

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 705**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 29/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2019 PCT/EP2019/074465**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2020 WO20053377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2019 E 19765747 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022 EP 3849976**

54 Título: **Un ligando del receptor GABA A**

30 Prioridad:

13.09.2018 EP 18194297

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

09.03.2023

73 Titular/es:

**SANIONA A/S (100.0%)
Smedeland 26B
2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, JANUS, S.;
AMRUTKAR, DIPAK;
JACOBSEN, THOMAS, AMOS;
DYHRING, TINO y
NIELSEN, KARIN, SANDAGER**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 935 705 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

Un ligando del receptor GABA_A

Campo técnico

5

La presente invención se refiere al 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)propan-2-ol, que es útil como modulador del receptor GABA. En una realización, dicho compuesto es útil en el tratamiento del dolor, dolor neuropático y/o picor.

10 **Antecedentes**

GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el SNC incluyendo la lámina II del asta dorsal de la médula espinal, donde terminan las fibras nociceptivas. La neurotransmisión inhibitoria en la médula espinal es de gran importancia en la transmisión del dolor y el aumento de la inhibición conduce a la analgesia (Zeilhofer HU. et al. (2009), Trends in pharmacological science).

15

Se ha encontrado que los moduladores de los receptores GABA_A median la analgesia profunda en modelos animales de dolor neuropático (Munro, G. et al. (2013) *European Journal of Pharmacology*, 716, 1-3, 17-23). Las terapias actuales para el tratamiento del dolor neuropático tienen un beneficio limitado para muchos pacientes e implican efectos secundarios indeseables o toxicidades que limitan la dosis. Además, las terapias actuales son sintomáticas, no modifican la enfermedad. Sigue habiendo necesidad de terapias mejoradas para la atención y tratamiento del dolor neuropático, especialmente aquellas que tengan la capacidad de modificar la enfermedad.

20

25

Además, se ha demostrado previamente que los ligandos del receptor GABA_A pueden ser útiles en el tratamiento del picor (véase, p. ej., documento WO 2017/129801).

Los receptores GABA_A son canales regulados por ligando que existen en múltiples isoformas. Cada receptor es un complejo pentamérico que comprende subunidades extraídas de las isoformas de subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ y θ . La mayoría de los receptores GABA_A presentes en el SNC contienen dos subunidades α , dos β y una γ (Mckernan RM. et al. (1996). *Trends in Neuroscience* 19, 139-43). Los efectos farmacológicos de la activación de un receptor GABA_A dependen principalmente del tipo de subunidades que contiene el receptor. Las benzodiazepinas ansiolíticas clásicas no muestran selectividad de subtipo. Se ha sugerido que uno de los elementos clave en las desventajas de las benzodiazepinas clásicas (tales como la sedación, dependencia y deterioro cognitivo) se relaciona con la subunidad α_1 del receptor GABA_A. Estudios recientes que utilizan ratones con mutaciones puntuales que hacen que las diferentes subunidades α sean insensibles al diazepam, sugieren que las subunidades α_2 y α_3 median los efectos analgésicos de las benzodiazepinas (Knabl J. et al. (2009). *Pain* 141, 233-38). Esto está respaldado por estudios farmacológicos que muestran efectos analgésicos de moduladores positivos selectivos de receptores GABA_A que contienen $\alpha_{2/3}$ en modelos preclínicos de dolor (Munro G. et al. (2008). *JPET*, 327, 969-81). Por lo tanto, se espera que los compuestos con selectividad por las subunidades α_2 y/o α_3 frente a la subunidad α_1 tengan un perfil de efectos secundarios mejorados.

30

35

40

Además, se ha mostrado que la falta de inhibición mediada por interneuronas GABAérgicas en la médula espinal es responsable del picor crónico en ratones mutantes Bhlhb5 (Ross SE. et al. (2010). *Neuron* 65, 886-98) lo que sugiere la potencial actividad terapéutica mediante la mejora de la inhibición espinal.

45

Los documentos WO 98/34923, EP 0616807, WO 2004/087690, WO 2007/110374 y WO 2010/055132 describen derivados de bencimidazol útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos del sistema nervioso central, que responden a la modulación del complejo receptor GABA_A.

50

Los documentos WO 03/086406, WO 03/087099, WO 03/099816 y WO 01/18000 describen derivados de imidazopiridina útiles como ligandos para receptores GABA.

Los documentos WO 2000/044752 y WO 99/67245 describen derivados de triazolo-piridazina útiles como ligandos para receptores GABA.

55

Estos moduladores de receptores GABA presentados anteriormente indican que diferencias estructurales menores pueden tener un gran impacto en la actividad biológica.

60

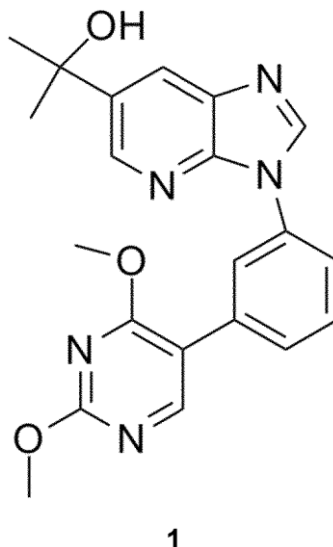
Sin embargo, muchos de los moduladores de receptores GABA presentados anteriormente están asociados con efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, existe una gran necesidad de compuestos con un perfil farmacológico optimizado y sin efectos secundarios no deseados.

Compendio

65

En un aspecto principal, la presente invención se refiere al 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-

imidazo[4,5-*b*]piridin-6-yl)propan-2-ol, representado en la fórmula 1 (compuesto 1).



Además, la presente invención se refiere al uso del compuesto 1 como un medicamento. Los autores de la presente invención han encontrado que el compuesto 1 es un nuevo receptor GABA_A α_3 que prefiere un modulador alostérico positivo. Así, en un aspecto, el compuesto 1 se usa en el tratamiento, prevención y/o alivio del dolor neuropático. En otro aspecto, el compuesto 1 se usa en el tratamiento, prevención y/o alivio del picor.

Descripción de los dibujos

Figura 1. (A) Compuesto 1, (B) Compuesto 9. Perfil de eficacia en los receptores GABA_A en registros de pinzamiento de voltaje de dos electrodos de ovocitos. Para cada conjunto de datos experimentales, se disolvió GABA en una solución Ringer de ovocitos en una concentración (0.5-3 μ M) dando lugar a corrientes provocadas de EC₁₀₋₂₀ para una combinación de subtipos de receptores GABA_A dada. Las corrientes máximas se leyeron y normalizaron respecto a una concentración efectiva máxima de diazepam, donde después los puntos de datos se ajustaron a la ecuación de Hill empírica por regresión no lineal, $n=3-14$. El compuesto 1 presenta una potenciación preferencial de las corrientes mediadas por GABA en los receptores que contienen GABA_A- α_3 , una activación menor (menos de 10%) de subunidades GABA_A- $\alpha_{2/5}$ y sin activación de los receptores que contienen GABA_A- α_1 .

Figura 2. Efectos del compuesto 1 después de administración aguda en el comportamiento de rascado en ratones CD-1 macho. El tratamiento agudo con el compuesto 1 revirtió la alodinia mecánica en ratas sometidas a lesiones de CCI con una dosis efectiva mínima menor o igual a 1 mg/kg después de administración oral. Después de 7 días de tratamiento crónico, se mantuvo un efecto analgésico significativo de las 3 dosis, mientras que el efecto de la morfina (6 mg/kg) se había perdido completamente. La morfina se administró por vía subcutánea. La lesión por constricción crónica (CCI) en ratas macho Sprague Dawley se realizó como describen Bennette y Xie, (1998). Los animales se analizaron 14 después de días de cirugía. ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ frente a vehículo, ANOVA de dos vías posttest LSD de Fisher, $n=7-9$.

Figura 3. Efectos del compuesto 1 después de la administración aguda y crónica en el umbral de retirada de la pata en ratas lesionadas por CCI. El compuesto 1 redujo de forma dependiente de la dosis el comportamiento de rascado inducido por el compuesto 48/80 en ratones macho CD-1. El compuesto 48/80, por inyección de 50 μ l por vía subcutánea en la nuca, indujo un aumento notable y significativo en los episodios de rascado en comparación con los ratones a los que se inyectó vehículo. El antagonista histaminérgico H1, hidrocloreuro de dipenhidramina, se usó como referencia y se administró por vía oral 60 min antes que el compuesto 48/80, mientras que el compuesto 1 se administró por vía oral 30 min antes a la administración del compuesto 48/80. ##### $p<0.0001$ frente a solución salina; *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, frente a vehículo+compuesto 48/80, ANOVA de una vía, test a posteriori LSD de Fisher, $n=7-9$.

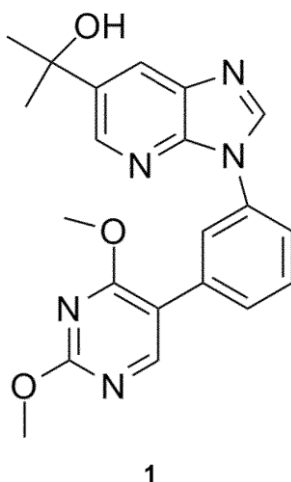
Figura 4. Efectos del compuesto 1 en la actividad locomotora exploratoria en ratas macho SD. El compuesto 1 administrado en hasta 30 mg/kg, correspondiente a una concentración cerebral libre de 494 no afectó a la actividad locomotora exploratoria en ratas macho Sprague Dawley ($p>0.05$ ANOVA de dos vías con medidas repetidas con tiempo y dosis como factores). El compuesto 1 se administró por vía oral con 3, 10 y 30 mg/kg, 10 ml/kg, 120 minutos antes de introducir las ratas en nuevas jaulas domésticas en condiciones de poca luz. La actividad de las ratas se registró automáticamente durante 30 minutos (TSE MoTil, Alemania).

