiento 7 días después de la segunda inyección de STZ. El quinto grupo estaba formado por ratones diabéticos que recibieron una aplicación tópica diaria de 50 µl de hidrogel que comprendía un 10 % de pirenzepina en una pata trasera y 50 µl de hidrogel solo en la otra pata trasera, comenzando el tratamiento 7 días después de la segunda inyección de STZ. El grupo de ratones diabéticos STZ tratados con hidrogel solo en ambas patas traseras desarrolló signos de neuropatía, incluyendo enlentecimiento de la conducción nerviosa, hipoalgesia térmica y pérdida de IENF en los dos meses siguientes a los tratamientos con STZ.

60 **[0088]** Dos meses después de la segunda inyección de STZ, se determinó la función de las neuronas sensoriales pequeñas en los cinco grupos de ratones midiendo la latencia de respuesta térmica de la pata trasera siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Los datos de la Figura 10(A) muestran que la latencia de respuesta térmica en ratones de control (no diabéticos) no se vio afectada por una aplicación tópica diaria del hidrogel que comprendía un 10 % de pirenzepina. Los ratones diabéticos STZ tratados con hidrogel solo en ambas patas traseras demostraron un aumento significativo en la latencia de la respuesta térmica en comparación con ambos grupos de ratones de control (no diabéticos). Los dos grupos de ratones diabéticos que recibieron aplicaciones tópicos diarias de hidrogel de pirenzepina en una pata

trasera no demostraron ningún cambio significativo en la latencia de la respuesta térmica en esa pata en comparación con los ratones de control (no diabéticos) (el análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía con comparación post-hoc utilizando la prueba de Tukey).

5 **[0089]** La integridad estructural de las neuronas sensoriales pequeñas se evaluó midiendo los perfiles de IENF en la piel plantar de la pata trasera como se describe en el Ejemplo 7. Los datos en las Figuras 10(B) y 10(C) muestran que la aplicación de hidrogel que comprende 10 % de pirenzepina en una pata trasera de ratones de control (no diabéticos) resultó en aumentos numéricamente, pero estadísticamente insignificantes, en IENF y SNP por mm de piel tomada de la pata trasera tratada con pirenzepina. Los ratones diabéticos STZ tratados con hidrogel solo en ambas patas traseras demostraron una disminución significativa en los niveles de IENF y SNP por mm de piel en las patas en comparación con los ratones de control (no diabéticos) que fueron tratados con hidrogel solo en ambas patas traseras. Los dos grupos de ratones diabéticos que recibieron aplicaciones tópicas diarias de 50 µl de hidrogel que comprendía 2 % o 10 % de pirenzepina no demostraron cambios significativos en los niveles de IENF y SNP en la pata tratada con pirenzepina en comparación con el control (ratones no diabéticos) que fueron tratados con hidrogel solo en ambas patas traseras (el análisis estadístico se realizó utilizando el ANOVA de una vía con comparación post-hoc utilizando la prueba de Tukey).

Ejemplo 10: Efectos restauradores de inyecciones subcutáneas de pirenzepina sobre la hipoalgesia térmica y la pérdida de IENF en ratones diabéticos

20 **[0090]** Se hicieron diabéticos ratones Swiss Webster machos exógenos con dos inyecciones de 90 mg/kg de STZ en días consecutivos. Un grupo de control de ratones Swiss Webster de la misma edad no recibió las inyecciones de STZ. Los ratones se mantuvieron durante 14 semanas después de las inyecciones de STZ. La neuropatía diabética estaba bien establecida en los ratones que recibieron inyecciones de STZ, como lo evidenciaron los signos de neuropatía, hipoalgesia térmica y pérdida de IENF. A las 14 semanas, los ratones diabéticos se separaron en dos grupos. El primero fue el grupo de ratones diabéticos no tratados. El otro grupo de ratones diabéticos recibió inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina en una dosis de 10 mg/kg durante 2 meses.

30 **[0091]** La función de las neuronas sensoriales pequeñas en grupos de ratones diabéticos y no diabéticos se evaluó a las 5, 7, 11 y 14 semanas después de las inyecciones de STZ. Se observó un aumento significativo de la latencia térmica en los ratones diabéticos en comparación con los ratones no diabéticos, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Se observó hipoalgesia 11 semanas después de las inyecciones de STZ y se volvió aún más pronunciada a las 14 semanas (Fig. 11(A)). El examen microscópico de muestras de tejido cutáneo recogidas de los ratones diabéticos a las 14 semanas mostró aproximadamente una pérdida del 40 % en IENF. Sin embargo, las administraciones diarias de pirenzepina a ratones diabéticos 5 redujeron significativamente la latencia térmica en las 4 semanas siguientes al inicio del tratamiento con pirenzepina, es decir, a las 18 semanas (Fig. 11(A)) y en la semana 21, es decir, 7 semanas después del inicio de los tratamientos con pirenzepina, la latencia térmica en los ratones diabéticos era idéntica a la de los controles no diabéticos (Fig. 11(A)). La determinación de los perfiles de IENF en los tres grupos de ratones a las 21 semanas demostró que la aplicación de los tratamientos con pirenzepina a ratones diabéticos restauró los perfiles de IENF para aproximarse a los de los ratones de control no diabéticos (Fig. 11 (B)).

40 **Ejemplo 11:** Reparación de neuropatía después de la retirada de los tratamientos con pirenzepina

45 **[0092]** Los ratones C57B16J se hicieron diabéticos con STZ como se describió anteriormente y luego recibieron 10 mg/kg de pirenzepina (inyecciones subcutáneas diarias). Después de 8 semanas, los tratamientos con pirenzepina evitaron la hipoalgesia 15 (Fig. 12). En este punto, se interrumpieron los tratamientos con pirenzepina y se midieron las latencias térmicas cada dos semanas a partir de entonces (Fig. 12). Únicamente 9 semanas después (el punto de tiempo de 17 semanas) hubo una reparación significativa de hipoalgesia en los ratones diabéticos inducidos con STZ tratados previamente (Fig. 12).

50 **Ejemplo 12:** Efectos de reversión de inyecciones subcutáneas de pirenzepina sobre la hipoalgesia térmica en ratas diabéticas

55 **[0093]** Un grupo de ratas Sprague Dawley macho adultas se volvieron diabéticas con una única inyección intraperitoneal de 75 mg/kg de STZ, mientras que un segundo grupo de ratas macho adultas se mantuvo como controles no diabéticos. Los dos grupos de ratas fueron monitoreados para la aparición de diabetes tipo 1 mediante la evaluación de la latencia térmica a intervalos de 4 semanas. Para la semana 12, la neuropatía estaba bien establecida en las ratas tratadas con STZ (Fig. 13). Las ratas diabéticas luego se separaron en dos grupos, con un grupo de ratas cada uno recibiendo una inyección subcutánea diaria de 10 mg/kg de pirenzepina. Las evaluaciones de la latencia térmica continuaron a intervalos de 4 semanas, y para la semana 20 del estudio, es decir, 8 semanas después de que comenzaran las inyecciones diarias de pirenzepina, la latencia térmica en las ratas diabéticas que recibieron las inyecciones había disminuido para aproximarse a los niveles en las ratas de control no diabéticas (Fig. 13).

Ejemplo 13: Efectos de la pirenzepina en la prevención del desarrollo del dolor, indicado por alodinia táctil, y enlentecimiento de la conducción nerviosa sensorial en ratas diabéticas

65

[0094] Dos grupos de ratas Sprague Dawley hembras adultas se volvieron diabéticas con una única inyección intraperitoneal de 55 mg/kg de STZ. Uno de los dos grupos de ratas inyectadas con STZ recibió tratamientos diarios de 10 mg/kg de pirenzepina mediante inyección subcutánea, mientras que el segundo grupo recibió inyecciones de vehículo solo. Un tercer grupo de ratas macho adultas se mantuvo como controles no diabéticos. Los tres grupos de ratas fueron monitoreados para detectar la aparición de neuropatía dolorosa diabética midiendo los umbrales de respuesta táctil de la pata en las semanas 5 y 9 de diabetes, como enseñó Calcutt (1996, Pain: 68:293-299). La neuropatía dolorosa, indicada por alodinia táctil (umbral de respuesta del 50 % por debajo de 5 g) estaba bien establecida en la semana 5 en las ratas tratadas con STZ que no recibieron los tratamientos con pirenzepina y persistió hasta 9 semanas de diabetes. Las ratas diabéticas tratadas con pirenzepina tuvieron umbrales de respuesta táctil de la pata que fueron significativamente más altos que las ratas diabéticas tratadas con vehículo después de 5 semanas de diabetes (Fig. 14A) y no diferentes de las ratas de control en la semana 9 de diabetes (Fig. 14A). La velocidad de conducción nerviosa sensorial (SNCV) se midió en las mismas cohortes de ratas después de 8 semanas de diabetes midiendo bajo anestesia con isoflurano, la latencia de las ondas H en el electromiograma de los músculos interóseos después de la estimulación eléctrica del nervio ciático en la escotadura ciática y el tendón de Aquiles y luego midiendo la distancia entre los dos puntos de estimulación nerviosa, como enseñó Calcutt (J. Clin. Invest. 111:507-514, 2003). La SNCV se redujo significativamente en ratas diabéticas y la pirenzepina previno parcialmente este déficit (Fig. 14B).

Ejemplo 14: Reversión de la neuropatía sensorial diabética con dosificación oral de pirenzepina

[0095] Se hizo diabéticos a ratones Swiss Webster machos exógenos con dos inyecciones de 90 mg/kg de STZ en días consecutivos. Un grupo de control de ratones Swiss Webster de la misma edad no recibió las inyecciones de STZ. Los ratones se mantuvieron durante 8 semanas después de las inyecciones de STZ. La neuropatía diabética estaba bien establecida en los ratones que recibieron inyecciones de STZ, como lo evidenciaron los signos de hipoalgesia térmica. A las 8 semanas, se administraron tratamientos diarios de pirenzepina a un subgrupo de ratones diabéticos con STZ mediante sonda oral durante un período adicional de 8 semanas. Los datos de la Fig. 15(A) muestran que los tratamientos que administraban pirenzepina por vía oral revirtieron la hipoalgesia térmica. Además, la dosificación oral con pirenzepina también revirtió la pérdida de IENF y SNP (Fig. 15(B)).

Ejemplo 15: Evaluación de los efectos de la pirenzepina sobre la expresión génica de AMPK y PGC1 α en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) en ratones diabéticos STZ

[0096] Algunos de los ratones de cada uno de los tres grupos de ratones (grupo de control no diabético; grupo diabético no tratado; grupo diabético que recibió inyecciones diarias de pirenzepina desde la semana 14 en adelante) del estudio descrito en el Ejemplo 10 se mantuvieron hasta 22 semanas después de las inyecciones STZ. Los DRG lumbares se aislaron y se enjuagaron en una solución helada que contenía tampón STE (sacarosa 250 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 7,4) y luego se homogeneizaron con un homogeneizador polytron (KINEMATICA GmbH, Suiza) utilizando pulsos de molienda de 3 x 7,5 s a intervalos de 30 s de acuerdo con el método enseñado por Chowdhury et al. (2010, Diabetes 59: 1082-1091).

