

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

P-3176

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-168005-00007-0000

Fecha: 2013-10-09 14:24:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 118

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **11-168.005**
Solicitud de patente a nombre de **XENON PHARMACEUTICALS INC.**

Yo, **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **XENON PHARMACEUTICALS INC.**, domiciliada en British Columbia, Canadá, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **9985** notificado por fijación en lista el 11 de junio de 2013, y considerando el memorial radicado el 247 de agosto de 2013, en donde se solicitó una prórroga para dar respuesta a dicho oficio, me permito manifestar me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo pliego reivindicatorio en donde se han modificado las reivindicaciones 1 y 2 y se han eliminado las reivindicaciones 3 a 8 y por lo tanto consta ahora de 2 reivindicaciones, en un esfuerzo por acelerar el trámite, como sigue:

2. Excepción a la patentabilidad

Con el objeto de atender a la objeción hecha por su Despacho a las reivindicaciones 3 a 7, estas han sido eliminadas del nuevo capítulo de reivindicaciones que presento junto con este escrito.

3. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso

Con el objeto de atender a la objeción hecha por su Despacho a la reivindicación 8 por cuanto su Despacho considera que esta no es patentable, dicha reivindicación se ha eliminado del nuevo capítulo reivindicatorio que presento con este escrito.

4. Reivindicaciones y Descripción

Para atender a las observaciones hechas por su Despacho, en el caso de las reivindicaciones 1 y 2 y al error en el nombre del compuesto, presento junto con este

P-3176

1/118

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

escrito un nuevo capítulo de reivindicaciones en donde se ha eliminado el término prodroga y se ha corregido el error en el nombre del compuesto.

Igualmente, en la descripción se ha corregido el error que aparece en el nombre del compuesto.

De otro lado, se ha eliminado la frase que hace referencia a la incorporación del contenido de los documentos citados por referencia. Esto se ha hecho con el fin de agilizar el trámite del asunto, pero quiero manifestar mi total desacuerdo con esta objeción. Su Despacho considera que lo que está en la descripción afecta el alcance de la protección. Esto es totalmente inaceptable ya que como lo expresa la misma Decisión 486, el alcance de la invención solo está definido por el tenor de las reivindicaciones. Lo que se escribe en la descripción debe ayudar a interpretar las reivindicaciones. Así que mucha de la información que se menciona como referencia tiene el objetivo de dar mayor claridad a ciertos conceptos que se mencionan con respecto a la invención. En ningún momento, tales referencias se introducen en las reivindicaciones y por lo tanto no afectan el alcance real de la protección. Así que la objeción planteada por su despacho está totalmente por fuera de lo que permite o no la norma de patentes. El colocar referencias en la descripción es perfectamente válido en Colombia y en cualquier país del mundo. Esta objeción no tiene fundamento jurídico ni técnico.

5. Novedad

El señor examinador indica que la reivindicación 1 y 2 carecen de novedad frente al documento D1 (WO 2006/110917). En este sentido, su Despacho menciona que el documento D1 describe el compuesto de fórmula (I) de la presente invención.

Frente a lo anterior, se desea poner de presente que la solicitante no está de acuerdo con la opinión de su Despacho y agrega que lo anterior no es correcto según los siguientes argumentos que prueba lo mencionado.

Su Despacho afirma que: *“La quiralidad de un compuesto y el que tenga enantiómeros es un elemento implícito en la divulgación y teniendo en cuenta si cualquiera de los enantiómeros aislados resulta más activo que la mezcla racémica es un proceso de rutina y es esperado que uno de los isómeros tenga mayor actividad en comparación con el racemato”*.

Inicialmente, observamos que la base para el rechazo hecho por su Despacho a la invención reivindicada no es el de falta de novedad. Más bien parece ser de falta de nivel inventivo (u obviedad) en vista del racemato del (S)-enantiómero reivindicado y divulgado en D1.

Adjunto, encontrará dos declaraciones del inventor Jean-Jacques Cadieux. Estas declaraciones fueron presentadas también durante el proceso de la solicitud de patente correspondiente US 12/825.168, la cual fue otorgada y se le asignó en número de patente US 8,450,358. Igualmente pido que se tenga en cuenta el convenio hecho con los Estados Unidos denominado PPH.

Está bien establecido el principio de la ley de patentes de que la patentabilidad de un enantiómero aislado sobre su racemato depende en gran manera en si los métodos son conocidos para resolver el enantiómero y/o si el enantiómero exhibe una actividad inesperada cuando se compara con la del racemato. Como se demuestra en la Declaración adjunto fechada Enero 30 de 2012, el (S)-enantiómero aquí reivindicado (es decir, el compuesto de fórmula (I-S) como se describió en la descripción de la presente solicitud) exhibe actividad inesperada comparado con la del racemato (es decir, el compuesto de fórmula (I) como se describió en la especificación y en D1) o cuando se comparó con el (R)-enantiómero correspondiente (es decir, el compuesto de fórmula (I-R) como se describió en la especificación).

Por ejemplo, al referirse a *Guanidine Influx Assay*, el (S)-enantiómero demostró una potencia de inhibición significativamente mayor (es decir, >1000 veces) contra el canal de sodio, hNa_v1.7 cuando se comparó con la potencia del (R)-enantiómero correspondiente y el racemato. Estos resultados son inesperados porque una persona versada en la técnica no sería capaz de predecir razonablemente este grado de potencia de inhibición de un enantiómero por encima del otro enantiómero. Como se observó en la declaración en cuestión, este nivel de potencia inesperado del (S)-enantiómero de la invención por encima del (R)-enantiómero o del compuesto de fórmula (I) permite obtener la actividad farmacológica deseada con una dosis menor y posiblemente con menores efectos colaterales.

Más aún, en *Electrophysiological Assay*, el (S)-enantiómero demostró tener una baja afinidad por el estado en descanso/cerrado del hNa_v1.7. Estos resultados demuestran aún más que el (S)-enantiómero es cerca de 5 veces más potente en ligarse al estado inactivado del hNa_v1.7 que el (R)-enantiómero y que el (S)-enantiómero es principalmente responsable de la potencia del compuesto de fórmula (I). Esto es inesperado porque la actividad biológica del racemato descansa principalmente en un enantiómero.

Además, en el documento *CFA Induced Inflammatory Pain Assay*, el (S)-enantiómero demuestra un mayor efecto máximo cuando es dosificado en 100 a 200 mg/kg mientras que el (R)-enantiómero correspondiente demostró un efecto significativamente menor cuando se dosificó en la misma cantidad. Sin embargo, el (R)-enantiómero logró una concentración de plasma mucho mayor en la dosis equivalente. Esto es un hallazgo inesperado e inusual. Como consecuencia, el uso del racemato, es decir, del compuesto de fórmula (I), resultaría en cerca de 10 veces en exceso del (R)-enantiómero inactivo. El uso del (S)-enantiómero solo mejoraría grandemente por lo tanto la probabilidad de obtener un efecto analgésico sin tener efectos colaterales adversos debido a la actividad no selectiva del (R)-enantiómero.

Los resultados de *Permeability Assay* fueron inesperados porque una persona versada en la materia esperaría que la proporción P_{app}, es decir, el compuesto de fórmula (I), estuviera cerca del punto medio del rango entre la proporción P_{app} del (S)-enantiómero y la proporción P_{app} del (R)-enantiómero. De hecho, la proporción P_{app} del (S)-enantiómero resultó significativamente más baja que las proporciones del (R)-

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

enantiómero y del racemato.

Por favor note que los resultados de *Guanidine Influx Assay* no necesariamente predicen el resultado del *Electrophysiological Assay* y que ni los resultados del *Guanidine Influx Assay* ni los resultados del *Electrophysiological Assay* necesariamente predicen el desenlace de los resultados in vivo del *CFA Induced Inflammatory Pain Assay*, particularmente con respecto a la concentración de plasma (lo que demostró un incremento en la biodisponibilidad del (R)-enantiómero, particularmente dado que el (S)-enantiómero logró un mayor efecto fisiológico con la misma dosis), y que los resultados de *Permeability Assay* fueron inesperados al demostrar que la proporción de la permeabilidad del (S)-enantiómero era menor que la del (R)-enantiómero y la del racemato.

Así, como se demostró en la declaración de Enero 27 de 2012, el (S)-enantiómero exhibió una actividad inesperada cuando se la comparó con la actividad del racemato en *Guanidine Influx Assay*, *Electrophysiological Assay* y *CFA Induced Inflammatory Pain Assay*.

La declaración de Mayo 29 de 2012, demostró adicionalmente que el (S)-enantiómero exhibió una actividad inesperada cuando se comparó con la actividad del racemato en el ensayo de solubilidad (*Solubility Assay*) y cuando se ensayó en cuanto a la inhibición de CYP2D6 en *Inhibition of Cytochrome P450 Isoform 2D6 (CYP2D6) Assay*.

En particular, como se observó en la declaración de Mayo 29 de 2012, una persona versada en la técnica no esperaría necesariamente que el (S)-enantiómero presentara una actividad superior comparada con el racemato en *Electrophysiological Assay* porque *Electrophysiological Assay*, a diferencia de *Guanidine Influx Assay*, no se basa en moduladores de canal dependiente de voltaje para inducir el influjo de los iones de sodio. Además, una persona versada en la materia no necesariamente esperaría que el (S)-enantiómero presentara propiedades superiores comparado con el racemato en *Solubility Assay* en vista de la divulgación del artículo de Lorenz y Seidel-Morgenstern mencionado en la declaración en cuestión (se anexa copia de dicho artículo). Finalmente, una persona versada en la materia no necesariamente esperaría que el (S)-enantiómero presentara propiedades superiores en comparación con el racemato en *Inhibition of Cytochrome P450 Isoform 2D6 (CYP2D6) Assay* en vista del artículo de Shin et al., mencionado en la declaración (Se anexa copia de este artículo).

Su Despacho debe notar que aunque puede “esperarse” que uno de los dos enantiómeros tenga mayor actividad biológica que el racemato, no hay una enseñanza en D1 que lleve a la persona versada en la materia a aislar específicamente el (S)-enantiómero y también tener una expectativa razonable de que el (S)-enantiómero tuviera la actividad biológica deseable, particularmente en vista de las enseñanzas de D1. Tampoco existe una enseñanza en D1 que conduzca a la persona versada en la materia a esperar que el (S)-enantiómero demuestre los resultados que demostró en todos los ensayos en que fue probado. De acuerdo a lo anterior, el (S)-enantiómero debería considerarse patentable en vista de la divulgación de D1.

En vista de lo anterior, las nuevas reivindicaciones 1 y 2 son patentables frente al documento D1.

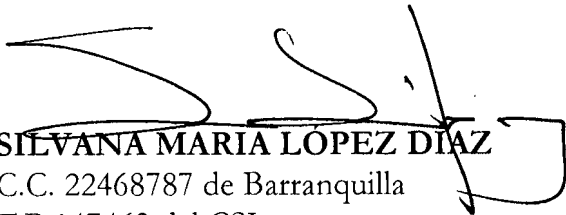
Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

C.C. 22468787 de Barranquilla

T.P 147463 del CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

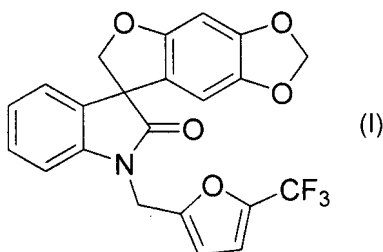
ENANTIÓMEROS DE COMPUESTOS DE ESPIROOXINDOL Y SUS USOS COMO
AGENTES TERAPÉUTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está dirigida a un enantiómero específico de un compuesto del
5 espirooxindol (*spiro-oxindole*), específicamente al uso del enantiómero en terapéutica humana o
veterinaria, para tratar enfermedades o condiciones en mamíferos, preferiblemente humanos, que
son mejoradas o aliviadas mediante la modulación, preferiblemente por inhibición, de canales de
sodio regulados por voltaje (*voltage-gated sodium channels*).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

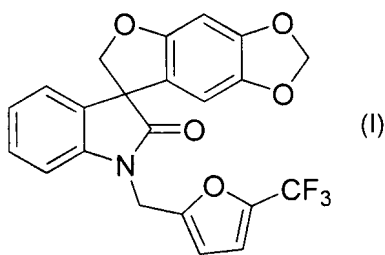
10 La Solicitud de Patente PCT Publicada No. WO 2006/110917, divulga ciertos compuestos
de espirooxindol, en particular 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-
f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona, en otras palabras, el compuesto correspondiente a la
siguiente fórmula (I):



15 Estos compuestos son descritos en la mencionada referencia como útiles en el tratamiento
de enfermedades o condiciones, tales como dolor, en mamíferos, preferiblemente humanos, las
cuales son mejoradas o aliviadas mediante la modulación, preferiblemente por inhibición, de
canales de sodio regulados por voltaje.

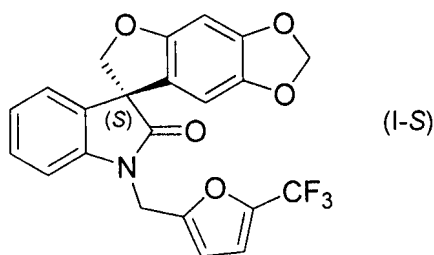
RESUMEN DE LA INVENCION

20 La presente invención está dirigida al descubrimiento de que el enantiómero-(*S*) y el
enantiómero-(*R*) del siguiente compuesto de fórmula (I):



demuestran una diferencia en potencia para la inhibición de la actividad de canales de sodio regulados por voltaje.

En consecuencia, en un aspecto, la invención provee el enantiómero-(*S*) de 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona, es decir, el enantiómero-(*S*) con la fórmula (I-*S*) siguiente:



o un solvato o prodroga aceptables del mismo. Preferiblemente, el enantiómero-(*S*) está sustancialmente libre del enantiómero-(*R*).

En otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica que comprende el enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una presentación, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), en un portador farmacéuticamente aceptable y en una cantidad que sea efectiva para tratar enfermedades o condiciones relacionadas con dolor cuando sea administrada a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente, un humano.

En otro aspecto, la invención provee terapia farmacéutica en combinación con el

enantiómero-(*S*) o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), y una o más terapias existentes, o cualquier combinación de las mismas, para aumentar la eficacia de alguna terapia con droga, existente o futura, o para disminuir los eventos adversos asociados con la terapia con droga, existente o futura. En una presentación, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que combina el enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), con terapias establecidas o futuras para las indicaciones divulgadas en la invención.

En otro aspecto, la invención provee un método para el tratamiento de una enfermedad o una condición en un mamífero, preferiblemente un humano, en la cual la enfermedad o condición se selecciona del grupo que abarca dolor, depresión, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias, enfermedades psiquiátricas, enfermedades neurológicas y ataques o paros (*seizures*), así como combinaciones de los mismos, en el cual el método consiste en administrar al mamífero necesitado una cantidad terapéuticamente efectiva del enantiómero-(*S*), como ya se dijo, o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otro aspecto, la invención provee un método para el tratamiento del dolor en un mamífero, preferiblemente un humano, en el cual el método comprende la administración al mamífero necesitado de una cantidad terapéuticamente efectiva del enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*).

En otro aspecto, la presente invención provee un método para el tratamiento o alivio de la severidad de una enfermedad, condición o desorden en el cual la activación o hiperactividad de una o más proteínas de canales de sodio regulados por voltaje, que incluyen pero no están limitadas a los canales de sodio regulados por voltaje $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, or $Na_v1.9$, esté implicada en la enfermedad, condición o desorden, método que comprende la administración al mamífero necesitado de una cantidad terapéuticamente efectiva del enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente

aceptables del mismo como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(R).

En otro aspecto, la presente invención provee un método para el tratamiento de enfermedades o condiciones en mamíferos, preferiblemente humanos, que estén asociados a la actividad de canales de sodio regulados por voltaje. En consecuencia, la invención provee un

5 método para el tratamiento de enfermedades o condiciones en mamíferos, preferiblemente humanos, que son mejorados o aliviados mediante la modulación, preferiblemente con la inhibición, de canales de sodio regulados por voltaje. Ejemplos de tales enfermedades o condiciones incluyen, pero no se limitan a ellos, dolor de cualquier naturaleza y origen, dolor asociado con HIV, neuropatía inducida por el tratamiento del HIV, neuralgia trigeminal,

10 neuralgia post-herpética, neuropatía diabética, Síndrome de Dolor Complejo Regional (CRPS, *en inglés*), Desorden del Dolor Paroxísmico Extremo (PEPD, *en inglés*), eudinia, sensibilidad al calor, sarcoidosis, síndrome de colon irritable, enfermedad de Crohns, dolor asociado con esclerosis múltiple (MS, *en inglés*), discapacidad motriz asociada con MS, esclerosis amiotrófica lateral (ALS, *en inglés*), prurito, hipercolesterolemia, hiperplasia prostática benigna, neuropatía

15 periférica, artritis, artritis reumatoidea, osteoartritis, distonía paroxísmica, parálisis periódica, síndromes de miastenia, miotonía, hipertermia maligna, fibrosis quística, pseudoaldosteronismo, rabdomiolisis, depresión bipolar, ansiedad, esquizofrenia, enfermedad debida a la exposición a insecticidas u otros agentes que promueven hiperexcitabilidad neuronal o muscular, eritemalgia hereditaria, eritemalgia secundaria, dolor rectal hereditario, dolor facial hereditario, migraña,

20 cefalea, cefalea neuralgiforme, migraña hemipléjica hereditaria, condiciones asociadas con el dolor cefálico, dolor sinusal, dolor de cabeza por tensión, dolor fantasma de extremidades, daño a nervios periféricos, cáncer, epilepsia, paros tónicos parciales y generales, síndrome de pierna intranquila, arritmias, fibromialgias, neuroprotección bajo condiciones isquémicas causadas por un ataque, glaucoma o trauma neural, taquiarritmias, fibrilación atrial y fibrilación ventricular, en

25 el cual el método comprende, la administración al mamífero necesitado de una cantidad terapéuticamente efectiva del enantiómero-(S), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(R).

En otro aspecto, la invención provee un método para el tratamiento de una enfermedad o condición en un mamífero, preferiblemente un humano, mediante la inhibición de flujo iónico a través de un canal de sodio regulado por voltaje en el mamífero, en el cual el método comprende la administración al mamífero necesitado de una cantidad terapéuticamente efectiva del enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*).

La invención además provee el uso del enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), en la preparación de una composición medicinal para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con la actividad de un canal de sodio regulado por voltaje. En consecuencia, la invención provee el uso del enantiómero-(*S*), o un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se dijo, preferible y sustancialmente libre del enantiómero-(*R*), en la preparación de una composición medicinal para el tratamiento de una enfermedad o condición que se ve mejorada o aliviada por la modulación, preferiblemente con la inhibición, de un canal de sodio regulado por voltaje

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar en más detalle algunos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de los dibujos en combinación con la descripción detallada de propuestas específicas que aquí se presentan.

La FIG. 1 presenta la relación concentración-respuesta para los enantiómeros -(*S*) y -(*R*) en el Ensayo de Flujo entrante de Guanidina del Ejemplo Biológico 1.

La FIG. 2 muestra una comparación de la eficacia de los enantiómeros -(*S*) y -(*R*) con una dosis oral en un modelo de dolor inflamatorio del Ejemplo Biológico 3.

La FIG. 3 muestra una comparación de la eficacia de los enantiómeros -(*S*) y -(*R*) con administración tópica en un modelo de dolor neuropático del Ejemplo Biológico 3.

La FIG. 4 muestra el progreso en el tiempo de picazón histamino-inducida en ratones no tratados en el ensayo *in vivo* descrito en el Ejemplo Biológico 7. Los datos se expresan como Media $\pm$ DE (desviación estándar) de los períodos de picazón.

La FIG. 5 muestra la eficacia contra una picazón histamino-inducida de un ungüento con un contenido de 8%(w/v) del enantiómero-(S), aplicado tópicamente. Los datos se expresan como Media $\pm$ DE (desviación estándar) de los períodos de picazón.

La FIG. 6 muestra la eficacia del enantiómero-(S) contra una picazón histamino-inducida cuando se administra por vía oral en lugar de tópicamente. Los datos se expresan como Media $\pm$ DE (desviación estándar) de los períodos de picazón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Tal como se usa en la memoria y en las reivindicaciones anexas, a menos que se especifique en contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado:

“Analgesia” se refiere a una ausencia de dolor en respuesta a un estímulo que normalmente sería doloroso.

“Alodinia” se refiere a una condición en la cual una sensación normalmente inocua, como presión o un toque suave, se percibe como dolorosa.

“Enantiómeros” se refiere a moléculas asimétricas que pueden existir en dos formas isoméricas diferentes cuyas configuraciones espaciales son diferentes. Otros términos usados para designar o referirse a enantiómeros incluyen “estereoisómeros” (debido al arreglo diferente o estereoquímica alrededor del centro quiral; aunque todos los enantiómeros son estereoisómeros, no todos los estereoisómeros son enantiómeros) o “isómeros ópticos” (debido a la actividad óptica de los enantiómeros puros, la cual consiste en la habilidad de enantiómeros puros diferentes de rotar en diferentes direcciones la luz polarizada por plano). Debido a que no poseen un plano de simetría, los enantiómeros no son idénticos a sus imágenes especulares; las moléculas que existen en dos formas enantioméricas son quirales, lo cual significa que puede considerarse que existen en formas “izquierda” y “derecha”. La causa más común de quiralidad

en moléculas orgánicas es la presencia de un carbono tetrahédrico unido a cuatro sustitutos o grupos diferentes. A tal carbono se le refiere como centro quiral o centro estereogénico. Un método para indicar el arreglo tridimensional de los átomos (o configuración) en un centro estereogénico es referirse al arreglo de la prioridad de los grupos cuando el grupo de menor prioridad está orientado en posición opuesta al observador hipotético: si el arreglo de los tres grupos restantes, de mayor a menor prioridad, es dextrógiro (en el sentido de las agujas del reloj), el centro estereogénico tiene una configuración "R" (o "D"); si el arreglo es en el sentido contrario, el centro estereogénico tiene una configuración "S" (o "L").

Los enantiómeros tienen la misma fórmula empírica y generalmente son químicamente idénticos en sus reacciones, sus propiedades físicas y sus propiedades espectroscópicas. Sin embargo, los enantiómeros muestran reactividad química diferente hacia otros compuestos asimétricos, y responden de manera diferente ante alteraciones físicas asimétricas. La alteración asimétrica más común es la luz polarizada.

Un enantiómero puede rotar la luz polarizada; esto indica que un enantiómero es ópticamente activo. Dos enantiómeros diferentes del mismo compuesto rotarán la luz polarizada en direcciones opuestas; así, la luz puede ser rotada hacia la izquierda, o contraria a las agujas del reloj, para un observador hipotético (a esto se le llama levógiro o "l", o "menos", o "-"), o puede ser rotada hacia la derecha, o en el sentido de las agujas del reloj, (a esto se le llama dextrógiro o "d", o "más", o "+"). El signo de la rotación óptica (+) o (-) no está relacionada con la designación R, S. A una mezcla de cantidades iguales de dos enantiómeros quirales se le llama mezcla racémica (*racemic mixture* o *racemate*) y se designa con uno de los dos signos (+/-) o de los prefijos "d,l" para indicar una mezcla de formas dextrógira y levógira. El compuesto de la fórmula (I) aquí descrito es una mezcla racémica. Las mezclas racémicas muestran rotación óptica cero porque cantidades iguales de formas (+) y (-) están presentes. En general, la presencia de un solo enantiómero rota la luz polarizada en una sola dirección; por ello, a un enantiómero sólo se le refiere como ópticamente puro.

Las designaciones "R" y "S" se usan para indicar la configuración absoluta de una

molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). La designación puede aparecer como un prefijo o como un sufijo; pueden o no estar separados del nombre del enantiómero mediante un guión; pueden o no estar guionados; y pueden o no estar encerrados dentro de paréntesis.

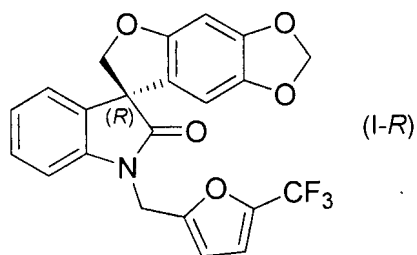
Las designaciones o prefijos “(+) y (-)” se usan aquí para designar el signo de rotación de luz polarizada inducida por el compuesto, el (-) indicando que el compuesto es levógiro (rota hacia la izquierda). El compuesto con prefijo (+) es dextrógiro (rota hacia la derecha).

“Resolución” o “resolviendo”: cuando estos términos se usan en referencia a una mezcla racémica o compuesto racémico se refieren a la separación de la mezcla racémica en sus dos formas enantioméricas, (es decir, sus formas (+) y (-); (R) y (S).

“Exceso enantiomérico” o “ee” se refiere a un producto en el cual un enantiómero está presente en exceso del otro, y se define como la diferencia absoluta en fracción molar entre ambos enantiómeros. El exceso enantiomérico se expresa típicamente como el porcentaje de un enantiómero presente en la mezcla con relación al otro enantiómero. Para los propósitos de esta invención, se considera que el enantiómero-(S) está “sustancialmente libre” del enantiómero-(R) cuando el enantiómero-(S) esté presente en exceso enantiomérico mayor del 80%, preferiblemente mayor de 90%, más preferiblemente mayor de 95%, y con el máximo de preferencia cuando sea mayor de 99%.

El protocolo de nomenclatura química y los diagramas estructurales aquí usados son una forma modificada del sistema de nomenclatura de la I.U.P.A.C. (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) aplicado mediante el programa ACD/Name Version 9.07. Por ejemplo, el compuesto de la fórmula (I), como se indicó antes en el Resumen de la Invención, se le llama aquí 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona. El enantiómero-(S) correspondiente, es decir el enantiómero-(S) de la fórmula (I-S), como se indicó antes en el Resumen de la Invención, se le llama aquí (S)-1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona.

El enantiómero-(R) correspondiente, el enantiómero-(R) de la siguiente fórmula (I-R):



o un solvato o prodroga del mismo, farmacéuticamente aceptables, se denomina aquí (R)-1'-[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona.

“Prodroga” se usa para indicar un compuesto que puede ser convertido bajo condiciones fisiológicas o por solvólisis en un compuesto biológicamente activo de la invención. Así, el término “prodroga” se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable. Una prodroga puede ser inactiva cuando se le administra a un paciente necesitado, pero se convierte *in vivo* en un compuesto activo de la invención. Típicamente, las prodrogas se transforman rápidamente, *in vivo*, para generar un compuesto padre de la invención, por ejemplo mediante hidrólisis en sangre. El compuesto prodroga a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (ver, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)). En Higuchi, T., *et al.*, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," A.C.S. Symposium Series, Vol. 14, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, se presenta una discusión sobre prodrogas.

También se pretende que el término “prodroga” incluya cualquier portador enlazado covalentemente que libere el compuesto activo de la invención *in vivo* cuando dicha prodroga sea administrada a un sujeto mamífero. Se pueden preparar prodrogas de un compuesto de la invención modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto de la invención de tal manera que las modificaciones sean separadas (*cleaved*), sea por manipulación rutinaria o *in vivo*, al compuesto padre de la invención. Prodrogas incluye compuestos de la invención en los cuales un grupo hidroxilo, amino o mercaptano está enlazado a cualquier grupo que cuando la prodroga del compuesto de la invención sea administrado a un sujeto mamífero, se separe para formar un grupo hidroxilo libre, un grupo amino libre o un grupo mercaptano libre, respectivamente. Ejemplos de prodrogas incluyen, pero no están limitados a, derivados de acetatos, formatos y

15

benzoatos de alcohol o derivados amida de grupos funcionales amino presentes en los compuestos de la invención y similares.

La invención aquí divulgada también contempla abarcar el enantiómero-(S) y el enantiómero-(R) aquí divulgados, isotópicamente marcados por tener uno o más átomos reemplazados por un átomo con diferente masa atómica o número atómico. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos aquí divulgados incluyen los isótopos del hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, como son ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , and ^{18}F , respectivamente. Estos compuestos radiomarcados (*radiolabelled*) podrían ser útiles para ayudar a determinar o medir la eficacia de los compuestos, caracterizando, por ejemplo, el sitio o modo de acción sobre los canales de sodio regulados por voltaje, o la afinidad de enlace a un sitio farmacológicamente importante de acción sobre canales de sodio regulados por voltaje. Los compuestos isotópicamente identificados son útiles en estudios de drogas y de distribución en substratos tisulares. Los isótopos radioactivos del tritio, es decir ^3H , y del carbono-14, *es decir*, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito dadas su facilidad de incorporación y disponibilidad de medios de detección. Un radioligando (*radioligand*) que incorpore tritio (^3H) es particularmente útil en estudios de enlaces por ligandos con membranas contentivas de canales de sodio regulados por voltaje debido a que el tritio tiene una larga vida media de descomposición y la emisión es de relativa baja energía, y por ello el radioisótopo es relativamente seguro. Típicamente, el radioligando se prepara por intercambio de tritio con un hidrógeno en un compuesto sin marcar. La identificación de enantiómeros activos y no activos de una mezcla racémica particular facilita el desarrollo de un ensayo de enlace por ligando porque el enantiómero inactivo sin marcar puede agregarse al ensayo para reducir, eliminar o controlar de alguna manera el enlazamiento no específico del enantiómero tritiado activo.

La sustitución con isótopos más pesados como el deuterio, es decir, ^2H , puede significar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, como por ejemplo, aumento de la vida media *in vivo* o requerimientos de dosis más pequeñas, y por ello puede ser preferida en algunas circunstancias.