Figura 5. Efectos del compuesto 1 en el rendimiento en Rotarod en ratas macho SD. El compuesto 1 administrado en hasta 30 mg/kg no perjudicó la capacidad de las ratas para mantener el equilibrio en una barra giratoria que acelera, medida como latencia para caer de la barra. Por el contrario, el modulador positivo del receptor GABA_A no selectivo, diazepam, acortó significativamente la latencia a la caída ($p < 0.05$). El compuesto 1 y el diazepam se administraron por vía oral 2 h y 1 h antes

del inicio de la prueba respectivamente. Las ratas se entrenaron en la barra giratoria durante dos días a 4-40 rpm durante 5 min antes de evaluar los efectos del fármaco el 3^{er} día. Las ratas que no pudieron correr durante más de 90 segundos después del entrenamiento no se incluyeron en el experimento. * $p < 0.05$, frente a vehículo, ANOVA de una vía, posttest LSD de Fisher, $n = 6-7$.

Descripción detallada

En un aspecto principal, la presente invención se refiere al 2-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol, representado en la fórmula 1.



En una realización, el compuesto 1 es una sal farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de la invención puede existir en una forma tautómera.

Sales farmacéuticamente aceptables

El compuesto químico de la invención se puede proporcionar en cualquier forma adecuada para la administración prevista, incluidas sales farmacéuticamente (es decir, fisiológicamente) aceptables. Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos no tóxicos tales como hidrocloreto, hidrobromuro, nitrato, perclorato, fosfato, sulfato, formiato, acetato, aconato, ascorbato, benzenosulfonato, benzoato, cinamato, citrato, embonato, enantato, fumarato, glutamato, glicolato, lactato, maleato, malonato, mandelato, metanosulfonato, naftaleno-2-sulfonato, ftalato, salicilato, sorbato, estearato, succinato, tartrato, tolueno-p-sulfonato y similares. Dichas sales pueden formarse mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica. Otros ácidos tales como el ácido oxálico, que no pueden considerarse farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios para obtener un compuesto químico de la invención y su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de sales catiónicas farmacéuticamente aceptables del compuesto 1 de la invención incluyen, sin limitación, las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, aluminio, litio, colina, lisinio y amonio, y similares, del compuesto 1 de la invención que contiene un grupo aniónico. Dichas sales catiónicas pueden formarse mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica. En el contexto de esta invención, las "sales de onio" de compuestos que contienen N también se contemplan como sales farmacéuticamente aceptables. Las "sales de onio" preferidas incluyen las sales de alquil-onio, las sales de cicloalquil-onio y las sales de cicloalquilalquil-onio.

Compuestos marcados

El compuesto químico de la presente invención se puede utilizar en su forma marcada o sin marcar. En el contexto de esta invención, el compuesto marcado tiene uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa que normalmente

se encuentra en la naturaleza. El marcaje permitirá una fácil detección cuantitativa de dicho compuesto.

Los compuestos marcados de la invención pueden ser útiles como herramientas de diagnóstico, radiotrazadores o agentes de seguimiento en diversos métodos de diagnóstico y para la formación de imágenes de receptores in vivo. El isómero marcado de la invención contiene preferiblemente al menos un radionúclido como marcador. Los radionúclidos emisores de positrones son todos candidatos para su uso. En el contexto de esta invención, el radionúclido se selecciona preferiblemente de ^2H (deuterio), ^3H (tritio), ^{13}C , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I y ^{18}F .

El método físico para detectar el isómero marcado de la presente invención puede seleccionarse de tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de imágenes de fotón único (SPECT), espectroscopia de resonancia magnética (MRS), imágenes de resonancia magnética (MRI) y tomografía de rayos axial computarizada (CAT), o combinaciones de los mismos.

Métodos de preparación

Los compuestos químicos de la invención se pueden preparar por métodos convencionales de síntesis química, p. ej., los descritos en los ejemplos de trabajo. Los materiales de partida para los procedimientos descritos en la presente solicitud son conocidos o se pueden preparar fácilmente por métodos convencionales a partir de productos químicos comercialmente disponibles.

Los productos finales de las reacciones descritas en el presente documento se pueden aislar por técnicas convencionales, p. ej., por extracción, cristalización, destilación, cromatografía, etc.

Los compuestos de esta invención pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas para los fines de esta invención.

Composiciones farmacéuticas

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto **1**, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Si bien el compuesto **1** de la presente invención para usar en terapia se puede administrar en forma de compuesto químico puro, se prefiere introducir el principio activo, opcionalmente en forma de una sal fisiológicamente aceptable, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones, diluyentes y/u otros auxiliares farmacéuticos habituales.

En una realización preferida, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto químico de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos, conocidos y usados en la técnica. El(los) vehículo(es) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no dañino(s) para el receptor de la misma. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser aquellas adecuadas para administración oral, rectal, bronquial, nasal, pulmonar, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, vaginal o parenteral (incluyendo inyección o infusión cutánea, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intracerebral, intraocular), o aquellas en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación, incluida la administración de polvos y aerosoles líquidos, o por sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de sistemas de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el compuesto de la invención, cuyas matrices pueden estar en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas.

El compuesto **1** de la invención, junto con un adyuvante, vehículo o diluyente convencional, se puede poner, por lo tanto, en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de las mismas. Dichas formas incluyen sólidos, y en particular comprimidos, cápsulas rellenas, formas de polvo y gránulos, y líquidos, en particular soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones, elixires y cápsulas rellenas con los mismos, todos para uso oral, supositorios para administración rectal, y soluciones inyectables estériles para uso parenteral. Dichas composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias de las mismas pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas farmacéuticas unitarias pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del principio activo acorde con el intervalo de dosificación diaria previsto que se va a emplear. El compuesto **1** de la presente invención se puede administrar en una amplia variedad de formas farmacéuticas orales y parenterales. Será obvio para los expertos en la técnica que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender, como componente activo, un compuesto químico de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto químico de la invención.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir del compuesto **1** de la presente invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material de encapsulación.

Las preparaciones farmacéuticas están preferiblemente en formas farmacéuticas unitarias. En esta forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma farmacéutica unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. Además, la forma farmacéutica unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla para chupar, o puede ser el número adecuado de cualquiera de estos en forma envasada.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de principio activo que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y toxicidad, p. ej., ED₅₀, se pueden determinar mediante procedimientos farmacológicos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación. La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre los niveles plasmáticos que dan como resultado efectos terapéuticos y las relaciones plasmáticas que dan como resultado efectos tóxicos. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes.

Por supuesto, la dosis administrada debe ajustarse cuidadosamente a la edad, peso y estado del individuo que se está tratando, así como a la vía de administración, la forma farmacéutica y pauta posológica, y el resultado deseado, y la dosis exacta la debe determinar, por supuesto, el profesional.

La dosis real depende de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, y queda a discreción del médico, y puede variarse ajustando la dosis a las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, se contempla ahora que las composiciones farmacéuticas que contienen de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 000 mg de principio activo por dosis individual, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg, son adecuadas para tratamientos terapéuticos. El principio activo puede administrarse en una o varias dosis al día. En ciertos casos, se puede obtener un resultado satisfactorio con una dosis tan baja como 0.1 µg/kg i.v. y 1 µg/kg v.o. Se considera ahora que el límite superior del intervalo de dosis es de aproximadamente 10 mg/kg i.v. y 100 mg/kg v.o. Los intervalos preferidos son de aproximadamente 0.1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg/día i.v. y de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg/día v.o.

Actividad biológica

El compuesto **1** de la presente invención es capaz de modular el complejo del receptor GABA_A, y se demuestra que es un modulador alostérico positivo (PAM) de los receptores GABA_A que contienen la subunidad α₃ y, en menor medida, las subunidades α₂ y α₅. El compuesto **1** revierte la alodinia mecánica en un modelo de rata para el dolor neuropático después de tratamiento agudo y crónico y mejora el rascado en ratones tratados con un compuesto que induce picor, sugiriendo efectos analgésicos así como antipruriginosos. El compuesto **1** no muestra inconveniente en cuanto a los efectos sedantes y de deterioro motor medidos en la actividad locomotora exploratoria de ratas y el rendimiento en el Rotarod.

Métodos de tratamiento

Al ser un ligando para receptores GABA_A, el compuesto **1** es útil en el tratamiento, prevención y/o alivio de los trastornos de un cuerpo vivo, incluido el ser humano. Preferiblemente, el compuesto **1** se usa en el tratamiento, prevención y/o alivio del dolor, tal como el dolor neuropático y/o picor.

Tratamiento del dolor neuropático

Las referencias a métodos de tratamiento en esta memoria descriptiva deben interpretarse como referencias al compuesto y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia. En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-6-il)propan-2-ol, representado en la fórmula **1** en el tratamiento, prevención y/o alivio del dolor neuropático. El dolor neuropático es una categoría de dolor que incluye varias formas de dolor crónico y que resulta de la disfunción del tejido nervioso en lugar del somático. El dolor neuropático, es decir, el dolor que deriva de una disfunción del sistema nervioso central o periférico, también puede ser consecuencia del daño a los nervios periféricos o a regiones del sistema nervioso central, puede resultar de una enfermedad o puede ser idiopático. Los síntomas del dolor neuropático incluyen sensaciones de ardor, pinchazos, electricidad, hormigueo, parestesia, disestesia, rigidez,

entumecimiento en las extremidades, sensación de distorsión corporal, alodinia (dolor provocado por estimulación que normalmente es inocua), hiperalgesia (sensibilidad anormal a dolor), hiperpatía (una respuesta de dolor exagerada que persiste mucho después de que cesen los estímulos de dolor), dolor fantasma y dolor espontáneo.