[0097] Se realizó transferencia Western cuantitativo como lo divulgaron previamente Chowdhury et al. (2010) y Femyhough et al. (1999, Diabetes 48: 881-889). Los homogeneizados de DRG de 5-10 μ g de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10 % y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, las manchas se bloquearon en leche descremada al 5 % que contenía Tween-20 al 0,05 %, se enjuagaron en PBS (pH 7,4) y se incubaron con los siguientes anticuerpos: policlonal anti-fosfo AMPK (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.), policlonal anti-PGC-1 α (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EE. UU.) y monoclonal anti-subunidad p de la ATP sintasa (dilución 1:2000, Mitosciences, Eugene, OR). La quinasa regulada por señales extracelulares (ERK; 1:2000, Covance, Princeton, NJ, EE. UU.) se sondeó como control de carga (estudios previos muestran que esta proteína no cambia el nivel de expresión en DRG en la diabetes). Las manchas se enjuagaron, se incubaron en reactivo de inmunotransferencia Luminol (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.) y se obtuvieron imágenes utilizando un analizador de imágenes BioRad Fluor-S (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.).

[0098] Los datos en las Figs. 16(A) - 16(D) muestran que la expresión génica de P-AMPK, T-AMPK y PGC-1 α se redujo en ratones diabéticos en comparación con los controles no diabéticos, y que las inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina durante 8 semanas restauraron la expresión de estos genes.

Ejemplo 16: Evaluación de los efectos de la pirenzepina en la expresión de proteínas del complejo respiratorio mitocondrial en ganglios de la raíz dorsal en ratones diabéticos STZ

[0099] Las muestras de DRG se evaluaron para la expresión de proteínas mitocondriales específicas en ratas diabéticas que recibieron inyecciones diarias de pirenzepina durante 8 semanas. Se realizó una transferencia Western cuantitativa como se describe en el Ejemplo 15. Se realizó una transferencia Western cuantitativa como se describió previamente por Chowdhury et al (2010) y Femyhough et al. (1999). Los homogeneizados de DRG de 5-10 μ g de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10 % y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, las transferencias se bloquearon en leche descremada al 5 % que contenía Tween-20 al 0,05 %, se enjuagaron en PBS (pH 7,4) y se incubaron con los siguientes anticuerpos: monoclonal anti-citocromo c oxidasa subunidad 4 (COX IV; 1:1000, Mitosciences, Eugene, OR, EE. UU.), monoclonal anti-NADH deshidrogenasa (ubiquinona) proteína hierro-azufre 3

(NDUFS3, 1:1000, Mitosciences, Eugene, OR, EE. UU.). La quinasa regulada por señales extracelulares (T ERK; 1:2000, Covance, Princeton, NJ, EE. UU.) se sondeó como control de carga. Las manchas se enjuagaron, se incubaron en reactivo Luminol para transferencia Western (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.) y se obtuvieron imágenes utilizando un analizador de imágenes BioRad Fluor-S (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.).

[0100] Los datos de las Figs. 17(A) a 17(C) demuestran que los tratamientos con pirenzepina restauraron la expresión de las proteínas mitocondriales NDUFS3 y COX IV.

Ejemplo 17: Evaluación de los efectos de la pirenzepina sobre la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en los ganglios de la raíz dorsal en ratones diabéticos STZ

[0101] Las muestras de DRG lumbar de los ratones descritos en el Ejemplo 10 se evaluaron para la restauración de la actividad de los complejos mitocondriales en ratones diabéticos que recibieron inyecciones diarias de pirenzepina durante 8 semanas.

[0102] Todas las mediciones de las actividades enzimáticas en preparaciones de DRG lumbares se realizaron espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro UV-visible Ultrospec 2100 de temperatura controlada (Biopharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) utilizando los métodos enseñados por Chowdhury et al. (2010). La actividad del complejo I se midió como actividad de NADH sensible a rotenona: citocromo c reductasa. Se añadieron a la cubeta un tampón de ensayo recién preparado (50 mmol/l de fosfato de K, pH 7,4, 1 mmol/l de KCN, 100 μ mol/l de NADH) y 10 μ g de proteína de la preparación de homogeneizado de DRG y se preincubaron durante 3 min a 25 °C. Después de añadir 100 μ mol/l de citocromo c oxidado, se siguió la reacción durante 2 minutos a 550 nm y luego durante 2 minutos más después de añadir 25 μ mol/l de rotenona para permitir el cálculo de la actividad del complejo I sensible a la rotenona. La actividad del complejo IV se midió a 25 °C controlando la disminución de la absorbancia del citocromo c reducido a 550 nm, como lo revelaron Chowdhury et al. (2000, Clin. Chim. Acta 298: 157-173). La reacción se inició mediante la adición de 40 μ mol/l de citocromo c reducido en un tampón de fosfato de 50 mmol/l que contenía 5 μ g de proteína solubilizada con 0,02 % de laurilmaltósido. La actividad de la enzima del ciclo de Krebs, citrato sintasa, se determinó a 25 °C en un medio que contenía 150 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,2), 0,02 % de laurilmaltósido, 0,1 mmol/l de ácido ditionitrobenzoico y 5 μ g de proteína según el método de Chowdhury et al (2007, Free Radic. Res. 41: 1116-1124). La reacción se inició mediante la adición de 100 μ mol/l de acetil CoA y se midieron los cambios en la absorbancia a 412 nm durante 1 minuto. Este valor se restó de la velocidad obtenida después de la adición de 0,05 mmol/l de ácido oxalacético.

[0103] Los datos de las figuras 18(A) - 18(C) demuestran que los tratamientos con pirenzepina restauraron los déficits en los complejos respiratorios mitocondriales I y IV, y en la citrato sintasa.

Ejemplo 18: Evaluación de los efectos de la pirenzepina sobre la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en ganglios de la raíz dorsal lumbar recién homogeneizados en ratas diabéticas STZ

[0104] Algunas de las ratas de cada uno de los tres grupos de ratas (grupo de control no diabético; grupo de 20 diabéticos no tratados; grupo diabético que recibió inyecciones diarias de pirenzepina desde la semana 14 en adelante) del estudio descrito en el Ejemplo 12 se mantuvieron durante 20 semanas después de las inyecciones STZ. Las ratas fueron sacrificadas y posteriormente se aislaron los DRG lumbares y se enjuagaron en una solución helada que contenía tampón STE (sacarosa 250 mmol/l, Tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 7,4), y luego se homogeneizaron con un homogeneizador polytron 25 (KINEMATICA GmbH, Suiza) utilizando pulsos de molienda de 3 x 7,5 s a intervalos de 30 s de acuerdo con el método enseñado por Chowdhury et al. (2010).

[0105] La actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias recién aisladas de DRG lumbar de ratas de control, diabéticas y tratadas con pirenzepina de la misma edad se determinó utilizando un electrodo tipo Clarke (Oxígrafo-2K de Oroboros; Instrumentos de Oroboros, Innsbruck, Austria) siguiendo el método enseñado por Chowdhury et al. (2005, Biochem Biophys Res Commun. 333: 1139-1145), en presencia de sustratos específicos e inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (Fig. 19). La respiración basal en las mitocondrias de DRG lumbar se expresa como respiración en el estado 4 con sustratos energéticos, piruvato y malato (P+M). La respiración acoplada en el estado 3 se indujo mediante la adición de ADP. A continuación, la tasa desacoplada se determinó añadiendo el agente desacoplador, carbonilcianuro p-5 trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). A continuación, se añadieron ascorbato (Ase) y N,N,N',N'-tetrametil-p fenilendiamina (TMPD) para determinar la capacidad de la citocromo c oxidasa (complejo IV). TMPD es un mediador redox artificial que ayuda a la transferencia de electrones del ascorbato al citocromo c.

[0106] Las tasas de respiración basal con piruvato y malato (P + M) fueron similares para las ratas de control no diabéticas, las ratas diabéticas y en las ratas diabéticas que habían recibido inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina diariamente durante las últimas ocho semanas del estudio (Fig. 19). La respiración acoplada en ratas diabéticas después de 20 semanas disminuyó aproximadamente un 30 % con respecto a las ratas de control no diabéticas (P + M + ADP). Sin embargo, la respiración acoplada en ratas diabéticas que habían recibido inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina no fue significativamente diferente de los controles no diabéticos. Mientras que la respiración desacoplada en ratas diabéticas después de 20 semanas disminuyó aproximadamente un 40 % con respecto a las ratas de control no diabéticas (FCCP), la respiración desacoplada en ratas diabéticas que habían recibido inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina no fue significativamente diferente de los controles no diabéticos. La capacidad de la

citocromo c oxidasa (complejo IV) en ratas diabéticas después de 20 semanas disminuyó aproximadamente un 25 % con respecto a las ratas de control no diabéticas (Ase + TMPD). Sin embargo, la capacidad de la citocromo c oxidasa en ratas diabéticas que habían recibido inyecciones subcutáneas diarias de pirenzepina no fue significativamente diferente de los controles no diabéticos.

5 Ejemplo 19: Preparación de una composición de pirenzepina para aplicación tópica

10 **[0107]** Se preparó una composición de pirenzepina para aplicación tópica mezclando 10 mg de polvo de pirenzepina en 0,5 ml de un gel adecuado para un gel al 2 % (20 mg/ml). Un gel adecuado se ejemplifica con el hidrogel estéril Intrasisite®, número de producto 66027313 (Smith & Nephew Inc, St. Laurent, PQ, CA). Alternativamente, se pueden mezclar 100 mg de polvo de pirenzepina en 1,0 ml de gel para preparar un gel al 10 % (100 mg/ml).

Ejemplo de referencia 20: Preparación de una formulación oral de pirenzepina

15 **[0108]** La pirenzepina (ya sea en su forma de clorhidrato o su forma de hidrato u otras formas de sal similares) se puede disolver en solución salina, agua destilada o en una formulación de comprimido adecuada para administración oral. Dichas formulaciones se pueden preparar utilizando el conocimiento general disponible sobre pirenzepina o sus diversas formas de sal en la bibliografía y por alguien con un conocimiento razonable de la técnica. Una formulación de clorhidrato de pirenzepina disuelta en agua y administrada por vía oral a ratones mostró eficacia (Fig. 15).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