La sustitución con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede

resultar útil en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET, *en inglés*) para examinar la ocupación (*occupancy*) en el sustrato receptor. Los enantiómeros de la invención marcados isotópicamente generalmente se pueden preparar mediante técnicas convencionales conocidas para aquellos diestros en el arte o mediante procesos análogos a aquellos aquí descritos que
5 utilicen reagentes adecuados, marcados isotópicamente, en lugar del reagente no marcado empleado con anterioridad.

La invención aquí divulgada también contempla abarcar los productos metabólicos *in vivo* generados por los enantiómeros divulgados. Tales productos pueden ser el resultado de, por ejemplo, la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, y procesos similares, del
10 compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. En consecuencia, la invención incluye productos metabólicos generados por un proceso que comprende el contacto de un enantiómero de la presente invención con un mamífero, por un período de tiempo suficiente para que se genere el producto metabólico. Tales productos metabólicos pueden ser identificados administrando a un animal, como puede ser una rata, un ratón, un cochinillo de Indias o acure
15 (*guinea pig*), un mono, o un humano, un enantiómero radiomarcado de la invención, en una dosis detectable y permitiendo el tiempo suficiente para que se complete el metabolismo, y luego aislando el producto metabólico de la orina, sangre u otras muestras biológicas.

“Selectividad” y “selectivo/a” se usan aquí como una medida relativa de la tendencia de un compuesto de la invención por asociarse preferentemente con una cosa y no con otra (o un
20 grupo de otras), como puede ser entre canales de sodio regulados por voltaje. Por ejemplo, la selectividad puede ser determinada por mediciones comparativas de la cinética y la afinidad por el enlazamiento equilibrado y/o por mediciones funcionales de transporte de iones a través de los canales de sodio regulados por voltaje. La tendencia de un compuesto de asociarse con un canal de sodio regulado por voltaje puede medirse mediante diferentes técnicas, y para los diestros en
25 el arte son conocidos muchos tipos de asociación, tal como se divulga en otras secciones de la presente memoria. Selectividad significa que en un tipo particular de asociación, medido de una manera específica, un compuesto demuestra una tendencia o preferencia por asociarse con un canal de sodio regulado por voltaje en lugar de otro u otros canales de sodio regulados por

voltaje. Esta asociación puede ser diferente para diferentes tipos de ensayos o formas diferentes de medir.

“Enantiómero estable” y “estructura estable” se pretende que indiquen un compuesto suficientemente robusto para sobrevivir la aislación a un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción, y luego su formulación a un agente terapéutico eficaz.

“Mamífero” incluye tanto a humanos como animales domésticos, animales de laboratorio y mascotas domésticas (*p.ej.*, gatos, perros, cerdos, ganado, ovejas, cabras, caballos y conejos) así como animales no domésticos como fauna salvaje y similares.

“Portador, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente” incluye sin limitaciones cualquier adyuvante, portador, excipiente, “deslizante” (*glidant*), agente edulcorante, diluyente, preservante, tinte/colorante, resaltador de sabor, surfactante, agente humedecedor, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, solvente o emulsificante que haya sido aprobado para uso en humanos y animales domésticos por, como ejemplo no limitante, la Administración de Alimentos y Drogas de Los Estados Unidos (United States Food and Drug Administration - FDA, *en inglés*), Salud Canadá (Health Canada, *en inglés*) o la Agencia Europea de Medicinas (European Medicines Agency, *en inglés*).

“Composición farmacéutica” se refiere a una formulación de un compuesto de la invención y a un medio generalmente aceptable en el arte para la liberación (*delivery*) del compuesto biológicamente activo a mamíferos, *p.ej.*, humanos. Tal medio incluye todos los portadores, diluentes o excipientes farmacéuticamente aceptables antes mencionados.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen pero no se limitan a ellos, cualquier solvente, adyuvante, mejorador de la biodisponibilidad, portador, deslizante (*glidant*), agente edulcorante, diluyente, preservante, tinte/colorante, resaltador de sabor, surfactante, agente humedecedor, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizador, agente isotónico, tampón químico (*buffer*) y/o emulsificante que haya sido aprobado para uso en humanos y animales domésticos por, como ejemplo no limitante, la Administración de Alimentos y Drogas de Los Estados Unidos (United States Food and Drug Administration - FDA, *en inglés*), Salud Canadá (Health

Canada, *en inglés*) o la Agencia Europea de Medicinas (European Medicines Agency, *en inglés*).

A manera de ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a los siguientes:

- alcohol bencílico
- 5 benzoato de benzilo
- caprilcaproil macroglicéridos (*p.ej.*, Labrasol®)
- dimetil amina ("DMA")
- etanol
- 2-(2-etoxietoxi)etanol (*p.ej.*, Transcutol®)
- 10 glucosa (solución)
- complejo gliceril caprilato/caprato y PEG-8 (polietilenglicol) caprilato/caprato (*e.g.*,
Labrasol®)
- alcohol isopropílico
- Lauroil Macrogol-32 Glicéridos (*e.g.* Gelucire® 44/14)
- 15 macrogol-15 hidroxistearato (*e.g.*, Solutol® HS15)
- triglicéridos de media cadena (*e.g.*, Miglyol® 810, Miglyol® 840 o
Miglyol® 812)
- aceite de maní
- polisorbato 80 (*p.ej.*, Tween® 80)
- 20 polietilenglicol (PEG)
- polietilenglicol 400 (PEG400, *e.g.*, Lutrol® E 400)
- polietilenglicol 6000
- polioxil 35 aceite de castor (*p.ej.*, Cremophor® EL)
- polioxil 40 aceite de castor hidrogenado (*e.g.*, Cremophor® RH 40)
- 25 propilenglicol (PG)
- propilenglicol monocaprilato (Capryol® 90)
- aceite de soya
- sulfobutileter- β -ciclodextrina (*e.g.*, Capitsol®)
- TPGS (α -tocoferol polietilenglicol succinato)
- 30 agua

Otros excipientes farmacéuticamente aceptables se divulgan en la presente.

Sucede a menudo que las cristalizaciones producen solvatos del compuesto de la invención. En su uso en la presente, el término "solvato" se refiere a un agregado que comprende una o más moléculas de un compuesto de la invención con una o más moléculas del solvente. El

solvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Alternativamente, el solvente puede ser un solvente orgánico. En consecuencia, los compuestos de la presente invención pueden existir como hidratos, incluyendo un monohidrato, dihidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las formas solvatadas correspondientes. El compuesto de la invención puede ser solvatos verdaderos, mientras que en otros casos el compuesto de la invención puede que sólo retenga agua adventicia o ser una mezcla de agua más algún solvente adventicio.

“Cantidad terapéuticamente suficiente” se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que al ser administrada a un mamífero, preferiblemente un humano, es suficiente para servir de tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición de interés en el mamífero, preferiblemente un humano. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una “cantidad terapéuticamente suficiente” variará dependiendo del compuesto, la condición y su severidad, la forma de administración y la edad del mamífero tratado, pero puede determinarse de manera rutinaria por alguien con habilidades ordinarias en el arte que aplique su propio conocimiento y esta divulgación.

“Trato” o “tratamiento” de la forma como aquí se utilizan cubre el tratamiento de una enfermedad o condición de un mamífero, preferiblemente un humano, que padece la enfermedad o condición de interés, que incluye:

- (i) prevenir que la enfermedad o condición ocurran en el mamífero, en particular cuando ese mamífero está predispuesto a la condición pero aún no se le ha diagnosticado;
- (ii) inhibir la enfermedad o condición, es decir, detener (*arrest*) su desarrollo;
- (iii) aliviar la enfermedad o condición, es decir, causar regresión de la enfermedad o condición;
- (iv) aliviar los síntomas resultantes de la enfermedad o condición, es decir, aliviar el dolor atendiendo o no la enfermedad o condición causante.

Como aquí se usan, los términos “mejorando”, “mejorado/a”, “aliviando” o “aliviado/a” deben entenderse según sus definiciones generalmente aceptadas. Por ejemplo, “mejorar” generalmente significa hacer mejor una condición en relación con la misma condición

prevaleciente antes del evento mejorador. "Aliviar" generalmente significa hacer más soportable una condición en relación con la misma condición prevaleciente antes del evento aliviador. Como se usan aquí, "mejorando" o "mejorado/a" pueden referirse a una enfermedad o condición que se hace mejor por la administración de un compuesto de la invención. Como se usan aquí, "aliviando" o "aliviado/a" pueden referirse a una enfermedad o condición que se hace más soportable por la administración de un compuesto de la invención. Por ejemplo, "aliviando" el dolor incluiría reducir la severidad o cantidad de dolor.

Tal como se usan en la presente, "enfermedad" y "condición" pueden usarse indistintamente o pueden diferenciarse en cuanto a que la enfermedad o condición particular puede no tener un agente causal conocido (o sea que la etiología no ha sido completada) y por lo tanto aún no se le puede reconocer como una enfermedad sino únicamente como una condición no deseable o síndrome, en la cual un conjunto de síntomas más o menos específicos han sido identificados por profesionales clínicos.

UTILIDAD Y PRUEBAS DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el (*S*)-enantiómero de 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(*1'H*)-ona, con composiciones farmacéuticas y métodos que hacen uso del (*S*)-enantiómero de la invención y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades o condiciones que son mejoradas o aliviadas mediante la modulación, preferiblemente inhibición, de canales de sodio regulados por voltaje; preferiblemente enfermedades y condiciones relacionadas con dolor y prurito; condiciones del sistema nervioso central tales como epilepsia, síndrome de la pierna inquieta, ansiedad, depresión y enfermedad bipolar; condiciones cardiovasculares como arritmias, fibrilación atrial y fibrilación ventricular; condiciones neuromusculares tales como parálisis muscular, miotonía o tétano; neuroprotección contra ataques, trauma neural y esclerosis múltiple; y canalopatías tales como la eritromelalgia y el síndrome de dolor rectal hereditario, mediante la administración a un paciente necesitado de tal tratamiento de una cantidad efectiva de un agente bloqueador de canales de sodio regulados por voltaje, que modula, y especialmente inhibe, y que preferiblemente proviene de los enantiómeros de la invención.

En general, la presente invención provee un método para el tratamiento de un mamífero, preferiblemente un humano, que padece, o para evitar que un mamífero, preferiblemente un humano, desarrolle, una enfermedad o condición asociada con la actividad de canales de sodio regulados por voltaje, especialmente dolores, en el cual el método comprende la administración al

5 mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva del (S)-enantiómero, o de un solvato o prodroga farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se expone en el Resumen de la Invención, en el cual el (S)-enantiómero modula, preferiblemente inhibe, la actividad de uno o más canales de sodio regulados por voltaje.

La familia de proteínas de canales de sodio regulados por voltaje ha sido ampliamente

10 estudiada y como resultado ha quedado demostrada su participación en un número de funciones corporales vitales. La investigación en esta área ha identificado variantes de las subunidades alfa que resultan en cambios mayores en las funciones y actividades de canales, cambios que a la larga pueden conducir a condiciones patofisiológicas mayores. Adicionalmente, la entrada excesiva de sodio puede surgir indirectamente por vía de agentes inflamatorios o factores que

15 resulten en una hiperexcitabilidad. Implícitamente con la función, esta familia de proteínas es considerada punto de primera opción para la intervención terapéutica. Las proteínas de canales de sodio regulados por voltaje $Na_v1.1$ y $Na_v1.2$ tienen una alta expresión en el cerebro (Raymond, C.K., *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2004), 279(44):46234-41) y son vitales para el funcionamiento normal del cerebro. En humanos, las mutaciones de $Na_v1.1$ y $Na_v1.2$ dan como resultado estados

20 epilépticos y en algunos casos declinación mental y migrañas (Rhodes, T.H., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004), 101(30):11147-52; Kamiya, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2004), 24(11):2690-8; Pereira, S., *et al.*, *Neurology* (2004), 63(1):191-2; Meisler, M.H. *et al.*, *J. Physiol.* (Lond.) (en imprenta). Por tales motivos, ambos canales han sido considerados blancos validados para el tratamiento de la epilepsia (ver la Patente PCT Publicada No. WO 01/38564).

25 El $Na_v1.3$ está expresado de manera primordial en el sistema nervioso central de animales neonatos, y en niveles bajos en todo el cuerpo de adultos (Raymond, C.K., *et al.*, *op. cit.*). Se ha demostrado que luego de un daño al sistema nervioso su expresión resulta sobreexpresada en las

neuronas del cuerno dorsal de ratas (Hains, B.D., *et al.*, *J. Neurosci.* (2003), 23(26):8881-92).

Muchos expertos en el área han considerado que el $\text{Na}_v1.3$ es un blanco adecuado para terapias de dolor porque su expresión es inducida por lesiones a nervios (Lai, J., *et al.*, *Curr. Opin. Neurobiol.* (2003), (3):291-72003; Wood, J.N., *et al.*, *J. Neurobiol.* (2004), 61(1):55-71; Chung,

5 J.M., *et al.*, *Novartis Found Symp.* (2004), 261:19-27; discussion 27-31, 47-54; Priest, B.T., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* (2009) 12:682-693).

La expresión del $\text{Na}_v1.4$ está esencialmente limitada a los músculos (Raymond, C.K., *et al.*, *op. cit.*). Las mutaciones de este gene han demostrado tener efectos profundos en la función muscular, incluyendo parálisis (Tamaoka A., *Intern. Med.* (2003), (9):769-70). Por ello este
10 canal es considerado un blanco para el tratamiento de parálisis periódica, miotonía, contractibilidad muscular anormal, espasmos o parálisis.

El canal cardíaco de sodio regulado por voltaje, $\text{Na}_v1.5$, se expresa principalmente en los miocitos cardíacos (Raymond, C.K., *et al.*, *op. cit.*), y se encuentra en las aurículas, ventrículos, el nodo sinoauricular, el nodo auriculoventricular y las células de Purkinge. El rápido golpe hacia
15 arriba de la acción cardíaca y la conducción rápida del impulso a través del tejido cardíaco se deben a la apertura de $\text{Na}_v1.5$. Como tal, $\text{Na}_v1.5$ está ligado a las arritmias cardíacas. Las mutaciones del $\text{Na}_v1.5$ humano resultan en múltiples síndromes arrítmicos, incluyendo, por ejemplo, QT3 largo (LQT3, *en inglés*), el síndrome de Brugada (BS, *en inglés*), un defecto hereditario en la conducción cardíaca, el síndrome de muerte nocturna repentina inesperada
20 (SUNDS, *en inglés*) el síndrome de muerte infantil repentina (SIDS, *en inglés*) (Liu, H. *et al.*, *Am. J. Pharmacogenomics* (2003), 3(3):173-9; Ruan, Y *et al.*, *Nat. Rev. Cardiol.* (2009) 6: 337-48). La terapia bloqueadora de canales de sodio regulados por voltaje ha sido usada extensamente en el tratamiento de arritmias cardíacas. La primera droga antiarrítmica, la quinidina, descubierta en 1914, está clasificada como una bloqueadora de canales de sodio.

25 El $\text{Na}_v1.6$ codifica un canal de sodio regulado por voltaje, abundante, ampliamente distribuido en los sistemas nerviosos central y periférico, agrupado en los nodos de Ranvier de los axones neurales (Caldwell, J.H., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), 97(10): 5616-20).

Como resultado de mutaciones que llevan a la pérdida de funciones en ratones, se han detectado ataxia y convulsiones (Papale, L.A. *et al.*, *Human Mol. Genetics* (2009) 18, 1633-1641). Aunque no se han detectado mutaciones en humanos, se cree que el Na_v1.6 juega un papel en la manifestación de síntomas asociados con la esclerosis múltiple y por ello se le ha considerado un blanco para el tratamiento de esta enfermedad (Craner, M.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004), 101(21):8168-73).

El Na_v1.7 está expresado principalmente en el sistema nervioso periférico, tanto en neuronas sensoriales como simpáticas (Raymond, C.K., *et al.*, *op. cit.*). Las mutaciones que llevan a la pérdida de funciones en humanos causan indiferencia congénita al dolor (CIP, *en inglés*) sin discapacitar las funciones cognitiva o motora (Cox, J.J. *et al.*, *Nature* (2006) 444 (7121), 894-8; Goldberg, Y.P. *et al.*, *Clin. Genet.* (2007) 71 (4), 311-9). Los individuos con CIP no experimentan dolor inflamatorio o neuropático, lo cual sugiere que el bloque selectivo del Na_v1.7 eliminaría múltiples formas de dolor crónico y agudo sin un efecto dañino sobre los sistemas nerviosos central o periférico, o sobre un músculo. Más aún, el polimorfismo de un solo nucleótido (R1150W), que tiene efectos muy sutiles sobre la dependencia del tiempo y el voltaje de la acción portera del Na_v1.7, tiene grandes efectos sobre la percepción del dolor (Reimann, F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2010), 107 (11), 5148-53). Cerca del 10% de pacientes con una variedad de condiciones de dolor son heterocigóticos por el alelo que confiere mayor sensibilidad al dolor. La participación del Na_v1.7 en mediar en las respuestas al dolor también queda evidenciada por un aumento de mutaciones que resulta en eritromelalgia o en el desorden de dolor paroxístico extremo (Dib-Hajj S.D. *et al.*, *Adv. Genet.* (2009) 63: 85-110). Aunque el Na_v1.7 está expresado principalmente en el sistema nervioso periférico, una mutación puntual del Na_v1.7 causa ataques febriles, indicando esto que este canal juega un papel en el sistema nervioso central (CNS, *en inglés*). Así, los bloqueadores de canales de sodio regulados por voltaje pueden resultar útiles como agentes anticonvulsivos.

La expresión del Na_v1.8 es predominante en los ganglios de la raíz dorsal (DRG, *en inglés*) (Raymond, C.K., *et al.*, *op. cit.*). La elevación del potencial de acción de las neuronas

sensoriales de los DRG es transportada principalmente por corriente a través del $\text{Na}_v1.8$, de manera que el bloqueo de esta corriente posiblemente bloqueará las respuestas de dolor (Blair, NT and Bean, BP, *J. Neurosci.* 22: 10277-90). Consistentemente con este hallazgo, la desactivación (*knock-down*) del $\text{Na}_v1.8$ en ratas se ha logrado utilizando ADN antisentido (*antisense*) o pequeños ARN interferentes, obteniéndose la reversión virtualmente completa del dolor neuropático en modelos de dolor por ligación y constricción crónica del nervio espinal. Se ha reportado un bloqueador selectivo del $\text{Na}_v1.8$ y es efectivo en el bloqueo tanto del dolor neuropático como el inflamatorio (Jarvis, M.F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007), 104 (20), 8520-5). La Patente PCT Publicada No. WO03/037274A2 describe pirasolamidas y sulfonamidas para el tratamiento de condiciones del sistema nervioso central o periférico, particularmente dolor y dolor crónico, mediante el bloqueo de canales de sodio asociados con la aparición (*onset*) o recurrencia de las condiciones indicadas. La Patente PCT Publicada No. WO03/037890A2 describe piperidinas para el tratamiento de condiciones del sistema nervioso central o periférico, particularmente dolor y dolor crónico, mediante el bloqueo de canales de sodio asociados con la aparición (*onset*) o recurrencia de las condiciones indicadas. Los compuestos, composiciones y métodos de estas invenciones son de uso particular para el tratamiento del dolor neuropático o inflamatorio mediante la inhibición del flujo de iones a través de un canal que incluye una subunidad PN3 ($\text{Na}_v1.8$).

El canal de sodio regulado por voltaje $\text{Na}_v1.9$ del sistema nervioso periférico, divulgado en Dib-Hajj, S.D., *et al.* (see Dib-Hajj, S.D., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), 95(15):8963-8), se expresa en los ganglios de la raíz dorsal. Se ha demostrado que el $\text{Na}_v1.9$ subyace la despolarización y excitación activadas por neurotropina (BDNF). El patrón limitado de expresión de este canal lo ha convertido en un candidato a blanco para el tratamiento del dolor (Lai, J, *et al.*, *op. cit.*; Wood, J.N., *et al.*, *op. cit.*; Chung, J.M. *et al.*, *op. cit.*).

NaX es un canal de sodio putativo para el cual aún no se ha demostrado que sea regulado por voltaje. Adicional a su expresión en pulmones, corazón, ganglios de la raíz dorsal y células Schwann del sistema nervioso periférico, el NaX se encuentra en neuronas y células endodiales

25

(ependymal) en áreas restringidas del CNS, particularmente en los órganos circunventriculares, los cuales participan en la homeostasis de fluidos corporales (Watanabe, E., *et al.*, *J. Neurosci.* (2000), 20(20):7743-51). Ratones sin NaX (*NaX-null*) mostraron entradas anormales de salina hipertónica en condiciones tanto de poca agua como poca sal. Estos hallazgos sugieren que el NaX juega un papel importante en la detección (*sensing*) central del nivel de sodio en los fluidos corporales y de la regulación de la conducta de absorción de sal. Su patrón de expresión y función lo sugieren como un blanco para el tratamiento de la fibrosis quística y otras dolencias relacionadas con la regulación de sales.

Estudios con tetrodoxina (TTX, *en inglés*), un bloqueador de canales de sodio regulados por voltaje usado para reducir la actividad neuronal en ciertas regiones del cerebro, apuntan a su potencial uso en el tratamiento de la adicción. Los estímulos apareados con drogas suscitan ansias y recaídas en ratas adictas y conductas de búsqueda de drogas en ratas. La integridad funcional de la amígdala bajolateral (*basolateral amygdala* -BLA, *en inglés*) es necesaria para poder restituir la conducta de búsqueda de cocaína suscitada por estímulos condicionados con cocaína, pero no por la cocaína misma. La BLA juega un papel similar en la restitución de conductas de búsqueda de heroína. La TTX indujo desactivación de la BLA en la restitución condicionada y preparada con heroína de una conducta extinguida de búsqueda de heroína en un modelo de ratas Fuchs, R.A. and See, R.E., *Psychopharmacology* (2002) 160(4):425-33).

Un subconjunto de fibras C median las respuestas a agentes pruritogénicos, especialmente picazones por histaminas, activadores de los receptores PAR-2, colestasis e infecciones virales (Steinhoff, M. *et al.*, *J. Neurosci.* 23:6176-80; Twycross, R. *et al.*, *Q. J. Med.* 96: 7-26). Canales de sodio regulados por voltaje se expresan en y median en los impulsos de nervios de fibra-C (*C-fiber*).

El valor general del (*S*)-enantiómero de la invención por modular, especialmente inhibir, el flujo iónico por canales de sodio regulados por voltaje puede determinarse a partir de los ensayos descritos más adelante en la sección de Ensayos Biológicos. Alternativamente, el valor general del (*S*)-enantiómero de la invención para el tratamiento de condiciones y enfermedades se

puede establecer mediante modelos con animales que son estándar en la industria para demostrar la eficacia de compuestos de tratamiento del dolor. Se han desarrollado modelos con animales de las condiciones neuropáticas de dolor en humanos que resultan en déficits sensoriales reproducibles (alodinia, hiperalgesia, y dolor espontáneo) sobre un período sostenido de tiempo que pueden ser evaluados mediante pruebas sensoriales. Estableciendo los niveles de alodinia e hiperalgesia presentes, inducidos mecánica o químicamente y por temperatura, se pueden modelar varias condiciones fisiopatológicas observadas en humanos permitiendo esto la evaluación de fármacoterapias.

En modelos de lesiones de nervios periféricos en ratas, la actividad ectópica en el nervio lesionado se correlaciona con los signos conductuales del dolor. En estos modelos, la aplicación del (S)-enantiómero de la invención y lidocaina anestésica local en concentraciones que no afectan la conducta general y ni la función motora pueden suprimir la actividad ectópica y revertir la alodinia táctil (Mao, J. and Chen, L.L, *Pain* (2000), 87:7-17). La escalación alimétrica de las dosis efectivas en estos modelos con ratas se traduce en dosis similares a aquellas que han demostrado ser eficaces en humanos (Tanelian, D.L. and Brose, W.G., *Anesthesiology* (1991), 74(5):949-951). Más aún, el Lidoderm®, lidocaina aplicada en la forma de un parche dérmico, es un tratamiento aprobado por la FDA de la neuralgia post-herpética (Devers, A. and Glaser, B.S., *Clin. J. Pain* (2000), 16(3):205-8).

Los bloqueadores de canales de sodio regulados por voltaje tienen usos clínicos adicionales al dolor. Evidencia reciente a partir de modelos con animales sugiere que los bloqueadores canales de sodio regulados por voltaje también pueden ser útiles para la neuroprotección bajo condiciones isquémicas causadas por ataques o trauma neural, y en pacientes con esclerosis múltiple (MS) (Clare, J.J. *et al.*, *op. cit.* and Anger, T. *et al.*, *op. cit.*).

El (S)-enantiómero de la invención modula, preferiblemente inhibe, el flujo iónico a través de un canal de sodio regulado por voltaje en un mamífero, especialmente en un humano. A cualquier modulación, sea inhibición parcial o completa, o prevención de flujo iónico, se le refiere aquí como “bloqueo” y a los compuestos correspondientes como “bloqueadores” o

“inhibidores”. En general, el compuesto de la invención modula la actividad de un canal de sodio regulado por voltaje hacia abajo, inhibe la actividad dependiente del voltaje del canal de sodio regulado por voltaje, y/o reduce o previene el flujo iónico de sodio a través de una membrana celular previniendo la actividad del canal de sodio regulado por voltaje como puede ser el flujo iónico.

El (S)-enantiómero de la invención es un bloqueador de canales de sodio y por lo tanto es útil en el tratamiento de enfermedades y condiciones en mamíferos, preferiblemente en humanos, y otros organismos, incluyendo todas aquellas enfermedades y condiciones que son el resultado de la actividad aberrante de canales de sodio regulados por voltaje o que puedan ser mejoradas o aliviadas mediante la modulación, preferiblemente la inhibición, de la actividad biológica de canales de sodio regulados por voltaje.

Tal como se define en la presente memoria, una enfermedad o condición que es mejorada o aliviada mediante la modulación, preferiblemente inhibición, de un canal de sodio regulado por voltaje, se refiere a una enfermedad o condición que es mejorada o aliviada mediante la modulación, preferiblemente inhibición, del canal de sodio regulado por voltaje, e incluye, pero no se limita a ello, dolor y prurito; condiciones del sistema nervioso central tales como epilepsia, ansiedad, depresión (Morinville *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 504:680-689 (2007)) y la enfermedad bipolar (Ettinger and Argoff, *Neurotherapeutics*, 4:75-83 (2007)); condiciones cardiovasculares tales como arritmias, fibrilación auricular y fibrilación ventricular, condiciones neuromusculares tales como el síndrome de la pierna inquieta y parálisis muscular o tétano; neuroprotección contra ataques, trauma neural y esclerosis múltiple; y canalopatías tales como eritromelalgia y el síndrome de dolor rectal hereditario.

Enfermedades y condiciones adicionales incluyen el dolor asociado con HIV, neuropatías inducidas por el tratamiento de HIV, neuralgia trigeminal, neuralgia glossofaríngea, neuropatía secundaria a la infiltración metastásica, adiposis dolorosa, lesiones talámicas, hipertensión, enfermedad autoinmune, asma, adicción a drogas (p.ej., opiatos, benzodiazepina, anfetamina, cocaína, alcohol, inhalación de butano), enfermedad de Alzheimer (Kim DY, Carey *et al.*, *Nat.*

Cell Biol. 9(7):755-764 (2007)), demencia, discapacidad de la memoria relacionada con la edad, síndrome de Korsakoff, restenosis, disfunción urinaria, incontinencia, Mal de Parkinson (Do and Bean, *Neuron* 39:109-120 (2003); Puopolo *et al.*, *J. Neurosci.* 27:645-656 (2007)), isquemia cerebrovascular, neurosis, enfermedad gastrointestinal, anemia falciforme (*sickle cell anemia* o *sickle cell disease*), rechazo de trasplantes, fallas cardíacas, infartos del miocardio, lesiones por reperfusión (*reperfusion*), claudicación intermitente, angina, convulsiones, desórdenes respiratorios, isquemias cerebrales o del miocardio, síndrome del QT largo (*long-QT syndrome*), taquicardia ventricular catecolaminérgica polimorfa, enfermedades oftálmicas, espasticidad, paraplegia espástica, miopatías, miastenia gravis, paramiotonía congénita, parálisis hipercalemica periódica, parálisis hipocalémica periódica, alopecia, desórdenes de ansiedad, desórdenes psicóticos, manías, paranoia, desorden afectivo estacional, desorden del pánico, desorden obsesivo-compulsivo (OCD, *en inglés*), fobias, autismo, Síndrome de Aspergers, síndrome de Retts, desorden desintegrativo, desorden de déficit de atención, agresividad, desórdenes de control de impulsos, trombosis, preeclampsia, fallo por congestión cardíaca, paro cardíaco, ataxia de Friedreich, ataxia espinocerebral, temblor, debilidad muscular, mielopatía, radiculopatía, lupus eritematoso sistémico, enfermedad granulomatosa, atrofia olivo-ponto-cerebral, ataxia espinocerebral, ataxia episódica, mioquimia, atrofia palidal progresiva, parálisis supranuclear progresiva y espasticidad, daño cerebral traumático, edema cerebral, daño hidrocefálico, daño de la espina dorsal, anorexia nervosa, bulimia, síndrome de Prader-Willi, obesidad, neuritis óptica, cataratas, hemorragia retinal, retinopatía isquémica, retinitis pigmentosa, glaucoma agudo y crónico, degeneración macular, oclusión arterial retinal, Corea, enfermedad de Huntington, Corea de Huntington, edema cerebral, proctitis, neuralgia post-herpética, eudinia, sensibilidad al calor, sarcoidosis, síndrome de colon irritable, síndrome de Tourette, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Brugada, síndrome de Liddle, enfermedad de Crohns, esclerosis múltiple y el dolor asociado con la esclerosis múltiple (MS, *en inglés*), esclerosis amiotrófica lateral (ALS, *en inglés*), esclerosis diseminada, neuropatía diabética, neuropatía periférica, síndrome dental de Charcot Marie, artritis, artritis reumatoidea, osteoartritis, condrocalcinosis, distonía paroxísmica, síndromes de miastenia, miotonía, distrofia miotónica, distrofia muscular, hipertermia maligna,

fibrosis cística, pseudoaldosteronismo, rabdomiolisis, discapacidad mental, depresión bipolar, ansiedad, esquizofrenia, enfermedades relacionadas con toxinas en canales de sodio, eritromelalgia hereditaria, eritromelalgia primaria, dolor rectal, cancer, epilepsia, ataques tónicos parciales y generales, ataques febriles, ataques de ausencia (*petit mal*), ataques mioclónicos, ataques clónicos, síndrome Lennox Gastaut, West (espasmos infantiles), síndrome de seno enfermo (Haufe V, Chamberland C, Dumaine R, *J. Mol. Cell Cardiol.* 42(3):469-477 (2007)), ataques multiresistentes, ataques profilácticos (anti-epileptogénicos), síndrome hereditario de la fiebre mediterránea, gota, síndrome de la pierna inquieta, arritmias, fibromialgia, neuroprotección bajo condiciones isquémicas causadas por ataque o trauma neural, taquiarritmias, fibrilación auricular y fibrilación ventricular, y como un anestésico general o local.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “dolor” se refiere a todas las categorías de dolor, sin importar su naturaleza u origen, y se entiende que incluye, pero no se limita a, dolor neuropático, dolor inflamatorio, dolor nociceptivo, dolor idiopático, dolor neurálgico, dolor orofacial, dolor por quemaduras, dolor crónico de huesos, dolor de la espalda baja, dolor de cuello, dolor abdominal, síndrome de la boca ardiente, dolor somático, dolor visceral (incluyendo el abdominal), dolor miofacial, dolor dental, dolor por cáncer, dolor por quimioterapia, síndrome de dolor miofascial, síndrome complejo de dolor regional (CRPS, *en inglés*), dolor de la articulación tempomandibular, dolor por trauma, Desorden del Dolor Paroxístico Extremo, dolor quirúrgico, dolor post-quirúrgico, dolor de parto, dolor de trabajo de parto, distrofia refleja simpática, avulsión del plexo braquial, vejiga neurogénica, dolor agudo, dolor musculoesquelético, dolor post-operatorio, dolor crónico, dolor persistente, dolor mediado periféricamente, dolor mediado centralmente, cefalea crónica, cefalea por tensión, cefalea en racimos o dolor facial vasogénico (*cluster headache*), cefalea por migraña, migraña hemipléjica hereditaria, condiciones asociadas con dolor cefálico, cefalea sinusal, dolor fantasma de extremidad, daño nervioso periférico, dolor posterior a un ataque, lesiones del tálamo, radiculopatía, dolor por HIV, dolor post-herpético, dolor no cardíaco de pecho, síndrome de colon irritable y dolor asociado con desórdenes intestinales y dispepsia, y combinaciones de los mismos.