5

Tratamiento del picor

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol, representado en la fórmula 1, en el tratamiento, prevención y/o alivio del picor.

10

El picor (también conocido como *Pruritus*) es una sensación que provoca el deseo o reflejo de rascarse. Se ha mostrado que el picor tiene muchas similitudes con el dolor. La mayoría de los casos de picor están relacionados con la histamina y se tratan con tratamiento con antihistamínicos. Sin embargo, algunos casos de picor no son tratables con antihistamínicos. Las posibles causas de picor incluyen piel seca, afecciones de la piel y erupciones cutáneas, enfermedades internas, trastornos nerviosos, irritación y reacciones alérgicas, fármacos y embarazo.

15

Muchos trastornos de la piel, tales como afecciones de la piel, caspa, queratodermia palmoplantar punteada, sarna, crecimiento de cicatrices, xerosis, piojos, varicela y urticaria, causan picazón. Dichas afecciones de la piel incluyen psoriasis, eccema (dermatitis), quemaduras solares, pie de atleta e hidradenitis supurativa.

20

La piel que pica puede ser un síntoma de una enfermedad subyacente. Estas incluyen enfermedad hepática, insuficiencia renal, diabetes mellitus, hiperparatiroidismo, anemia por deficiencia de hierro, ictericia, colestasis, uremia, policitemia, problemas de tiroides y cánceres, incluidos leucemia y linfoma. Las afecciones que afectan al sistema nervioso, tales como la esclerosis múltiple, diabetes mellitus, nervios pinzados y culebrilla (herpes zoster), pueden causar picor.

25

El picor puede ser provocado o potenciado por una serie de materiales y sustancias químicas tales como lana, cosméticos, jabones, histamina, opioides, prostaglandinas, proteasas, citoquinas, neuropéptidos, en particular sustancia P, serotonina, cloroquina Compuesto 48/80 (N° CAS 94724-12-6) y sales biliares. Las alergias alimentarias también pueden hacer que la piel pique.

30

Los factores que se cree que aumentan la sensación de picor incluyen la sequedad de la epidermis y la dermis, anoxia de los tejidos, dilatación de los capilares, estímulos irritantes, enfermedades primarias de la piel y trastornos psiquiátricos.

35

En una realización, el picor es *Pruritus*. En una realización, el *Pruritus* es *Pruritus* anal. En una realización, el *Pruritus* es *Pruritus* escrotal. En una realización, el *Pruritus* es *Pruritus* vulvar. En una realización, el *Pruritus* es *Pruritus* anogenital.

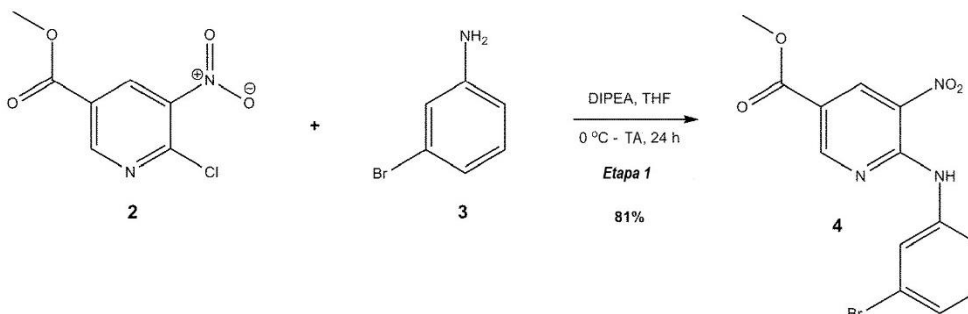
40

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (1)

45

Etapas 1: Preparación de 6-((3-bromofenil)amino)-5-nitronicotinato de metilo (4)



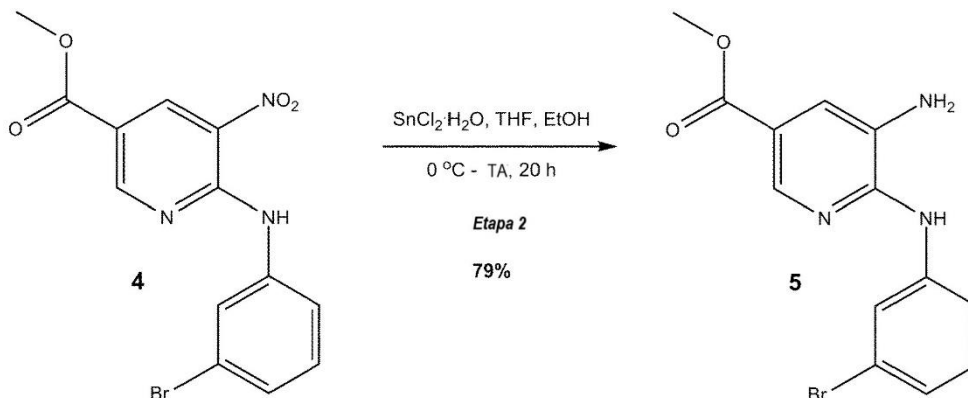
A una solución agitada de ácido 6-cloro-5-nitro-nicotínico **2** (100 g, 461.72 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (750 ml) a 0 °C se añadió *N,N*-disopropiletilamina (120.6 ml, 692.58 mmol) seguido de 3-bromoanilina **3** (55 ml, 494,1 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h en atmósfera de nitrógeno. La reacción se vigiló por TLC y UPLC. La mezcla de reacción se concentró a la mitad de su volumen inicial a presión reducida. Se añadió éter de petróleo (800 ml) a la mezcla de reacción y la suspensión se agitó durante 1 h. El sólido naranja que apareció se filtró con succión y se lavó a fondo con éter de petróleo

55

(8 x 300 ml) para proporcionar el 6-((3-bromofenil)amino)-5-nitronicotinato de metilo **4** (132 g, 81%) como sólido naranja.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.31 (s, 1H, protón intercambiable), 8.94 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 7.60 Hz, 1H), 7.41-7.36 (m, 2H), 3.88 (s, 3H); LCMS (ESI): *m/z*: 352.9 (M+H)⁺.

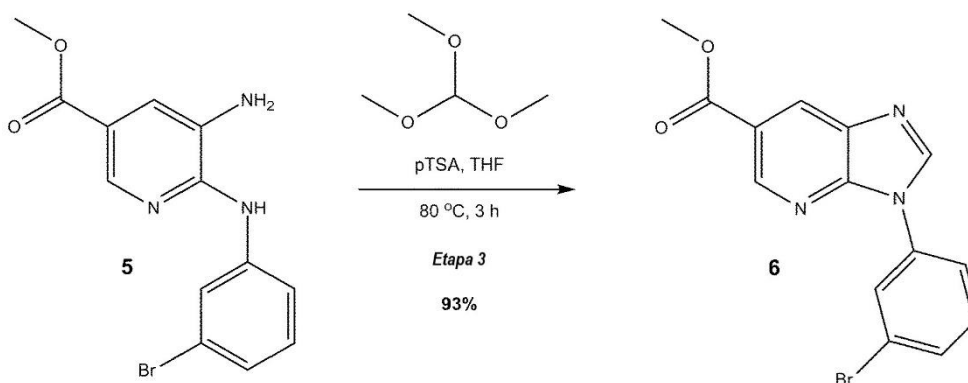
Etapla 2: Preparación de 5-amino-6-((3-bromofenil)amino)nicotinato de metilo (**5**)



A una suspensión enfriada (0°C) de 6-((3-bromofenil)amino)-5-nitronicotinato de metilo **4** (485 g; 1377.28 mmol) en una mezcla de etanol:THF [1:1; (2600 ml)], se añadió cloruro estannoso dihidrato (932.3 g; 4131.8 mmol) en porciones a 0°C y la mezcla de reacción se agitó durante 20 h en atmósfera de nitrógeno mientras se dejaba que la temperatura de la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. El progreso de la reacción se vigiló por TLC y UPLC. Después de 20 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo obtenido se diluyó con agua (1000 ml). La mezcla acuosa se hizo básica con bicarbonato de sodio sólido (hasta pH ~ 9-10) a 5°C. Luego se añadió cloroformo (1500 ml) a la parte acuosa y se agitó durante 15 minutos, los productos inorgánicos insolubles aparecidos se filtraron sobre un lecho de Celite. El lecho se lavó a fondo con cloroformo (5 * 500 ml) La capa orgánica se separó, se lavó con solución de salmuera saturada (800 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar el 5-amino-6-((3-bromofenil)amino)nicotinato de metilo **5** (350 g, 78.88%) como sólido grisáceo.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.38 (s, 1H, protón intercambiable), 8.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 10.00 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.27-7.22 (m, 1H), 7.13-7.10 (m, 1H), 5.31 (s, 2H, protón intercambiable), 3.80 (s, 3H); LCMS (ESI): *m/z*: 324.0 (M+H)⁺.