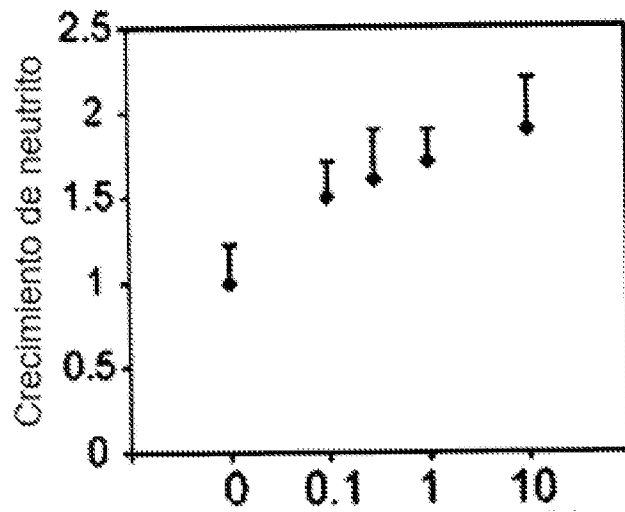
REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para su uso en un método de tratamiento de la neuropatía diabética mediante administración tópica o transdérmica, comprendiendo la composición:
- una cantidad eficaz de un antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo;
- 10 uno o más agentes potenciadores de la penetración o codisolventes; y
- un vehículo o excipiente farmacológicamente aceptable o combinaciones de los mismos.
- 15 2. Composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición es para administración tópica y es una loción, una crema, un gel, un fluido viscoso o un parche transdérmico.
- 20 3. Composición para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo, se selecciona de un grupo que consiste en: aprofeno, dicitlomina, bromuro de glicopirronio, nitrocaramifeno, espirotramina, telenzepina, trihexifenidilo, (-)-S-ET126, N-desmetilclozapina, O-metoxi-sila-hexociclo, p-fluorotrihexifenidilo, MB-OXTP, McN-A-343, MDL74019DG, MT7, PD150714, VU0255035 y sales y mezclas de los mismos.
- 25 4. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina comprende aproximadamente el 2 % en peso de la composición farmacéutica.
5. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina comprende aproximadamente el 10 % en peso de la composición farmacéutica.
- 30 6. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la neuropatía diabética es una polineuropatía diabética simétrica.
7. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende al menos uno de un agente espesante, un agente gelificante, un emoliente, un antioxidante, un conservante antimicrobiano, un agente emulsionante, un disolvente miscible en agua, un alcohol y agua.
- 35 8. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el agente potenciador de la penetración es un agente potenciador de la penetración transdérmica.
9. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el potenciador de la penetración comprende un sulfóxido y/o una alcanona y/o un ácido graso lineal.
- 40 10. Composición para uso según la reivindicación 9, en la que el ácido graso lineal es un ácido linoleico.
- 45 11. Compuesto antagonista del receptor muscarínico de acetilcolina selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo, para uso en un método de tratamiento de la neuropatía diabética en un sujeto, en el que el sujeto es un ser humano, y el método comprende administrar una composición que comprende el compuesto mediante inyección.
- 50 12. Compuesto para uso según la reivindicación 11, en el que el antagonista del receptor de acetilcolina muscarínico selectivo para el subtipo de receptor M1, o una sal del mismo, se selecciona de un grupo que consiste en: aprofeno, dicitlomina, bromuro de glicopirronio, nitrocaramifeno, pirenzepina, espirotramina, telenzepina, trihexifenidilo, (-)-S-ET126, N-desmetilclozapina, O-metoxi-sila-hexociclo, p-fluorotrihexifenidilo, MB OXTP, McN-A-343, MDL74019DG, MT7, PD150714, VU0255035, y sales y mezclas de los mismos.

55

60

65



Log₁₀ [Pirenzepina]µM

Ratas diabéticas tipo 2 ZDF de 4 meses

- neuronas cultivadas en 25 mM glucosa durante 1 día

Valores son medios ± SEM (n=3)