La presente invención también se relaciona con compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos para usar compuestos y composiciones farmacéuticas en el tratamiento o prevención de enfermedades o condiciones tales como la hiperplasia prostática benigna (BPH, *en inglés*), hipercolesterolemia, cáncer y prurito (picazón).

5 La hiperplasia prostática benigna (BPH), también conocida como hipertrofia prostática benigna, es una de las enfermedades más comunes que afectan a los hombres de edad avanzada. La BPH es una condición progresiva caracterizada por un engrandecimiento nodular del tejido prostático que resulta en la obstrucción de la uretra. Consecuencias de la BPH pueden incluir hipertrofia del músculo suave de la vejiga, una vejiga descompensada, retención aguda de orina y
10 un incremento en la incidencia de infecciones del tracto urinario.

La BPH tiene un alto impacto en salud pública y es una de las razones más comunes de intervención quirúrgica en hombres mayores. Se han hecho intentos de aclarar la etiología y patogénesis, y a tal fin se han desarrollado modelos experimentales. Modelos espontáneos de animales se imitan al chimpancé y al perro. La BPH en el hombre y en el perro comparten
15 muchas características comunes. En ambas especies el desarrollo de la BHP ocurre espontáneamente con la edad avanzada y puede evitarse con la castración temprana/prepuberal. Una alternativa médica a la cirugía resulta muy deseable para el tratamiento de la BPH y sus consecuencias.

La hiperplasia epitelial prostática, tanto en el hombre como en el perro, es sensible a los
20 andrógenos: sufre una involución ante la privación de andrógeno y reasume la hiperplasia epitelial cuando el andrógeno es repuesto. Se ha demostrado que las células procedentes de la glándula prostática expresan altos niveles de canales de sodio regulados por voltaje. Estudios de inmunomarcaje (*immunostaining*) demostraron claramente evidencia de canales de sodio regulados por voltaje en tejidos prostáticos (*Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005; 8(3):266-73).
25 La inhibición con tetrodotoxina (*tetrodotoxin*), un bloqueador selectivo, de la función de los canales de sodio regulados por voltaje, inhibe la migración de células derivadas de la próstata y cánceres de mama (Brackenbury, W.J. and Djamgoz, M.B.A., *J. Physiol.* (Lond) (2006) 573:

343-56; Chioni, A-M. *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2009) 41: 1216-1227).

La hipercolesterolemia, es decir, valor alto de colesterol en sangre, es un factor de riesgo establecido en el desarrollo de, p.ej., aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, hiperlipidemia, ataques, hiperinsulinemias, hipertensión, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares (CVD, *en inglés*), isquemia miocárdial, y ataques al corazón. Así, rebajando los niveles totales de colesterol en suero en individuos con altos niveles de colesterol se sabe que se pueden reducir los riesgos de estas enfermedades. Particularmente, la reducción del colesterol de baja densidad de lipoproteínas es un paso esencial en la prevención de la CVD. A pesar de que hay una variedad de terapias contra de la hipercolesterolemia, hay una necesidad y búsqueda continuas de terapias alternativas en este campo del arte.

La invención provee compuestos que son útiles como agentes antihipercolesterolemia y sus condiciones relacionadas. Los compuestos presentes pueden actuar de varias maneras. Aunque no se desea que estén ligados a ningún mecanismo de acción en particular, los compuestos pueden ser inhibidores directos o indirectos de la enzima acil CoA: transferasa acil colesterol (ACAT, *en inglés*) que resulta en la inhibición de la esterificación y el transporte de colesterol a través de la pared intestinal. Otra posibilidad es que los compuestos de la invención pueden ser inhibidores directos o indirectos de la biosíntesis del colesterol en el hígado. Es posible que algunos compuestos de la invención actúen como inhibidores directos e indirectos de la ACAT y la biosíntesis del colesterol.

El prurito, comunmente conocido como picazón, es una condición dermatológica común. Existen dos categorías amplias de picazón basadas en sus etiologías: picazón inflamatoria de la piel y picazón neuropática (Binder *et al.*, *Nature Clinical Practice*, 4:329-337, 2008). En el primer caso, los mediadores inflamatorios activan pruriceptores cutáneos, que son un subconjunto de fibras nerviosas dérmicas aferentes, primordialmente fibras C sin mielina. El tratamiento de este tipo de picazón consiste ya sea en bloquear los receptores de los agentes inflamatorios (tales como antihistaminas) o bloquear la actividad eléctrica subsiguiente. Los canales de sodio regulados por voltaje tienen un papel central en la transmisión de actividad eléctrica en neuronas

y la modulación de canales de sodio regulados por voltaje es un medio de modulación bastante conocido para este tipo de comunicación. Aunque las causas del prurito neuropático son complejas y menos entendidas, hay evidencia bien establecida, por las fibras C sensoras neuronales de la dermis, de la existencia de sensibilidad central e hipersensibilidad al influjo. En cuanto al prurito inflamatorio, los canales de sodio parecen ser esenciales para la propagación de señales eléctricas de la piel al sistema nervioso central (CNS). La transmisión de los impulsos de picazón produce la incómoda sensación que genera el deseo o el reflejo de rascarse.

Tanto la picazón inflamatoria como la neuropática pueden ser bloqueadas por conocidos bloqueadores de canales de sodio regulados por voltaje, siendo la lidocaina el más común (Villamil *et al.*, *American Journal of Medicine* 118:1160-1163, 2005; Inan *et al.*, *European Journal of Pharmacology* 616: 141-146, 2009; Fishman *et al.*, *American Journal of Medicine* 102: 584-585, 1997; Ross *et al.*, *Neuron* 65: 886-898, 2010). Las dosis de lidocaina necesarias para aliviar la picazón son comparables con aquellas efectivas en el tratamiento del dolor. Ambos circuitos sensoriales comparten mediadores comunes y trayectorias neuronales relacionadas (Ikoma *et al.*, *Nature Reviews Neuroscience*, 7:535-547, 2006). Sin embargo, otros tratamientos para el dolor son inefectivos contra la picazón y pueden exacerbar el prurito en lugar de aliviarlo. Por ejemplo, los opioides en particular, son efectivos en aliviar el dolor pero pueden generar prurito severo. Así, el bloqueo de canales de sodio regulados por voltaje es una terapia particularmente prometedora tanto para el dolor como para el prurito.

Se ha comprobado que compuestos de la presente invención tienen efectos analgésicos en un número de modelos animales, en dosis que van desde 1mg/Kg a 100 mg/Kg. Los compuestos de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de la picazón.

Los tipos de picazón o irritación de la piel incluyen, pero no se limitan a:

- a) prurito psoriático, picazón debida a la hemodiálisis, prurito "acuagénico" (*aguagenic*)¹, y picazón debida a desórdenes de la piel (p.ej., dermatitis por contacto), desórdenes sistémicos, neuropatía, factores psicogénicos o una mezcla de los

anteriores;

- b) picazón producida por reacciones alérgicas, picadas de insectos, hipersensibilidad (p.ej., piel seca, acné, eczema, psoriasis), condiciones inflamatorias o lesiones;
- c) picazón asociada con la vestibulitis vulvar;
- 5 d) irritación de la piel o efecto inflamatorio por la administración de otro terapéutico como pueden ser, por ejemplo, antibióticos, antivirales y antihistamínicos; y
- e) la picazón debida a la activación de los receptores acoplados de la G-proteína PAR-2.

El (S)-enantiómero de la invención modula, preferiblemente inhibe, el flujo iónico a
10 través de un canal de sodio dependiente de voltaje. Preferiblemente, el (S)-enantiómero de la invención es un modificador dependiente del estado o de la frecuencia de los canales de sodio regulados por voltaje, con una afinidad baja por el estado limitado/cerrado y una alta afinidad por el estado desactivado. Aunque no es la intención estar ligado a ningún mecanismo de acción en particular, el (S)-enantiómero de la invención probablemente interactuará con los sitios
15 sobrepuestos localizados en la cavidad interna del poro conductor de sodio del canal, de manera similar a lo descrito para otros bloqueadores de canales de sodio dependientes de estado (Cestèle, S., *et al.*, *op. cit.*). El (S)-enantiómero de la invención probablemente también interactuará con sitios externos a la cavidad interna y tenga efectos alostéricos sobre la conducción de iones de sodio a través del poro del canal.

20 En una presentación preferida de la invención, el (S)-enantiómero de la invención modula, preferiblemente inhibe, la actividad de $Na_v1.7$. En otra presentación preferida de la invención, el (S)-enantiómero de la invención modula selectivamente, preferiblemente inhibe, la actividad de $Na_v1.7$ en comparación con la modulación o inhibición de otros canales de sodio regulados por voltaje (*i.e.*, $Na_v1.1$ al $Na_v1.6$ y $Na_v1.8$ al $Na_v1.9$). Debido a que la mayoría de los otros canales
25 de sodio están implicados en otros procesos fisiológicos importantes, tales como la contracción y

¹ Nota del intérprete: no se encontró el término "aguagenic" en ningún diccionario consultado.

ritmicidad del corazón ($Na_v1.5$), la contracción del músculo esquelético ($Na_v1.4$), y la conducción de actividad eléctrica en el CNS y neuronas motoras ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$ y $Na_v1.6$), resulta deseable que el (*S*)-enantiómero de la invención evite la modulación significativa de estos otros canales de sodio.

5 Cualquiera de estas consecuencias puede eventualmente ser la responsable por el beneficio general proveído por el (*S*)-enantiómero de la invención.

Típicamente un agente terapéutico exitoso de la invención cumplirá con alguno o todos los siguientes criterios. La disponibilidad oral debe estar en 20% o más. La eficacia en un modelo animal es menor de alrededor de 0,1 μ g a unos 100 mg/Kg de peso corporal y la dosis humana
10 apuntada está entre 0,1 μ g a unos 100 mg/Kg de peso corporal, aunque dosis fuera de este rango pueden ser aceptables ("mg/Kg" significa miligramos del compuesto por kilogramo de masa corporal del sujeto a quien se le está administrando). El índice terapéutico (o relación dosis tóxica a dosis terapéutica) debe ser mayor de 100. La potencia (expresada por el valor de IC_{50}) debe ser menor
15 10 μ M, preferiblemente menos de 1 μ M, y más preferiblemente menor de 50 nM. El IC_{50} ("Concentración Inhibidora - 50%) es una medida de la cantidad del (*S*)-enantiómero de la invención requerida para alcanzar un 50% de inhibición del flujo de iones a través de un canal de sodio, en un período de tiempo específico, en un ensayo de la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con la inhibición de la actividad de $Na_v1.1$,
20 $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, o $Na_v1.9$ en una muestra biológica o en un mamífero, preferiblemente un humano, método que comprende administrar a un mamífero o contactar una muestra biológica con el (*S*)-enantiómero de la invención o con una composición que comprenda el (*S*)-enantiómero de la invención. El término "muestra biológica", tal como aquí se usa, incluye, sin limitaciones, cultivos de células o extractos de los mismos; material de
25 biopsias obtenido de mamíferos o extractos de los mismos; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lagrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

Adicionalmente a los usos precedentes del (*S*)-enantiómero de la invención, el compuesto

también puede ser útil en la modulación, preferiblemente inhibición, de la actividad de canales de sodio regulados por voltaje en una muestra biológica, con diferentes propósitos conocidos para un diestro en el arte. Ejemplos de tales propósitos incluyen, sin intención de ser limitantes, el estudio de canales de iones de sodio regulados por voltaje en fenómenos biológicos y patológicos; y la evaluación comparativa de moduladores nuevos u otros moduladores de canales de iones de sodio regulados por voltaje.

El (S)-enantiómero de la invención también puede usarse para tratar mamíferos no humanos (*p.ej.*, métodos de tratamiento veterinario) por enfermedades o condiciones que son mejoradas o aliviadas mediante la modulación, preferiblemente inhibición, de canales de sodio regulados por voltaje, particularmente para el tratamiento de inflamaciones y dolor. Tal tratamiento se entiende que es de particular interés para mamíferos de compañía, tales como perros y gatos.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LA INVENCION Y

SU ADMINISTRACIÓN

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que contienen el (S)-enantiómero de la invención. En una presentación, la presente invención se relaciona con una composición del (S)-enantiómero de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y en una cantidad efectiva para modular, preferiblemente inhibir, el flujo de iones a través de un canal de sodio regulado por voltaje, para tratar enfermedades, tales como el dolor, cuando es administrada a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un paciente humano.

La administración del (S)-enantiómero de la invención, en forma pura o en una composición farmacéutica adecuada, puede realizarse por vía de cualquiera de las formas aceptadas de administración de agentes que sirven utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse combinando un compuesto de la invención con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente adecuados y aceptables, y pueden formularse en preparaciones sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como tabletas,

cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores, microesferas y aerosoles. Rutas típicas para administrar tales composiciones farmacéuticas, incluyen, sin limitantes, oral, tópica, transdérmica, inhaladas, parenteral, sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral como aquí se usa incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraesternón (*intrasternal*), y técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan para permitir que los ingredientes activos contenidos en ellas estén biodisponibles al administrarse la composición al paciente. Las composiciones que serán administradas a un sujeto o paciente, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano, toman la forma de una o más unidades de dosis, en las cuales una tableta, por ejemplo, puede ser una dosis única, y un envase de un compuesto de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosis. Los métodos reales de preparar tales formas de dosificación son conocidos, o resultarán evidentes, a aquellos diestros en el arte; por ejemplo, véase *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición a ser administrada, en todo caso, contendrá una cantidad efectivamente terapéutica de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o condición de interés según las enseñanzas de esta invención.

Las composiciones farmacéuticas útiles referidas en la presente también contienen un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induzca por su cuenta la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la composición, y el cual pueda ser administrado sin toxicidad indebida. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitantes, líquidos, como agua, solución salina, glicerol, etanol, y similares. Una discusión exhaustiva de portadores, diluentes y otros excipientes se presenta en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J., edición actual).

Una composición farmacéutica de la invención puede ser en forma de un sólido o líquido. En un aspecto, el portador/los portadores es/son particulados, de manera que las composiciones

son, por ejemplo, en forma de tabletas o polvo. El portador/los portadores pueden ser líquidos, con las composiciones, por ejemplo, en forma de jarabe oral, líquido inyectable o un aerosol, el cual es útil en, por ejemplo, la administración inhalada.

Cuando sea para administración oral, la composición farmacéutica es preferiblemente en forma sólida o líquida, donde semi-sólido, semi-líquido, suspensión y gel son formas incluidas dentro de las formas que en la presente se consideran sólidas o líquidas.

Como composición sólida para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en polvo, gránulos, tabletas comprimidas, pastillas, cápsulas, goma de mascar, galletas o formas similares. Tal composición sólida contendrá, típicamente, uno o más diluentes inertes o portadores comestibles. Adicionalmente, uno o más de los siguientes pueden estar presentes: aglutinantes como la carboximetilcelulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, goma *tragacanth* o gelatina; excipientes como almidón, lactosa o dextrinas; agentes desintegrantes como el ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes como la sacarosa o sacarina; un agente saborizante como la yerbabuena, salicilato de metilo o sabor a naranja; y un agente colorante.

Cuando la composición farmacéutica está en forma de cápsula, por ejemplo una cápsula de gelatina, puede contener, adicionalmente a los materiales de los tipos antes descritos, un portador líquido como el polietilén glicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para aplicación inyectada, por citar dos ejemplos. Cuando el objetivo sea administración oral, las composiciones preferidas contienen, adicionalmente al (S)-enantiómero de la invención, uno o más de un agente edulcorante, preservantes, tinte/colorante y un mejorador de sabor. En una composición para ser inyectada, puede incluirse uno o más de un surfactante, preservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón químico (*buffer*), estabilizador y un agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, sean soluciones, suspensiones

o formas similares, pueden incluir uno o más de los siguientes coadyuvantes: diluentes estériles como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos como mono y diglicéridos sintéticos, que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros
5 solventes; agentes antibacteriales como el alcohol bencílico o metil paraben; antioxidantes como el ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetracético; tampones químicos (*buffers*) como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para ajustar la tonicidad como el cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede contenerse en ampollas, jeringas desechables o ampollas de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico. Un coadyuvante
10 preferido es la solución salina fisiológica. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida de la invención prevista para ser administrada por vía parenteral u oral debe contener una cantidad del (S)-enantiómero de la invención tal que se obtenga una dosis adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos 0,01% del (S)-enantiómero
15 de la invención en la composición. Cuando esté prevista para administración oral, esta cantidad puede variar entre 0,1 y 70% en peso de la composición. Las composiciones farmacéuticas orales preferidas contienen entre 4% y cerca del 50% del (S)-enantiómero de la invención. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas preferidas de acuerdo a la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosis parenteral contenga entre 0,01 a 10% en peso del
20 (S)-enantiómero de la invención antes de la dilución.

La composición farmacéutica de la invención puede estar prevista para administración tópica, en cuyo caso el portador puede comprender una base de solución, emulsión, ungüento o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: petrolato, lanolina, polietilenglicol, cera de abejas, aceite mineral, diluentes como agua y alcohol, emulsificantes y
25 estabilizadores. Los agentes espesantes pueden estar presentes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si es para administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden

contener una concentración del (S)-enantiómero de la invención entre 0,1 a unos 10% en peso por volumen.

5 Para aplicaciones tópicas se prefiere administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica preparada según la invención para atacar un área, *p.ej.*, superficies de la piel, membranas mucosas y similares, que estén adyacentes a neuronas periféricas que vayan a ser tratadas. Esta cantidad generalmente estará entre unos 0,0001 mg hasta aproximadamente 1 g del (S)-enantiómero de la invención por aplicación, dependiendo del área a ser tratada, de si el uso es diagnóstico, profiláctico o terapéutico, la severidad de los síntomas, y la naturaleza del vehículo tópico utilizado. Una preparación tópica preferida es el ungüento, en el cual se utiliza 10 entre 0,001 hasta unos 50 mg de ingrediente activo por cc de ungüento base. La composición farmacéutica puede ser formulada como composiciones transdérmicas o dispositivos de entrega transdérmica ("parches"). Tales composiciones incluyen, por ejemplo, un respaldo, un contenedor del principio activo, una membrana de control, un revestimiento y adhesivo de contacto. Estos parches transdérmicos pueden usarse para proveer pulsos continuos, o para 15 entregar contra demanda los compuestos de la presente invención, según se desee.

La composición farmacéutica de la invención puede estar prevista para administración rectal en la forma, por ejemplo, de un supositorio, el cual se derretirá en el recto, liberando la droga. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente adecuado no irritante. Tales bases incluyen, sin ser limitante la enumeración, lanolina, 20 mantequilla de cacao y polietilen glicol.

Una formulación típica para la administración intramuscular o intraespinal (*intrathecal*) consistirá de una suspensión o solución de un ingrediente activo en un aceite, por ejemplo aceite de *arachis* o aceite de ajonjolí. Una formulación típica para administración intravenosa o intraespinal consistirá de una solución acuosa estéril isotónica contentiva de, por ejemplo, un 25 ingrediente activo y dextrosa o cloruro de sodio, o una mezcla de dextrosa y cloruro de sodio.

Las composiciones de la invención pueden ser formuladas para proveer liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo, es decir el

(S)-enantiómero de la invención, después de ser administrado al paciente empleando procedimientos conocidos en el arte. Los sistemas de liberación controlada de drogas incluyen los sistemas de bombas osmóticas y sistemas de licuefacción (*dissolutional*) que contienen depósitos recubiertos de polímeros o formulaciones de matriz droga -polímero. Ejemplos de sistemas de liberación controlada se dan en U.S. Pat. Nos. 3,845,770 y 4,326,525 y en P. J. Kuzma *et al.*, *Regional Anesthesia* 22 (6): 543-551 (1997), todas las cuales son incorporadas a la presente memoria como referencia.

Las composiciones de la invención también pueden ser administradas a través de sistemas intranasales de liberación en terapias médicas locales, sistémicas y nasocerebrales. La tecnología de Dispersión Controlada de Partículas (CPD)TM *en inglés*, los envases tradicionales de aspersión (*spray*) nasal, inhaladores o nebulizadores, son conocidos entre los diestros en el arte como proveedores efectivos de liberación de drogas en casos locales y sistémicos, apuntando a la región olfatoria y los senos paranasales.

La invención también se relaciona con un dispositivo intravaginal de concha o núcleo de liberación de droga adecuado para la administración a una hembra humana o animal. El dispositivo puede estar formado por el ingrediente farmacéutico activo en una matriz polimérica rodeado por una vaina y capaz de liberar el (S)-enantiómero de la invención en un patrón sustancialmente de orden cero, en una base diaria similar a los dispositivos utilizados para aplicar testosterona como se describe en la Patente PCT Publicada No. WO 98/50016.

Los métodos actuales de liberación ocular incluyen la administración tópica (gotas), inyecciones subconjuntivas, inyecciones perioculares, inyecciones intravitreales, implantes quirúrgicos e iontoforesis (una pequeña corriente eléctrica se usa para transportar drogas ionizadas hacia adentro y a través del cuerpo). Aquellos diestros en el arte combinarían los excipientes más indicados con el (S)-enantiómero de la invención para una administración intraocular segura y efectiva.

La ruta de administración más adecuada dependerá de la naturaleza y severidad de la condición que va a ser tratada. Aquellos diestros en el arte también están familiarizados con la

determinación de métodos (es decir, oral, intravenoso, por inhalación, subcutáneo, rectal, etc), formas de dosis, excipientes farmacéuticamente adecuados y otras materias relevantes a la liberación del (S)-enantiómero de la invención a un sujeto que lo requiera.

La composición farmacéutica de la invención puede incluir varios materiales que modifican la forma física de una unidad sólida o líquida de dosificación. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una capa de revestimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la cubierta son típicamente inertes y pueden seleccionarse de entre, por ejemplo, azúcar, laca (*shellac*) y otros agentes entéricos de revestimiento. Alternativamente, los ingredientes activos pueden ser contenidos en una cápsula de gelatina.

La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que amalgame el (S)-enantiómero de la invención y de esa manera ayude en la liberación del compuesto. Agentes adecuados que pueden actuar en esta forma incluyen un anticuerpo mono o policlonal, una proteína o un liposoma.

La composición farmacéutica de la invención puede consistir en unidades de dosificación que pueden ser administradas como un aerosol. El término aerosol se usa para indicar una variedad de sistemas que van desde aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en empaques presurizados. La liberación puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema adecuado de bomba que dispensa los ingredientes activos. Los aerosoles del (S)-enantiómero de la invención pueden ser liberados por sistemas mono, bi o trifásicos para liberar el/los ingrediente/s activo/s. La liberación del aerosol incluye el necesario envase, activadores, válvulas, subcontenedores, y similares, que juntos pueden formar un juego/equipo (*kit*). Alguien diestro en el arte, sin demasiada experimentación, puede determinar los aerosoles preferidos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse mediante metodologías bien conocidas en el arte farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a ser administrada mediante inyección puede prepararse combinando el (S)-

enantiómero de la invención con agua destilada estéril para formar una solución. Puede agregarse un surfactante para facilitar la formación de una solución homogénea o una suspensión. Los surfactantes son compuestos que interactúan de manera no covalente con el (S)-enantiómero de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto en el sistema acuoso de liberación.

El (S)-enantiómero de la invención debe ser administrado en una cantidad terapéuticamente efectiva, la cual variará dependiendo de varios factores incluyendo la actividad del compuesto específico utilizado; de la estabilidad metabólica y extensión de la acción del (S)-enantiómero de la invención; la edad, peso corporal, salud en general, género y dieta del paciente; el modo y momento de la administración; la tasa de excreción; la combinación de drogas; la severidad del desorden o condición particular; y del sujeto a quien se aplica la terapia. En general, una dosis diaria terapéuticamente efectiva del (S)-enantiómero de la invención es (para un mamífero de 70 Kg) desde unos 0,001 mg/Kg (*es decir*, 0,07 mg) hasta unos 100 mg/Kg (*es decir*, 7,0 g); preferiblemente una dosis diaria terapéuticamente efectiva es de (para un mamífero de 70 Kg) desde unos 0,01 mg/Kg (*es decir*, 0,70 mg) hasta unos 50 mg/Kg (*es decir*, 3,5 g); y más preferiblemente una dosis diaria terapéuticamente efectiva es de (para un mamífero de 70 Kg) desde unos 1 mg/Kg (*es decir*, 70 mg) hasta unos 25 mg/Kg (*es decir*, 1,75 g).

Los rangos de dosis efectivas que aquí se presentan no se prevé que sean limitantes y representan rangos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis más preferida se ajustará al sujeto individual, tal como lo entenderá y determinará alguien diestro en la artes relevantes. (ver (see, *e.g.*, Berkowet *al.*, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodmanetna., eds., Goodman and Cilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, LTD., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci *al.*, eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk,

CT (1992)).

La dosis total requerida para cada tratamiento puede ser administrada mediante múltiples dosis o en una sola dosis durante el curso de un día, de así desearse. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son menores de la dosis óptima del compuesto.

5 De ahí en adelante, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que el efecto óptimo, bajo las circunstancias imperantes, sea alcanzado. El compuesto o composición farmacéutica diagnosticada puede ser administrada sola o conjuntamente con otro/s diagnosticados y/o fármacos dirigidos a la patología, o dirigidos a otros síntomas de la patología. Cantidades efectivas del (S)-enantiómero de la invención o de la composición de la invención van desde unos
10 0,1 µg hasta unos 100 mg/Kg de peso corporal, administrados a intervalos de 4-72 horas, durante un período de 2 horas a 1 año, y/o cualquier rango o valor dentro de esos rangos, tales como 0,0001-0,001; 0,001-0,01; 0,01-0,1; 0,1-1,0; 1,0-10; 5-10, 10-20, 20-50 y 50-100 mg/Kg, a intervalos de 1-4, 4-10, 10-16, 16-24, 24-36, 36-48, 48-72 horas, por un período de 1-14, 14-28, o 30-44 días, o 1-24 semanas, o cualquier rango o valor de entre esos rangos.

15 El receptor de la administración del (S)-enantiómero de la invención y/o composiciones de la invención puede ser cualquier animal, como un mamífero por ejemplo. Entre los mamíferos los receptores preferidos son mamíferos de las Ordenes Primates (incluyendo humanos, simios y monos), Arteriodactyla (incluyendo caballos, cabras, vacas, ovejas, cerdos), Rodenta (incluyendo ratones, ratas, conejos y hamsters), y Carnivora (incluyendo gatos y perros). Entre las aves, los
20 receptores preferidos son pavos, pollos y otros miembros de la misma Orden. Los receptores más preferidos son los humanos.