Etapla 3: Preparación de 3-(3-bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridina-6-carboxilato de metilo (**6**)



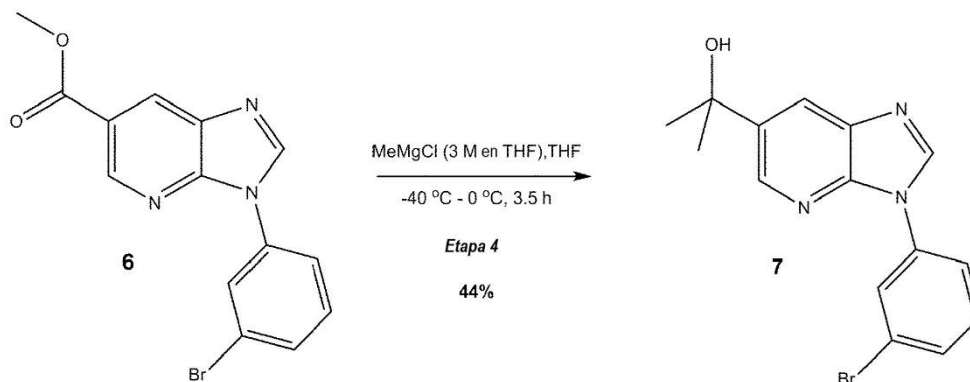
A una solución agitada de 5-amino-6-((3-bromofenil)amino)nicotinato de metilo **5** (350 g, 1086.41 mmol) en THF anhidro (3000 ml) se añadió ortoformiato de trimetilo (172.94 g, 1629.6 mmol) seguido de ácido p-toluenosulfónico (pTSA) (61.99 g, 325.92 mmol) en una porción, y la masa de reacción se calentó a 80°C en atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción se vigiló por TLC y UPLC. Después de 3 h, la mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente, y el disolvente se retiró a presión reducida. El producto bruto obtenido se diluyó con agua (1000 ml), y la parte acuosa se hizo básica con bicarbonato de sodio hasta pH ~ 9-10 mientras se agitaba a TA. La agitación se continuó durante 1 h más. El sólido que apareció se filtró con succión y se secó completamente al vacío para proporcionar la masa bruta (380 g, equilibrio de masas 105.3%) como un sólido blanquecino. El producto bruto se disolvió en cloroformo (5000 ml), se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el 3-(3-

bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridina-6-carboxilato de metilo **6** (335 g, 92.83%) como sólido blanquecino.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 9.12 (s, 1H), 9.03 (d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.27-8.26 (m, 1H), 8.04-8.01 (m, 1H), 7.73-7.71 (m, 1H), 7.63-7.59 (m, 1H), 3.94 (s, 3H); LCMS (ESI): m/z : 334.0 ($M+H$) $^+$.

5

Etapla 4: Preparación de 2-(3-(3-bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (**7**)

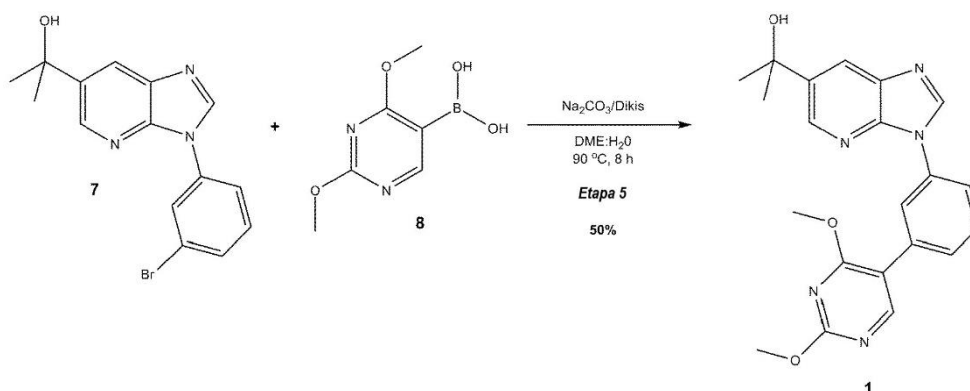


- 10 A una suspensión agitada de 3-(3-bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridina-6-carboxilato de metilo **6** (50 g, 150.53 mmol) en THF anhidro (600 ml) a -20°C se añadió solución de MeMgCl [(72 ml, 143.92 mmol); 2 M en THF] gota a gota durante un período de 30 minutos en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 3.5 h en atmósfera de nitrógeno mientras se mantenía la temperatura de reacción entre -20°C y 0°C.
- 15 El progreso de la reacción se vigiló por TLC y UPLC. Después de 3.5 h, la masa de reacción se inactivó con solución saturada de cloruro de amonio (1500 ml), la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3*1000 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera saturada (500 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar la masa bruta (51 g, equilibrio de masas 102%) como una goma marrón. El producto bruto se purificó por una columna ultrarrápida sobre un lecho de alúmina neutra usando acetato de etilo al 20% en hexano como eluyente para proporcionar el producto
- 20 deseado 2-(3-(3-bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol **7** (22 gramos, 44%) como una goma marrón.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.95 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.59-7.55 (m, 1H), 5.32 (s, 1H, protón intercambiable), 1.55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z : 334.0 ($M+H$).

25

Etapla 5: Preparación de 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (**1**)



30

- A una solución agitada de 2-(3-(3-bromofenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol **7** (0.75 g, 2.25 mmol) en una mezcla de 1,2-dimetoxietano:agua [2:1; (45 ml)], se añadió ácido 2,4-dimetoxipirimidina-5-borónico **8** (0.456 g, 2.48 mmol), seguido de Na_2CO_3 (0.478 g, 4.51 mmol). La mezcla se desgasificó con nitrógeno gaseoso durante 25 minutos. Se añadió dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (0.079 g, 0.112 mmol) a la
- 35 mezcla de reacción anterior y se calentó a 90°C en atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción se vigiló por TLC y UPLC. Después de 15 h, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se inactivó con agua fría (75 ml). La parte acuosa se extrajo con acetato de etilo (3*200 ml), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2*50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto bruto (0.865 g; equilibrio de masas 97.8%) como una goma marrón.
- 40 El producto bruto se purificó por columna ultrarrápida usando acetato de etilo en hexano al 50% como eluyente

para proporcionar el producto deseado (0.575 g) como un sólido blanquecino, que después se trituró, filtró y secó con succión para proporcionar el 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (**1**) (0.5 g, 56.62%) como un sólido blanquecino.

- 5 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.94 (s, 1H), 8.60 (d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.24 (d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.13-8.12 (m, 1H), 8.01-7.98 (m, 1H), 7.70-7.63 (m, 2H), 5.3 (s, 1H, protón intercambiable), 3.98 (d, J = 4.00 Hz, 6H), 1.55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z: 392.3 (M+H)⁺, MR: 86.0°C - 93.4°C.

Ejemplo 2: Inhibición *in vitro* de la unión de ³H-flumazenil

10

Preparación de tejidos

Se cultivaron líneas celulares HEK-293 con expresión estable de receptores GABA α₃β₃γ₂ recombinantes (37°C, 5% de CO₂) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con ultraglutamina 1, D-glucosa 4500 mg/l, suero bovino fetal al 10% y que contiene los siguientes antibióticos: zeocina (0.1 mg/ml), higromicina B (0.15 mg/ml) y G418 (0.5 mg/ml).

15

Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia en matraces de cultivo grandes (175 cm²), se separó el DMEM y las células se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; KCl: 0.2 g/l, KH₂PO₄: 0.2 g/l, NaCl: 8 g/l, Na₂HPO₄: 1.15 g/l). Las células se recolectaron después de la adición de 2 ml de DPBS al cultivo durante aproximadamente 5 min, seguido de un suave raspado de las células del fondo del matraz de cultivo. Después de la adición de otros 15 ml de DPBS, la suspensión celular se transfirió a tubos Falcon y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. El sedimento se lavó una vez en 15 ml de tampón de Tris-HCl o Tris-citrato (50 mM, pH 7.1) utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax y se centrifugó a 2°C durante 10 min a 27 000 x g. El sedimento lavado se resuspendió en 15 ml de tampón de Tris-HCl o Tris-citrato (50 mM, pH 7.1) y se congeló a -80°C hasta el día del experimento de unión.

20

25

Ensayo

30

El día del experimento, la preparación de la membrana se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 2°C durante 10 min a 27 000 x g. El sedimento se resuspendió utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax en tampón de Tris-citrato (50 mM, pH 7.1) hasta 30 - 150 µg de proteína por ensayo y luego se utilizó para ensayos de unión. Se añadieron partes alícuotas de 0.5 ml de suspensión celular a 25 µl de solución de ensayo y 25 µl de ³H-flumazenil (1 nM, concentración final), se mezclaron y se incubaron por duplicado durante 40 min a 2°C. La unión no específica se determinó utilizando clonazepam (1 µM, concentración final).

35

Todas las diluciones de los compuestos de ensayo y la incubación del ensayo se realizaron en viales/placas de vidrio. Se prepararon soluciones de los compuestos de ensayo y ³H-flunitrazepam a 22x la concentración final deseada. Los compuestos se disolvieron en DMSO al 100% (solución madre 10 mM), se diluyeron en etanol-agua al 48% y se analizaron por triplicado en diluciones seriadas.

40

La unión se terminó por filtración rápida en filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman utilizando una cosechadora de células Brandel, seguido de 10 lavados con 1 ml de tampón de Tris-citrato enfriado con hielo. La cantidad de radiactividad en los filtros se determinó por recuento de centelleo líquido convencional utilizando un contador Tri-CarbTM (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). La unión específica es la unión total menos la unión no específica.

45

Resultados

50

Tabla 1. Valores de K_i y IC₅₀ para el compuesto **1**.

Compuesto	K _i (µM)	IC ₅₀ (µM)
2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (1)	0.015	0.038

El valor de IC₅₀ es la concentración de la sustancia de ensayo que inhibe la unión específica de ³H-flumazenil en 50%,

$$IC_{50} = (\text{concentración aplicada de } \mathbf{1}) * \frac{1}{\left(\frac{C_0}{C_x} - 1\right)}$$

55

donde C₀ es la unión específica en el ensayo de control y C_x es la unión específica en el ensayo de prueba.

Conclusión

Se encontró que el 2-(3-(3-(2,4-dimetoxipirimidin-5-il)fenil)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-6-il)propan-2-ol (**1**) tenía un valor de K_i de 0.015 µM y un valor de IC₅₀ de 0.038 µM.