Fig. 1

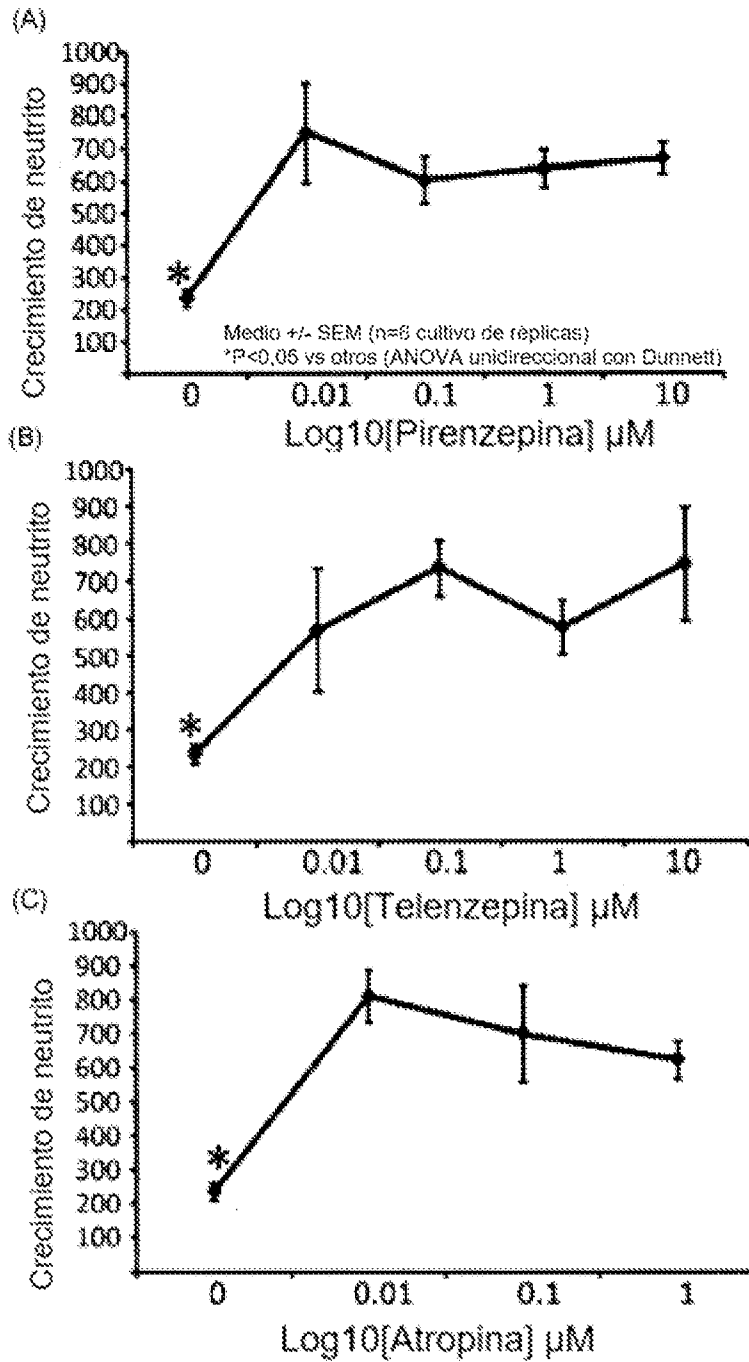


Fig. 2

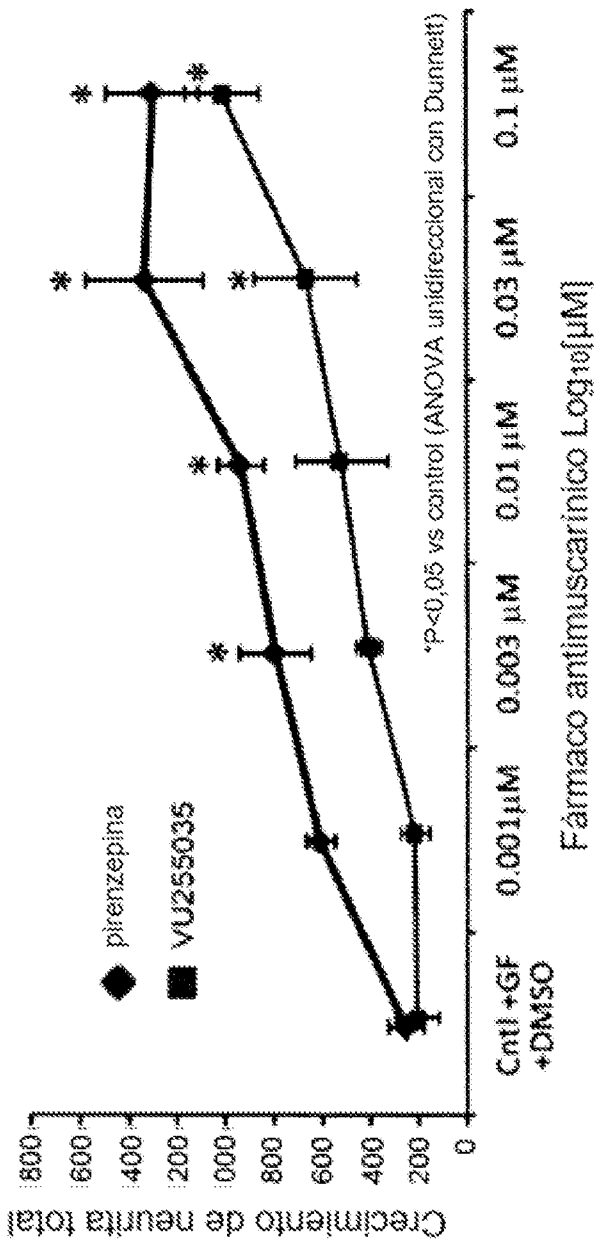


Fig. 3

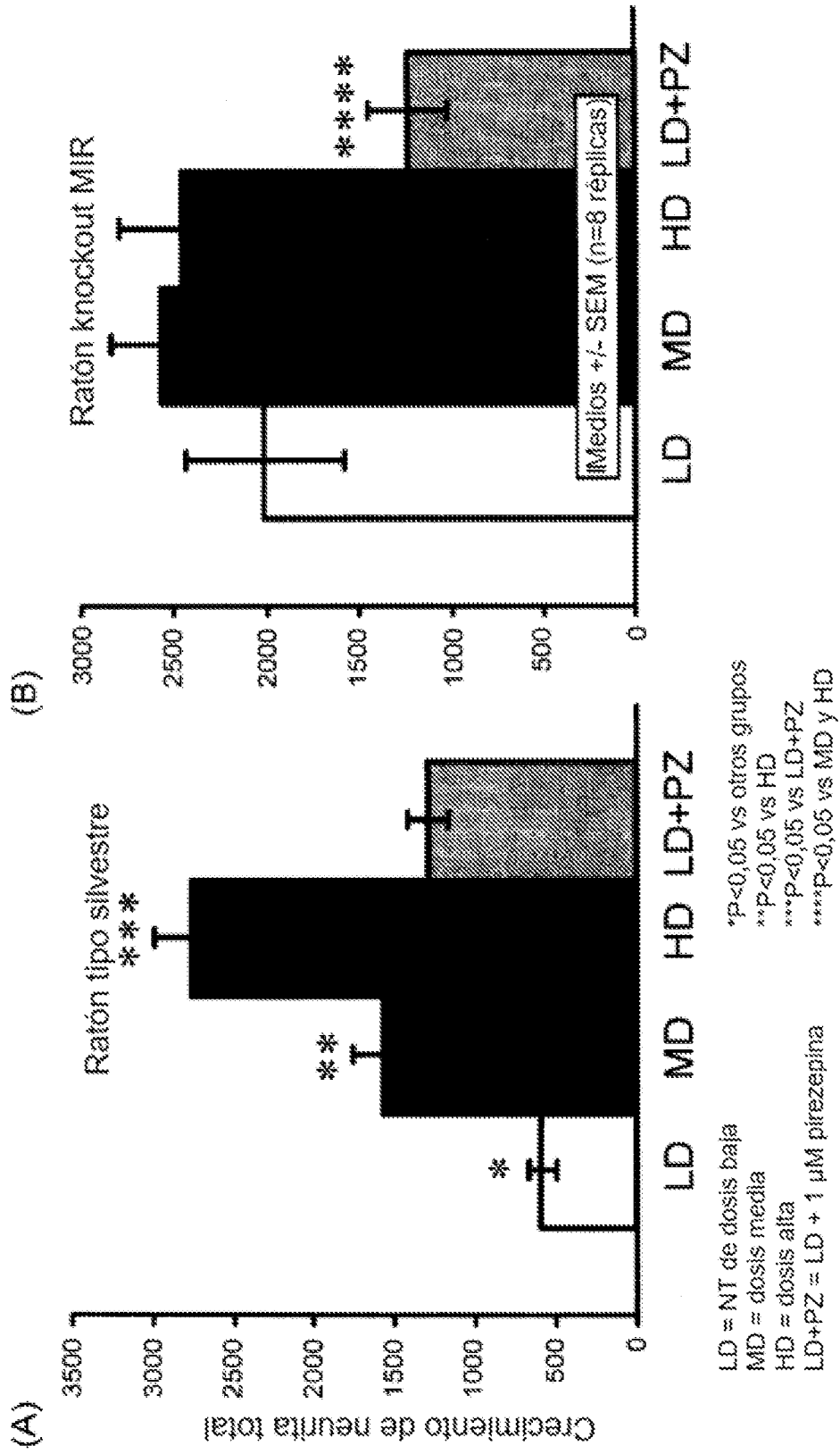


Fig. 4

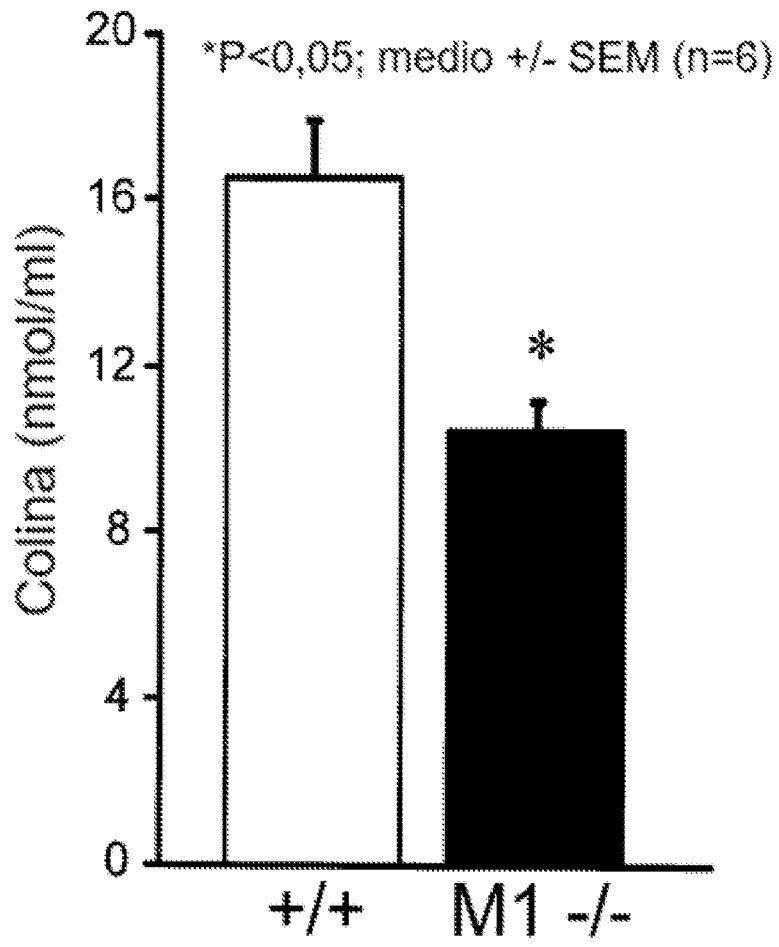
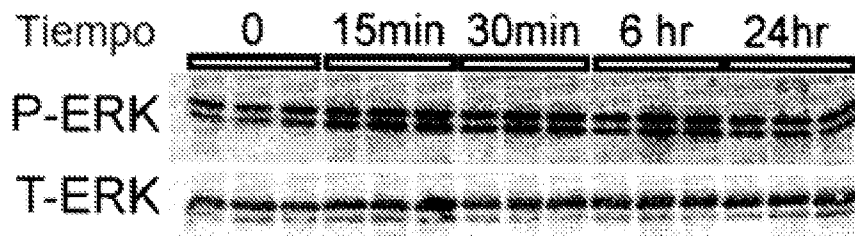


Fig. 5

(A)



(B)

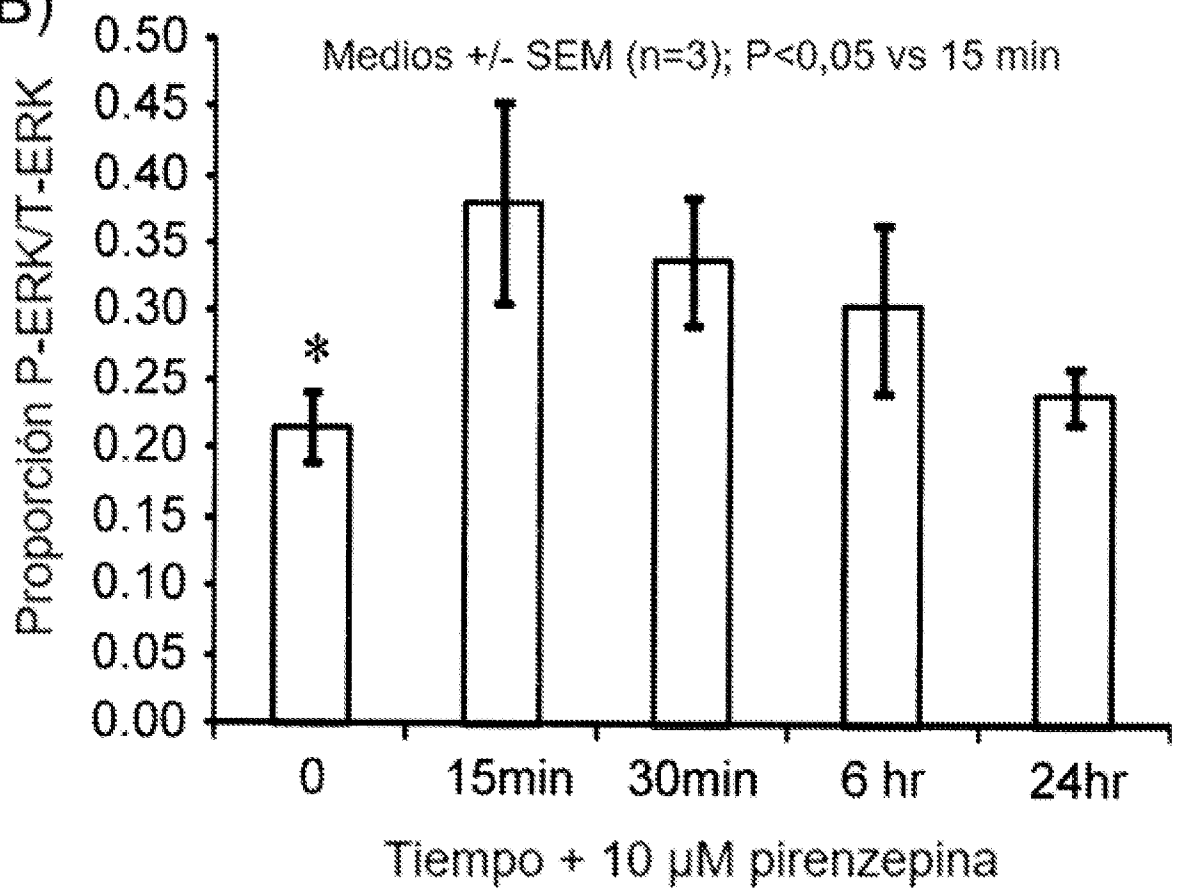


Fig. 6

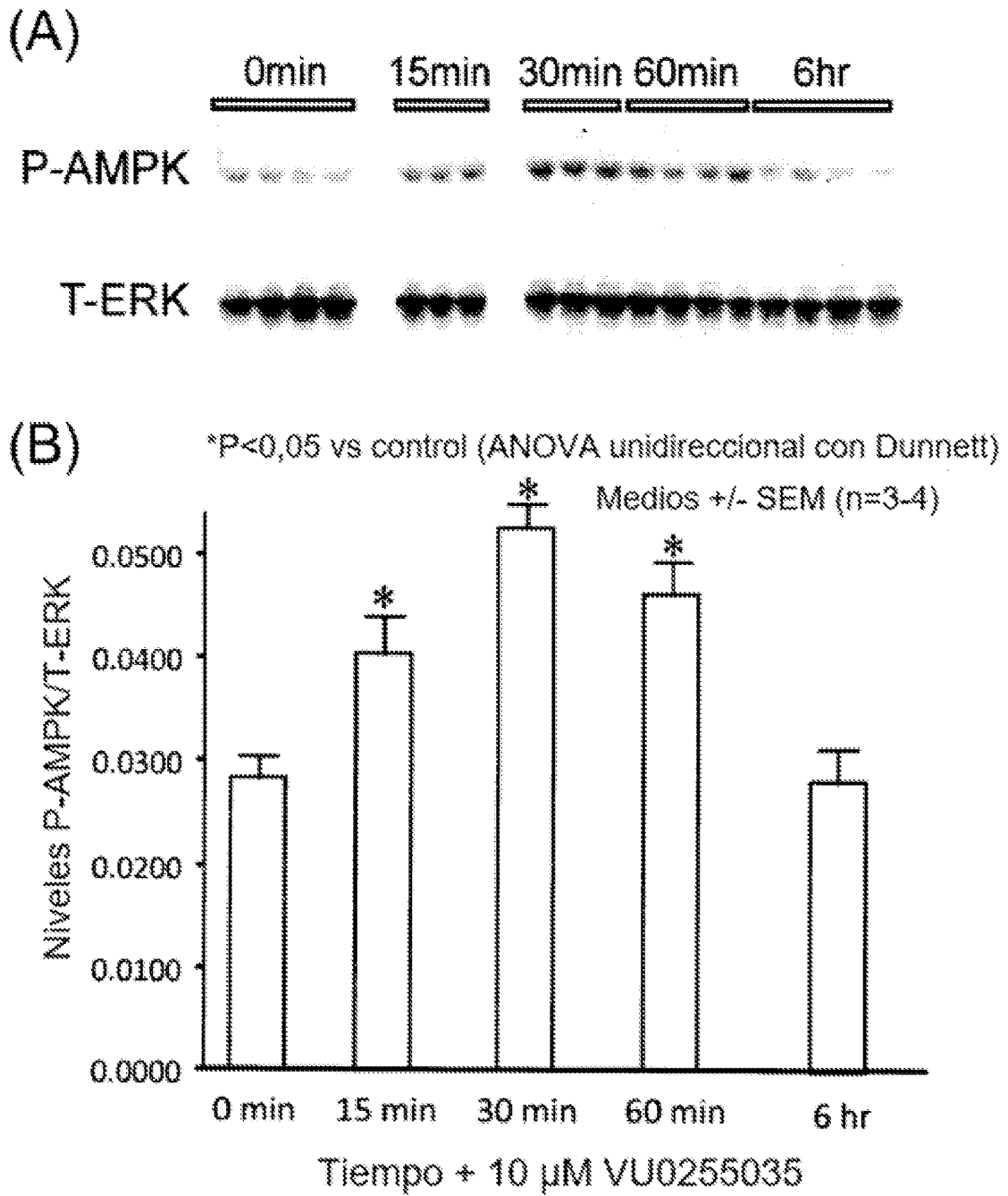
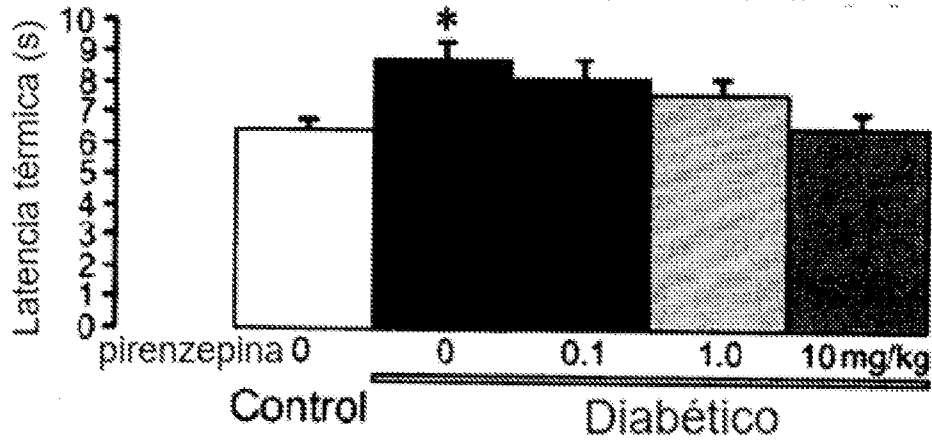