TERAPIA COMBINADA

El (S)-enantiómero de la invención puede ser combinado con utilidad con uno o más agentes terapéuticos o como una combinación de los mismos, para el tratamiento de
25 enfermedades y condiciones en mamíferos, preferiblemente humanos, que son mejoradas o aliviadas por la modulación, preferiblemente inhibición, de canales de sodio regulados por voltaje. Por ejemplo, el (S)-enantiómero de la invención puede ser administrado

simultáneamente, secuencialmente o por separado en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo, sin que se tomen como limitantes,:

- analgésicos opiáceos, como por ejemplo: morfina, heroína, cocaína, oximorfina, levorfanol, levalorfan, oxicodona, codeína, dihidrocodeína, propoxifen, nalmefen, fentanil, hidrocodona, hidromorfona, meripidina, metadona, nalorfina, naloxone, naltrexone, buprenorfina, butorfanol, nalbufina y pentazocina;
- analgésicos no opiáceos, como por ejemplo: acetaminofen, salicilatos (p.ej., aspirina).
- Drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs, *en inglés*), como por ejemplo: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, celecoxib, diclofenac, diflusal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, nitroflurbiprofeno, olsalazina, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulfasalazina, sulindac, tolmetin y zomepirac; (NOTA DEL INTERPRETE: EN EL ORIGINAL SE REPITEN ALGUNAS DROGAS. LA REPETICION SE MANTUVO AL TRADUCIR).
- Anticonvulsiantes, como por ejemplo: carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, valproato, topiramato, gabapentina y pregabalina;
- Antidepresivos como antidepresivos tricíclicos, tales como por ejemplo amitriptilina, clomipramina, despramina, imipramina y nortriptilina;
- Inhibidores selectivos de COX-2, como por ejemplo: celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, y lumiracoxib;
- Alfa-adrenérgicos, como por ejemplo: doxazosina, tamsulosina, clonidina, guanfacina, dexmetatomidina, modafinil, y 4-amino-6,7-dimetoxi-2-(5- metano sulfonamida-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil) quinazolina;
- Sedantes barbitúricos, como por ejemplo: amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbita, metohexital, pentobarbital, fenobartital, secobarbital, talbutal, teamilal y tiopental;

- Antagonista de la tachiquinina (*tachykinin*) (NK, *en inglés*), particularmente un antagonista NK-3, NK-2 or NK-1, como por ejemplo: (αR , 9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)benzil)]-8,9,10,11-tetrahidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]-naftiridina-6-13-dione (TAK-637), 5-[[2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometilfenil)etoxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]-metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona (MK-869), aprepitant, lanepitant, dapitant o 3-[[2-metoxi5-(trifluorometoxi)fenil]-metilamino]-2-fenilpiperidina (2S,3S);
- Analgésicos de carbón-brea, particularmente paracetamol;
- Inhibidores de retoma de serotonina, como por ejemplo : paroxetina, sertralina, norfluoxetina (fluoxetina desmetil metabolito), metabolito demetilsertralina, 3 fluvoxamina, paroxetina, citalopram, citalopram metabolito desmetilcitalopram, escitalopram, d,l-fenfluramina, femoxetina, ifoxetina, cianodotiequina, litoxetina, dapoxetina, nefazodona, cericlamina, trazodona y fluoxetina;
- Inhibidores de retoma de noradrenalina (norepinefrina), como por ejemplo : maprotilina, lofepramina, mirtazepina, oxaprotilina, fezolamina, tomoxetina, mianserina, bupropiona, bupropiona metabolito hidroxibupropiona, nomifensina y viloxazina (Vivalan®), especialmente un inhibidor selectivo de la retoma de noradrenalina como la reboxetina, particularmente el (S,S)-reboxetina, y sedantes/ansiolíticos neurolépticos de venlafaxina duloxetina;
- Inhibidores duales de retoma de serotonina-noradrenalina, tales como venlafaxina, venlafaxina metabolito O-desmetilvenlafaxina, clomipramina, clomipramina metabolito desmetilclomipramina, duloxetina, milnacipran e imipramina;
- Inhibidores de la acetilcolinasterasa como el donepezil ;
- Antagonistas del 5-HT₃ como el ondansetron;
- Antagonistas del receptor de glutamato metabotrópico (mGluR) o agonistas o potenciadores alostéricos del glutamato en mGluR's ;
- Anestésicos locales como la mexiletina y la lidocaina ;

- Corticosteroides como la dexametasona ;
- Antiarrítmicos como por ejemplo: mexiletina y fenitoina;
- Antagonistas muscarínicos, como por ejemplo: tolterodina, propiverina, tropsio t cloruro, darifenacin, solifenacin, temiverina e ipratropio;
- 5 • Agonistas muscarínicos o potenciadores alostéricos de la acetilcolina en receptores muscarínicos;
- Canabinoides o potenciadores alostéricos de endorfinas en receptores canabinoides;
- Agonistas de receptores vaniloides (*p.ej.*, resinferatoxina) o antagonistas (*p.ej.*, capsazepina);
- 10 • Sedantes, como por ejemplo: glutetimida, meprobamato, metaqualona, y dicloralfenazona;
- Ansiolíticos como las benzodiasepinas;
- Antidepresivos como la mirtasapina;
- Agentes tópicos (*p.ej.*, lidocaina, capsacina y resiniferotoxin);
- 15 • Relajantes musculares como las benzodiasepinas, baclofen, carisoprodol, clorzoxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol y orfrenadina;
- Antihistaminas o antagonistas de H1;
- Antagonistas del receptor NMDA;
- Agonistas/antagonistas del receptor de 5-HT;
- 20 • Inhibidores de PDEV;
- Tramadol®;
- Analgésicos colinérgicos (nicotínicos);
- Ligandos alfa-2-delta;
- Antagonistas de la prostaglandina subtipo E2;
- 25 • Antagonistas de leukotrieno B4;
- Inhibidores de la 5-lipoxigenasa; y
- Antagonistas del 5-HT3.

Enfermedades y condiciones que pueden ser tratadas y/o prevenidas usando tales combinaciones incluyen, pero no constituyen una lista limitativa: dolor mediado central y periféricamente, agudo, crónico, enfermedades neuropáticas, así como otras enfermedades con dolor asociado y otros desórdenes nerviosos centrales tales como epilepsia, ansiedad, depresión y enfermedad bipolar; o desórdenes cardiovasculares tales como arritmias, fibrilación auricular y fibrilación ventricular; desórdenes neuromusculares como el síndrome de la pierna inquieta y parálisis muscular y tétano (Hamann M, Meisler MH, Richter, A *Exp. Neurol.* 184(2):830-838 (2003)); neuroprotección contra ataques, trauma neural y esclerosis múltiple; y canalopatías como eritromelalgia y el síndrome de dolor rectal hereditario.

“Combinación” como aquí se usa se refiere a una mezcla o permuta del (S)-enantiómero de la invención con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Salvo que el contexto haga claro algo diferente, “combinación” puede incluir liberación simultánea o secuencial del (S)-enantiómero de la invención con uno o más agentes terapéuticos. Salvo que el contexto haga claro algo diferente, “combinación” puede incluir formas de dosificación del (S)-enantiómero de la invención con otro agente terapéutico. Salvo que el contexto haga claro algo diferente, “combinación” puede incluir rutas de administración del (S)-enantiómero de la invención con otro agente terapéutico. Salvo que el contexto haga claro algo diferente, “combinación” puede incluir formulaciones del (S)-enantiómero de la invención con otro agente terapéutico. Formas de dosificación, rutas de administración y composiciones farmacéuticas incluyen, sin que se tome como limitativo, todos los descritos en la presente.

Una terapia de combinación de la invención incluye la aplicación tópica del (S)-enantiómero de la invención con un agente oral. La aplicación tópica del (S)-enantiómero de la invención tiene una exposición sistémica muy baja y tiene actividad que es aditiva con un número de analgésicos orales. Otra terapia de combinación posible incluye una dosis oral del (S)-enantiómero de la invención con un agente oral. Otra terapia de combinación de la invención adicional incluye una aplicación tópica del (S)-enantiómero de la invención con un agente tópico.

El (S)-enantiómero de la invención puede ser incorporado a composiciones para recubrir un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, cánulas (*stents*) y catéteres. De acuerdo con esto, la presente invención, en otro aspecto, incluye una composición para recubrir un dispositivo implantable que comprende un compuesto de la presente invención tal como se describe arriba, y un portador adecuado para recubrir el dispositivo implantable. En otro aspecto más, la presente invención incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende el (S)-enantiómero de la invención y un portador adecuado para recubrir el dispositivo implantable. Revestimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables recubiertos se describen en US Patents No. 6,099,562; 5,886,026; and 5,304,121.

JUEGOS (KITS) DE PARTES

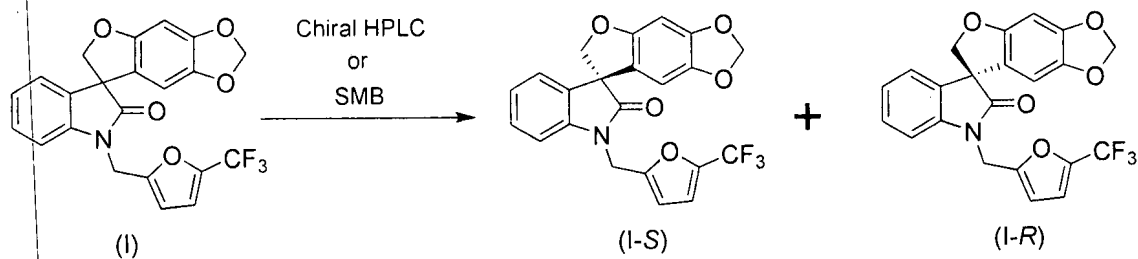
La presente invención también provee juegos (*kits*) que contienen una composición farmacéutica de la invención. El juego también incluye instrucciones para el uso de la composición farmacéutica para modular la actividad de canales de iones en el tratamiento del dolor, así como otros accesorios divulgados en la presente. Preferiblemente, un paquete comercial contendrá una o más unidades de dosis de la composición farmacéutica. Por ejemplo, tal unidad de dosis puede ser una cantidad suficiente para la preparación de una inyección intravenosa. Resultará evidente para los diestros en el arte que tales composiciones, sensibles a la luz y al aire, pueden requerir empaques y/o formulación especiales. Por ejemplo, puede que se use un empaque opaco a la luz, y/o sellado al contacto con el aire ambiental, y/o formulado con recubrimientos o excipientes adecuados.

PREPARACIÓN DEL (S)-ENANTIÓMERO DE LA INVENCION

El (S)-enantiómero de la invención y el (R)-enantiómero correspondiente se preparan por resolución de la fórmula (I), como se indica en el Resumen de la Invención, usando métodos de cromatografía líquida quiral de alta presión o métodos de cromatografía de simulación de movimiento de lecho, como se describe más adelante en el Esquema de Reacción en el cual “HPLC quiral (*chiral HPLC*)” se refiere a cromatografía quiral líquida de alta presión, y “SMB”

se refiere a cromatografía de simulación de movimiento de lecho:

ESQUEMA DE REACCIÓN



El compuesto de la fórmula (I) puede prepararse mediante métodos expuestos en la
5 Patente PCT Publicada No. WO 2006/110917, por métodos aquí descritos, o mediante métodos conocidos para los diestros en el arte.

Alguien con conocimientos ordinarios en el arte reconocería variaciones en el Esquema de Reacción mostrado arriba que serían adecuados para la resolución de los enantiómeros individuales.

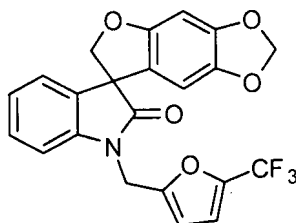
10 Alternativamente, el (S)-enantiómero de la fórmula (I-S) y el (R)-enantiómero de la fórmula (I-R) pueden ser sintetizados a partir de materiales que son conocidos o fácilmente preparados usando procesos análogos a aquellos que son conocidos.

Preferiblemente, el (S)-enantiómero de la invención obtenido por la resolución de métodos expuestos aquí está sustancialmente libre del (R)-enantiómero o contiene sólo trazas del
15 (R)-enantiómero.

Los siguientes Ejemplos Sintéticos sirven para ilustrar los métodos de resolución expuestos por los Esquemas de Reacción antes mostrados y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO SINTÉTICO 1

Síntesis del 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona (Compuesto de la fórmula (I))



A una suspensión de espiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona (1,0 g, 3,6 mmol), que puede ser preparada de acuerdo con los métodos expuestos en la Patente PCT Publicada No. WO 2006/110917, y carbonato de cesio (3,52 g, 11 mmol) en acetona (50 mL) se agregó 2-bromometil-5-trifluorometilfuran (1,13 g, 3,9 mmol) en una porción, y la mezcla de reacción se removi6 a 55-60°C durante 16 horas. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue filtrada y el filtrado se evapor6 bajo presi6n reducida. El residuo fue sometido a columna cromatogr6fica, elusionando (*eluting*) con etil acetato/hexano 1/9 – 1/1) para proveer 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona, el compuesto de la f6rmula (I), (1.17 g, 76%) como un s6lido blanco: mp 139–141 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,32-6,97 (m, 5H), 6,72 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,07 (s, 1H), 5,90-5,88 (m, 2H), 5,05, 4,86 (ABq, *J*_{AB} = 16,1 Hz, 2H), 4,91 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,66 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 176,9, 155,7, 153,5, 148,8, 142,2, 141,9, 140,8, 140,2, 139,7, 139,1, 132,1, 129,2, 124,7, 124,1, 123,7, 121,1, 120,1, 117,6, 114,5, 114,4, 110,3, 109,7, 103,0, 101,9, 93,8, 80,0, 57,8, 36,9; MS (ES⁺) *m/z* 430,2 (*M* + 1), 452,2 (*M* + 23); Cal'd for C₂₂H₁₄F₃NO₅: C, 61,54%; H, 3,29%; N, 3,26%; Encontrado: C, 61,51%; H, 3,29%; N, 3,26%.

EJEMPLO SINTÉTICO 2

Resoluci6n del Compuesto de la F6rmula (I) mediante HPLC Quiral

El compuesto de la f6rmula (I) fue resuelto al (*S*)-enanti6mero de la invenci6n y el correspondiente (*R*)-enanti6mero por HPLC quiral bajo las condiciones siguientes:

Columna: Chiralcel ® OJ-RH; 20 mm I.D. × 250 mm, 5 mic; Lot: OJRH CJ-EH001

51

(Daicel Chemical Industries, Ltd)

Eluente: Acetonitrilo/Agua (60/40, v/v, isocrático)

Tasa de flujo: 10 mL/min

Tiempo de ejecución: 60 min

5 Carga: 100 mg del compuesto de la fórmula (I) in 1 mL de acetonitrilo

Temperatura: Ambiente

Bajo las condiciones quirales HPLC anteriores, el (*R*)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I), es decir, (*R*)-1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona, fue aislado como primera fracción como un sólido blanco; ee (exceso enantiomérico) >99% (OJ-RH calidad analítica, 55% acetonitrilo en agua); mp 103-105 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,32-6,99 (m, 5H), 6,71 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,89 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 5,13, 5,02 (ABq, *J*_{AB} = 16,4 Hz, 2H), 4,82, 4,72 (ABq, *J*_{AB} = 9,4 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 177,2, 155,9, 152,0, 149,0, 142,4, 142,0, 141,3, 132,0, 129,1, 123,9, 120,6, 119,2, 117,0, 112,6, 109,3, 108,9, 103,0, 101,6, 93,5, 80,3, 58,2, 36,9; MS (ES+) *m/z* 430,2 (*M* + 1), [α]_D -17,46° (*c* 0,99, DMSO).

EJEMPLO SINTÉTICO 3

Resolución del Compuesto de la Fórmula (I) por Cromatografía SMB

El compuesto de la fórmula (I) fue resuelto al (*S*)-enantiómero de la invención y el correspondiente (*R*)-enantiómero por cromatografía SMB bajo las condiciones siguientes:

20 Extracto: 147.05 mL/min

Refinado: 76.13 mL/min (*Raffinate*)

Eluente: 183.18 mL/min

Carga: 40 mL/min

Reciclo: 407.88 mL/min

25 Tiempo de ejecución: 0.57 min

Temperatura: 25 °C

Presión: 46 bar

La solución de carga (25 g del compuesto de la fórmula (I) en 1,0 L de fase móvil (25:75:0.1 (v:v:v), mezcla de acetonitrilo/metanol/ácido trifluoroacético)), se inyectó continuamente al sistema SMB (Novasep Licosep Lab Unit), equipado con ocho columnas idénticas en configuración 2-2-2-2 contentivas de 110 g (por columna, 9,6 cm, 4,8 cm Diámetro Interno) de ChiralPAK-AD como fase estacionaria. El primer enantiómero elusionado, (el (*R*)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I)) fue contenido en la corriente del refinado y el segundo enantiómero elusionado (el (*S*)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I)) fue contenido en la corriente de extracción. Los datos de caracterización del (*S*)-enantiómero y el (*R*)-enantiómero obtenidos de la resolución SMB fueron idénticos a los obtenidos anteriormente utilizando la HPLC quiral.

El compuesto de la fórmula (I) se resolvió en sus enantiómeros constituyentes en un sistema preparativo de autopurificación LCMS Waters. El primer enantiómero elusionado de la columna quiral fue brominado (en un sitio bastante alejado del centro estereogénico) para lograr el derivado 5'-bromo, el cual fue subsiguientemente cristalizado para generar un solo cristal adecuado para cristalografía por rayos X. Se obtuvo la estructura cristalina de este derivado brominado del primer enantiómero elusionado y su configuración absoluta resultó ser la misma del (*R*)-enantiómero de la invención. En consecuencia, el segundo enantiómero elusionado de la columna quiral es el (*S*)-enantiómero de la invención. Más aún, el material obtenido de la corriente de extracción de la resolución SMB tenía una rotación óptica específica del mismo signo (positiva, es decir, dextrógira) que la del material obtenido de la antes mencionada resolución LC.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

En el arte se conocen varias técnicas para probar la actividad del compuesto de la invención o determinar su solubilidad en excipientes conocidos farmacéuticamente aceptables. Para que la invención aquí descrita se comprenda más fácilmente, se exponen los siguientes ensayos biológicos. Debe entenderse que estos ejemplos son sólo con propósitos ilustrativos y no deben tomarse de manera alguna como limitantes de esta invención.

ENSAYO BIOLÓGICO 1

Ensayo de aflujo de Guanidina (ensayo *in vitro*)

Este ejemplo describe un ensayo *in vitro* para probar y perfilar agentes de prueba contra canales de sodio regulados por voltaje humanos o en ratas que están establemente expresados en células de un origen expresado endógena o heterogéneamente. El ensayo también es útil para determinar el IC₅₀ de un compuesto modulador, preferiblemente bloqueador, de un canal de sodio regulado por voltaje. El ensayo está basado en el aflujo de guanidina descrito por Reddy, N.L., *et al.*, *J. Med. Chem.* (1998), 41(17):3298-302.

El ensayo de aflujo de guanidina es un ensayo de aflujo de un radiotrazador utilizado para determinar la actividad de flujo iónico de canales de sodio regulados por voltaje en un formato de alta producción basado en una microplaca. El ensayo usa hidrocloreuro de guanidina-¹⁴C en combinación con varios moduladores conocidos de canales de sodio regulados por voltaje que producen un aflujo continuo, para ensayar la potencia de agentes de prueba. La potencia se determina mediante un cálculo con IC₅₀. La selectividad se determina comparando la potencia del compuesto para el canal de sodio regulado por voltaje de interés con su potencia contra otros canales de sodio regulados por voltaje (también llamado 'perfilaje de selectividad').

Cada uno de los agentes de prueba es ensayado contra células que expresan los canales de sodio regulados por voltaje de interés. Los canales de sodio regulados por voltaje se caracterizan como sensibles o insensibles a TTX. Esta propiedad es útil cuando se evalúan las actividades de un canal de sodio regulado por voltaje de interés cuando reside en una población mezclada con otros canales de sodio regulados por voltaje. La siguiente Tabla 1 resume las líneas celulares que son útiles para filtrar por una cierta actividad de canal de sodio regulado por voltaje en presencia o ausencia de TTX.

TABLA 1

LÍNEA CELULAR	Expresión mRNA	Caracterización Funcional
CHO-K1 (Ovario de Hamster chino; línea celular anfitriona recomendada) ATTC accession number CCL-61	• Expresión de Na_v1.4 mostrada por RT-PCR • No se detectó ninguna otra expresión de Na_v	• El aumento de 18 a 20 veces el aflujo de [¹⁴C] guanidina fué bloqueado completamente usando TTX. (Na_v1.4 es un canal sensible al TTX).
L6 (célula mioblástica de rata) ATTC Number CRL-1458	• Expresión de Na_v1.4 y 1.5	• El aumento de 10 a 15 veces el aflujo de [¹⁴C] guanidina fué sólo bloqueado parcialmente por TTX a 100 nM (el Na_v1.5 es resistente al TTX)
SH-SY5Y (neuroblastoma humano) ATTC Number CRL-2266	• Expresión de Na_v1.9 y Na_v1.7 publicada (Blum <i>et al.</i>)	• El aumento de 10 a 16 veces el aflujo de [¹⁴C] guanidina fué bloqueado parcialmente por TTX (Na_v1.9 es resistente al TTX)
SK-N-BE2C (una línea celular de neuroblastoma humano ATCC Number CRL-2268)	• Expresión de Na_v1.8	• Estimulación de células BE2C con piretroides resulta en un aumento de 6 veces del aflujo de [¹⁴C] guanidina por encima de la referencia (<i>background</i>). • El TTX bloqueó el aflujo parcialmente (el Na_v1.8 es resistente al TTX)
PC12 (pheocromocitoma de rata) ATTC Number CRL-1721	• Expresión de Na_v1.2 y Na_v1.7	• El aumento de 8 a 12 veces el aflujo de [¹⁴C] guanidina fué bloqueado completamente usando TTX. (Na_v1.2 y Na_v1.7 son canales sensibles al TTX)
HEK293 (riñón embrionario humano) ATTC Number CRL-1573	• Expresión de hNa_v1.7	• Nav1.7 es un canal sensible al TTX. El TTX IC₅₀ en el ensayo funcional de Guadinio es 8 nM.

5 También es posible utilizar líneas celulares immortalizadas que expresan heterogéneamente canales de sodio regulados por voltaje. La clonación, transfección (*transfection*) estable y propagación de tales líneas celulares son conocidas para los diestros en el arte (véase por ejemplo, , Klugbauer, N, *et al.*, *EMBO J.* (1995), 14(6):1084-90; and Lossin, C.,

55

et al., *Neuron* (2002), 34, pp. 877-884).

Células que expresen los canales de sodio regulados por voltaje de interés se cultivan de acuerdo al suplidor o en el caso de una célula recombinante, en presencia de medios selectivos de cultivo tales como el G418 (Gibco/Invitrogen). Las células son desasociadas de los platos de cultivo con una solución enzimática (1X) Trypsin/EDTA (Gibco/Invitrogen) y analizadas para establecer su densidad y viabilidad usando un hemocitómetro (Neubauer). Las células desasociadas son lavadas y resuspendidas en su medio de cultivo, luego colocadas en platos Scinti (*Scintiplates*) recubiertos de Poly-D-Lysine (Perkin Elmer) (aproximadamente 100.000 células/pozo) e incubadas a 37°C / 5% CO₂ durante 20-24 horas. Luego de un lavado extenso con solución salina de bajo sodio con un tampón químico HEPES (*HEPES-buffered*) (LNHBSS) (150 mM cloruro de colina, 20 nM HEPES (Sigma), 1 mM cloruro de calcio, 5 mM cloruro de potasio, 1 mM cloruro de magnesio, 10 mM Glucosa) los agentes de prueba son diluidos con LNHBSS y luego agregados a cada pozo a la concentración deseada. (Se pueden utilizar concentraciones variadas del agente de prueba). La mezcla de activación/radiomarcada contiene un alcaloide como la veratridina o Aconitina (Sigma) o un piretroide como la delmatrina, el veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Sigma) y ¹⁴C-hidrocloruro de guanidina (ARC), para medir el flujo a través de los canales de sodio regulados por voltaje.

Luego de cargar las células con el agente de prueba y la mezcla de activación/radiomarcada, los platos Scinti recubiertos con Poly-D-Lysine son extensamente lavados con LNHBSS complementado con Guanidina (Sigma). Los platos Scinti recubiertos con Poly-D-Lysine son secados y luego contados usando un Wallac MicroBeta TriLux (Perkin-Elmer Life Sciences). La habilidad del agente de prueba para bloquear la actividad de canales de sodio regulados por voltaje es determinada comparando la cantidad de ¹⁴C-guanidina presente dentro de las células que expresan los diferentes canales de sodio regulados por voltaje. Con base en estos datos, se pueden realizar una serie de cálculos, expuestos en otras secciones de la presente memoria, para determinar si un agente de prueba es selectivo por un canal de sodio regulado por

56

voltaje en particular.

El valor IC₅₀ de un agente de prueba para un canal de sodio regulado por voltaje específico puede determinarse usando el antes expuesto método general. El IC₅₀ puede determinarse usando una curva de 3, 8, 10, 12 o 16 puntos, en duplicado o triplicado, con una concentración inicial de 1, 5 or 10 μM diluida en serie con una concentración final que alcance los rangos sub-nanomolar, nanomolar y micromolar bajo. Típicamente, la concentración del punto medio del agente de prueba se fija en 1 μM, y se aplican concentraciones secuenciales de medias diluciones mayores o menores (p.ejg. 0.5 μM; 5 μM and 0.25 μM; 10 μM and 0.125 μM; 20 μM etc.). La curva IC₅₀ se calcula usando el Modelo Logístico de 4 Parámetros (*4 Parameter Logistic Model*) o el Modelo Sigmoidal de Respuesta de Dosis (*Sigmoidal Dose-Response Model* formula (ajuste = (A+((B-A)/(1+((C/x)^D))))).

El aumento de selectividad, factor de selectividad o múltiplo de selectividad, se calcula dividiendo el valor de IC₅₀ del canal de sodio regulado por voltaje de prueba entre el canal de sodio regulado por voltaje de referencia, por ejemplo, el Na_v1.5.

De acuerdo con lo anterior, el compuesto de la fórmula (I), el (S)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I), es decir, el (S)-enantiómero de la invención, y el (R)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I), cuando se ensayaron en esta prueba, demostraron una actividad bloqueadora de canal de sodio regulado por voltaje contra el hNa_v1.7 como se muestra en la Tabla 2:

TABLA 2

Compuesto	Nombre químico	IC ₅₀ (μM)
(I)	1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,007
(I-R)	(R)-1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	4,200
(I-S)	(S)- 1'-[[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil]spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,003

La relación concentración-respuesta para el (S)-enantiómero de la invención y el (R)-

57

enantiómero se muestran en la FIG. 1. Las curvas sólidas indican el mejor ajuste de los mínimos cuadrados a un isoterma aglutinante 1:1; los valores de IC_{50} que describen estas curvas se dan en la Tabla 2. En este modelo, el (*S*)-enantiómero de la invención demostró una potencia significativamente mayor (es decir, un múltiplo > de 100) contra el $hNa_v1.7$ cuando se le comparó con la potencia de inhibición del (*R*)-enantiómero correspondiente.

Estos resultados favorecen el uso del (*S*)-enantiómero de la invención sobre el (*R*)-enantiómero o el compuesto de la formula (I) (la mezcla racémica) para las aplicaciones aquí descritas porque se puede obtener una mayor actividad farmacológica a niveles menores de dosificación con la posibilidad de menos efectos secundarios. Más aún, el (*R*)-enantiómero es una herramienta muy importante para estudios de seguridad porque permite distinguir entre efectos producidos por mecanismos (aquellos mediados por el bloqueo de canales de sodio) y actividades fuera del objetivo que pueden ser eliminadas en análogos sin comprometer la eficacia. Si un efecto adverso es producto de un mecanismo, entonces el (*S*)-enantiómero será mucho más potente que el (*R*)-enantiómero, dado que los sitios secundarios de acción probablemente no tengan estereoselectividades idénticas y los dos enantiómeros probablemente tengan efectos similares, incluyendo la potencia, sobre sitios de acción secundarios.

EJEMPLO BIOLÓGICO 2

Ensayo electrofisiológico (ensayo *in vitro*)

Las células HEK293 que expresan el $hNa_v1.7$ fueron cultivadas en medios DMEM (Gibco) con 0,5 mg/mL G418, +/-1% PSG, y 10% de suero fetal inactivado con calor a 37°C y 5% CO₂. Para los registros electrofisiológicos las células fueron dispuestas en platos de 10 mm.

Los registros de células completas fueron examinados con métodos establecidos de tenazas de voltaje (Bean *et al.*, *op. cit.*) empleando un amplificador Axopatch 200B y software Clampex (Axon Instruments, Union City, CA). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los electrodos fueron pulidos al fuego para resistencias de 2-4 Mohms. Los errores de voltaje y los artefactos de capacitancia fueron minimizados mediante compensación con resistencias en serie y capacitancia de compensación, respectivamente. Los

datos se adquirieron a 40 kHz y filtrados a 5 kHz. La solución externa (baño) consistió de NaCl (140 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), HEPES (10 mM) a pH 7.4. La solución interna (pipeta) consistió de (in mM): NaCl (5), CaCl₂ (0.1), MgCl₂ (2), CsCl (10), CsF (120), HEPES (10), EGTA (10), a un pH 7.2.

Para estimar la afinidad continua (*steady-state*) de los compuestos por el estado en reposo e inactivado del canal (K_r and K_i , respectivamente), se utilizaron pulsos de prueba de 12,5 ms a voltajes depolarizadores desde -60 hasta +90 mV a partir de un potencial sostenido de -120 mV para construir las relaciones corriente-voltage (curvas I-V). Se usó un voltaje cerca del pico de la curva I-V (-30 mV a 0 mV) como pulso de prueba durante todo el resto del experimento. Las curvas de inactivación en estado continuo (diponibilidad) se contruyeron entonces midiendo la corriente activada durante un pulso de prueba de 8,75 ms luego de pulsos condicionantes de 1 segundo a potenciales en el rango de -120 a -10 mV.