60

Ejemplo 3: Electrofisiología de ovocitos

El ensayo descrito aquí se lleva a cabo para determinar la potencia funcional *in vitro*, así como la eficacia de los PAM en los subtipos de receptores GABA_A del cerebro principales. Para establecer esto, se determinó un perfil de concentración-respuesta completo a una concentración de GABA que daba lugar al 5-20% de la respuesta máxima provocada por GABA de los receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 2\gamma 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*

Colagenasa desfoliada X. Los ovocitos de *laevis* se obtuvieron de Ecocyte Bioscience. Para la inyección, los ovocitos se pusieron en una cámara diseñada a medida en solución de Barth Mod. (NaCl 90 mM, KCl 1 mM, NaNO₃ 0.66 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, CaCl₂ 0.74 mM, MgCl₂ 0.82 mM, gentamicina 100 µg/ml y HEPES 10 mM ajustado a pH 7.55) y se inyectaron 25-50 nl de mezcla de ARNc utilizando una Bomba Pico (WPI). La mezcla de ARNc contiene las subunidades α_x , β_2 y γ_{2s} de GABA_AR en la proporción 3:1:3 y en una concentración total de 0.5 µg/µl. Después de inyección, los ovocitos se mantuvieron a 18°C en Barth Mod. durante 1-5 días.

Experimentos de pinzamiento de voltaje de dos electrodos

Respuestas electrofisiológicas de X. Los ovocitos de *laevis* se midieron utilizando la técnica de pinzamiento de voltaje de dos electrodos. Los ovocitos individuales se pusieron en cámaras de registro diseñadas a medida que se perfundieron continuamente con >2 ml/min de OR2 (NaCl 90 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7.4). La solución de ensayo experimental era una solución tampón OR2 convencional que tenía una osmolaridad medida de aproximadamente 180 mOsm. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de tubos de vidrio de borosilicato con filamento (Sutter BF150-110-10) utilizando un extractor DMZ-Universal (Zeitz Instrument), se rellenaron con KCl 2 M y cuando se sumergieron en solución de OR2, las resistencias de los electrodos estaban en el intervalo de 0.5-1 MΩ. El ovocito se atravesó utilizando micromanipuladores manuales y se dejó que se equilibrara a un potencial de mantenimiento de -50 mV a -80 mV durante al menos 1 min para garantizar una corriente de fuga máxima de 100 nA antes de que se iniciara el experimento. El potencial de mantenimiento se fijó normalmente a -60 mV, que es significativamente más bajo que un potencial de reposo típico de -25 mV. En caso de que las amplitudes de corriente fueran bajas en un lote de ovocitos, se utilizó un potencial de mantenimiento de -80 mV siempre que la corriente de fuga no excediera los 100 nA. Las corrientes se amplificaron mediante un amplificador Geneclamp 500B (Axon), se filtraron en paso bajo a 20 Hz, se digitalizaron a 200 Hz por un Digidata 1322A (Axon) y luego se registraron y analizaron por un PC (Compaq Evo) usando el paquete integrado pClamp9 (Axon).

Las soluciones de compuestos se aplicaron a través de un tubo capilar, con un diámetro interior de 1.5 mm (Modulohm 214813), puesto aproximadamente a 2 mm del ovocito y conectado a través de un tubo de teflón a un automuestreador Gilson 233XL. Se utilizó el paquete de software Gilson 735 para controlar todo el equipo Gilson (automuestreador 233XL, diluidor 402 y bombas Minipuls 3) y para activar el registro mediante pCLAMP9. Un caudal de 2.5 ml/min a través del tubo capilar durante las aplicaciones aseguró un rápido intercambio del líquido que rodea el ovocito. La duración de la aplicación se fijó para que durara 60 s, que era suficiente para obtener corrientes pico. El intervalo de tiempo entre registros era de 5 min, durante los cuales el ovocito se perfundió con OR2 también a través del tubo capilar.

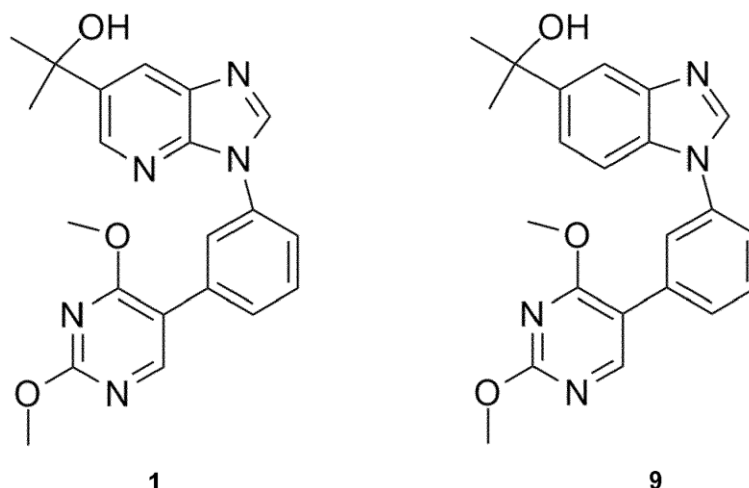
Datos experimentales

Para cada conjunto de datos experimentales, se disolvió GABA en OR2 en una concentración conocida por dar lugar a corrientes provocadas de EC₅-EC₂₀ para una combinación dada de subtipos de receptores GABA_A (0.5-5 µM) y esta solución después se usó para controles así como una solución madre para disolver los compuestos a ensayar en el experimento. Un conjunto experimental completo contenía cuatro trazas de control de GABA, una traza de referencia de diazepam 0.5 µM, 10 trazas de control de GABA y finalmente trazas de un compuesto de ensayo en concentraciones crecientes. Los ovocitos individuales se descartaron después de una serie experimental.

Los efectos moduladores del diazepam se calcularon comparando la traza de diazepam con la traza de control inmediatamente anterior. Asimismo, los efectos moduladores del compuesto en las trazas de ensayo se obtuvieron comparando con el control inmediatamente antes de las trazas de ensayo. Para permitir la comparación de los efectos de un compuesto entre ovocitos individuales, todas las potenciaciones de compuestos se normalizaron respecto a la potenciación del diazepam de control en el mismo ovocito.

Resultados

El ensayo se realizó para los compuestos **1** y **9**, véase a continuación, y los resultados se presentan en la Figura 1.



Conclusión

Como puede verse a partir de los perfiles de concentración-respuesta, la modulación por los compuestos **1** y **9** varía, especialmente con respecto a la modulación del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Es importante destacar que la modulación del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ es cercana a cero para el compuesto **1**, mientras que es claramente negativa para el compuesto **9**. Este ejemplo también demuestra que una diferencia estructural relativamente pequeña entre dos moléculas tiene un gran impacto en la actividad biológica.

Ejemplo 4: Efectos agudos y crónicos del compuesto **1** en la alodinia mecánica en la lesión por constricción crónica (CCI) en ratas.

Método

Animales:

Ratas macho SPRD (Taconic), 140-160 gramos en la cirugía

Cirugía:

La anestesia se indujo y se mantuvo mediante isoflurano al 2.5% combinado con oxígeno (30%) y óxido nitroso (68%). El nervio ciático se expuso a nivel de la mitad del muslo proximal a la trifurcación ciática. Se ataron cuatro ligaduras de tripa crómica (4/0) (Ethicon, New Brunswick, NJ) sin apretar alrededor del nervio, con una separación de 1-2 mm, de modo que el suministro vascular no se viera comprometido claramente. El músculo suprayacente se cerró en capas con sutura quirúrgica absorbible sintética 4/0. La piel se cerró con 1-2 grapas.

Ensayos de comportamiento de ratas con lesiones nerviosas:

3-14 días después de la cirugía, se vigiló en los animales la presencia de alodinia mecánica. Antes de la evaluación, las ratas individuales se sacaron de sus jaulas domésticas y se les permitió habituarse durante 60 minutos en una jaula de ensayo de plexiglás blanco de 15 x 20 cm con ventilación abierta, colocada sobre una rejilla metálica elevada que permitía el acceso a la superficie plantar de la pata trasera lesionada. La presencia de alodinia mecánica se evaluó utilizando una serie de cabellos de von Frey calibrados (límite inferior = 0.1 y límite superior = 26 g, Stoelting Co, Wood Dale IL), que se aplicaron a la superficie plantar de la pata con fuerza creciente hasta que un filamento individual usado comenzó a doblarse. El filamento se aplicó durante un período de 1-2 s y se repitió 5 veces a intervalos de 1-2 s. Se consideró que el filamento que inducía la retirada de la pata en 3 de 5 aplicaciones representaba el umbral para el umbral de la pata (PWT) para que se produjera una respuesta mecánica alodínica. Solo aquellos animales que mostraban comportamientos de dolor neuropático distintivos (alodinia) se incluyeron en los experimentos de ensayos de fármacos. Los animales que mostraban PWT menor que/o igual a 4 g en la pata ipsilateral y PWT mayor que/o igual a 8 g en la pata contralateral se consideró que eran alodínicos. En los días de ensayo de fármaco, el experimentador ignoraba el tratamiento. El tratamiento farmacológico tuvo lugar el día 15 después de la cirugía.

Tratamiento con fármaco:

Efecto agudo del fármaco:

Compuesto **1**: 1, 3, 10 mg/kg, 10 ml/kg, por administración oral.
Pretratamiento: 2 h

Hidrocloruro de morfina: peso de base libre 6 mg/kg, 1 ml/kg, administración subcutánea. Pretratamiento: 30 minutos

Vehículo para el Compuesto 1 y la morfina: DMSO al 5% + (2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina (HPBCD) al 30% en agua.

- 5 Evaluación estadística: ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones múltiples.

Efecto crónico del fármaco:

Compuesto 1: 1, 3, 10 mg/kg, 10 ml/kg, por administración oral una vez al día durante 7 días.

- 10 Hidrocloruro de morfina: peso de base libre 6 mg/kg, 1 ml/kg, administración subcutánea una vez al día durante 7 días. El día 8, se vigiló la alodinia mecánica mediante la aplicación de filamentos de von Frey ("nivel basal") después de administrar a las ratas el Compuesto 1 o hidrocloruro de morfina, y se vigiló la alodinia mecánica con filamentos de von Frey de nuevo 2 h y 3 h después de la administración (Compuesto 1) o 30 minutos después de la administración (hidrocloruro de morfina).