Fig. 7

(A) Latencia térmica de pata (pirenzepina sistèmica)

*P<0,05 vs control y 10 mg/kg PZ



(B) Niveles de IENF de pata (pirenzepina sistèmica)

*P<0,05 vs control y 10 mg/kg PZ

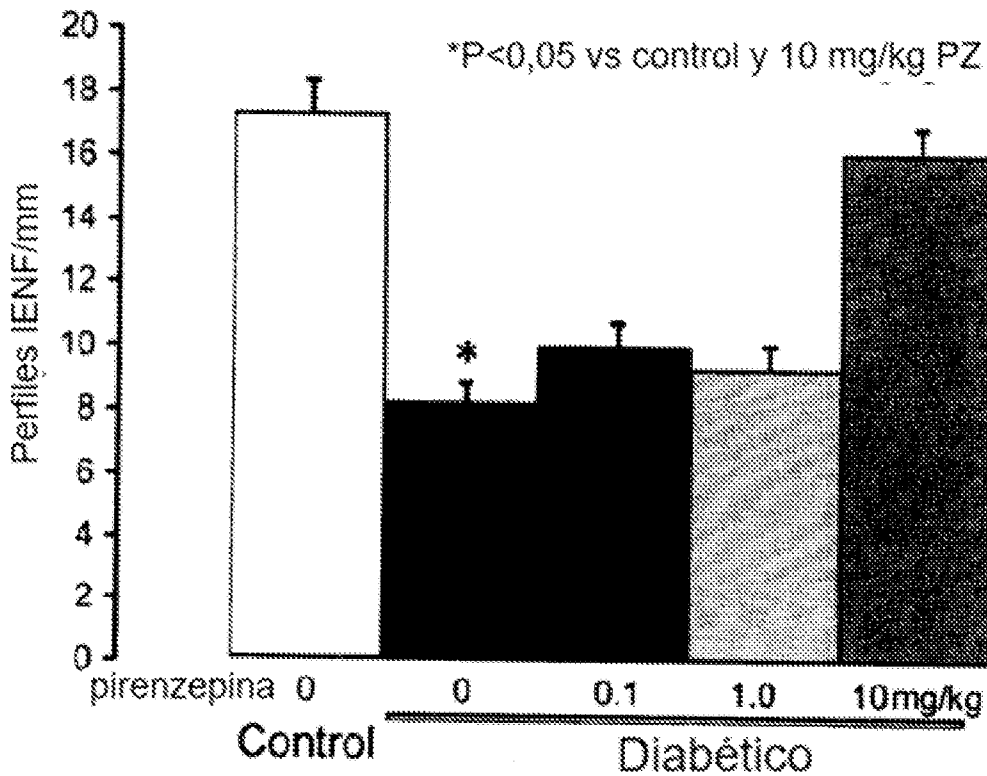
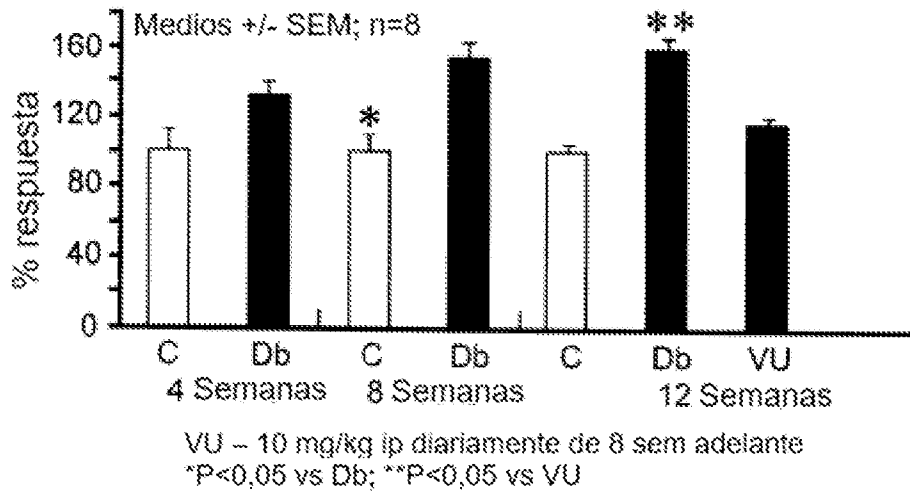


Fig. 8

(A)



(B)

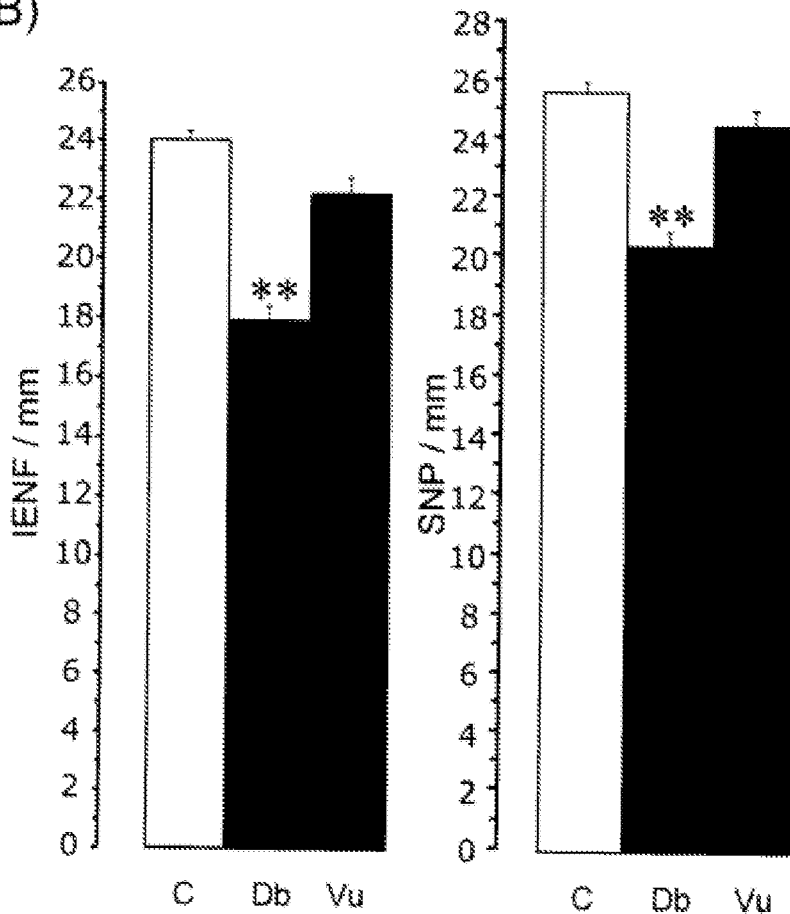
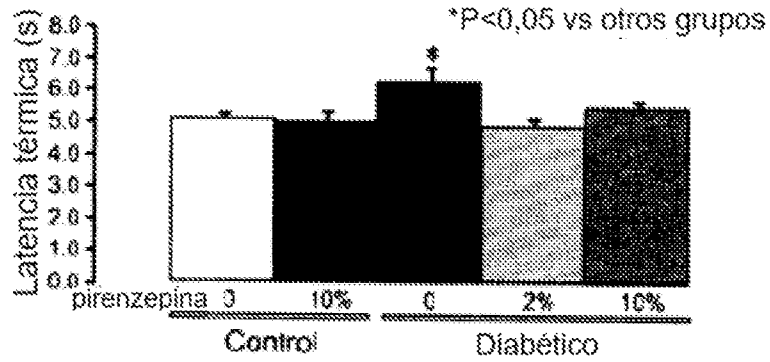


Fig. 9

(A) La latencia térmica de pata (pirenzepina tópica)



(B) Niveles IENF en piel del pie (pirenzepina tópica)