La dependencia al voltaje en estado continuo del enlace de un compuesto a un canal de sodio regulado por voltaje se determinó midiendo el bloqueo de la corriente iónica bajo dos potenciales sostenidos. El enlace a los canales en estado de reposo se determinó utilizando un potencial sostenido de -120 mV, de manera que se obtuviera la máxima disponibilidad. El enlace a canales en estado no activado se evaluó bajo un potencial sostenido tal que sólo aproximadamente un 10% de los canales estuvo disponible para abrirse. El potencial de membrana se mantuvo a este voltaje por lo menos durante 10 segundos de manera que el enlace de la droga pudiera equilibrarse.

54

La constante aparente de disociación a cada voltaje se calculó mediante la ecuación;

% inhibición = $\frac{[Droga]}{([Droga] + K_d)} \times 100$

donde K_d es la constante de disociación (K_r or K_i), y $[Droga]$ es la concentración del compuesto de prueba.

De acuerdo con lo anterior, cuando se probaron en este modelo el compuesto de la fórmula (I), el (S)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I), es decir, el (S)-enantiómero de la invención, y el (R)-enantiómero del compuesto de la fórmula (I), demostraron afinidades por el estado en reposo/cerrado y el estado inactivado del hNa_v1.7, tal como se muestra en la Tabla 3 seguidamente:

TABLA 3

Compuesto	Nombre químico	K_i (μM)	K_r (μM)
(I)	1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,142	>10uM
(I-R)	(R)- 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,869	>10uM
(I-S)	(S)- 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'H)-ona	0,161	>10uM

Tal como muestran estos resultados, el (S)-enantiómero de la invención es un modificador del hNa_v1.7 dependiente del estado y del voltaje, con una afinidad baja por el estado de reposo/cerrado y una alta afinidad por el estado inactivo. Los resultados demostraron que el (S)-enantiómero era unas 5 veces más potente en enlazarse con el estado inactivo del hNa_v1.7 que el (R)-enantiómero. Más aún, los resultados demostraron que el (S)-enantiómero es el principal responsable por la potencia de la mezcla racémica, es decir, el compuesto de la fórmula (I).

EJEMPLO BIOLÓGICO 3

Ensayos *in vivo*Dolor agudo (Prueba de la formalina)

La prueba de la formalina se usa como modelo animal del dolor agudo. En la prueba de la formalina, a los animales se les habitúa brevemente a una cámara de pruebas de plexiglass durante 20 minutos el día anterior al experimento. El día de la prueba, los animales son inyectados con los artículos de prueba de manera aleatoria. A los 30 minutos de haberse administrado la droga, se les inyectan subcutáneamente 50 μ L de formalina al 10% en la superficie plantar de la pata trasera de las ratas. La adquisición de datos de video se inicia inmediatamente después de la administración de la formalina, con una duración de 90 minutos.

Las imágenes son capturadas usando el software Actimatrix Limelight que guarda los archivos bajo la extensión *.lvi, y luego los convierte a codificación MPEG-4. Los videos son entonces analizados utilizando el software de análisis conductual "The Observer 5.1", (Version 5.0, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands). El análisis del video se realiza observando la conducta del animal y marcando a cada uno según su tipo, y definiendo la extensión de la conducta (Dubuisson and Dennis, 1977). Las conductas anotadas incluyen: (1) conducta normal; (2) no poner peso sobre la pata; (3) levantar la pata; (4) lamer/morder y rascarse la pata. Alzar, favorecer, o lamer, morder o rascar excesivamente la pata inyectada indican una respuesta al dolor. Una respuesta analgésica o protección frente a los compuestos queda evidenciada si ambas patas descansan sobre el piso, sin ningún favorecimiento, lamido excesivo, mordedura o rascado de la pata inyectada.

El análisis de los datos de la prueba de la formalina se realiza con base en dos factores: (1) Máximo Efecto Inhibitorio Potencial Porcentual (%MPIE, *en inglés*) y (2) calificación del dolor. El %MPIE se calcula en varios pasos, donde el primero es sumar la extensión de las conductas no normales (conductas 1, 2, 3) de cada animal. Se obtiene un valor único para el grupo del vehículo promediando todas las calificaciones dentro del grupo del vehículo de tratamiento. El siguiente

cálculo resulta en un valor MPIE para cada animal:

$$\text{MPIE (\%)} = 100 - [(\text{suma del tratamiento/valor promedio del vehículo}) \times 100\%]$$

La calificación del dolor se calcula a partir de la escala ponderada descrita arriba. La duración de la conducta se multiplica por el peso (esto ranquea la severidad de la respuesta), y luego se divide entre la extensión total de la observación para determinar el nivel de dolor de cada animal. El cálculo se representa con la siguiente fórmula:

$$\text{Calificación del dolor} = [0(T_0) + 1(T_1) + 2(T_2) + 3(T_3)] / (T_0 + T_1 + T_2 + T_3)$$

Dolor Inflamatorio Crónico Inducido por CFA

En esta prueba se evalúa la alodinia táctil con filamentos von Frey calibrados. Luego de una semana completa de climatización en las instalaciones de un vivero, se inyectaron subcutáneamente 150 µL de la emulsión "Complete Freund's Adjuvant" (CFA) (CFA suspendida en una emulsión (1:1) aceite/sol. salina a una concentración de 0,5 mg/mL) en la superficie plantar de las patas traseras izquierdas de las ratas bajo una anestesia suave con isoflurano. Se permitió a los animales recuperarse de la anestesia y se evaluaron los umbrales nociceptivos (*nociceptive*) base térmico y mecánico de todos los animales una semana después de la administración de la CFA. A todos los animales se les habituó al equipo experimental durante 20 minutos el día anterior al comienzo del experimento. Los artículos de prueba y de control fueron administrados a los animales, y se midieron los umbrales nociceptivos (*nociceptive*) en puntos determinados del tiempo luego de la administración de la droga para determinar las respuestas analgésicas a cada uno de los seis tratamientos disponibles. Los puntos en el tiempo fueron determinados para mostrar el mayor efecto analgésico para cada compuesto.

El (S)-enantiómero de la invención y el correspondiente (R)-enantiómero se compararon utilizando dosificaciones orales y tópicas. La FIG. 2 muestra una comparación de la eficacia del (S)-enantiómero de la invención y el (R)-enantiómero con dosificación oral. Cada enantiómero se dosificó a 10, 30, 100 o 200 mg/Kg. La concentración obtenida en plasma con cada dosis también fue determinada, y la respuesta de reversión al dolor (como el aumento porcentual a partir del

umbral base) se graficó como una función de la concentración en plasma.

El (*S*)-enantiómero tuvo un efecto máximo mayor cuando se dosificó en 200 mg/Kg. El (*R*)-enantiómero logró una concentración en plasma mucho mayor a una dosis de nivel equivalente. Este fue un hallazgo inesperado e inusual. Como consecuencia, el uso de la mezcla racémica, es decir, el compuesto de la fórmula (I), resultaría en un exceso de 10 veces el enantiómero inactivo, es decir, el (*R*)-enantiómero. Según esto, el uso del (*S*)-enantiómero de la invención aumentaría considerablemente la posibilidad de conseguir eficacia con una probabilidad mínima de encontrar actividades no previstas que no sean estereoselectivas.

El (*S*)-enantiómero de la invención también se administró tópicamente a los animales en dosis variadas (1%, 2%, 4% and 8% (p/v)) y los umbrales nociceptivos fueron medidos en puntos definidos en el tiempo luego de la administración de la droga, para determinar las respuestas analgésicas a cada uno de los tratamientos disponibles. Los puntos en el tiempo fueron previamente determinados de manera que mostraran el efecto analgésico mayor para cada compuesto en prueba.

Los umbrales de respuesta de los animales a estímulos táctiles se midieron mediante un anestesiómetro Model 2290 Electrovonfrey (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) después del test de Hargreaves. Los animales fueron introducidos en un recinto elevado de Plexiglass colocado sobre una superficie de malla metálica. Luego de 15 minutos de acomodo, se aplicó perpendicularmente un pelo von Frey, previamente calibrado, a la planta de las patas traseras de un mismo lado de los animales, con suficiente fuerza, medida en gramos, para producir una respuesta firme de la pata. La respuesta indicó un retiro del estímulo doloroso y eso constituyó el punto final de la eficacia. Las pruebas continuaron hasta determinar cuál pelo tenía la menor fuerza para inducir una reacción de la pata o hasta alcanzar la fuerza de corte que fue de 20 g. Esta fuerza de corte se usa porque representa aproximadamente el 10% del peso del animal y sirve para prevenir el levantamiento completo de la extremidad debido al uso de pelos más rígidos, lo cual cambiaría la naturaleza del estímulo. Los datos se expresaron como el aumento

porcentual a partir del umbral base, en gramos.

El (S)-enantiómero de la invención, cuando se probó con este modelo, demostró un efecto analgésico como se muestra en la Tabla 4:

TABLA 4

Compuesto	Aumento porcentual a partir de la línea base (CFB)			
	1 % tópico	2% tópico	4% tópico	8% tópico
(I-S)	0.62	16.71	28.79	45.06

El (S)-enantiómero de la invención a 2%, 4% y 8% (p/v) mostró aumentos en los umbrales mecánicos de retiro de las patas en las pruebas von Frey, valores que se expresan como un aumento porcentual a partir de la línea base (IFB, *en inglés*) para indicar un efecto analgésico. El efecto analgésico del (S)-enantiómero aumentó con el aumento de las dosis hasta alcanzar la mayor dosis utilizada de 8% p/v, para la cual se mostró el IFB de mayor porcentaje en +45,1%. Sin embargo, el grupo de dosificación de 1% (p/p) no demostró un aumento apreciable en cuanto al umbral mecánico de retiro de las patas. Los resultados indican que el (S)-enantiómero tiene efectos analgésicos en el modelo de dolor inflamatorio inducido por CFA en el rango de 2% a 8% (p/v).

Modelos de Nonicepción Post-operativos

En este modelo, la hiperalgesia causada por una incisión intraplanar en la pata se mide aplicando un estímulo táctil incremental a la pata hasta que el animal retire la pata ante el estímulo aplicado. Mientras los animales estaban anestesiados con isoflurano al 3,5%, el cual se aplica via un cono nasal, se hizo una incisión longitudinal con un escalpelo No. 10 en el plantar de la pata trasera izquierda a través de la piel y la fascia, comenzando a 0,5 cm del borde proximal del talón y extendiéndolo en dirección de los dedos. Luego de la incisión la piel se juntó utilizando 2 suturas 3-0 de seda, esterilizadas. El sitio de la herida se cubrió con Polysporin y Betadine. Los animales fueron regresados a su jaula para recuperación hasta el día siguiente.

Los umbrales de retiro de los animales a los estímulos táctiles tanto para las patas

operadas (ipsilaterales) como las no operadas (contralaterales) pueden medirse usando el anestesiómetro Modelo 2290 Electrovonfrey (IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Los animales fueron introducidos en un recinto elevado de Plexiglass colocado sobre una superficie de malla metálica. Luego de al menos 10 minutos de aclimatación, se aplicaron pelos von Frey, previamente calibrados, perpendicularmente a la superficie plantar de ambas patas de los animales, con suficiente fuerza para producir un leve movimiento del pelo contra la superficie plantar, en orden ascendente comenzando por el pelo de 10 g. Las pruebas continuaron hasta determinarse el pelo de menor fuerza que produjera un movimiento rápido de la pata o hasta alcanzar la fuerza de corte que fue de aproximadamente 20 g. Esta fuerza de corte se usa porque representa aproximadamente el 10% del peso corporal del animal y sirve para prevenir el levantamiento completo de la extremidad debido al uso de pelos más rígidos, lo cual cambiaría la naturaleza del estímulo.

Modelo de dolor neuropático; lesión de constricción crónica

Para este modelo se hizo una incisión de 3 cm a través de la piel y la fascia a la mitad del muslo de la pierna trasera izquierda del animal, usando un escalpelo No. 10. El nervio ciático izquierdo se expuso mediante una disección directa del *biceps femoris*, con cuidado para minimizar la hemorragia. Se ataron 4 ligaduras sueltas a lo largo del nervio ciático utilizando suturas esterilizadas 4-0, no degradables, de seda, a intervalos de 1 a 2mm una de la otra. La tensión de las ligaduras sueltas fue lo suficientemente apretada como para inducir una leve constricción del nervio ciático, visible al microscopio de disección con 4x de ampliación. En el falsamente operado animal el nervio ciático izquierdo fue expuesto sin manipulación adicional. Se aplicó ungüento antibacterial directamente a la herida y el músculo se cerró usando suturas esterilizadas. Se aplicó Betadine al músculo y sus alrededores, seguido del cierre de la piel con grapas quirúrgicas.

Los umbrales de retiro de los animales a los estímulos táctiles se midieron usando el anestesiómetro Modelo 2290 Electrovonfrey (IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Los animales fueron introducidos en un recinto elevado de Plexiglass colocado sobre una superficie

de malla fangosa. Luego de al menos 10 minutos de aclimatación, se aplicaron pelos von Frey, previamente calibrados, perpendicularmente a la superficie plantar de ambas patas de los animales, con suficiente fuerza para producir un leve movimiento del pelo contra la superficie plantar, en orden ascendente comenzando por el pelo de 0,1 g. Las pruebas continúan hasta determinarse el pelo de menor fuerza que produzca un movimiento rápido de la pata o hasta alcanzar la fuerza de corte de aproximadamente 20 g. Esta fuerza de corte se usa porque representa aproximadamente el 10% del peso corporal del animal y sirve para prevenir el levantamiento completo de la extremidad debido al uso de pelos más rígidos, lo cual cambiaría la naturaleza del estímulo.

Los umbrales térmicos nociceptivos de los animales se evaluaron usando el test de Hargreaves. Luego de la medición de los umbrales táctiles, a los animales se les introdujo en un recinto de plexiglass colocado sobre una plataforma elevada de vidrio con unidades de calentamiento. La plataforma de vidrio estaba termostáticamente controlada a una temperatura aproximada de 24 a 26 °C para todas las corridas de prueba. Se permitió a los animales que se acomodaran durante 10 minutos luego de su entrada al recinto hasta que cesara toda actividad exploratoria. Se usó el medidor de analgesia Model 226 Plantar/ Tail Stimulator Analgesia Meter (IITC, Woodland Hills, CA) para aplicar un haz irradiante de calor desde debajo de la plataforma de vidrio a la superficie plantar de las patas traseras. Durante todas las corridas de prueba, la intensidad en reposo y la intensidad activa de la fuente de calor se fijó en 1 y 55 respectivamente, y se usó un tiempo de corte de 20 segundos para evitar daño a los tejidos.

Se comparó el (*S*)-enantiómero con el correspondiente (*R*)-enantiómero y la mezcla racémica (el compuesto de la fórmula (I)) en este modelo CCI usando aplicación tópica de la droga, tal como se describe para el modelo CFA (ver FIG. 3). Cada compuesto de prueba se administró como un ungüento contentivo de 2% (p/v). Consistentemente con las actividades diferentes de estos dos enantiómeros inhibidores de canales de sodio regulados por voltaje, sólo el (*S*)-enantiómero de la invención revirtió respuestas al dolor mientras que el (*R*)-enantiómero no tuvo ningún aumento significativo respecto a la línea base. Tanto el (*S*)-enantiómero como la

mezcla racémica muestran un aumento porcentual similar respecto a la línea base lo cual tiende a sugerir que el (S)-enantiómero es responsable por el efecto analgésico.

EJEMPLO BIOLÓGICO 4

Ensayo de Arritmia inducida por Aconitina

5 La actividad antiarrítmica de los compuestos de la invención se demuestra mediante la siguiente prueba. Se provoca arritmia mediante la administración intravenosa de aconitina (2,0 $\mu\text{g/Kg}$) disuelta en solución salina fisiológica. Compuestos de prueba de la invención se administran intravenosamente 5 minutos después de la administración de la aconitina. La evaluación de la actividad antiarrítmica se realiza midiendo el tiempo que va desde la
10 administración de la aconitina hasta la ocurrencia de extrasístoles (ES) y el tiempo entre la administración de aconitina hasta la ocurrencia de taquicardia ventricular (VT).

En ratas bajo anestesia con isoflurano (1/4 a 1/3 de 2%), se realiza una traqueotomía haciendo primero una incisión en el área del cuello, luego aislando la traquea para hacer una incisión de 2mm por donde se inserta en la traquea un tubo traqueal de 2 cm de tal manera que la
15 abertura del tubo queda posicionada justo sobre la boca. El tubo se asegura con suturas y se acopla a un ventilador por el tiempo que dure el experimento.

Seguidamente se hacen incisiones de 2,5 cm en las áreas femorales y usando una sonda roma de disección se aíslan los vasos femorales. Se introducen cánulas en ambas venas femorales, una para mantener la anestesia con pentobarbital (0,02-0,05 mL) y la otra para
20 infusión e inyección de la droga y el vehículo. Se introduce una cánula en la arteria femoral con el catéter de gel a presión sanguínea del transmisor.

Las conexiones del ECG se acoplan a los músculos del tórax en la posición de conexión II (superior derecha/por encima del corazón, la punta blanca; inferior izquierda/debajo del corazón, la punta roja). Las puntas se aseguran con suturas.

25 Todas las áreas quirúrgicas se cubren con gasa húmeda con solución salina al 0,9%. Se suple esta solución salina (1-1,5 mL a 0,9%) para humedecer las áreas post-cirugía. El ECG del animal y su ventilación se dejan para que se equilibren por al menos 30 minutos.

La arritmia se induce con una infusión de aconidina a 2 $\mu\text{g/Kg/min}$ durante 5 minutos. Durante este tiempo se registra el ECG y observa continuamente.

EJEMPLO BIOLÓGICO 5

Ensayo de arritmia inducida por isquemia

5 Se han usado modelos de roedores para arritmias ventriculares, tanto en versión aguda cardíaca como en paradigmas de prevención, para probar terapias potenciales para arritmias auriculares y ventriculares en humanos. La isquemia cardíaca conducente a infartos del miocardio es una causa común de morbilidad y mortalidad. La habilidad de un compuesto de prevenir la taquicardia y fibrilación ventriculares inducidas por isquemia es un modelo aceptado para
10 determinar la eficacia de un compuesto en una situación clínica de taquicardia y fibrilación ventriculares.

Primero se induce anestesia con pentobarbital (i.p.) y se mantiene mediante una infusión intravenosa única. A las ratas SD machos se les introduce una cánula en la tráquea para darle ventilación artificial con aire de la habitación en un volumen por golpe de 10 mL/Kg, 60
15 golpes/minuto. La arteria femoral derecha y vena se arman con cánula usando tubo PE50 para registrar la presión arterial de la sangre (MAP) y la administración intravenosa de compuestos, respectivamente.

Se abre el pecho entre las costillas 4 y 5 para crear una abertura tal que permita ver el corazón. Cada rata es colocada en una plataforma ranurada y se acoplan retenedores metálicos a
20 la caja torácica para abrir la cavidad del pecho. Se usa una aguja de suturar para penetrar al ventrículo justo por debajo del atrio levantado y se la saca en diagonal hacia debajo de manera que se pueda obtener una de la zona de oclusión (OZ, en inglés) de >30% y >50%. El punto de salida está ~ 0,5 cm debajo de donde la aorta conecta con el ventrículo izquierdo. La sutura se atiranta de manera que un lazo suelto (*loose loop*) se forme alrededor de una rama de la arteria.
25 Entonces se cierra el pecho del animal dejando que el extremo del oclisor sea accesible desde el exterior del pecho.

Se colocan electrodos en la posición de conexión II (aurícula derecha al ápice) para las

mediciones del ECG, como sigue: un electrodo se introduce en la pata delantera derecha y el otro en la pata trasera derecha.

La temperatura corporal, la presión arterial media (MAO, *en inglés*), el ECG y el latido cardíaco se registran de manera constante durante todo el experimento. Una vez que los parámetros críticos se han estabilizado, se hace un registro de 1-2 minutos para establecer los valores base. Se inicia la infusión de un compuesto de la invención o de la sustancia de control una vez que los valores base se han establecido. Luego de una infusión de 5 minutos de compuesto o control, se hala la sutura fuertemente para ligar la LCA y generar una isquemia en el ventrículo izquierdo. Se registran los parámetros críticos de manera continua durante 20 minutos luego de ligar la vía, a menos que la MAP alcance el nivel crítico de 20-30 mm Hg por al menos 3 minutos, en cuyo caso se detiene el registro porque el animal sería declarado muerto y sería sacrificado. Se califica la habilidad de los compuestos de la invención para prevenir arritmias y mantener valores casi normales de MAP y HR (latido cardíaco) y se compara con el control.

EJEMPLO BIOLÓGICO 6

En comparación con la mezcla racémica, es decir, el compuesto de la fórmula (I), el (S)-enantiómero, sustancialmente libre de (R)-enantiómero, tiene un mejor perfil de solubilidad en una variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables. Así, el (S)-enantiómero puede formularse en un menor número de unidades de dosis que la mezcla racémica. Esta propiedad facilita dosificar a los pacientes a un nivel superior de ser necesario para conseguir eficacia. Ejemplos de la diferencia en solubilidad se muestran en la Tabla 5 a continuación:

TABLA 5

Excipiente	Compuesto de la fórmula (I) (mezcla racémica))	(S)-enantiómero
Labrasol®	72,5 mg/mL	231 mg/mL
Propilenglicol	2,7 mg/mL	9.8 mg/mL
PEG 400	< 50 mg/mL	> 55 mg/mL
Capryol® 90	18,1 mg/mL	96 mg/mL
Tween® 80	64 mg/mL	> 123 mg/mL
Etanol	10,0 mg/mL	36.4 mg/mL
Labrasol®/PEG 400 60/40	70,4 mg/mL	182 mg/mL
Labrasol®/Capryol®90 60/40	44,4 mg/mL	191 mg/mL
Labrasol®/Transcutol® 60/40	74,2 mg/mL	186 mg/mL

EJEMPLO BIOLÓGICO 7

5 Ensayo in vivo para el tratamiento del prurito

La histamina produce prurito (picazón) en humanos. De acuerdo con esto, este ensayo evalúa la eficacia del (S)-enantiómero de la invención administrado tópica y oralmente sobre el prurito inducido por histamina en ratones machos ICR.

Los animales se dividieron aleatoriamente en grupos de prueba, incluyendo un grupo sin
10 tratamiento, un grupo tratado con una composición tópica con un 8% (p/v) de (S)-enantiómero, y
un grupo tratado con una composición farmacéutica oral de 50mg/Kg de (S)-enantiómero. Un día
antes de la prueba se rasuraron las regiones escapulares de los animales con tijeras de barbero. El
día de la prueba los animales se habituaron durante 60 minutos en la cámara de pruebas
compuesta de un tubo plástico transparente colocado verticalmente sobre una superficie plana.
15 Después del período de acostumbramiento, los animales fueron retirados del tubo plástico,
puestos en restricción e inyectados con histamina en la región escapular rasurada. Las
inyecciones se hicieron intradérmicamente en la piel en volúmenes pequeños de inyección (10
µL) usando una jeringa Hamilton. Las soluciones inyectadas consistieron de histamina disuelta
en solución salina en una concentración de 100 µg/10 µL (or 10 mg/mL). A cada ratón se le

inyectaron 10 µg de la solución. Inmediatamente luego de las inyecciones. Los animales fueron devueltos a las cámaras de prueba y observados por un total de 50 minutos mediante cámaras colocadas sobre las cámaras de prueba. Las cámaras estaban conectadas a una computadora en la cual se creaban, guardaban y analizaban archivos digitales.

5 Se calificó el número de ataques de picazón durante 40 minutos. Se definió como “ataque de picazón” el acto de levantar la pata trasera y usarla para rascar la región escapular, y luego regresarla al suelo. Alternativamente, si en lugar de colocar la pata trasera en el suelo el ratón se lamía la pata, entonces eso también se contaba como un ataque de picazón.

10 En el grupo no tratado, los animales (n=7) fueron habituados en la cámara de prueba durante 60 minutos antes de inyectársele la histamina. Para evaluar el (S)-enantiómero tópico en el prurito inducido por histamina, unos animales (n=16/grupo) fueron habituados en la cámara de prueba durante 30 minutos, seguidos por la aplicación en la región rasurada de la espalda de 50 mg de (S)-enantiómero tópico al 6% (p/v) o de un vehículo. Los animales fueron regresados a la cámara de pruebas para otros 30 minutos de acostumbramiento
15 antes de inyectárseles la histamina. Para evaluar el (S)-enantiómero oral se dosificaron animales (n=8/grupo) mediante un gavaje oral con 50 mg/Kg del (S)-enantiómero o de un vehículo, seguido de un período de 60 minutos de acostumbramiento antes de la inyección de histamina.

Los datos se analizaron usando el software de análisis estadístico GraphPad Prism 5 y para un análisis univariable (*univariate*) se usó un test-t no apareado. Los resultados se expresan
20 como la media ± SEM. Los valores que alcanzaron un nivel de significación de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

25 La inyección de histamina en la piel le causó picazón esporádica a los animales en ataques que duraron 1-2 segundos. En el grupo no tratado, los ataques de picazón comenzaron inmediatamente después de la inyección y duraron, más o menos, 40 minutos a partir de ese momento (ver FIG. 4). El grupo tratado con el (S)-enantiómero tópico al 8% (p/v) mostró un prurito significativamente reducido (ver FIG. 5). Los animales tratados solamente con el vehículo

tuvieron un número total de ataques de picazón de $134,3 \pm 13,31$ ($n=16$) mientras que los ratones tratados con el (*S*)-enantiómero tópico tuvieron $89,00 \pm 10,51$ ($n=16$) ataques de picazón. La diferencia entre estos grupos fue estadísticamente significativa con un valor *p* de 0,0122. El grupo tratado con 50 mg/Kg de (*S*)-enantiómero oral similarmente mostró un prurito significativamente reducido (ver FIG. 6). Los animales tratados sólo con el vehículo tuvieron un total de $42,88 \pm 6,667$ ($n=8$) ataques de picazón, mientras que los ratones tratados con el (*S*)-enantiómero tuvieron $17,25 \pm 6,310$ ($n=8$) ataques de picazón. La diferencia entre los grupos tratados oralmente también fue estadísticamente significativa con un valor de *p* de 0,0144. Los resultados demostraron que el (*S*)-enantiómero administrado oral y tópicamente redujo el prurito.

EJEMPLO BIOLÓGICO 8

Prueba clínica en humanos para el tratamiento de eritromelalgia primaria/hereditaria (IEM)

La Eritromelalgia Primaria/Hereditaria (IEM, *en inglés*) es una rara condición dolorosa hereditaria. La causa subyacente de la IEM puede ser una o más mutaciones de ganancia de función (*gain-of-function*) en el canal de sodio regulado por voltaje $Na_v1.7$, el cual se ha demostrado que es inhibido por el (*S*)-enantiómero de la invención.

Los pacientes humanos con IEM tienen episodios recurrentes de intenso dolor quemante asociado con enrojecimiento y calentamiento de manos y pies, pero eventualmente el dolor se hace constante. El dolor se calma enfriando pero ha sido largamente resistente a la intervención farmacológica. Sin embargo, hay reportes de bloqueadores de canales de sodio regulados por voltaje que muestran alivio de moderado a sobresaliente para esta condición.

Una prueba clínica para determinar la eficacia del (*S*)-enantiómero de la invención en mejorar o aliviar la IEM puede diseñarse para que sea un estudio de tres períodos, doble-ciego, de dosis múltiple y entrecruzamiento cromosómico (*cross-over*) para minimizar la tasa de abandonos de los participantes, y tomará en consideración que los pacientes inscritos sólo estarán disponibles para un estudio de 10 días. Cada paciente inscrito en el estudio servirá como su propio control, al recibir el placebo y los 400 mg del (*S*)-enantiómero de la invención dos veces al día en un modo de entrecruzamiento cromosómico (*cross-over*).

EJEMPLO BIOLÓGICO 9

Prueba clínica en humanos para el tratamiento del dolor dental

El propósito de esta prueba clínica fue comparar la seguridad y eficacia (al comienzo, duración del alivio, y eficacia general) de una dosis única de 500 mg del (S)-enantiómero versus una dosis de un placebo para aliviar dolor luego de la extracción de un tercer molar.

Se inscribieron sesenta y un sujetos en el estudio. La edad media de los sujetos fue de 20,4 años y todos machos. La mayoría de los sujetos eran caucásicos (95,1%).

La severidad y el alivio del dolor se midió usando una Escala de Calificación Numérica de Intensidad de Dolor de 11 puntos (graduada desde 0= cero dolor en absoluto hasta 10= peor dolor imaginable) (PINRS, *en inglés*) y una Escala de Alivio Categórico del Dolor de 5 puntos (REL, *en inglés*). Los sujetos pasaron la prueba PINRS después de la cirugía pero antes de la administración del (S)-enantiómero de la invención. Se derivaron variables de eficacia de las calificaciones REL y PINRS, incluyendo alivio total de dolor (TOTPAR, *en inglés*), diferencia en intensidad de dolor (PID, *en inglés*) y diferencia de intensidad de dolor sumada (SPID, *en inglés*). Se evaluaron en los puntos temporales a las 4, 6, 8 y 12 horas después de la administración del (S)-enantiómero de la invención.