- 15 Vehículo: DMSO al 5% + HPBCD al 30% (en agua)

Evaluación estadística: ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones múltiples.

Resultados

- 20 La administración aguda del Compuesto 1 dio como resultado una mejora significativa de los comportamientos de dolor neuropático evaluado vigilando la alodinia mecánica utilizando cabellos de von Frey. La dosis más baja ensayada de 1 mg/kg, y 3 mg/kg mejoraron significativamente el umbral de retirada de la pata en comparación con el tratamiento con vehículo, vigilado 2 h y 3 h después del tratamiento, véase la Figura 2 (2 h: $p < 0.01$, 3 h: $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguido de test a posteriori LSD de Fisher). 10 mg/kg solamente no
- 25 lograban alcanzar la significación estadística. El hidrocloruro de morfina en 6 mg/kg también mejoró significativamente el umbral de retirada de la pata en comparación con el tratamiento con vehículo 2 h y 3 h después del tratamiento ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ frente a vehículo respectivamente). Después de 7 días de administración diaria del Compuesto 1, se mantuvo una mejora significativa del umbral de retirada de la pata después de 1-3, y 10 mg/kg pretratado 3 h antes del ensayo ($p < 0.05$, 0.01 y 0.01 frente a vehículo respectivamente) y 10 mg/kg administrado 2 h antes del ensayo ($p < 0.001$ frente a vehículo) (ANOVA de una
- 30 vía seguido de test a posteriori LSD de Fisher). Por el contrario, el tratamiento crónico con morfina antes de la administración aguda del fármaco eliminó por completo el efecto alodínico que indica el desarrollo de tolerancia (figura 2).

- 35 Conclusión

Este ejemplo demuestra que el compuesto 1 mejora los comportamientos de dolor neuropático después de la administración aguda del fármaco y que el efecto se mantiene después de la administración crónica del fármaco, lo que indica falta de desarrollo de tolerancia. Por el contrario, el efecto de un opioide, el hidrocloruro

40 de morfina, se pierde por completo después de la administración crónica del fármaco debido al desarrollo de tolerancia.

Ejemplo 5: Efectos agudos del compuesto 1 en el rascado inducido por el compuesto 48/80 en ratones macho CD-1

- 45 Método

Animales:

- 50 Ratones macho CD-1 (22-30 g) (InterVivo Solutions, Canadá)

Tratamiento con fármaco:

- 55 Se administró a los animales uno de los siguientes tratamientos: compuesto 1, vehículo (control negativo) o hidrocloruro de difenhidramina (control positivo); N=8 ratones por grupo. El compuesto 1 se administró mediante alimentación por sonda oral en una concentración de 3, 10 y 30 mg/kg en vehículo (DMSO al 5% + HPBCD al 30% en agua) 30 minutos antes del ensayo.

- 60 El hidrocloruro de difenhidramina se administró mediante alimentación por sonda oral en una dosis de 60 mg/kg en Tween 80 al 5% en agua destilada (BEW=1.14) 60 minutos antes del ensayo. Todos los tratamientos se administraron en un volumen de administración de 10 ml/kg. El compuesto 48/80 se administró por vía intradérmica en el cuello en 50 μ g/0.02 ml en solución salina.

Vigilancia del comportamiento:

- 65 Observación visual de episodios de rascado durante 30 minutos. Las evaluaciones visuales se realizaron con

ocultación del tratamiento.

Evaluación estadística:

- 5 ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori.

Resultados

- 10 El compuesto **1** alivió significativamente el picor, evaluado como episodios de rascado, con una dosis efectiva mínima de 10 mg/kg en comparación con el tratamiento con vehículo ($p < 0.01/0.001$ frente al tratamiento con vehículo para 10 y 30 mg/kg respectivamente, ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori), véase la Figura 3.

Conclusión

- 15 Este ejemplo demuestra que el compuesto **1** mejora significativamente el comportamiento de rascado en ratones, lo que indica efectos positivos sobre el picor.

- 20 Ejemplo 6: Efectos agudos del compuesto 1 en la actividad locomotora exploratoria en ratas macho Sprague Dawley (SD).

Método

Animales:

- 25 Ratas macho SD (180-250 gramos, NTac:SD, Taconic, Dinamarca)

Tratamiento con fármaco:

- 30 Se administró a los animales uno de los siguientes tratamientos: Vehículo (DMSO al 5% + HPBCD al 30% en agua) o compuesto **1** (3, 10, 30 mg/kg, 10 ml/kg, por administración oral), 120 minutos antes del ensayo. $n = 6-7$ por grupo de dosis.

Vigilancia del comportamiento:

- 35 2 h después de la administración, las ratas se pusieron individualmente en jaulas domésticas convencionales nuevas con lecho de serrín reducido. Las jaulas se pusieron en marcos equipados con fotocélulas y haces que permitían el registro automático del comportamiento locomotor (TSE MoTil, Alemania). La actividad locomotora exploratoria se registró durante 30 minutos.

- 40 Evaluación estadística:

ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori.

- 45 Resultados

El compuesto **1** no ejercía ningún efecto en la actividad locomotora exploratoria en ratas macho SD en la dosis más alta ensayada (30 mg/kg) (ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori), véase la Figura 4.

- 50 Conclusión

Este ejemplo demuestra que el compuesto **1** no afectó a la actividad locomotora exploratoria en ratas en las dosis ensayadas, lo que indica falta de propensión a causar sedación.

- 55 Ejemplo 7: Efectos agudos del compuesto 1 en el rendimiento del Rotarod en ratas macho Sprague Dawley (SD).

Método

- 60 Animales:

Ratas macho SD (150-180 gramos, NTac:SD, Taconic, Dinamarca)

- 65 Tratamiento con fármaco:

Se administró a los animales uno de los siguientes tratamientos: Vehículo (DMSO al 5% + HPBCD al 30% en agua), compuesto **1** (3, 10, 30 mg/kg, 10 ml/kg, por administración oral) o Diazepam 10 mg/kg (10 ml/kg, por administración oral) 120 minutos o 60 minutos antes del ensayo, respectivamente. n = 6-7 por grupo de dosis.

5 Vigilancia del comportamiento:

Las ratas se entrenaron en un Rotarod que aceleraba (4-40 rpm, PanLab), una prueba de 5 minutos por día, durante dos días antes del ensayo de fármaco. Solo se incluyeron en el estudio las ratas que eran capaces de permanecer en la barra giratoria durante más de 90 segundos después de dos días de entrenamiento. El día del ensayo, las ratas se pusieron en la barra giratoria, acelerando con una velocidad de 4-40 rpm/5 minutos con el tiempo mínimo posible para pasar en la barra designado como 0 s, y el tiempo máximo pasado en la barra fijado en 300 s. El compuesto **1** se administró 2 h antes del ensayo, mientras que el control positivo, diazepam, se administró 60 minutos antes del ensayo.

15 Evaluación estadística:

ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori.

Resultados

20

El compuesto **1** no afectó a la capacidad de la rata para mantener el equilibrio sobre la barra que aceleraba, medida como latencia a la caída, en la dosis más alta ensayada (30 mg/kg) en comparación con las ratas tratadas con vehículo. Por el contrario, el diazepam acortó significativamente el tiempo para la caída de la barra ($p < 0.05$ frente al tratamiento con vehículo) (ANOVA de una vía seguido de test LSD de Fisher para comparaciones a posteriori), véase la Figura 5.

25

Conclusión

Este ejemplo demuestra que el compuesto **1** no perjudicó la capacidad de la rata para mantener el equilibrio en una barra que aceleraba en las dosis ensayadas, lo que indica una falta de propensión a producir alteraciones motoras.

30

Ejemplo 8: Unión a proteínas plasmáticas estimada por diálisis de equilibrio rápido

35 El propósito de este ensayo es determinar el grado de unión de un compuesto de ensayo a las proteínas plasmáticas.

Método

40 Dispositivos de diálisis de equilibrio rápido (RED):

Se utilizaron insertos desechables compuestos de dos cámaras una al lado de la otra (plasma y tampón) separadas por un cilindro vertical de membrana de diálisis (MWCO aprox. 8000). Los dispositivos RED se pusieron en una placa base de teflón y se incubaron durante 4 horas a 37°C en una incubadora Heidolph ajustada a 100 rpm.

45

Ensayo

El ensayo se realizó en un sistema de manipulación de líquidos de acuerdo con la siguiente descripción del ensayo:

50

- Preparación de plasma enriquecido
- Se pone el número correspondiente de dispositivos RED en la placa base de teflón y se precalienta la placa en la incubadora.
- Se añaden 400 µl de plasma a la cámara de plasma y 600 µl de tampón de PBS a la cámara de tampón.
- Se incuba durante 4 horas a 37°C en la incubadora Heidolph ajustada a 140 rpm.
- Después de la incubación, se transfieren 50 µl de las cámaras de plasma a tubos eppendorf y se añaden 50 µl de tampón de PBS.
- De forma correspondiente, se transfieren 50 µl de las cámaras de tampón a tubos eppendorf y se añaden 50 µl de plasma.
- Se hacen precipitar todas las muestras con 300 µl de MeCN.
- Se centrifuga durante 25 minutos a 5°C y 14 000 rpm (16 000g).
- Se transfiere el líquido sobrenadante a viales de HPLC con un volumen igual de agua MilliQ
- Se analiza por LC-MS/MS con detección SRM
-

55

60

65 Resultados

La unión a proteínas se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Unión de proteína} = \left(1 - \frac{A_{\text{tampón}}}{A_{\text{plasma}}} \right) * 100\%$$

$$\text{Fracción libre: } f_u = 100 - \% \text{ Unión de proteína}$$

5 donde,

$A_{\text{tampón}}$ es el área determinada por LC-MS/MS para la muestra de la cámara de tampón.