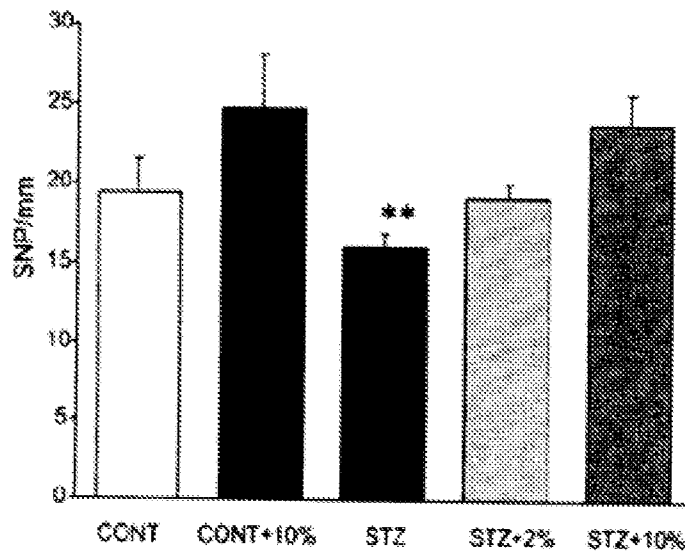
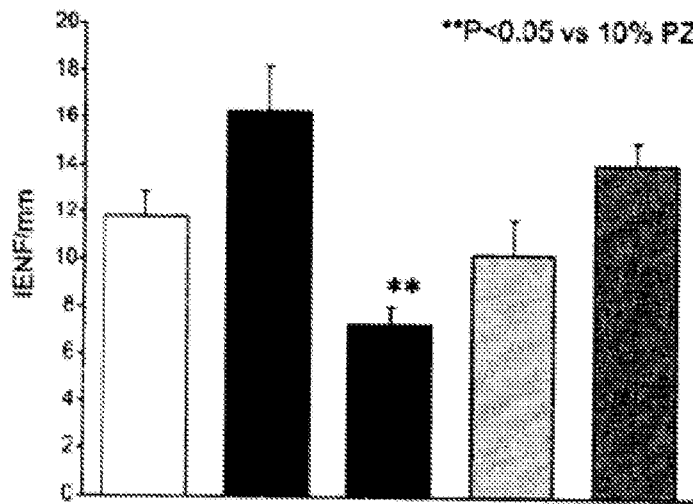
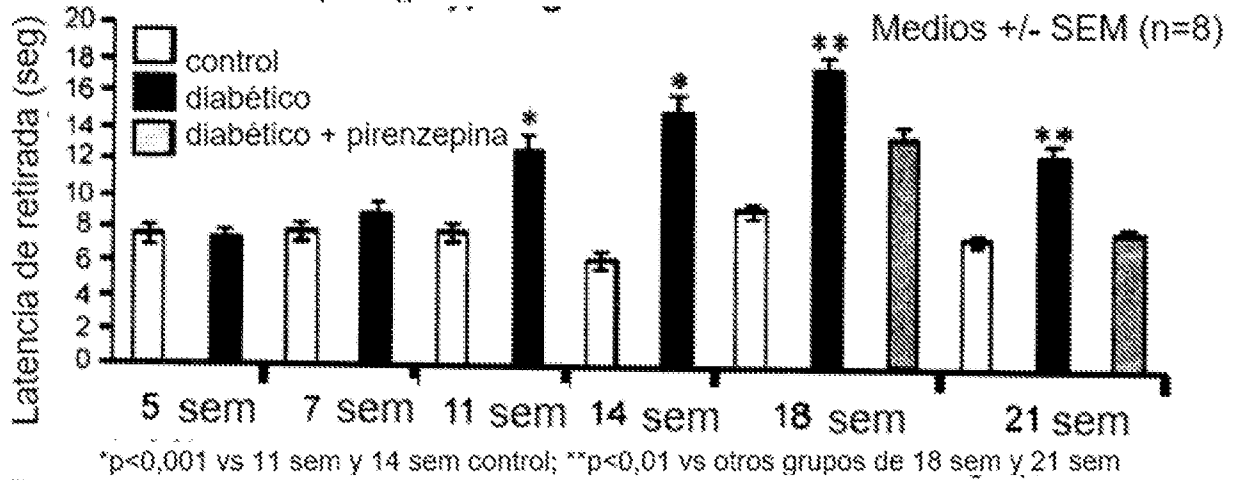
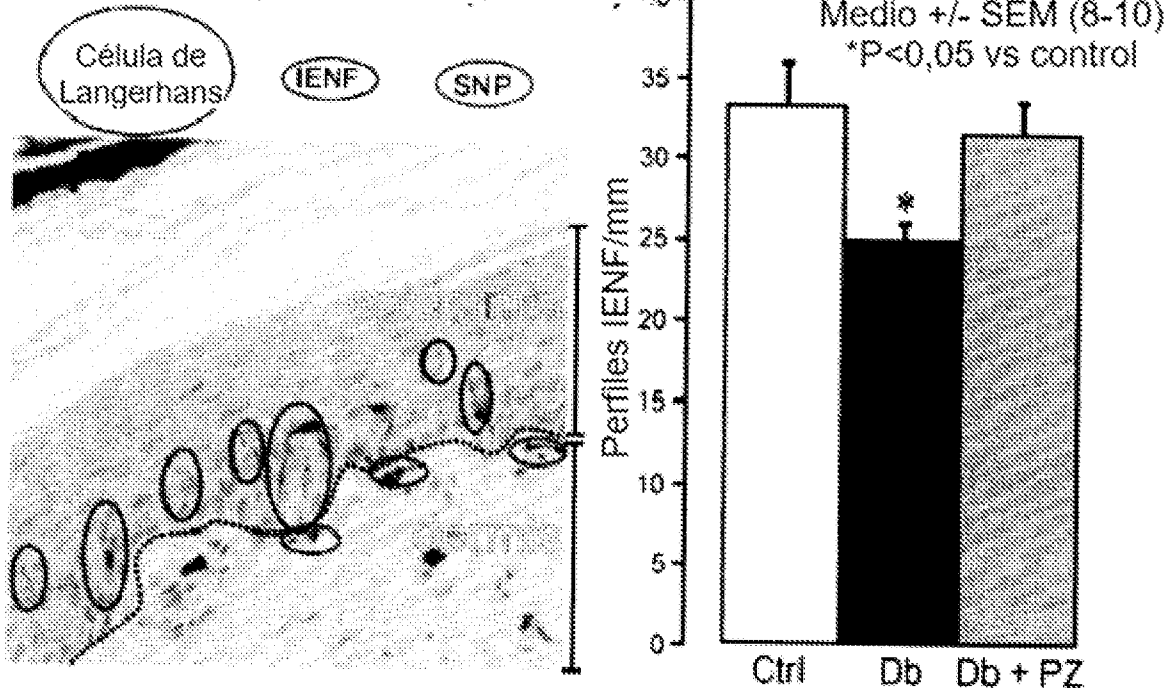


Fig. 10

(A) Inversión de hipoalgesia térmica

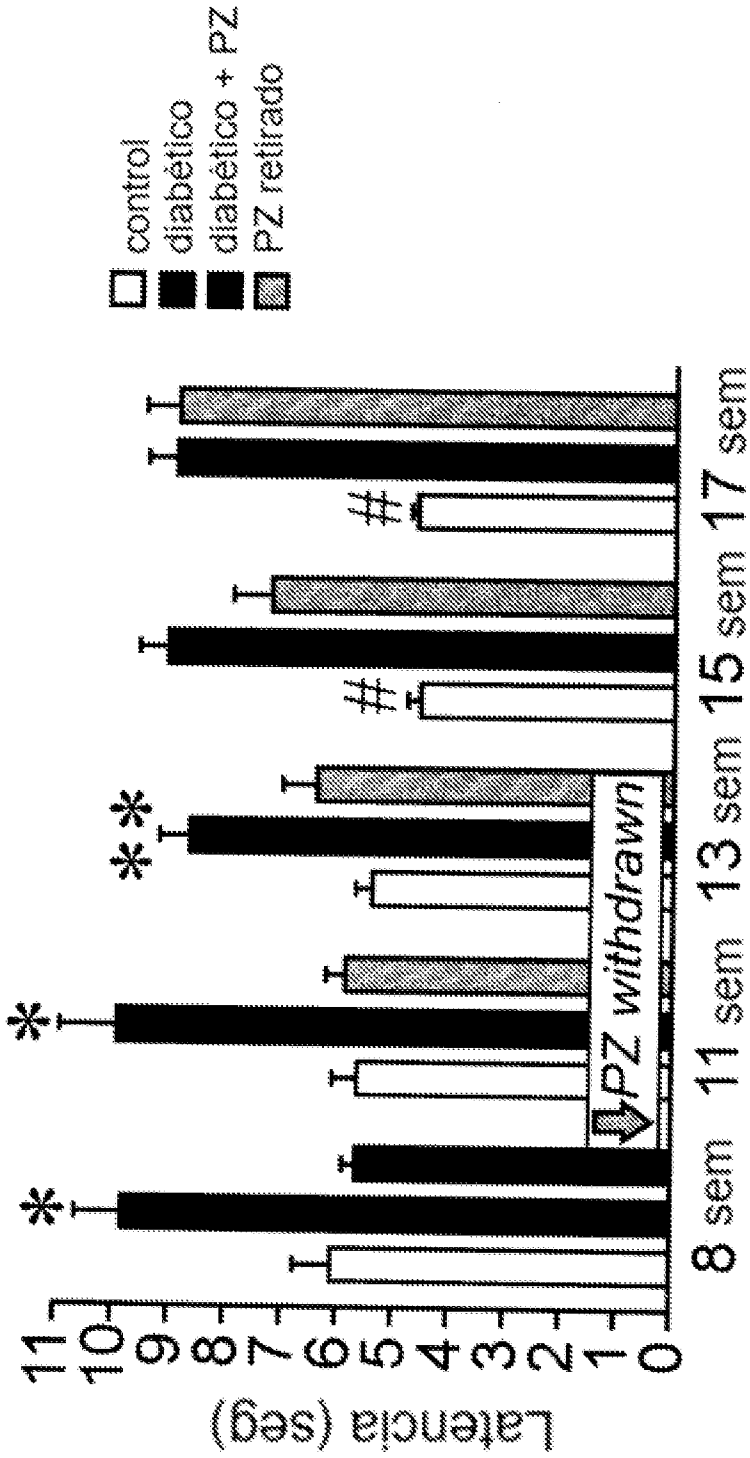


(B) Retirada de pérdida IENF (a 22 sem)



Los ratones a 14 sem presentaron aproximadamente 40 % en IENF en la piel. El tratamiento con pirenzepina (diariamente 10 mg/kg sc) se inició en este punto y se mantuvo durante 2 meses.

Fig. 11



* - $p < 0.001$ Db vs control y Db + PZ
 ** - $p < 0.05$ Db vs control y Db + PZ
 # - $p < 0.01$ control vs Db y Db + PZ