Sin embargo, los puntos finales primarios y todos los secundarios mostraron una tendencia consistente con una clara separación entre el (S)-enantiómero y el placebo. Estos resultados sugieren que el (S)-enantiómero tiene propiedades analgésicas pero no se obtuvo una significancia estadística del placebo debido a dos razones: (1) una relativamente alta respuesta al placebo, y (2) el lento arranque de la acción del (S)-enantiómero. El modelo dental utilizado está diseñado para y se ajusta mejor a la evaluación de drogas de rápido arranque como la clase de agentes antiinflamatorios NSAID. Resultó evidente de este estudio que el (S)-enantiómero de la invención no tiene una actividad de arranque rápido como el NSAID. Sin embargo, el alivio del dolor que mostraron aquellos sujetos que recibieron el (S)-enantiómero fue mayor en comparación con los sujetos que sólo recibieron el placebo, lo suficiente como para que la eficacia en la población total mostrara una señal analgésica consistente en todos los puntos

finales evaluados.

EJEMPLO BIOLÓGICO 10

Pruebas clínicas en humanos de la Seguridad del (S)-enantiómero de la Invención

Esta prueba clínica fue la Fase 1, aleatoria, doble ciega, controlada por placebo, de un estudio en sujetos sanos para evaluar la seguridad y la farmacocinética de un ungüento aplicado tópicamente contentivo del (S)-enantiómero de la invención.

El ungüento con (S)-enantiómero se aplicó diariamente durante 21 días consecutivos para determinar la toxicidad/irritancia local del (S)-enantiómero. También se evaluaron la farmacocinética y niveles locales de droga. Se evaluaron la exposición sistémica al (S)-enantiómero después de aplicaciones tópicas y la irritación local después de múltiples dosis del ungüento con (S)-enantiómero. Cada sujeto recibió 5 tratamientos en 21 días consecutivos: (S)-enantiómero como ungüento con 4% y 8% (p/p) (1 x 100 µL; Tratamientos A and B, respectivamente), placebo en ungüento (Tratamiento C), solución salina al 0,9% (1 x 100 µL; control negativo; Tratamiento D), y una solución de sodio lauril sulfato al 0,1% (SLS, *en inglés*) (1 x 100 µL; control positivo; tratamiento E). Los tratamientos fueron aplicados en dos sitios diferentes en la parte alta de la espalda de cada sujeto en sitio cerrado (5 tratamientos) y en sitio parcialmente cerrado (los tres primeros tratamientos). La localización para cada tratamiento en cada sitio (Tratamientos A, B, C, D, y E en sitio cerrado y tratamientos A, B, y C en sitio parcialmente cerrado) fue aleatoria (*ramdomised*). Los sujetos fueron confinados en las instalaciones de las investigaciones clínicas desde aproximadamente 18 horas antes de la primera dosis el Día 1 hasta aproximadamente 8 horas después de la segunda dosis (Día 2). Los sujetos regresaron cada día durante 19 días continuos (Días 3 al 21) para las dosis y procedimientos de estudio.

No se reportaron Eventos Adversos Serios (SAE, *en inglés*) o muertes. Todos los Eventos Adversos (AE, *en inglés*) fueron de severidad menor o moderada, estando la mayoría de los AE relacionados con reacciones locales de la piel debidos a la cinta adhesiva usada para cerrar los vendajes. Todos los sujetos reaccionaron al control positivo. El control positivo se detuvo en

todos los sujetos el Día 4 luego de quejas por excesivas molestias planteadas por los sujetos. Las calificaciones por irritación de la piel fueron bajas para todos los tratamientos administrados (la mayor calificación fue de 3 en una escala del 0-7) lo que indicó que el ungüento de (S)-enantiómero fue bien tolerado localmente. No se vio ninguna diferencia entre las calificaciones acumulativas de irritación por el (S)-enantiómero al 4% (p/p), el (S)-enantiómero al 8% (p/p), los ungüentos placebo y el control negativo (solución salina al 0,9%). Las señales de irritación se habían resuelto completamente para el Día 28 (7 días después de la última dosis) en la mayoría de los sujetos.

Las trazas del electrocardiograma no mostraron cambios clínicos significativos en el pulso, estado de reposo quiescente, o intervalos QT_c de los sujetos, ni ningún cambio clínico significativo en relación con la línea de base en los signos vitales de los sujetos, exámenes físicos o evaluaciones de laboratorio. La exposición sistémica al (S)-enantiómero fue descartable, dado que las concentraciones de (S)-enantiómero en plasma estuvieron por debajo del límite de cuantificación (LLOQ) (0,1 ng/mL o 100 pg/mL) en la mayoría de las muestras (489 de 546 = ~90%). El nivel más alto observado de (S)-enantiómero en un sujeto durante el período de dosificación (Día 22) fue de 994 pg/mL. Basados en la irritación local mínima y el perfil de seguridad favorable, junto con la baja exposición sistémica del (S)-enantiómero, se concluyó que el (S)-enantiómero de la invención fue bien tolerado y seguro como analgésico tópico.

EJEMPLO BIOLÓGICO 11

Pruebas clínicas en humanos para el tratamiento de la neuralgia post-herpética

La Neuralgia Post-Herpética (PHN, *en inglés*) es un modelo bien establecido y bien reconocido para el estudio de dolor neuropático. Más aún, el PHN muestra una fuerte evidencia de eficacia por bloqueadores de canales de sodio. El siguiente estudio representa un estudio aleatorio, doble ciego, controlado por placebo, de dos tratamientos, de entrecruzamiento cromosómico (*cross-over*) de dos períodos, para evaluar la seguridad, tolerabilidad, eficacia primaria y exposición sistémica al (S)-enantiómero de la invención administrado tópicamente a pacientes con PHN. Los objetivos primarios son (a) comparar la seguridad y eficacia de un

75

ungüento que contiene el (S)-enantiómero con las de un placebo, en el alivio de dolor en pacientes con PHN, y (b) evaluar la extensión de la exposición sistémica del (S)-enantiómero luego de la aplicación tópica del (S)-enantiómero a pacientes con PHN. Los tratamientos consistirán del ungüento de (S)-enantiómero al 8% (p/p) y el correspondiente ungüento placebo.

5 El estudio incluirá los siguientes cuatro períodos:

1. Un período inicial de filtrado y lavado (hasta 3 semanas);
2. Un período monociego y con placebo (1 semana);
3. Un período de tratamiento de entrecruzamiento cromosómico (*cross-over*) que consistirá en 2 períodos de tratamiento cada uno de 3 semanas separadas por 2 semanas de corridas de lavado/monociego (un total de 8 semanas); y
4. Un período de seguimiento de seguridad (2 semanas).

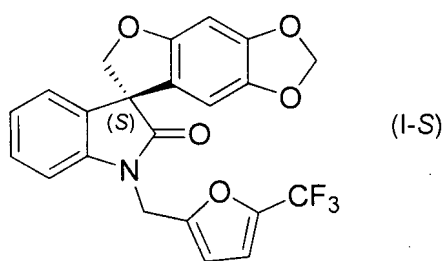
* * * * *

15 Aunque la invención precedente se ha descrito en cierto detalle para facilitar su comprensión, resultará evidente que algunos cambios y modificaciones pueden ser realizadas dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. En consecuencia, las presentaciones descritas deben considerarse como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no debe ser limitada a los detalles aquí divulgados, sino que puede ser modificada dentro del alcance y equivalentes de las reivindicaciones anexas.

76

REIVINDICACIONES

1. El (*S*)-enantiómero de 1'-{[5-(trifluorometil)furan-2-il]metil}spiro[furo [2,3-*f*][1,3]benzodioxol-7,3'-indol]-2'(1'*H*)-ona, que tiene la siguiente fórmula (I-S):



o un solvato del mismo que sea aceptable farmacéuticamente.

2. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el (*S*)-enantiómero de la Reivindicación 1, o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

76

78

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants : Mikhail Chafeev, Jianmin Fu and Jean-Jacques Cadieux
Application No. : 12/825168
Filed : June 28, 2010
For : ENANTIOMERS OF SPIRO-OXINDOLE COMPOUNDS AND
THEIR USES AS THERAPEUTIC AGENTS

Examiner : Anna Pagonakis
Art Unit : 1628
Docket No. : 980057.472
Date : January 27, 2012

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner for Patents:

DECLARATION OF JEAN-JACQUES CADIEUX UNDER 37 CFR 1.132

I, Jean-Jacques Cadieux, do hereby declare that:

1. I am a Canadian citizen, presently residing at #7-5090 Hastings Street, Burnaby, British Columbia V5B 1P6, Canada.
2. I am a named inventor of the invention disclosed in the above-identified patent application.
3. I received my Ph.D. degree in Synthetic Organic Chemistry ("Synthesis of *centro*-substituted Triquinacene Derivatives") at Simon Fraser University in Burnaby, British Columbia, Canada in 2004, and my B.Sc. degree at the University of Ottawa, Ottawa, Canada in 1999.
4. Since 2004, I have been employed at Xenon Pharmaceuticals Inc. (Xenon), the assignee of record of the above-identified U.S. patent application, in Burnaby, British Columbia, Canada. My current duties as Project Manager are to develop and maintain detailed

72

project plans and critical timelines for Xenon's research projects. My previous duties as a Research Scientist at Xenon included 1) identifying the most promising research compounds and ensuring their smooth progression through the project timeline; 2) acting as the main liaison between Xenon's Chemistry Department and other relevant departments; 3) ensuring adequate compound supply for *in vivo* studies; and 4) providing technical and administrative guidance to colleagues and senior management as needed. Additional duties included the design, synthesis and optimization of selective small-molecule sodium channel blockers for pain management; the elucidation of the structure-activity relationship (SAR) of lead compounds and the development of large scale syntheses of same.

5. I am a co-author of the following publications:

- (1) Cadieux, J.A.; Zhang, Z.; Mattice, M.; Brownlie-Cutts, A.; Fu, J.; Ratkay, L.G.; Kwan, R.; Thompson, J.; Sanghara, J.; Zhong, J.; Goldberg, Y.P. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Pyrazoles as Blockers of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 90-95.
- (2) Chowdhury, S.; Chafeev, M.; Liu, S.; Sun, J.; Raina, V.; Chui, R.; Young, W.; Fu, J.; Cadieux, J.A. Discovery of XEN907, a Spirooxindole Blocker of Nav1.7 for the Treatment of Pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 3676-3681.
- (3) Oballa, R.M.; Carson, R.; Lait, S.; Cadieux, J.A.; Robichaud, J. Total Syntheses of the Sesquiterpenoids (+)-*trans*-Dracunculifoliol and (+)-4-Hydroxyoppositan-7-one. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2761-2766.
- (4) Pettigrew, J.D.; Cadieux, J.A.; So, S.S.S.; Wilson, P.D. Phenylboronic Acid Mediated Triple Condensation Reactions of Phloroglucinol and Unsaturated Carbonyl Compounds. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 467-470.
- (5) Cadieux, J.A.; Buller, D.B.; Wilson, P.D. A Versatile Route to Centro-Substituted Triquinacene Derivatives: Synthesis of 10-Phenyltriquinacene. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3983-3986.

6. All of the assays described within this Declaration were performed in Canada and was performed by, on behalf of or under the supervision of the joint inventors named in the above-identified patent application.

78

7. Guanidine Influx Assay

The compounds disclosed in the above-identified patent application, *i.e.*, the compound of formula (I), the (*S*)-enantiomer of the compound of formula (I) and the (*R*)-enantiomer of the compound of formula (I), were tested in the *in vitro* guanidine influx assay described in Biological Example 1 of the above-identified patent application for their effectiveness in inhibiting the activity of *hNa_v1.7*, a voltage-gated sodium channel of interest.

8. Results and Discussion

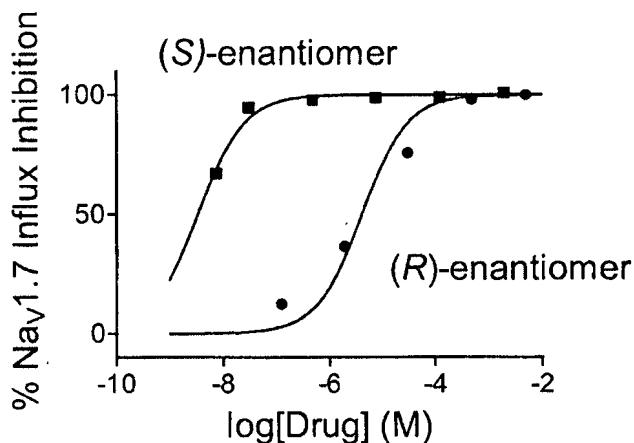
The compounds, when tested in this assay, demonstrated voltage-gated sodium channel blocking activity against *hNa_v1.7* as set forth below in Table 1 wherein "(I)" is the compound of formula (I) as described in the specification, "(I-*R*)" is the (*R*)-enantiomer of the compound of formula (I) and "(I-*S*)" is the (*S*)-enantiomer of the compound of formula (I):

Table 1

Compound	Chemical Name	IC ₅₀ (μM)
(I)	1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3- <i>f</i>][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	0.007
(I- <i>R</i>)	(<i>R</i>)-1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3- <i>f</i>][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	4.200
(I- <i>S</i>)	(<i>S</i>)-1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3- <i>f</i>][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	0.003

The concentration-response relationship for the (*S*)-enantiomer and the (*R*)-enantiomer when tested in this assay is shown in Figure 1 of the above-identified patent application, which is reproduced below:

Figure 1: Stereoselective Block of Guanidinium Influx in $hNa_v1.7$



The solid curves in Figure 1 above indicate the least-squares best fit to a 1:1 binding isotherm; the IC_{50} 's that define these curves are given above in Table 1.

The results of this assay demonstrate that the (S)-enantiomer has a significantly higher (*i.e.*, >1000-fold) inhibition potency against $hNa_v1.7$ when compared to the inhibition potency of the corresponding (R)-enantiomer. Accordingly, these results favor the use of the (S)-enantiomer of the invention over the (R)-enantiomer or the compound of formula (I) for treating disease or conditions ameliorated or alleviated by the inhibition of $hNa_v1.7$ in that a greater pharmacological activity may be achieved at a lower dose with possibly fewer side effects due to the inhibition of non- $hNa_v1.7$ sodium channels.

9. Electrophysiological Assay

The compounds disclosed in the above-identified patent application, *i.e.*, the compound of formula (I), the (S)-enantiomer of the compound of formula (I) and the (R)-enantiomer of the compound of formula (I), were tested in the *in vitro* electrophysiological assay described in Biological Example 2 of the above-identified patent application for their affinity for the rested/closed state and the inactivated state of $hNa_v1.7$, a voltage-gated sodium channel of interest.

10. Results and Discussion

The compounds, when tested in this assay, demonstrated affinities for the rested/closed state (K_r) and the inactivated state (K_i) of hNa_v1.7 as set forth below in Table 2:

Table 2

Compound	Chemical Name	K_i (μ M)	K_r (μ M)
(I)	1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	0.142	> 10 μ M
(I- <i>R</i>)	(<i>R</i>)-1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	0.869	> 10 μ M
(I- <i>S</i>)	(<i>S</i>)-1'-{[5-(trifluoromethyl)furan-2-yl]methyl}spiro[furo[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one	0.161	> 10 μ M

These results demonstrate that the (*S*)-enantiomer has a low affinity for the rested/closed state of hNa_v1.7 and a high affinity for the inactivated state of hNa_v1.7. The results further demonstrate that the (*S*)-enantiomer is about 5 times more potent in binding to the inactivated state of hNa_v1.7 than the (*R*)-enantiomer and that the (*S*)-enantiomer is primarily responsible for the potency of the compound of formula (I).

11. CFA Induced Chronic Inflammatory Pain Assay

The (*S*)-enantiomer of the compound of formula (I) and the (*R*)-enantiomer of the compound of formula (I) were tested in the *in vivo* CFA induced chronic inflammatory pain assay described in Biological Example 3 of the above-identified patent application for their analgesic effect at the oral doses described therein.

12. Results and Discussion

The compounds, when tested in this assay, demonstrated an analgesic effect as set forth in Table 3¹ below:

Table 3

Compound	Dose Level (mg/kg)	Plasma concentration (µM)	Mean % increase from baseline
(I-S)	0	0	-3.2
(I-S)	10	0.20	18.1
(I-S)	30	0.68	38.9
(I-S)	100	2.12	77.8
(I-S)	200	3.30	67.4
(I-R)	0	0	0.5
(I-R)	10	0.43	-7.0
(I-R)	30	2.74	7.4
(I-R)	100	14.42	10.3
(I-R)	200	22.54	17.0

The results in Table 3 demonstrate that the (S)-enantiomer had a greater maximal effect when dosed at 100 - 200 mg/kg. However, the (R)-enantiomer achieved a much higher plasma concentration at equivalent doses. This is an unexpected and unusual finding. As a consequence, the use of the racemate, *i.e.*, the compound of formula (I), would result in about a 10-fold excess of the inactive (R)-enantiomer. Therefore, the use of the (S)-enantiomer alone would greatly improve the likelihood of obtaining an analgesic effect without encountering adverse side effects due to the non-selective activity of the (R)-enantiomer.

14. Permeability Assay

In order for a drug to be effective when delivered through an oral route of administration, it must be effectively absorbed through the intestinal epithelium. An *in vitro* assessment of a compound's intestinal permeability can be afforded by employing the human colon adenocarcinoma-derived cell line Caco-2. In this assay, a differentiated enterocyte-like

¹ The data presented in Table 3 was the basis for Figure 2 in the application as originally filed.

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132

Application No. 12/825,168

Page 7 of 11

monolayer of Caco-2 cells possessing barrier function is cultured in a serum-free environment. A solution of the test compound is then introduced to the apical side of the monolayer and, after a 2 h incubation period, the concentrations of test compound on both sides of the Caco-2 monolayer are determined by LC/MS/MS analysis. From these concentration data, the apparent permeability P_{app} of a test compound across the monolayer in the apical-to-basolateral direction (indicative of compound influx from the GI tract to the systemic circulation) can be calculated. In a similar manner, a solution of the same test compound is then introduced to the basolateral side of the monolayer and concentrations on both sides of the membrane are determined after incubation. This in turn allows the basolateral-to-apical compound P_{app} (indicative of compound efflux from the systemic circulation to the GI tract) to be determined. The ratio of [P_{app} (apical to basolateral) / P_{app} (basolateral to apical)] is known as the P_{app} ratio. Compounds having lower P_{app} ratios are associated with greater intestinal permeability and improved oral bioavailability.

Accordingly, the compound of formula (I), the (*S*)-enantiomer of the compound of formula (I) and the (*R*)-enantiomer of the compound of formula (I) were tested in this assay as follows:

Preparation of Solutions

A. Supplemented Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

To 500 mL of HBSS (Invitrogen, Grand Island, NY) was added 25 mM D-glucose (2.25 g) and 25 mM HEPES buffer solution (Invitrogen, Grand Island, NY) (12.5 mL). The solution's pH was adjusted to 7.4 with 1 M NaOH, filtered, sterilized and stored at 4 °C.

B. Basal seeding medium with Mito+ Serum Extender

One bottle of Mito+ Serum Extender (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was reconstituted with 500 μ L of autoclaved water. Reconstituted Mito+ Serum Extender (250 μ L) and fetal bovine serum (25 mL) (Invitrogen, Grand Island, NY) was then added

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132
Application No. 12/825,168
Page 8 of 11

to 250 mL of basal seeding medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The resulting solution was stored at 4 °C.

C. Entero-Stim Medium with Mito+ Serum Extender

One bottle of Mito+ Serum Extender was reconstituted with 500 µL of autoclaved water. Reconstituted Mito+ Serum Extender (250 µL) was then added to 250 mL of Entero-Stim medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The resulting solution was stored at 4 °C.

Caco-2 Cells – Seeding

The media from two 100% confluent 100 mm Petri dishes of Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) was aspirated and 1 mL of trypsin-EDTA (Invitrogen, Grand Island, NY) was added to each dish and aspirated. Fresh trypsin-EDTA (1 mL) was added to each dish and the dishes were incubated at 37 °C for approximately 2 minutes. Fetal bovine serum in Dubelcco's Modified Eagle Medium (9 mL, 20%) (Invitrogen, Grand Island, NY) was added to each dish to neutralize the trypsin. The contents of both dishes were transferred into a 50 mL conical tube, which was centrifuge for 5 minutes at 1000 rpm. The supernatant was aspirated and the cell pellet was resuspended in 10 mL of FBS Basal seeding media with Mito+Serum Extender. The cells were counted on a hemocytometer and resuspended to a final concentration of 4×10^5 cells/mL using Basal seeding medium with Mito+ Serum Extender. The cell suspension was mixed thoroughly and 0.5 mL of the cell suspension was transferred to each of the 24 well inserts of a Biocoat HTS Caco-2 Assay System plate insert (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). FBS Basal seeding media (30 mL) was added to the multiwell feeder tray and the tray was incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 100% relative humidity for 24 h.

Caco-2 Cells – Differentiating

The FBS Basal seeding media was carefully aspirated from the multiwell feeder tray and the media was carefully aspirated from the plate insert. Entero-Stim medium with Mito+ Serum Extender (0.5 mL) was added to the interior of each insert. Entero-Stim medium with Mito+ Serum Extender (30 mL) was added to the multiwell feeder tray. The plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 100% relative humidity for 48 h.

The media was carefully aspirated from each insert. Fresh Entero-Stim medium with Mito+ Serum Extender (0.5 mL) was added to the interior of each insert. A portion (15 mL) of the media was withdrawn from the multiwell feeder tray. Fresh Entero-Stim medium with Mito+ Serum Extender (15 mL) was added to the multiwell feeder tray and the tray was incubated at 37 °C, 5% CO₂ and 100% relative humidity for 24 h.

Preparation of Compounds

The test compounds were prepared from dry powder as 20 mM stock solutions in *N,N*-dimethylsulfoxide (DMSO) and 5 µL of each stock solution was transferred to a glass vacutainer tube. Supplemented Hanks' balanced salt solution (4 mL) was added to each vacutainer tube and the tubes were mixed on a vortex mixer, placed in a 37 °C water bath for 10 minutes and centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes.

Permeability Assay

On a new 24-well plate, 600 µL of Supplemented Hanks' balanced salt solution was added, in triplicate, to the left-hand side of the plate for testing apical-to-basolateral permeability and 600 µL of each test compound solution was added, in triplicate, to the right hand side of the plate for testing basolateral-to-apical permeability.

The insert plates containing the Caco-2 cell monolayers were removed from the incubator. The media from the inserts and feeder tray were gently removed by decantation. The inserts were placed on the 24-well plate. A test compound solution

85

(200 μ L) was added, in triplicate, to the inserts on the left hand side of the plate and 200 μ L of Supplemented Hanks' balanced salt solution was added, in triplicate, to the right hand side of the plate. The plates were covered and incubated with shaking for 2 h at 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ and 100% relative humidity. Without disturbing the cell monolayer, 100 μ L of solution from each insert was transferred into a new 96-well plate. HPLC-grade acetonitrile (500 μ L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, containing 0.1% v/v formic acid) was added to each well, the plate was mixed by vortexing and the results were analyzed by LC/MS/MS.

Results and Discussion

The compounds, when tested in this assay, demonstrated P_{app} ratios as set forth below in Table 4:

Table 4

Compound	Chemical Name	P_{app} (apical to basolateral) ($\times 10^{-6}$ cm/s)	P_{app} (basolateral to apical) ($\times 10^{-6}$ cm/s)	P_{app} ratio
(I)	1'-{[5-(trifluoromethyl)-furan-2-yl]methyl}spiro[furo-[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1'H)-one	1.68	2.09	1.25
(I-R)	(R)-1'-{[5-(trifluoromethyl)-furan-2-yl]methyl}spiro[furo-[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1'H)-one	3.57	4.30	1.20
(I-S)	(S)-1'-{[5-(trifluoromethyl)-furan-2-yl]methyl}spiro[furo-[2,3-f][1,3]benzodioxole-7,3'-indol]-2'(1'H)-one	2.45	2.06	0.84

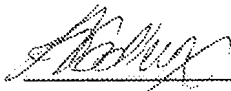
These results demonstrate that the (S)-enantiomer exhibited a 49% improvement in the P_{app} ratio with respect to the compound of formula (I) and the (R)-enantiomer of

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132
Application No. 12/825,168
Page 11 of 11

the compound of formula (I)². This is unexpected in that one skilled in the art would expect the P_{app} ratio for the compound of formula (I), i.e., the racemate, to be near the midpoint of the range between the P_{app} ratio of the (*S*)-enantiomer and the P_{app} ratio of the (*R*)-enantiomer.

15. In addition to the foregoing assays, the solubility of the compound of formula (I) and the (*S*)-enantiomer in various common solvents was analyzed, the results of which were presented in Biological Example 6 of the above-identified patent application. The results demonstrated that the (*S*)-enantiomer had a better solubility profile than the compound of formula (I). This property of the (*S*)-enantiomer would allow it to be formulated in fewer number of dosage units than the compound of formula (I), which would facilitate the dosing of patients to achieve optimal efficacy if needed.
16. In conclusion, the (*S*)-enantiomer demonstrated unexpected beneficial physiological properties when compared to the (*R*)-enantiomer and to the compound of formula (I).
17. I declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001, Title 18, United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of this application and any patent issuing therefrom.

Respectfully submitted,



Jean-Jacques Cadieux

Signed at Bromley, QC Canada this 30th day of January, 2012.

2087695_1.DOCX

² The P_{app} ratios of the compound of formula (I) and the (*R*)-enantiomer are equivalent within experimental error.

88

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants : Mikhail Chafeev, Jianmin Fu and Jean-Jacques Cadieux
Application No. : 12/825168
Filed : June 28, 2010
For : ENANTIOMERS OF SPIRO-OXINDOLE COMPOUNDS AND
THEIR USES AS THERAPEUTIC AGENTS

Examiner : Anna Pagonakis
Art Unit : 1628
Docket No. : 980057.472
Date : May 29, 2012

Mail Stop AF
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner for Patents:

SUPPLEMENTAL DECLARATION OF JEAN-JACQUES CADIEUX UNDER 37 CFR 1.132

I, Jean-Jacques Cadieux, do hereby declare that:

1. I am a Canadian citizen, presently residing at #7-5090 Hastings Street, Burnaby, British Columbia V5B 1P6, Canada.
2. I am a named inventor of the invention disclosed in the above-identified patent application.
3. I received my Ph.D. degree in Synthetic Organic Chemistry ("Synthesis of *centro*-substituted Triquinacene Derivatives") at Simon Fraser University in Burnaby, British Columbia, Canada in 2004, and my B.Sc. degree at the University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada in 1999.
4. Since 2004, I have been employed at Xenon Pharmaceuticals Inc. (Xenon), the assignee of record of the above-identified U.S. patent application, in Burnaby, British Columbia, Canada. My current duties as Project Manager are to develop and maintain detailed

88

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132

Application No. 12/825,168

Page 2 of 9

project plans and critical timelines for Xenon's research projects. My previous duties as a Research Scientist at Xenon included 1) identifying the most promising research compounds and ensuring their smooth progression through the project timeline; 2) acting as the main liaison between Xenon's Chemistry Department and other relevant departments; 3) ensuring adequate compound supply for *in vivo* studies; and 4) providing technical and administrative guidance to colleagues and senior management as needed. Additional duties included the design, synthesis and optimization of selective small-molecule sodium channel blockers for pain management; the elucidation of the structure-activity relationship (SAR) of lead compounds and the development of large scale syntheses of same.

5. I am a co-author of the following publications:

- (1) Cadieux, J.A.; Zhang, Z.; Mattice, M.; Brownlie-Cutts, A.; Fu, J.; Ratkay, L.G.; Kwan, R.; Thompson, J.; Sanghara, J.; Zhong, J.; Goldberg, Y.P. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Pyrazoles as Blockers of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 90-95.
- (2) Chowdhury, S.; Chafeev, M.; Liu, S.; Sun, J.; Raina, V.; Chui, R.; Young, W.; Fu, J.; Cadieux, J.A. Discovery of XEN907, a Spirooxindole Blocker of Nav1.7 for the Treatment of Pain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 3676-3681.
- (3) Oballa, R.M.; Carson, R.; Lait, S.; Cadieux, J.A.; Robichaud, J. Total Syntheses of the Sesquiterpenoids (+)-*trans*-Dracunculifoliol and (+)-4-Hydroxyoppositan-7-one. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2761-2766.
- (4) Pettigrew, J.D.; Cadieux, J.A.; So, S.S.S.; Wilson, P.D. Phenylboronic Acid Mediated Triple Condensation Reactions of Phloroglucinol and Unsaturated Carbonyl Compounds. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 467-470.
- (5) Cadieux, J.A.; Buller, D.B.; Wilson, P.D. A Versatile Route to Centro-Substituted Triquinacene Derivatives: Synthesis of 10-Phenyltriquinacene. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3983-3986.

6. All of the assays described within this Declaration were performed by, on behalf of or under the supervision of the joint inventors named in the above-identified patent application.

7. The *Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132* ("first Declaration"), filed herein on January 27, 2012, described several assays which demonstrated the unexpected superior activity of the (*S*)-enantiomer over the activity of the compound of formula (I), *i.e.*, the "racemate" (as both are described in the above-identified patent application). A summary of these assays and their results follows.

a. Guanidine Influx Assay

The results of this assay demonstrated that the (*S*)-enantiomer has a significantly higher (*i.e.*, >1000-fold) inhibition potency against hNa_v1.7 when compared to the inhibition potency of the corresponding (*R*)-enantiomer (as described in the above-identified patent application) and a 2-fold inhibition potency when compared to the racemate.