A_{plasma} es el área determinada por LC-MS/MS para la muestra de la cámara de plasma.

La fracción libre en el plasma del compuesto **1** era de 16% en ratón y de 19% en rata.

10

Conclusión

El compuesto **1** está abundantemente libre en el plasma para ejercer efectos farmacológicos.

15

Ejemplo 9: Unión al tejido cerebral

El propósito de este ejemplo es evaluar la unión a proteínas del compuesto **1** en el homogeneizado de cerebro de rata utilizando el método de diálisis de equilibrio rápido (RED).

20

Material y equipo

Homogeneizado de cerebro de rata

La fracción de proteínas cerebrales de rata se preparó a partir de tejidos cerebrales recientes aislados de ratas Wistar adultas. Se sacrifican ratas Wistar macho (Harlan, Países Bajos) (según el método aprobado) y se recoge el tejido cerebral inmediatamente. Se diseccionó la sustancia blanca y se preparó un homogeneizado de tejido (10% p/v) en solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4. Esta fracción se denominó homogeneizado de cerebro y se utilizó en el experimento.

25

30

Procedimiento para la diálisis de equilibrio

Preparación de la placa base de teflón

Los pocillos de la placa base de Teflon® se enjuagaron con etanol al 20% durante 10 minutos. Se eliminó el etanol y los pocillos se enjuagaron dos veces con agua destilada, luego se dejó secar la placa antes de su uso.

35

Diálisis de equilibrio

Se añadió 1 µl de compuesto **1** (solución madre 2 mM en DMSO al 100%) a 200 µl de extracto de cerebro (concentración final 10 µM). Se pusieron 200 µl de muestra en la cámara de muestra. Se añadieron 350 µl de PBS 10 mM a la cámara de tampón. La unidad se cubrió con cinta de sellado y se incubó a 37°C en un agitador orbital a aproximadamente 350 rpm durante 4 horas para lograr el equilibrio. A continuación, se extrajeron volúmenes iguales de las cámaras de tampón y de extracto y se pusieron en tubos de microcentrifuga separados.

45

Procedimiento para el análisis de muestras

Se pipetearon 50 µl de cada muestra posterior a la diálisis de las cámaras de tampón y de extracto en tubos de microcentrifuga separados. Se añadieron 50 µl de extracto a las muestras de tampón, así como un volumen igual de PBS a las muestras de extracto recogidas. Se añadieron 300 µl de tampón de precipitación (acetónitrilo:agua que contiene ácido fórmico al 0.1% 90/10 + referencia interna, es decir, tolbutamida o ibuprofeno, 5 µg/ml) para precipitar la proteína y liberar el compuesto, que se agitaron con vórtice y se incubaron durante 30 minutos en hielo antes de centrifugar 10 minutos a 13 000-15 000 g. Luego, el líquido sobrenadante se transfirió a viales o a una placa de 96 pocillos y se realizaron mediciones cuantitativas por LC/MS/MS. La concentración del compuesto **1** en las cámaras de tampón y extracto se determinó a partir de las áreas de los picos con respecto a la referencia interna.

55

Resultados

60

La fracción no ligada (f_u) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$f_{u, \text{diluida}} = \frac{A_{\text{tampón}}}{A_{\text{homogeneizado de cerebro}}}$$

$$f_{u, no\ diluida} = \frac{\frac{1}{D}}{\frac{1}{f_{u, diluida}} + \frac{1}{D}} * 100\%$$

donde,

$A_{tampón}$ es el área determinada por LC-MS/MS para la muestra de la cámara de tampón.

5 $A_{homogeneizado\ de\ cerebro}$ es el área determinada por LC-MS/MS para la muestra de la cámara de homogeneizado de cerebro.

Compuestos de referencia: haloperidol (unión alta) y cafeína (unión baja).

10 La fracción libre del compuesto **1** en el tejido cerebral era 7% en ratas.

Conclusión

El compuesto **1** está abundantemente libre en el cerebro para ejercer efectos farmacológicos.

15 Ejemplo 10: Perfil farmacocinético

El propósito de este ejemplo es obtener datos farmacocinéticos. Las muestras de plasma se tomaron típicamente en 6-8 puntos de tiempo (N = 3-4). Las muestras se analizaron usando una curva de calibración larga usando 10 patrones. Las muestras de plasma se precipitaron con proteínas y se diluyeron usando un sistema de manipulación de líquidos después del análisis usando LC-MS/MS.

Ensayo

25 B. Preparación de patrones

Se prepararon típicamente dos conjuntos individuales de patrones en los siguientes niveles de concentración: 1, 3, 10, 100, 300, 1000, 3000, 5000 y 10 000 ng/ml. El primer conjunto de patrones se analizó al comienzo del análisis y se usó para la calibración. El segundo conjunto de patrones se analizó al final del análisis y se usó como control de calidad.

30

Preparación de la muestra

- Se hicieron precipitar 50 µl de plasma con 150 µl de referencia interna en acetonitrilo
- Seguido de centrifugación 25 min a 5°C a 16 000 g (tubos Eppendorf) o 3000 g para la microplaca de titulación (MTP)
- Se transfirieron 50 µl de líquido sobrenadante y 150 de agua Milli-Q a un vial de HPLC / MTP

35

Resultados

40 Criterios de aceptación

Se permite que cada punto de las curvas de calibración varíe 15% del valor nominal (LLOQ puede variar 20%). Un punto puede ser excluido si varía más. La curva de calibración debe contener como mínimo 5 puntos y no se pueden excluir dos puntos consecutivos. Los QC tienen los mismos criterios de aceptación que los patrones en la curva de calibración.

45

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon en WinNonlin.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos. El compuesto **1** se administró en una solución transparente de HP-Beta-CD al 30% y DMSO al 5%.

Vía	Dosis (mg/kg)	AUC _(0-8h) (h*ng/ml)	C ₀ (ng/ml)	t _{1/2} (h)	Cl (l/h/kg)	V _z (l/kg)	B/P
IV	0.5	985	863	4.3	0.38	2.4	0.5

5 Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos. El compuesto **1** se administró en una solución transparente de HP-Beta-CD al 30% y DMSO al 5%.

Dosis (mg/kg)	AUC _(0-24h) (h*ng/ml)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} (h)	B/P _{3h}
1	1134*	163	4	0.4
3	8005	552	6	0.5
10	34528	2267	8	0.5
30	98537	6591	4	0.6

*AUC calculada 0-8 h, la concentración después de 8 h era 149 ng/ml.

Conclusión

10 El compuesto **1** muestra semivida larga y aclaramiento bajo en ratas. El compuesto **1** también muestra linealidad de la dosis (C_{máx}), alta exposición en el plasma y alta exposición.

Ejemplo 11: Estudio de aclaramiento intrínseco usando hepatocitos humanos y de rata

15 En este ensayo, el compuesto **1** se incubó con hepatocitos criopreservados durante diferentes puntos de tiempo y la desaparición del compuesto **1** se vigiló por LC-MS/MS. Las condiciones utilizadas en el ensayo se resumen a continuación.

- Concentración de compuesto en el ensayo: 1 µM
- Tiempo de incubaciones con hepatocitos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos a 37°C con CO₂ al 5%
- Densidad celular de hepatocitos: 106 células/ml
- Volumen de ensayo: 500 µl
- N° de repeticiones: 2
- Compuesto de referencia: testosterona (aclaramiento alto)

Resultados

25

Tabla 4. Aclaramiento de hepatocitos en seres humanos y ratas.

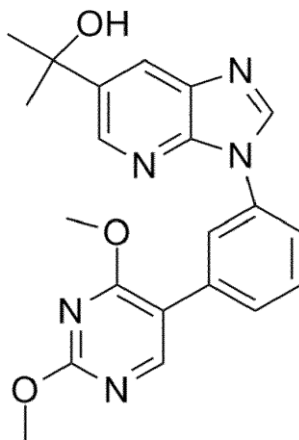
Aclaramiento de hepatocitos	
Especie	Cl _{int} in vivo (µl/min/millón de células)
Ser humano	1.87
Rata	2.11

Conclusión

30 El compuesto **1** tiene un aclaramiento bajo en hepatocitos humanos y de rata.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1:



1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto definido en la reivindicación 1.

3. El compuesto definido en la reivindicación 1, para usar en medicina.

10

4. El compuesto definido en la reivindicación 1, para usar en el tratamiento del dolor neuropático.

5. El compuesto para usar según la reivindicación 4, en donde el dolor neuropático es alodinia.

15

6. El compuesto definido en la reivindicación 1, para usar en el tratamiento del picor.

7. El compuesto para usar según la reivindicación 6, en donde el picor es *Prutirus*.

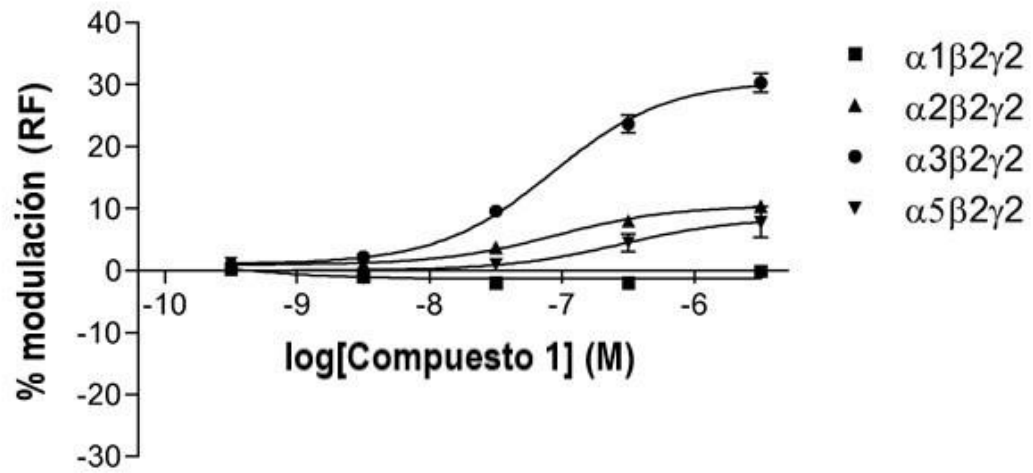
8. El compuesto para usar según la reivindicación 6, en donde el picor es causado por una afección de la piel.