Fig. 12

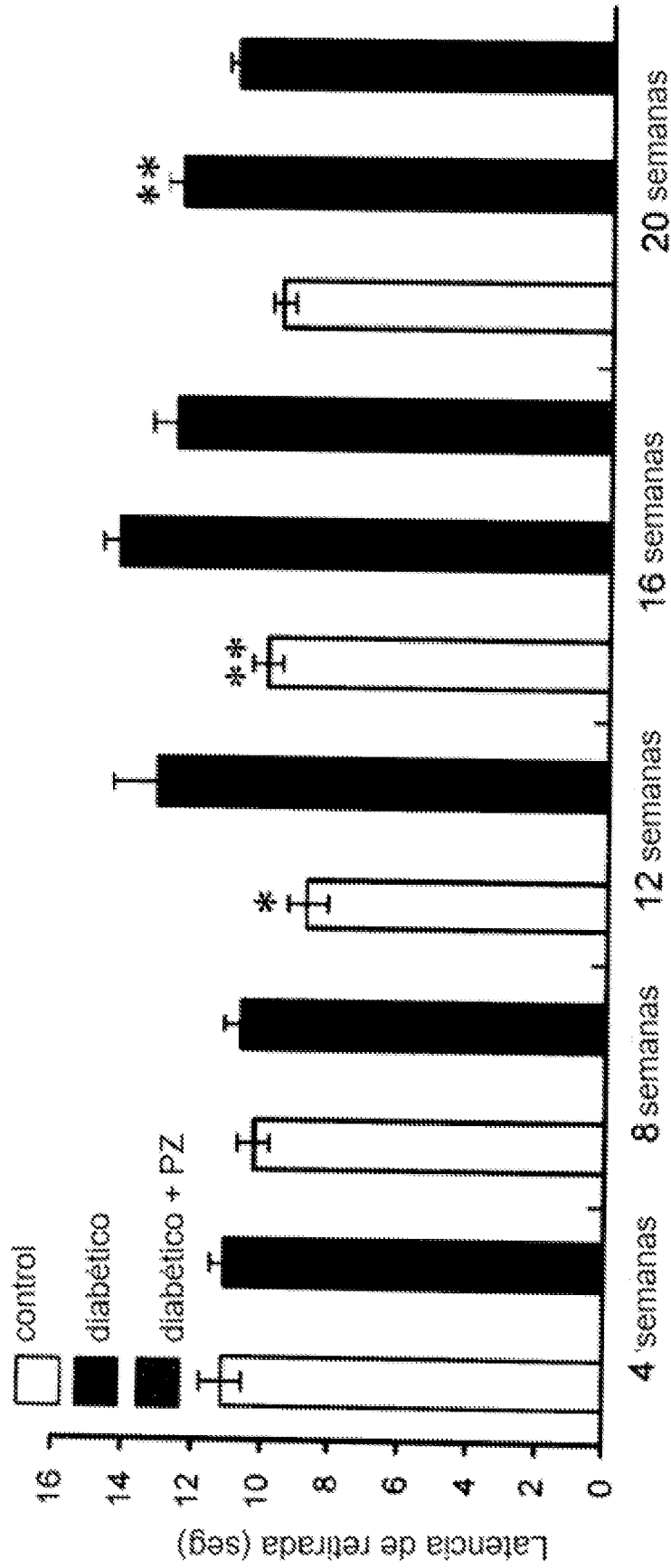
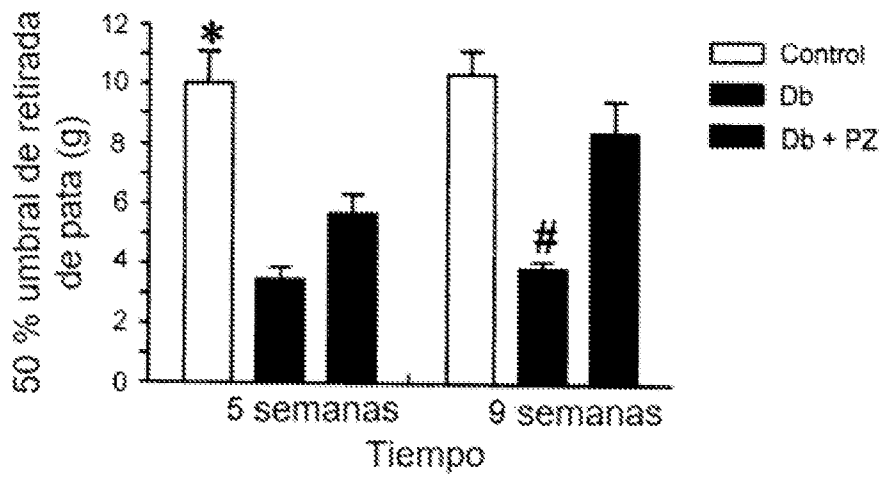
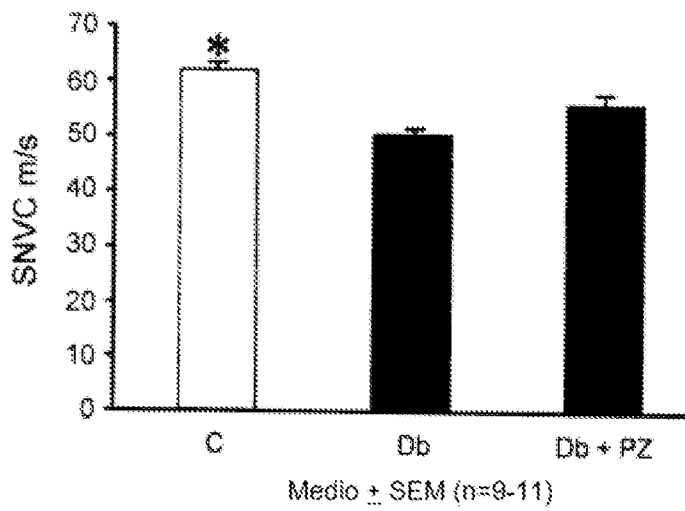


Fig. 13



*P < 0,001 para control vs diabético y diabético tratado con PZ

P < 0,001 para diabético vs control y diabético tratado con PZ



* P < 0,01 vs diabético

Fig. 14

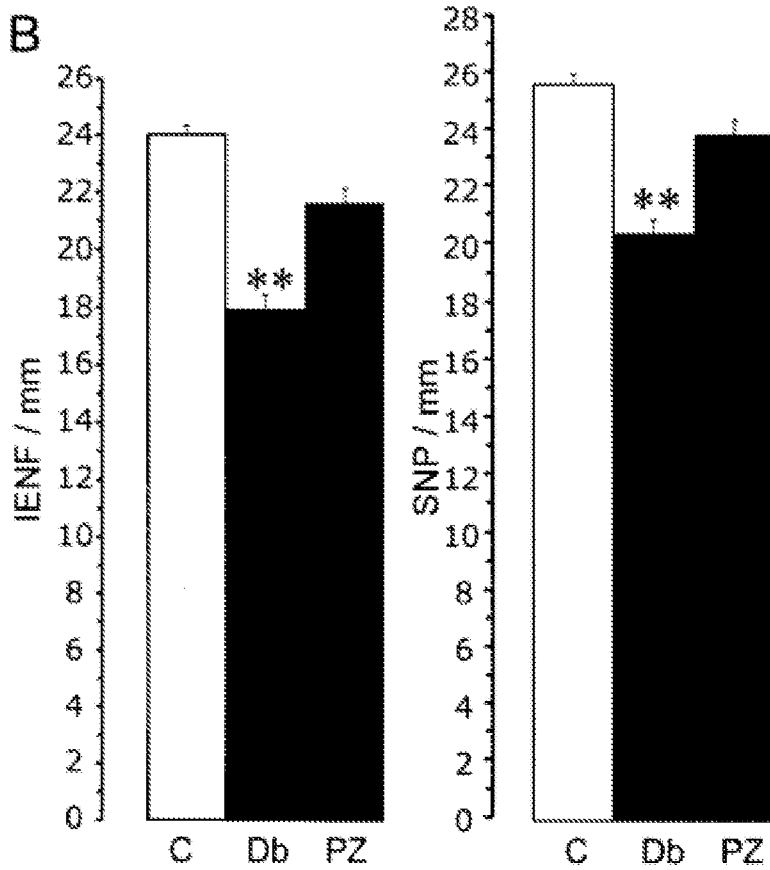
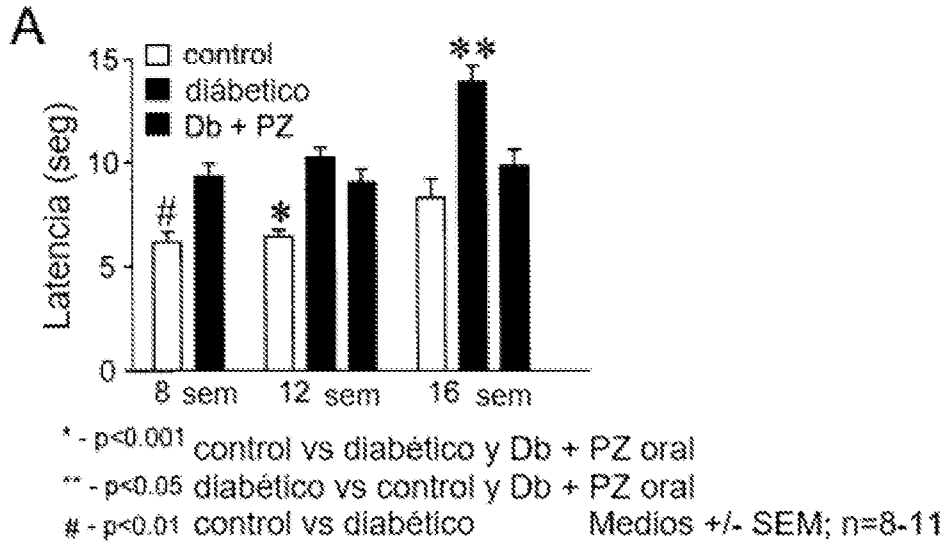


Fig. 15

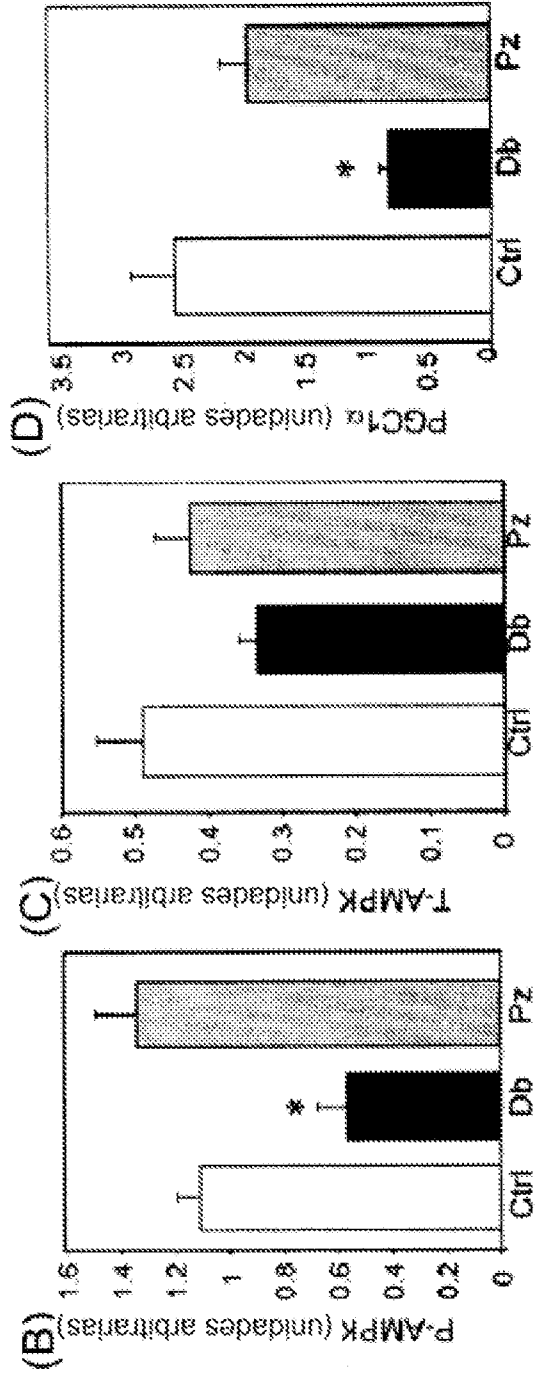
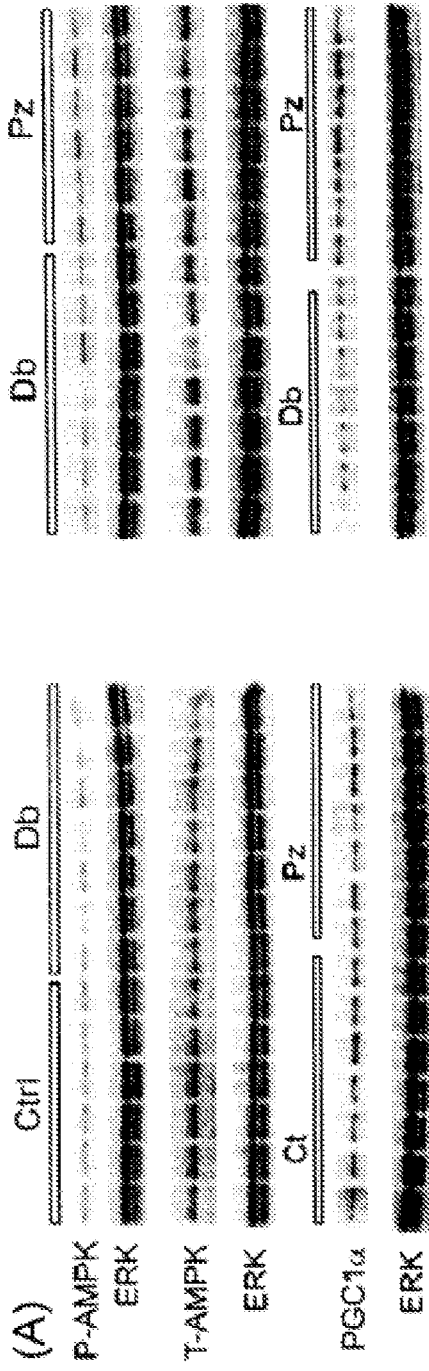