Accordingly, these results favor the use of the (*S*)-enantiomer of the invention over the (*R*)-enantiomer and the racemate for treating disease or conditions ameliorated or alleviated by the inhibition of hNa_v1.7 in that a greater pharmacological activity may be achieved at a lower dose.

b. Electrophysiological Assay

The results demonstrated that the (*S*)-enantiomer has a low affinity for the rested/closed state of hNa_v1.7 and a high affinity for the inactivated state of hNa_v1.7. The results further demonstrate that the (*S*)-enantiomer is about 5 times more potent in binding to the inactivated state of hNa_v1.7 than the (*R*)-enantiomer and that the (*S*)-enantiomer is primarily responsible for the potency of the racemate.

c. CFA Induced Chronic Inflammatory Pain Assay

The results demonstrated that the (*S*)-enantiomer had a greater maximal effect when dosed at 100 - 200 mg/kg. However, the (*R*)-enantiomer achieved a much higher plasma concentration at equivalent doses. This was an unexpected and unusual finding. As a consequence, the use of the racemate would result in about a 10-fold excess of the inactive (*R*)-enantiomer. Therefore, the use of the (*S*)-enantiomer alone would greatly

improve the likelihood of obtaining an analgesic effect without encountering adverse side effects due to the non-selective activity of the (*R*)-enantiomer.

d. Permeability Assay

The results demonstrated that the (*S*)-enantiomer exhibited a 49% improvement in the P_{app} ratio with respect to the racemate and the (*R*)-enantiomer of the compound of formula (I)¹. This is unexpected in that one skilled in the art would expect the P_{app} ratio for the racemate to be near the midpoint of the range between the P_{app} ratio of the (*S*)-enantiomer and the P_{app} ratio of the (*R*)-enantiomer.

8. Solubility in Pharmaceutical Excipients

It is well-known in the art that formulating a pharmaceutical agent with one or more pharmaceutically-acceptable excipients can be beneficial for the pharmaceutical agent's delivery. The pharmaceutical agent's solubility in such excipients is often a limiting factor in achieving an optimal dosage form for the pharmaceutical agent. For instance, poor solubility of a pharmaceutical agent in an excipient can restrict the maximal drug loading of the pharmaceutical agent in a dosage form and/or can lead to undesirable stability events such as precipitation of the pharmaceutical agent on storage.

As described in Biological Example 6 in the above-identified patent application and noted in the first Declaration, the (*S*)-enantiomer displayed significantly greater solubility when compared to the solubility of the racemate. Thus, the (*S*)-enantiomer can be formulated in a fewer number of dosage units than the racemate. This property facilitates dosing patients at a higher level if needed to achieve efficacy.

To determine the stability of capsule formulations containing the racemate and the (*S*)-enantiomer, capsule formulations of the racemate and the (*S*)-enantiomer were prepared in different dosage amounts, *e.g.*, 1 mg, 2 mg, 10 mg, *etc.*, utilizing different pharmaceutically-acceptable excipients and combinations thereof. Each capsule

¹ The P_{app} ratios of the compound of formula (I) and the (*R*)-enantiomer are equivalent within experimental error.

92

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132

Application No. 12/825,168

Page 5 of 9

formulation was then evaluated for stability by subjecting the capsules to prolonged storage (24 months) in climate-controlled, certified chambers under two different conditions (25 ± 2 °C/ $60\% \pm 5\%$ relative humidity and 40 ± 2 °C/ $75\% \pm 2\%$ relative humidity). At specified intervals during the prolonged storage (*i.e.*, at 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months), a sample of the capsules was removed from the stability chamber and analyzed for physical appearance, potency, purity, content uniformity/homogeneity and dissolution rate.

Of the capsule formulations tested for the racemate, which included capsule formulations comprising 60 mg of racemate, capsule formulations comprising 10 mg of racemate, 250 mg of LabrasolTM, 200 mg of GelucireTM 44/14 and 50 mg of propylene glycol exhibited the maximum stability for capsule formulations comprising the racemate. In contrast, capsule formulations comprising 100 mg of the (*S*)-enantiomer, 484 mg of LabrasolTM, 157 mg of Cremophor ELP®, 75 mg of Imwitor® 742 and 18 mg of Vitamin E liquid USP exhibited the desired stability characteristics (100 mg was the highest strength tested for the (*S*)-enantiomer). This difference in stability between capsule formulations comprising the racemate and capsule formulations comprising the (*S*)-enantiomer was a direct result of the (*S*)-enantiomer's superior solubility in pharmaceutically-acceptable excipients, as disclosed in Biological Example 6 in the above-identified patent application and as further described below.

The saturated solubilities of the racemate and the (*S*)-enantiomer, expressed in terms of percentage by weight (% w/w) of the racemate and the (*S*)-enantiomer in a variety of pharmaceutically-acceptable excipients, are as set forth below in Table 1.

92

Table 1

Excipient	Saturated solubility (% w/w) at 25 °C	
	Racemate	(S)-Enantiomer
benzyl alcohol	4.8%	24.2%
Cremophor EL® (perethoxylated castor oil)	1.9%	> 20%
Labrasol® (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides)	6.0%	> 20%
poly(ethylene glycol) 400	0.9%	4.8%
Ethanol	1.2%	4.6%
propylene glycol	0.5%	0.9%

The saturated solubilities of the racemate and the (S)-enantiomer presented above were determined by stirring a suspension of each compound (above its saturated solubility limit), by centrifuging the suspension at high speed (e.g., 14,000 rpm) and by analyzing the supernatant by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The above results demonstrated that the (S)-enantiomer was significantly more soluble in a broad range of pharmaceutically-acceptable excipients than the corresponding racemate. These results are not only unexpected in that it is not possible to predict *a priori* whether a racemate or a pure enantiomer thereof will have greater solubility (see, for example, Lorenz, H. and Seidel-Morgenstern, A. *Thermochemica Acta* **2002**, 382, 129-142, Figure 4 at 136; where the pure enantiomer is less soluble than the racemate), they also permit a wider range of formulations which can be employed for the (S)-enantiomer as compared to the racemate.

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132
Application No. 12/825,168
Page 7 of 9

9. Inhibition of Cytochrome P450 Isoform 2D6 (CYP2D6)

The xenobiotic metabolizing enzyme cytochrome P450 isoform 2D6 (CYP2D6) is responsible for the metabolism of several marketed drugs, including paroxetine (Paxil®), propafenone (Rythmol®), venlafaxine (Effexor®) and fluoxetine (Prozac®). It is well-known in the art that drugs which inhibit CYP2D6 can lead to clinically significant drug-drug interactions arising from abnormal increases in plasma concentrations of the CYP2D6 substrate (the "victim drug") engendered by blockade of CYP2D6 by the inhibitor (the "perpetrator drug"). As such, inhibition of CYP2D6 by a drug candidate is problematic from a development point-of-view and is generally considered to be an undesirable property (for a review describing medicinal chemistry efforts directed towards removing CYP2D6 inhibition liabilities, see: Le Bourdonnec, B. and Leister, L.K., *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3093-3121).

Several liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods are known for determining whether a drug/compound is an inhibitor of CYP2D6 as well as the extent of any inhibition found. Such methods incubating the CYP2D6 substrate bufuralol (both in the presence and in the absence of the drug/compound) with a known amount of liver microsomal protein (which contains, *inter alia*, CYP2D6) (see Dierks, E.A. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 23-29 and Weaver, R. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 955-966). The CYP2D6-mediated conversion of bufuralol to 1-hydroxybufuralol during the incubation is then determined by LC-MS. A decrease in this conversion is indicative of inhibition of CYP2D6 by the tested drug/compound.

The results from testing the racemate and the (*S*)-enantiomer in a LC/MS-based CYP2D6 inhibition assay are set forth below in Table 2:

Table 2

Percentage inhibition of CYP2D6 at a concentration of 10 μ M	
Racemate	(S)-Enantiomer
75.4 $\pm$ 10.7%	29.1 $\pm$ 0.9%

The above results demonstrated that the (S)-enantiomer is a significantly weaker inhibitor of CYP2D6 than the racemate. This unexpected result renders the (S)-enantiomer far less likely to cause a clinically significant drug-drug interaction than the corresponding racemate.

Moreover, the data presented in the above-identified patent application as well as in the first Declaration demonstrate that the activity against *hNav1.7* observed for the racemate largely resides in the (S)-enantiomer. In view of the data presented in Table 2 above, administration of a given amount of the active (S)-enantiomer as opposed to administration of twice that amount of the racemate would lead to equivalent efficacy while dramatically reducing the extent of CYP2D6 inhibition.

10. In conclusion, the (S)-enantiomer demonstrated unexpected beneficial properties when compared to the racemate.
11. We are aware that the Examiner contends that the superior activities of the (S)-enantiomer in view of the racemate would be expected, given the superior activity of the (S)-enantiomer in view of the racemate in the guanidine influx assay. Such is not the case. One skilled in the art would not necessarily expect that the (S)-enantiomer would possess superior activity as compared to the racemate in the electrophysiological assay because the electrophysiological assay, unlike the guanidine influx assay, does not rely upon voltage-gated channel modulators (which in turn may alter channel pharmacology) to induce a sustained influx of sodium ions. In addition, one skilled in the art would not necessarily expect that the (S)-enantiomer would possess superior properties as compared to the racemate in the solubility assay as examples where a given enantiomer is less

Declaration of Jean-Jacques Cadieux under 37 CFR 1.132
Application No. 12/825,168
Page 9 of 9

soluble (*i.e.*, inferior) than its corresponding racemate are known in the art (see, for example, Lorenz, H. and Seidel-Morgenstern, A. *Thermochemica Acta* **2002**, 382, 129-142, Figure 4 at 136). Finally, one skilled in the art would not necessarily expect that the (S)-enantiomer would possess superior properties (*i.e.*, lower inhibition) as compared to the racemate in the CYP2D6 inhibition assay because examples where a given enantiomer is a more potent CYP2D6 inhibitor (*i.e.*, inferior) than its corresponding racemate are known in the art (see, for example, Shin, J.G., Kane, K. and Flockhart, D.A. *Br. J. Pharm.* **2001**, 51, 45-52, Table 1 at 48).

12. I declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001, Title 18, United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of this application and any patent issuing therefrom.

Respectfully submitted,



Jean-Jacques Cadieux

Signed at Barrabá, Bogotá, Colombia this 29th day of May, 2012.

2189130_1.DOCX



Thermochimica Acta 382 (2002) 129–142

thermochimica
acta

www.elsevier.com/locate/tca

Binary and ternary phase diagrams of two enantiomers in solvent systems

Heike Lorenz*, Andreas Seidel-Morgenstern

Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Sandtorstraße 1, D-39106 Magdeburg, Germany

Received 17 April 2001; accepted 15 June 2001

Abstract

The binary phase diagram of the mandelic acid enantiomers and the binary and ternary phase diagrams of the same enantiomer(s) and water are studied as a typical enantiomeric system. The results of the experimental work performed are presented in detail and discussed both with regard to the applicability of different methods for solubility measurement and their importance for crystallization based enantioseparation. It will be shown that, in addition to classical methods differential scanning calorimetry (DSC) can be applied successfully for solubility determination. From the obtained phase diagrams various possibilities of gaining pure mandelic acid enantiomers from aqueous solutions are derived. The particular role of the eutectic composition in the enantiomeric system is emphasized. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Phase diagram; DSC; Solubility; Enantiomers; Mandelic acid

1. Introduction

The detailed knowledge of fundamental solid/liquid equilibrium (SLE) data expressed in phase diagrams is essential for designing and optimizing crystallization processes. On the basis of the appropriate phase diagram it can be decided, if (fractional) crystallization can be applied for the separation or purification of a certain product of interest. Further, suitable operating conditions of an appropriate crystallization process can be specified. This is important both for the production of large scale (bulk) chemicals and special chemicals produced only in “small” amounts. Since more than 50% of the pharmaceutical active substances are known to be chiral [1], processes for enantioseparation and for finally recovering the solid enantiomer from solution are of large interest.

Enantioseparation and racemate resolution are frequently performed by means of crystallization methods, as there are the manual sorting of the crystals (from conglomerates), resolution by entrainment (preferential crystallization), separation via diastereomeric salt formation and crystallization from optically active solvents [2–4]. Furthermore, fractional crystallization can be used to get pure enantiomers from asymmetric (enantiomerically enriched) mixtures. In general, a final crystallization step is usually necessary to gain the solid enantiomer from its more or less diluted solution, even if other methods (chromatography, asymmetric synthesis) have been applied for racemate resolution. Contrary to inorganic and organic bulk products, where thermodynamic data for construction of the required phase diagrams are mostly available, for enantiomeric systems there is usually a lack of corresponding data. For this reason, crystallization processes of chiral products are sometimes carried out without detailed data just on the basis of experience. The knowledge of

* Fax: +49-391-6117-562.

E-mail address: lorenz@mpi-magdeburg.mpg.de (H. Lorenz).

SLE data would help to optimize the process itself and, hence to increase the productivity.

The essential phase diagrams which have to be known are the binary melting point phase diagram describing the melting behavior of the two enantiomers, and for crystallization from solution, the binary pure enantiomer/solvent or the ternary two enantiomer/solvent solubility phase diagrams, describing the solubility behavior of the enantiomeric system in presence of a solvent.

Binary melting point phase diagrams are usually determined by thermoanalytical methods [5–7]. Particularly, differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) have proved to be capable of determining phase transitions and hence, these techniques are widely applied as analytical tools for pharmaceutical development [8–11]. The determination of phase diagrams by means of DSC has been reported for many years confirming its applicability and efficiency. Some examples from literature including recently published articles with the focus on designing crystallization processes are given in [12–14]. Generally, mixtures of different composition of the two components are prepared and the DSC curves resulting from a nonisothermal experiment using a low linear heating rate are measured. The melting points of pure substances are determined from the extrapolated onset temperature (T_o) of the melting effect [5,15]. For mixtures the solidus and liquidus line in the phase diagram are mostly taken from the extrapolated onset temperature T_o of the eutectic effect and the peak (T_p) [4,12,13] or extrapolated offset temperature (T_f) [16] of the dissolution effect of the excess component in the eutectic melt. However, the interpretation of DSC curves with respect to phase diagrams is not trivial at all. A comprehensive review on binary phase diagrams of chiral systems considering also reversible transitions which may occur between condensed phases (e.g. polymorphism, reversible decomposition of the racemate) was published recently by Coquerel [17].

The liquidus curve in the binary phase diagram of a chiral system can generally be predicted using a classical thermodynamic expression of the van't Hoff type, the so-called Schröder–van Laar equation [4]:

$$\ln(x\gamma) = \frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (1)$$

with x the mole-fraction of the enantiomer in excess ($0.5 \leq x \leq 1$ for conglomerates; $x_{eu} \leq x \leq 1$ for compound forming systems (x_{eu} —eutectic composition)), γ the activity coefficient of the enantiomer in the mixture, ΔH_m and T_m the melting enthalpy (J/mol) and melting temperature (K) of the pure enantiomer, T the temperature of the mixture and R is the universal gas constant (J/mol K).

For an ideal mixture the activity coefficient is unity and Eq. (1) reduces to

$$\ln x = \frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

Eqs. (1) and (2) represent the Schröder–van Laar equation in its simplified form neglecting the heat capacity term, which was found to be negligible in the case of enantiomers [4]. In the case of (ideal) compound forming enantiomeric systems the racemate branch in the phase diagram ($0.5 \leq x \leq x_{eu}$) can be calculated according to the Prigogine–Defay equation [4,18]

$$\ln(4x(1-x)) = \frac{\Delta H_{m,rac}}{R} \left(\frac{1}{T_{m,rac}} - \frac{1}{T} \right) \quad (3)$$

which is formally comparable to Eq. (2) but takes the different stoichiometric conditions into account. Analogous to Eq. (1) x represents the mole fraction of one of the enantiomers; $T_{m,rac}$ and $\Delta H_{m,rac}$ being the melting temperature and melting enthalpy of the racemic compound.

Even more scarcely available than the melting point phase diagrams are solubility data for the enantiomeric systems in a suitable solvent leading to the ternary solubility phase diagram of the system (+)-enantiomer/(–)-enantiomer/solvent. The reason seems to be the significant time exposure necessary for classical solubility measurements and, in the case of value added products, the comparatively “large” sample amount required. For this reason, various efforts have been carried out to develop advanced experimental possibilities for solubility determination directed to decrease the sample amount and the time required for the experiments as well as to improve the accuracy of classical methods.

Capewell et al. [19] described a new “apparatus and procedure for the measurement of solubility of rapidly equilibrating solid–liquid systems to 90 °C”, which delivers solubilities for inorganic salts in water with an outstanding precision of $\pm 0.05\%$ and a deviation from

the well-known tabled values of $\pm 0.1\%$. With up to 56 samples per experimental run it enables a high sample throughput, which is favorably in routine measurements. Nevertheless, it does not overcome the relatively high sample volume required, which is up to 50 ml saturated solution per experiment.

To reduce the amount of substance needed for solubility determination thermoanalytical methods like DSC attain special interest. One of the main advantages of the DSC in pharmaceutical development is the small sample amount (some mg) required for measurements. Recently, Endoh and Suga [20] and Myerson et al. [21] presented first results of solubility determination by means of thermogravimetry (TG) and DSC, respectively. Endoh and Suga [20] proposed the measurement of the mass loss due to evaporation of the solvent from an unsaturated solution of known concentration during a typical heating experiment in a conventional TG-DTA apparatus. When the solution composition crosses the solubility curve a slight change in the vaporization rate is indicated in the DTG curve. This effect is used to estimate the present solution composition and the appropriate temperature, thus providing one point in the phase diagram. The results presented refer to the solubility of NaCl, KCl and Na_2SO_4 in water. Limitations of the proposed new method seem to be the characteristics of the thermobalance (accuracy, sensitivity, resolution) responsible for the mass measurement (complete sample mass about 5 mg) and the evaporation rate of the solvent, which must not be too high. Own research results [21] are concerned with applying a conventional DSC apparatus for solubility measurements. The heat consumption due to the dissolution process during a controlled heating experiment is recorded and used to obtain the appropriate equilibrium temperature. First results with various organic compounds in different (aqueous and nonaqueous) solvents indicate the applicability of the technique.

These methods are quite novel and still in the development stage. However, they are promising methods for determination of solubilities as data basis for optimized crystallization from solution and, in the case of enantiomers, for their successful separation and enrichment by crystallization methods.

On the background given, in the present article the binary melting point phase diagram of the mandelic acid enantiomers and the ternary solubility phase

diagram of the enantiomeric mandelic acid/water system are exemplarily studied to derive, finally, possible ways for a crystallization based enantioseparation. The experimental work to be described includes (a) the determination of the binary melting point diagram (+)-mandelic acid/(–) mandelic acid by means of DSC, (b) detailed measurements of ternary solubility data using a classical isothermal method with phase separation and subsequent analysis and (c) the estimation of solubilities applying a DSC method. The results are compared to literature values and discussed with respect to the applicability of the DSC technique (potential, efficiency) for solubility measurements. Furthermore, classical thermodynamic expressions are applied to evaluate the measured data in the binary system (+)/(–)-mandelic acid. The importance of phase diagrams for enantioselective crystallization purposes is demonstrated for the separation of mandelic acid enantiomers from solution by means of vaporization and cooling crystallization techniques. Furthermore, on the basis of the experimental study described an optimized approach for estimating the ternary solubility phase diagram for an arbitrary enantiomeric system is proposed.

2. Experimental

The experimental part involves the application of two different methods for determination of phase diagrams: DSC for binary phase diagrams as a polythermal technique and a classical isothermal method for solubility measurements in the whole ternary system. In the following the methods are described in detail. The mandelic acid enantiomers {(+)-(S)- and (–)-(R)-mandelic acid} and the racemic (rac) mandelic acid as supplied from Merck or Aldrich were of synthesis grade (>99% purity), the water used as solvent was deionized. To investigate the potential of the DSC method additionally an enantiomeric system of relevance for the pharmaceutical industry was studied (no structure is given here). The acetonitrile chosen as solvent was of HPLC grade.

2.1. Application of DSC for phase diagram studies

The thermoanalytical investigations have been carried out using a SETARAM TG-DSC 111 apparatus in

100

the DSC mode. The DSC 111 is a Calvet type heat flux calorimeter, where the sample and the reference crucible are completely surrounded by the heat flow measurement thermopiles avoiding any errors due to local temperature distributions and heat loss. The heat flux sensor is calibrated by the Joule effect method; temperature calibration is performed regularly using the melting temperatures of high pure indium, tin, lead and aluminium for high temperatures and water for low temperatures. The calibration involves heating rates between 0.05 and 10 K/min as they cover the most commonly used. In all experiments the calorimeter was flushed with pure helium (99.999%) at a flow rate of about 8 ml/min.

The melting point phase diagram of the enantiomeric mandelic acid system was determined by heating samples (8–20 mg) of the pure enantiomers or any mixtures of them at a heating rate of 0.5 K/min in closed aluminium crucibles and recording the resulting DSC curve. The mixtures were prepared by previously weighing and mixing bigger sample amounts than required and crushing them together in a mortar. The mg-sample to be measured is then taken from this mixture. It could be shown that an optimal mixing effect is obtained in this way. A previously melting and annealing phase as usually applied for sample homogenization could not be performed, because mandelic acid decomposes significantly and irreversibly during the melting process. For this reason each sample could only be measured once. To evaluate the influence of the decomposition on the data related to the melting behavior, exemplary thermogravimetric experiments were carried out. Therefore, the TG-DSC 111 coupling was applied to correlate the heat effect with a simultaneous mass loss measurement. The melting point of the pure substances is obtained from the extrapolated onset temperature (T_e); the solidus and liquidus temperature for the mixtures are taken from the T_e of the eutectic effect and the peak temperature (T_p) of the subsequent dissolution effect.

A particular advantage of the SETARAM DSC 111 device with regard to solubility measurements is the comparatively large sample amount usable, which is up to 150 μ l in closed stainless steel crucibles and 250 μ l in aluminum ones. This is important, because the low heating rates required to achieve equilibrium measurements generally lead to poor signal-to-noise

ratios, when the heat loss/consumption rate is low, as it is the case in nonisothermal dissolution experiments. The solubility determination by DSC is based on the heat effect caused by the dissolution process. A mixture of known composition with an excess of solute is subjected to a constant heating rate and the temperature, where the last particles are just dissolved, is taken as the corresponding saturation temperature.

To prepare a solution of defined composition the required amount of solute is weighed in the crucible and the solvent is added with the help of a micropipette. The stainless steel crucible used is then crimped with an aluminum o-ring. It is gas tight and allows to withstand pressures up to 100 bar at 300 °C. To avoid errors due to evaporation of the solvent the actual mass of the solvent present at the measurement is calculated by weighing the crucible after it is crimped and no further evaporation is possible. The gas tightness could be confirmed exemplary by weighing back the crucibles after measurement cycles have been completed. Further sample preparation involves a first fast heating above the expected dissolution temperature and a subsequent annealing for about 20 min. This previous dissolving step avoids disturbing effects due to the heterogeneous (particulate) nature of the sample like the initial particle size of the solute and its distribution in the solution. After observing the recrystallization process during controlled cooling, the solubility measurement is started. Full sample amounts were between 50 and 110 mg, the optimal heating rate was found to be 1 K/min. A more detailed description of the method applied will be published soon [22].

2.2. Solubility measurements and the determination of the ternary (solubility) phase diagram of the enantiomeric mandelic acid system

For determination of solubilities in the ternary system the well-known isothermal method with phase separation and subsequent analysis [23] (adapted to chiral systems) has been applied.

An excess of either pure enantiomer or a mixture of known enantiomeric composition was added to a certain amount of solvent in a closed glass container (volume 20 or 50 ml). This container was immersed in a double or triple walled thermostated equilibrium apparatus and the solution was then electromagnetically stirred at the desired temperature (temperature

100

controlled to within ± 0.02 K) until equilibrium was achieved (at least 4 h). The time required for establishing the solid/liquid equilibrium was determined in a separate experiment, withdrawing and analyzing samples of the mother liquor after different time intervals during dissolution studies. It could be shown that, at 25 °C the equilibrium has already been attained after 20 min for both the (+)-mandelic acid enantiomer and the racemate. For ternary systems containing both mandelic acid enantiomers and water, the liquid and solid phase (saturated solution and undissolved solid) were analyzed to determine their composition. The amount of solute in the saturated solution was determined by evaporating the solvent in a rotary evaporator. Comparatively the mandelic acid concentration in the solution has also been estimated by alkalimetric titration against 0.1 M NaOH. The (+)- to (–)-enantiomer ratio (enantiomeric composition) was analyzed by HPLC. Finally, the quality of the results could be assessed from an overall mass balance. For binary systems consisting of a pure enantiomer and the solvent, only the liquid phase was examined taking a liquid sample with the help of a pipette after allowing the solid phase to settle and then evaporating the liquid sample. The sample amounts used for solubility measurements were always related to 5 or 10 ml of water as solvent. Additionally, experiments with “small” sample amounts related to 0.5, 1 and 2 ml water have

been performed to evaluate the applicability of this classical method for solubility determination of value added pharmaceutical substances. Mixtures of different enantiomeric composition were always prepared by adding the appropriate amount of the excess enantiomer to racemic mandelic acid.

About 55 points in the ternary phase diagram (+)-mandelic acid/(–)-mandelic acid/water have been measured allowing to specify solubilities at temperatures between 0 and 60 °C covering the whole range of enantiomeric compositions.

3. Results and discussion

In the following the binary and ternary phase diagrams obtained for the enantiomeric mandelic acid system are presented and discussed. The two different methods applied for solubility determination are compared. Finally, on the basis of the ternary solubility phase diagram possibilities for enantioselective crystallization in the system studied are derived.

3.1. Binary melting point phase diagram of the mandelic acid enantiomers

In Fig. 1 DSC curves measured for mixtures of different enantiomeric composition between the

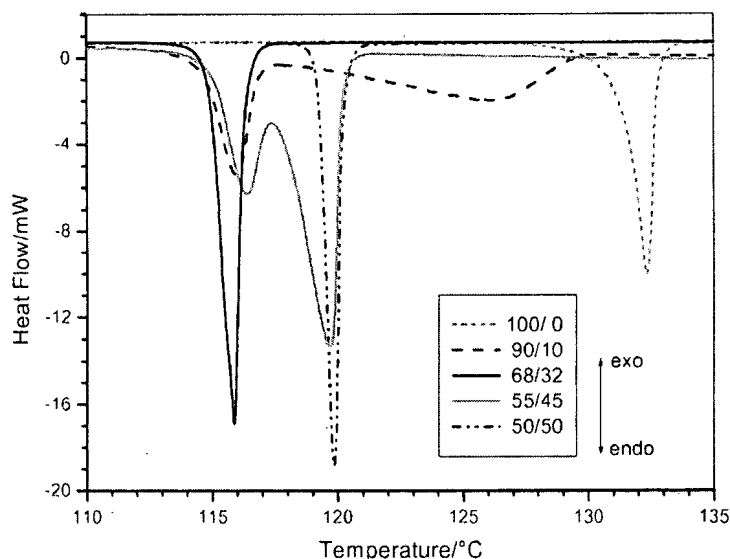


Fig. 1. DSC curves of different mixtures of mandelic acid enantiomers (100/0 corresponds to $x = 1$, 90/10 to $x = 0.9$, etc.).

102

racemic composition ($x = 0.5$) and the pure enantiomer ($x = 1$) are presented. Three sharp melting effects at 131.6 °C for the pure enantiomer, 120.2 °C for the racemic mixture and at 114.8 °C for a mixture containing the enantiomers in the ratio of 68.23:31.77 are obtained. The latter indicates the eutectic in the mandelic acid enantiomeric system. The racemic mixture shows a melting point between the eutectic and the pure enantiomer. Thus, at the racemic composition a real compound is formed in the solid state containing both enantiomers in equal quantities (racemic compound or “true” racemate). According to the classification of Roozeboom [24] the system under study can thus be assigned to the compound forming type with a melting point minimum for the racemate compared to the pure enantiomer. Mixtures between the eutectic composition and the pure enantiomer (e.g. sample 90/10 in Fig. 1) or the eutectic and the racemate (sample 55/45 in Fig. 1) show a melting region consisting of the eutectic effect and the subsequent dissolution effect, where the excess component (pure enantiomer or racemate, respectively) are dissolved in the liquid (melt) phase.

The resulting binary melting point phase diagram is presented in Fig. 2. As the two enantiomers of a chiral compound are characterized by the same melting point, a symmetric phase diagram around $x = 0.5$ is obtained. For this reason only one-half of the phase diagram ($0.5 \leq x \leq 1$) is shown in Fig. 2. The symmetry of the diagram could be confirmed by DSC

experiments with both, mixtures containing the (+)- and the (–)-enantiomer in excess. As already indicated above, the phase diagram shows the typical form of a compound forming system with a racemic compound having a lower melting point than the pure enantiomer. The comparison with literature data reveals a good agreement with the pure substance data published recently by Li et al. [26], but a discrepancy to the results of Leclercq [25] and the very old detailed data given in [27]. However, the deviation obtained is mainly in the range of ± 3 K, i.e. smaller than $\pm 3\%$ of the melting temperature. Even the melting point of the racemic mandelic acid and its (–)-enantiomer is given in the Ullmann Encyclopedia [28] to be between 118–121 and 132–135 °C, respectively. The melting enthalpies were determined from DSC measurements to be the reason for inconsistencies 24.5 kJ/mol for the pure enantiomers and 25.6 kJ/mol for the racemate. For comparison in the literature values of 26.4 and 25.1 kJ/mol [25] as well as 25.7 and 26.8 kJ/mol [26] are given. The eutectic was reported before to vary between $x = 0.6$ and 0.7 [27,29].