20

9. El compuesto para usar según la reivindicación 8, en donde la afección de la piel es psoriasis.

10. El compuesto para usar según la reivindicación 8, en donde la afección de la piel es eczema.

A



B

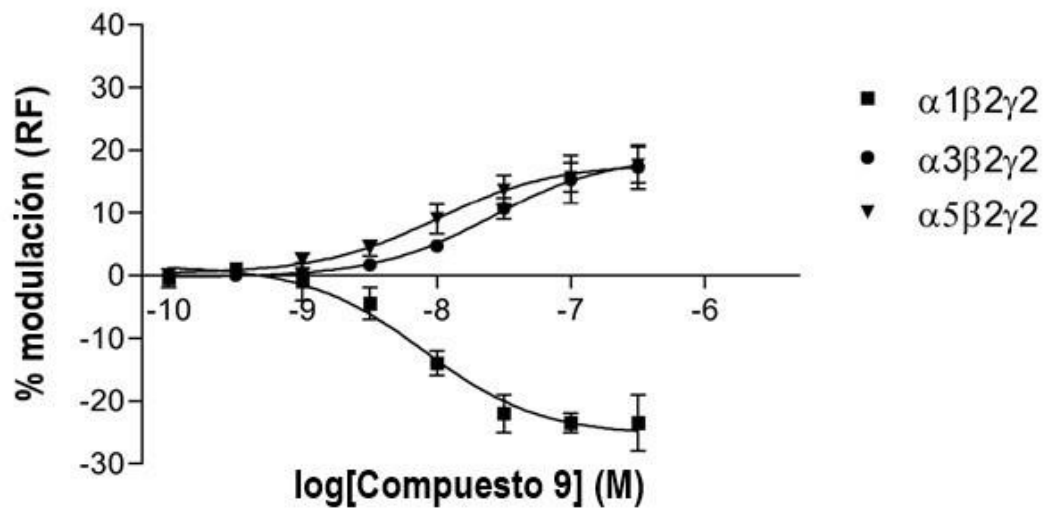


Figura 1



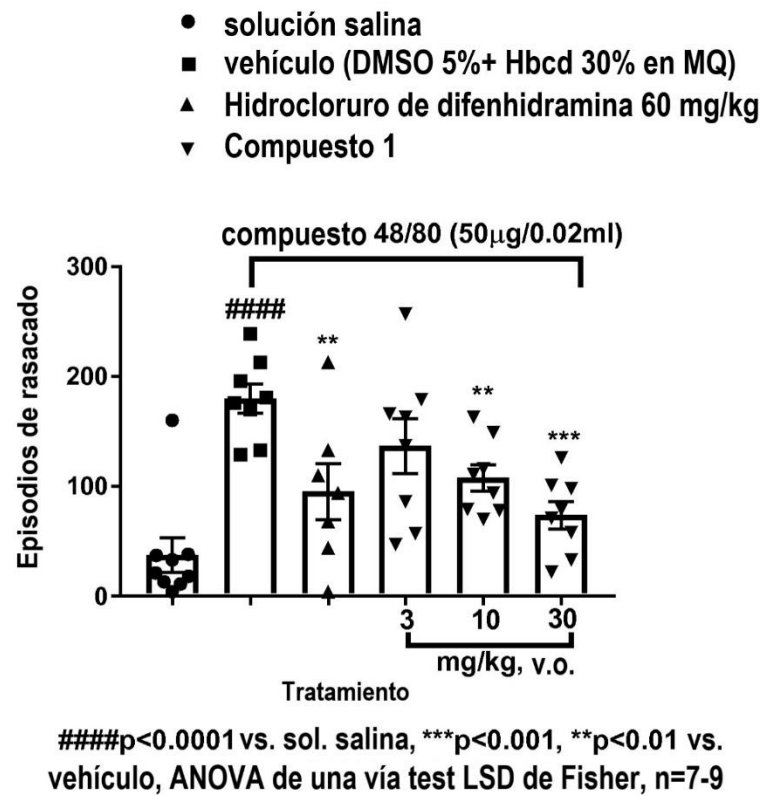


Figura 3

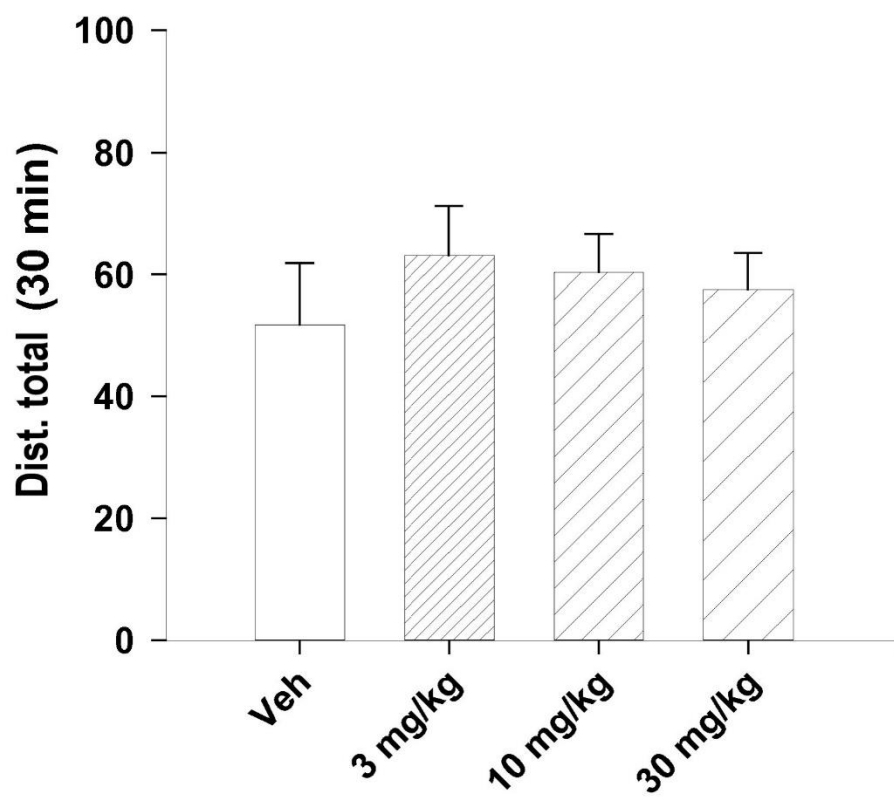


Figura 4

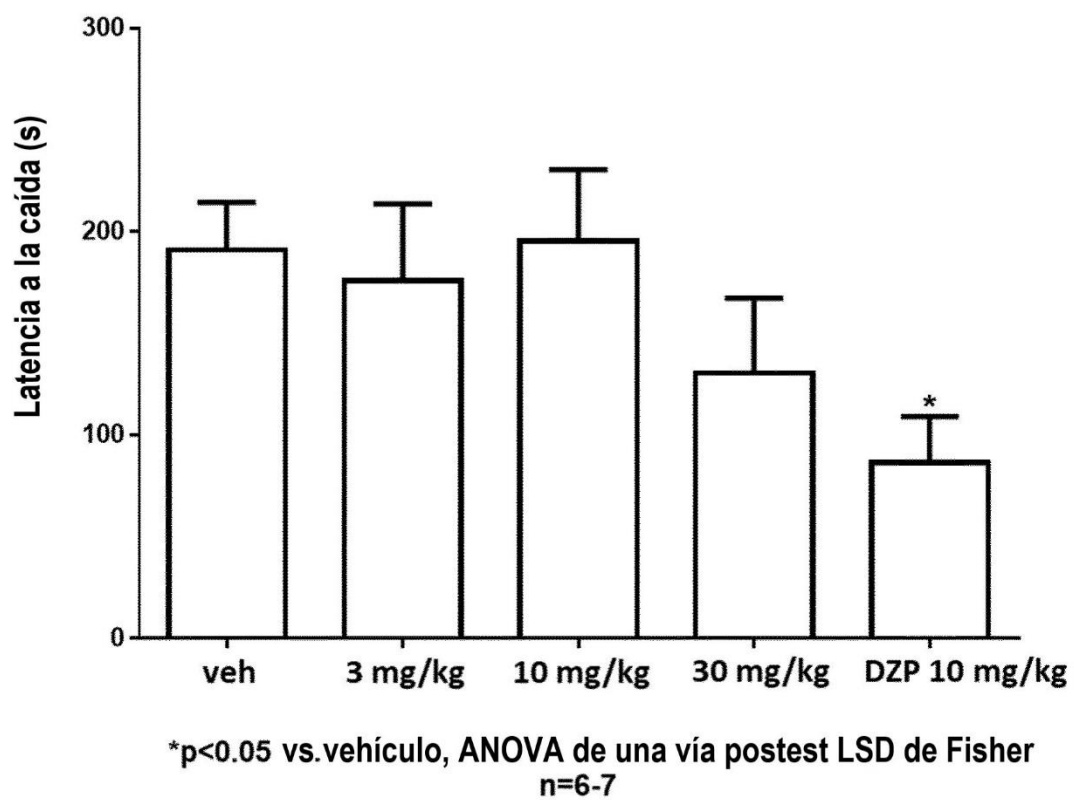


Figura 5