Fig. 16

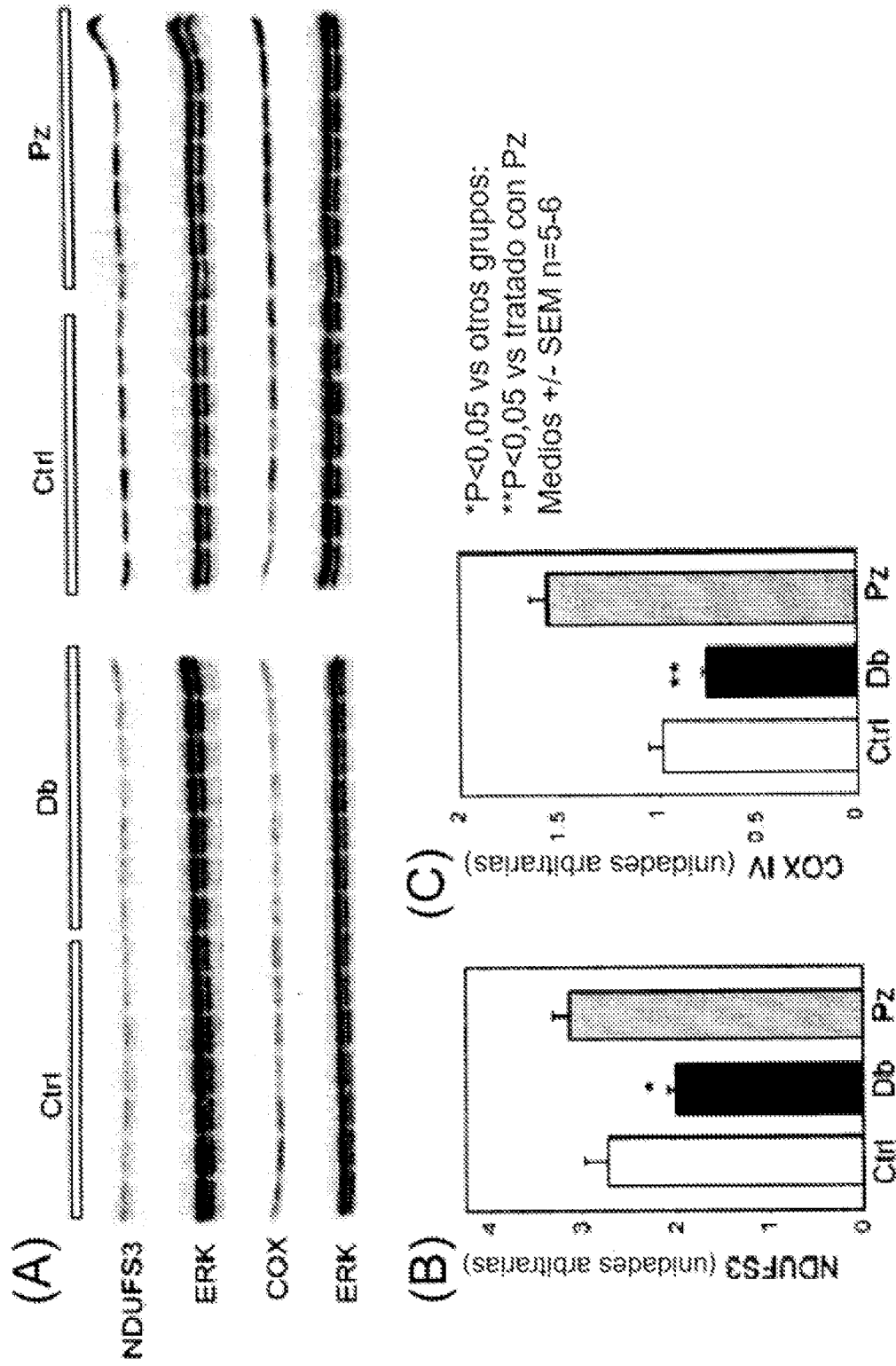


Fig.17

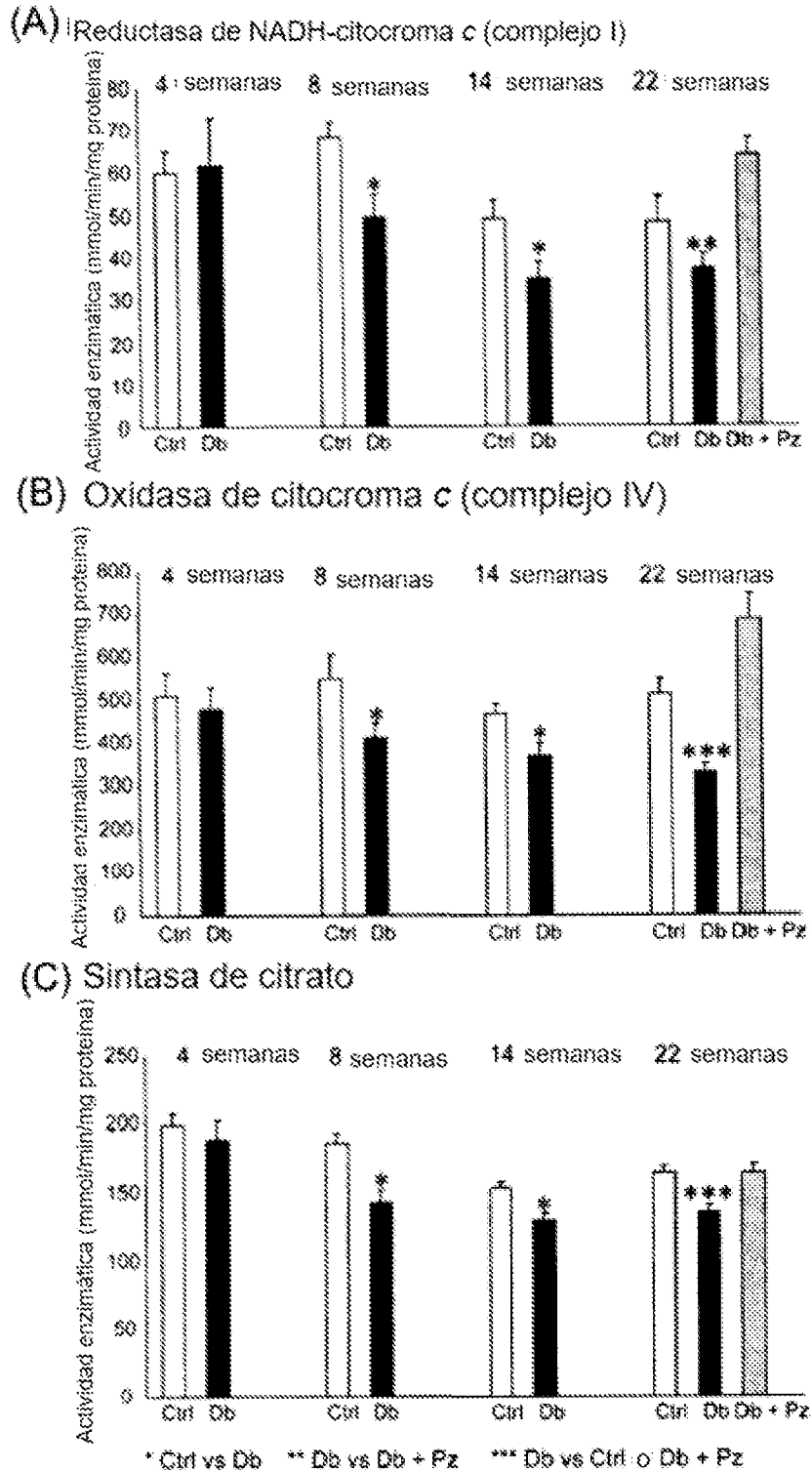


Fig. 18

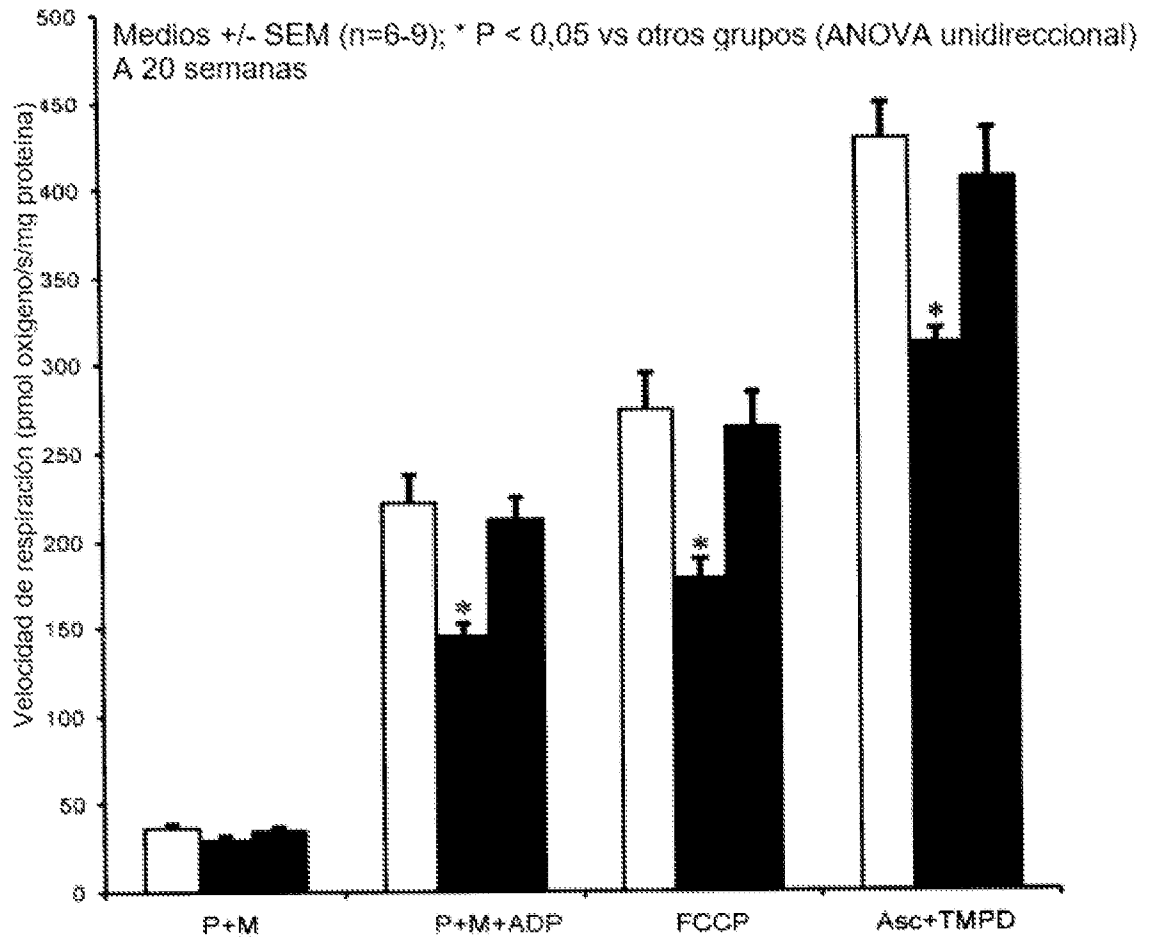


Fig. 19