The main problem seems to be the significant decomposition of the mandelic acid during the melting process, making it principally impossible to identify a real “melting point”. Furthermore, mandelic acid is known to be unstable when exposed to light [28,30]. Repeatability measurements with the pure enantiomers and the racemate have shown, that the error in the determination of the melting temperature and the

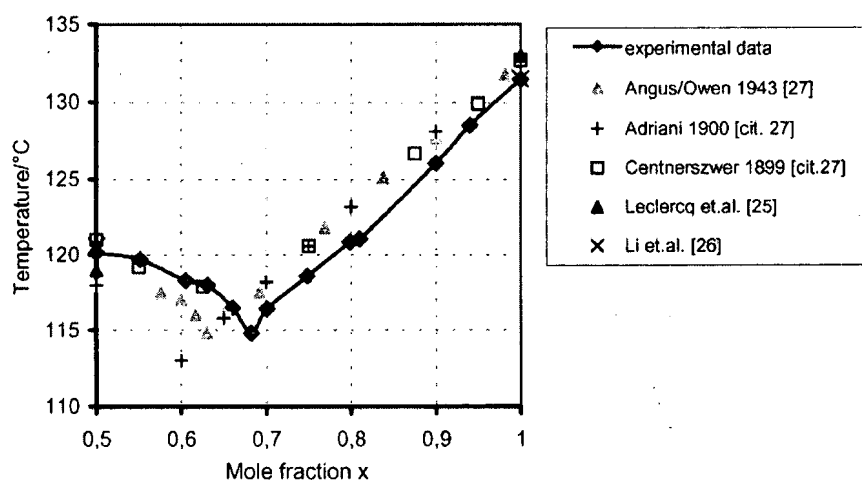


Fig. 2. Binary melting point phase diagram of the mandelic acid enantiomers.

102

103

melting enthalpy are below ± 0.2 and $\pm 1.4\%$, respectively. The mass loss due to decomposition was estimated by means of TG-DSC coupling to be 2.2 wt.% until the melting starts (T_c) and 2.8 wt.% at the end of the melting peak. Thus, this error should be kept in mind when evaluating the accuracy of the given melting temperatures and melting enthalpies.

When using the obtained pure component data (T_m , ΔH_m , $T_{m,rac}$, $\Delta H_{m,rac}$) for calculating the liquidus curves by means of the simplified Schröder–van Laar and Prigogine–Defay equations (Eqs. (2) and (3)) no satisfying agreement between the estimated and experimental curve was obtained. Around the eutectic (between about $x = 0.6$ and 0.8) with $x_{eu} = 0.693$ the liquidus lines predicted showed a significant deviation to lower temperatures. As a result, the eutectic temperature was calculated to 112.2°C compared to an experimental value of 114.8°C . Although, generally ideal behavior of the liquid melt phase is assumed in a binary chiral system, sometimes nonideality is described in literature [31]. This is reported in cases, where the enantiomers tend to associate and the responsible groups in the molecule are located nearby the chiral center. In the binary system (+)-/(-)-mandelic acid association is likely to take place, caused by the presence and neighborhood of a hydroxyl and a carboxyl group in the mandelic acid molecule allowing both intramolecular and intermolecular interactions (hydrogen bond, dimerization, etc.). Fig. 3 shows

the calculated liquidus lines in the phase diagram when fitting the experiments by means of Eqs. (2) and (3) using the most certain (accurate) data points near the pure component sides ($x \leq 0.605$; $x \geq 0.799$). As result, the eutectic composition could be specified to 0.69/0.31, corresponding well with the result (0.7) from Fouquey and Jacques [29]. The melting enthalpies were determined to be 31.2 kJ/mol for the racemate and 28.1 kJ/mol for the enantiomer, what is considerably higher than the experimental data and expected from the significant sample decomposition during melting.

3.2. Solubility phase diagrams of the pure mandelic acid enantiomers and the racemate

To determine the ternary solubility phase diagram of the mandelic acid enantiomers in water two experimental methods, a classical isothermal method in a solubility apparatus and a polythermal DSC based technique, have been applied. The results obtained are summarized in Figs. 4–8.

In Fig. 4 the solubility of the racemic mandelic acid and its (+)-enantiomer in water is presented as function of temperature. In both cases the solubility increases with temperature. The racemate is not only higher soluble than the pure enantiomer (as already derivable from the melting points), but also shows a different temperature dependency of the solubility.

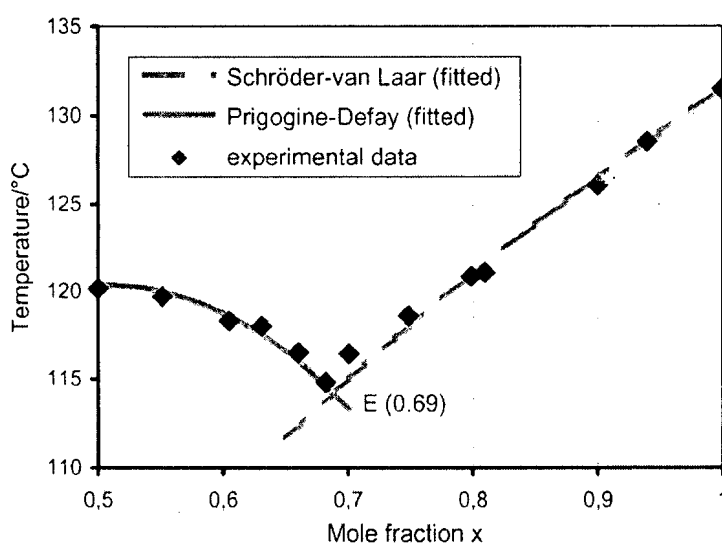


Fig. 3. Binary melting point phase diagram of the mandelic acid enantiomers—fitted and experimental values.

103

104

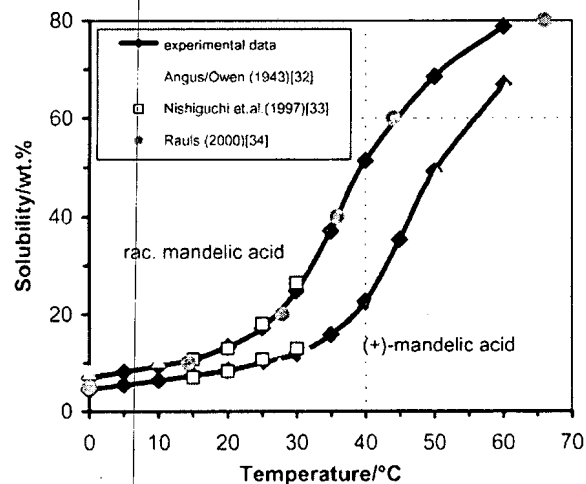


Fig. 4. Solubility of mandelic acid in water as function of temperature (classical isothermal method).

The rapid rise of the solubility following a rather moderate increase starts at a significantly lower temperature level (about 10 K) compared to the enantiomer. This leads to considerable differences in the solubilities of the racemate and the enantiomer at temperatures higher than 30 °C. There are regions, where the solubility of the racemate is twice as high as for the (+)-mandelic acid. The most favorable conditions, a cooling crystallization process for gaining the solid substance from the solution should be operated at, are given in the region with the strongest effect

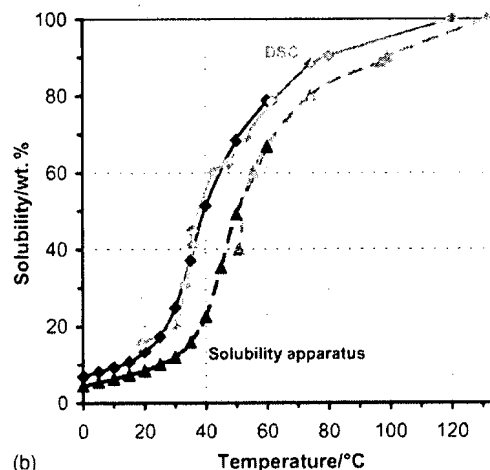
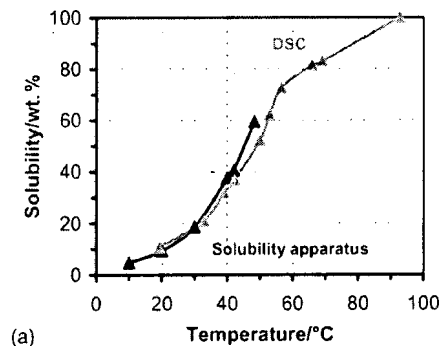


Fig. 6. Applicability of different methods for solubility measurement—solubility as function of temperature for (a) enantiomer A, (b) (♦) racemic mandelic acid, (▲) (+)-mandelic acid.

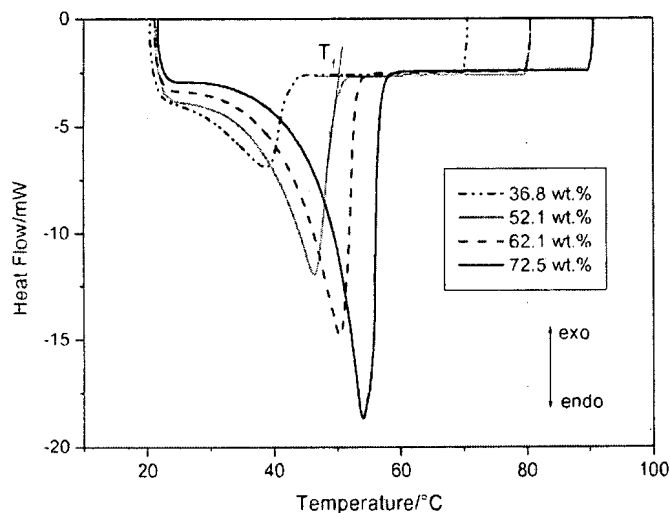


Fig. 5. Illustration of typical DSC curves for solutions of different concentration of enantiomer A in acetonitrile (heating rate: 1 K/min; total sample mass: 68–78 mg).

104

105

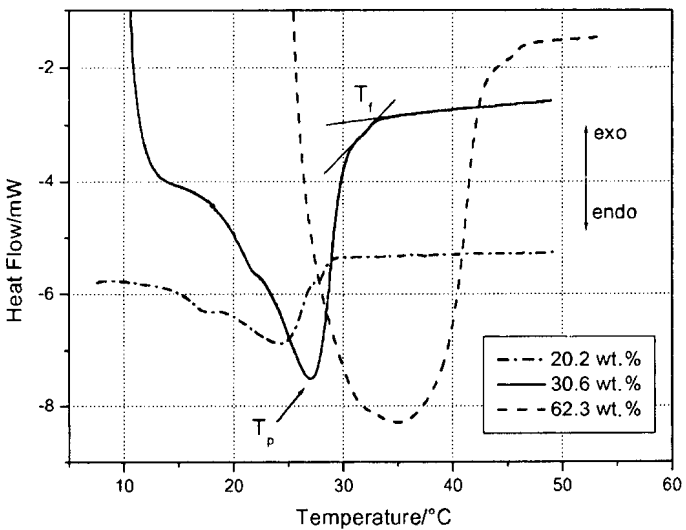


Fig. 7. DSC curves for solutions of racemic mandelic acid in water of different concentration (heating rate: 1 K/min; total sample mass: 79.034, 98.795, 97.527 mg).

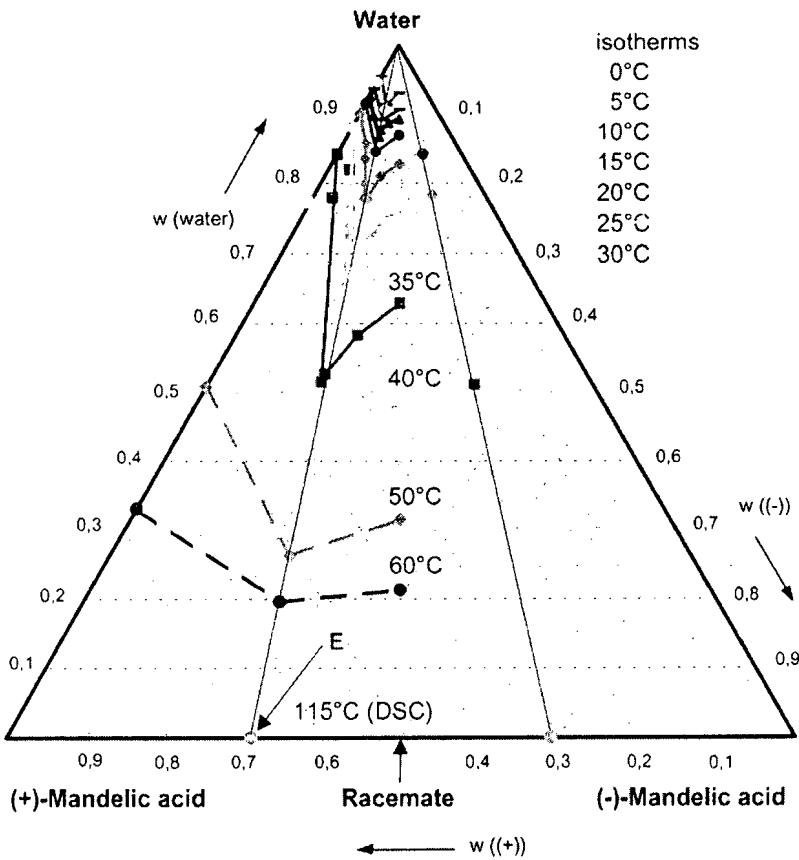


Fig. 8. Ternary (solubility) phase diagram of the enantiomeric mandelic acid/water system (graduated in weight fraction units (w)).

105

106

of temperature on solubility. This corresponds to the steepest slope in the solubility curve which is between about 30 and 40 °C for the racemate and 40 and 50 °C for the pure enantiomer. The solubility data measured are found to be in good agreement with the very few literature sources. However, the discrepancy to the high temperature racemate solubility data given by Angus and Owen [32] cannot conclusively be explained. The maximal error of the solubility data in the temperature range reported was estimated to be smaller than 2.5% by means of repeatability measurements. Higher errors are mostly caused by too low amounts of solvent and solute when phase separation becomes difficult. In our case it could be shown that at least 1 ml solvent and about 100 mg solute should be considered as the lower limits.

The results of solubility determination by means of the DSC method are presented in Figs. 5–7. Fig. 5 shows for illustration the DSC curves obtained for different mixtures of the pure enantiomer of the pharmaceutical relevant specialty chemical (enantiomer A) in acetonitrile. Broad endothermal effects are observed, caused by the continuous heat consuming dissolution process of the solid enantiomer in the solvent. From the increasing offset temperatures (T_f) obtained for higher solution concentrations a positive slope of the solubility curve is expected. Under equilibrium conditions the course of the dissolution effect in the DSC curve should follow the solubility curve. Then, the end of this effect (often typical in DSC experiments) corresponds to the saturation temperature at the given solution composition. In the case of a nonequilibrium measurement (as frequently given under DSC conditions) the dissolution process is determined by kinetic effects (especially diffusion phenomena).

To validate the applicability of the DSC method, in Fig. 6 the saturation temperatures derived from the DSC curves are compared to solubility data determined by means of the applied classical method. This comparison is shown for the enantiomer A (Fig. 6a) as well as for mandelic acid (Fig. 6b). Obviously, the agreement of the results is satisfying.

However, whereas for the system enantiomer A–acetonitrile very distinct thermal effects were observed, for the mandelic acid–water system (particularly the (+)-mandelic acid) the information was less transparent. So, the DSC curves were not always

that “peak shaped” and sharp at the end as demonstrated for the enantiomer A.

Characteristic DSC curves for different mixtures of racemic mandelic acid in water are presented in Fig. 7. The saturation temperatures were determined from the offset temperatures (T_f) as indicated. In the case of (+)-mandelic acid the dissolution effects observed were very flat and T_f could not exactly be identified. Thus, the saturation temperatures included in Fig. 6b were taken from the peak temperature (T_p), which was always clearly recognizable. The dissolution process of (+)-mandelic acid in water seems to be significantly influenced by kinetic effects under the applied DSC conditions.

The problem of performing equilibrium measurements under DSC conditions in heterogeneous solid–liquid systems, which are expected to be strongly influenced by diffusion effects, cannot be solved principally. A first complete dissolution and annealing step before carrying out the solubility measurement (as it has been done) helps to minimize the disturbing effects of the initial particle size and the initial unfavorable distribution of the solute in the DSC crucible, but does not compensate the missing stirring and, the required well mixed solution. Consequently, the DSC method is not able to replace common (classical) techniques for solubility measurements, but it can additionally be used when only very low sample amount is available and high temperature/pressure measurements are required. When using the applied classical method, in minimum some grams both of the racemate and the pure enantiomer are needed to determine the ternary solubility diagram (in the way it has been done) for a well soluble system with a strong effect of temperature on solubility. The polythermal DSC technique can at least be used to “scan” quite quickly the temperature dependency of the solubility in only one high temperature run and to get first rough solubility data.

However, more testing and a theoretical analysis of the method are required. Further details will soon be published [22].

3.3. Ternary solubility phase diagram of the mandelic acid enantiomers in water

In Fig. 8 the equilibrium data determined in the ternary system (+)-mandelic acid/(–)-mandelic

106

tionically pure mandelic acid can be crystallized from its aqueous solution at a given temperature, is then determined by the triangle limited by the pure enantiomer corner, the pure enantiomer solubility and the solubility of the eutectic mixture (existence region of the enantiomer).

Corresponding to the binary enantiomeric system, the solubility experiments concentrated primarily to mixtures with (+)-mandelic acid in excess; for mixtures containing the (–)-enantiomer in excess only a few measurements have been carried out to confirm the expected mirror image symmetry. So, the right-hand side of the ternary phase diagram may be constructed by reflecting the solubility curves in the triangle (+)-mandelic acid–racemate–water about the racemate–water line. The strong temperature dependency of the solubility for both the pure enantiomer and the racemate in a medium temperature range (as described already in Fig. 4) is represented in the ternary solubility diagram by increasing distances between the saturation isotherms. Starting on an isotherm from the pure mandelic acid enantiomer side and the racemate composition, the solubility grows steadily approaching a certain maximum, the appropriate eutectic point. As a result, the solubility curve gets the typical shape expected for a compound forming system. The eutectic was found to be independent on temperature at an enantiomeric composition of 69:31 (or vice versa) matching the eutectic in the binary mandelic acid system. This value is in agreement with the only literature source available [33]. The region in the phase diagram, where finally enan-

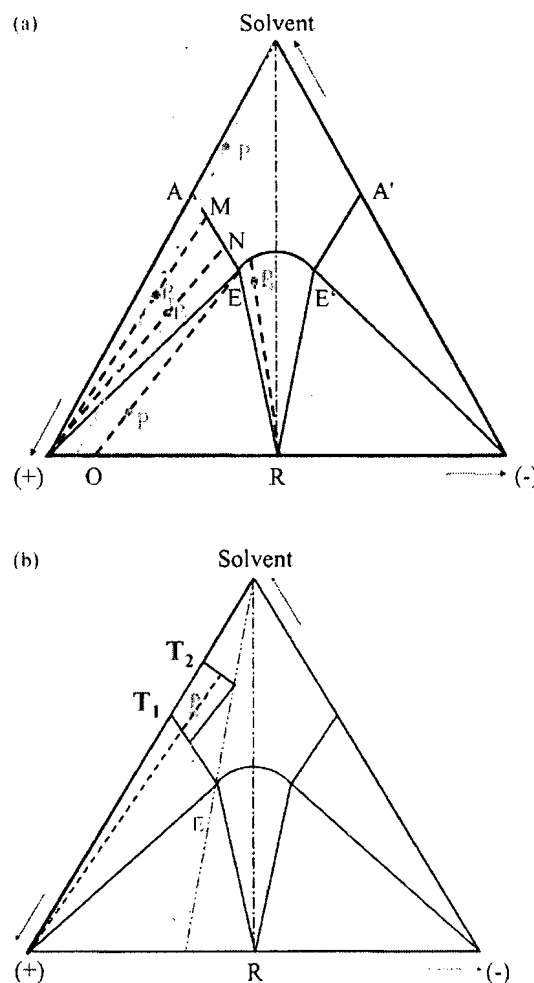


Fig. 9. Enantioselective crystallization from solution for a compound forming enantiomeric system. (a) Vaporization crystallization; (b) cooling crystallization.

107

68

vaporization of the solvent gives a solution of e.g. composition P_1 , which splits into a solid phase consisting of the pure (+)-enantiomer and a saturated solution of composition M on the appropriate solubility curve. After separating the solid, solution M can repeatedly be evaporated reaching e.g. point P_2 , delivering again crystals of the pure (+)-enantiomer and a saturated solution of composition N. Depending on the initial mixture and the procedures performed a few crystallization steps can be carried out ending up with a saturated solution of eutectic composition E. The amount of pure enantiomer to be gained by such a fractional crystallization process can be calculated directly from the phase diagram using the lever rule [35]. It should be noted that during these fractional crystallization steps the solution composition must not leave the existence region of the pure enantiomer. If, e.g. too much solvent has been evaporated, the solution composition enters the three-phase region defined by the triangle (+)-enantiomer–E–R, where the enantiomer and the racemate crystallize together and consequently, no pure (+)-enantiomer can be recovered anymore. Thus, a solution P_3 splits into a mixture of racemate and (+)-enantiomer of composition O and a saturated solution of eutectic composition. Furthermore, if the enantiomeric composition in the initial solution is lower than the eutectic, no further enantiomeric enrichment can be achieved. A solution composition inside the region E–R–E' (e.g. P_4) always delivers the racemate as the stable solid phase.

In the case of a cooling crystallization (Fig. 9b), an initial solution of composition P, located outside the pure enantiomer existence region at a high temperature T_1 , becomes supersaturated, when cooling to a lower temperature T_2 . Resulting from this, the pure (+)-enantiomer crystallizes. Due to the strong temperature dependency of the mandelic acid solubility both vaporization and cooling crystallization techniques can be applied to gain the solid enantiomer from its aqueous solution.

3.4. Conclusions

On the basis of the binary and ternary phase diagrams the enantiomeric mandelic acid could be identified as a compound forming system. Thus, racemic mandelic acid forms a real 1:1 compound in the solid

state. Consequently, the racemate cannot be resolved by crystallization methods without any auxiliary optically active agent (solvent or a resolving agent for diastereomer formation). Resolution by entrainment, also called preferential crystallization, is successfully applicable only in the case of conglomerate forming systems and, thus not suitable for the given system. However, fractional crystallization allows to gain pure enantiomers, if the initial solution composition is located in the existence region of the desired enantiomer in the appropriate phase diagram. Thus, for mandelic acid the pure (+)- or (-)-enantiomers can directly be crystallized from an aqueous solution or the melt, if their ratio is higher than 0.69:0.31, respectively.

For this reason a two-step process consisting of a previous racemate resolution step and a subsequent crystallization step for further purification offers the possibility of producing pure enantiomers. The first step could be a chromatographic or advanced membrane separation process, as they are already applied or under intensive research in the case of enantiomeric drugs. Replacing such comparatively expensive separation techniques partly by usually cheaper crystallization procedures should result (when optimized) in higher efficiencies and/or productivities for the whole combined process. Anyway, the fundamental solid/liquid phase equilibria and, particularly the position of the eutectic point, determine the transition region between the two steps for enantioseparation. In the case of mandelic acid the previously performed chromatography must deliver a minimum enantiomeric enrichment higher than 0.69:0.31. It could be shown in a previous study that, a purity requirement of 70% instead of >99% for the chromatographic step allows a productivity increase of about one order of magnitude [34].

The estimation of ternary solubility phase equilibria has proved to be a time and sample consuming process. Especially in the case of valuable pharmaceuticals like certain enantiomeric drugs the sample amounts required for systematic solubility studies may be a problem. However, to scan the possibilities for enantioseparation by means of different crystallization methods and to optimize them subsequently, reliable and accurate data are of essential importance. To reduce the time exposure and to minimize the amount of substance for the experiments to be

108

609

performed, the following approach is suggested as a result of the presented study.

1. "Scanning" the binary melting point phase diagram of the enantiomeric system to specify its type and the eutectic composition (DSC experiments using the enantiomer, the racemate and several mixtures of them; check for substance stability by repeated runs).
2. If the eutectic composition cannot be specified with sufficient accuracy by experimental work the prediction of the phase diagram by theory (using the reliable experimental data) may be helpful.
3. Determining the solubility of the pure enantiomer, the racemate and, in the case of true racemates, the eutectic mixture as function of temperature. In addition to the common classical methods usually applied, DSC can be recommended, when only small sample amount is available and high temperature/pressure data are required. When using a classical method to measure the solubilities of value added products, the amount of solute and solvent per sample should be optimized to save substance.
4. Construction of the ternary solubility phase diagram. The temperature dependency of the pure enantiomer existence region allows to choose a suitable crystallization technique.

4. Summary

In the contribution the binary and ternary phase diagrams of the mandelic acid enantiomers in water have been studied. From the melting point phase diagram the mandelic acid enantiomeric system could be identified as a compound forming system with a melting point of the racemate lower than for the enantiomers. This is in agreement with the racemate solubility, which was measured to be considerably higher compared to the enantiomers. Furthermore, the ternary solubility phase diagram revealed a strong temperature dependency of the solubility and an eutectic at an enantiomeric composition of 0.69:0.31. Thus, pure mandelic acid enantiomers can be gained from partially enriched solutions having an enantiomeric composition higher than this eutectic, whereby both cooling and evaporation crystallization techniques are

applicable. It could be shown that, the exact knowledge of the eutectic composition is of particular importance for assessment of crystallization based enantioseparation. As racemic mandelic acid cannot be resolved by crystallization alone, a two-step procedure consisting of a previous chromatographic step resolving the racemate and delivering the required enantiomeric enrichment followed by a subsequent (fractional) crystallization step has been proposed. Moreover, it could be demonstrated that, additionally to common methods DSC can be applied for the determination for solubility data for value added (pharmaceutical) products.

Acknowledgements

The authors thank Jacqueline Kaufmann and Dragomir Sapoundjiev for help during the extensive experimental work and Fonds der Chemischen Industrie for financial support.

References

- [1] H. Brunner, *Rechts oder links: in der Natur und anderswo*, Wiley, Weinheim, 1999.
- [2] R.M. Secor, *Chem. Rev.* 63 (1963) 297.
- [3] A. Collet, *Enantiomer* 4 (1999) 157.
- [4] J. Jacques, A. Collet, S.H. Wilen, *Enantiomers, Racemates and Resolutions*, Krieger, Malabar, 1994.
- [5] W.F. Hemminger, H.K. Cammenga, *Methoden der Thermischen Analyse*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989.
- [6] M.E. Brown (Ed.), *Principles and practice*, in: *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [7] E.L. Charsley, S.B. Warrington (Eds.), *Thermal Analysis: Techniques and Applications*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992.
- [8] D. Giron, *Pharmaceutical Science and Technology Today (PSTT)* 1 (1998) 191 and 262.
- [9] D. Giron, *J. Therm. Anal. Calorimet.* 56 (1999) 1285.
- [10] S.-D. Clas, C.R. Dalton, B.C. Hancock, *PSTT* 2 (1999) 311.
- [11] K.C. Thompson, *Thermochim. Acta* 355 (2000) 83.
- [12] M. Siniti, S. Jabrane, J.M. Letoffe, *Thermochim. Acta* 325 (1999) 171.
- [13] M. Matsuoka, R. Ozawa, *J. Crystal Growth* 96 (1989) 596.
- [14] H. Takiyama, Y. Nishitani, M. Matsuoka, Automatic determination of solid-liquid phase equilibria by using measured DSC curves, in: *Proceedings of the 14th Int. Symp. on Industrial Crystallization*, Cambridge, 12–16 September, 1999.

609

110

- [15] DIN 51004, Thermal analysis (TA), Determination of melting temperatures of crystalline materials by differential thermal analysis (DTA), German Standards, 1994.
- [16] M.E. Brown, Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications, Chapman & Hall, London, 1988.
- [17] G. Coquerel, *Enantiomer* 5 (2000) 481.
- [18] I. Prigogine, R. Defay, *Chemische Thermodynamik*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1962.
- [19] S.G. Capewell, G.T. Hefter, P.M. May, *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999) 1481.
- [20] K. Endoh, H. Suga, *Thermochim. Acta* 327 (1999) 133.
- [21] A.S. Myerson, R. Mohan, H. Lorenz, Estimation of solubility and crystal growth kinetics using a differential scanning calorimeter, Poster Contribution 141a, in: Proceedings of the AIChE 2000 Annual Meeting, Los Angeles, 12–17 November 2000.
- [22] R. Mohan, H. Lorenz, M. Rauls, A.S. Myerson, *Crystal Growth & Design*, 2001, in preparation.
- [23] J.W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1993.
- [24] H.W.B. Roozeboom, *Z. Phys. Chem.* 28 (1899) 494.
- [25] M. Leclercq, A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron* 32 (1976) 821.
- [26] Z.J. Li, M.T. Zell, E.F. Munson, D.J.W. Grant, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 337.
- [27] W.R. Angus, R.P. Owen, *J. Chem. Soc. London* (1943) 227.
- [28] B. Elvers (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1989.
- [29] C. Fouquey, J. Jacques, *Tetrahedron* 26 (1970) 5637.
- [30] *Beilstein's Handbuch*, 4. Aufl., E I 10, Springer, Berlin, 1932.
- [31] W. Holze, *Thermodynamische Untersuchungen an Systemen aus optisch aktiven Weinsäure- und α -Phenylethylaminabkömmlingen*, PhD thesis, Universität Magdeburg, 1967.
- [32] W.R. Angus, R.P. Owen, *J. Chem. Soc. London* (1943) 231.
- [33] N. Nishiguchi, M. Moritoki, T. Shinohara, K. Toyokura, in: G.D. Botsaris, K. Toyokura (Eds.), *Separation and Purification by Crystallisation*, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1997, p. 73.
- [34] H. Lorenz, P. Sheehan, A. Seidel-Morgenstern, *J. Chromatogr. A* 908 (2001) 201.
- [35] W.L. McCabe, J.C. Smith, P. Harriot, *Unit Operations of Chemical Engineering, International Edition*, McGraw-Hill, New York, 1993.

110

Potent inhibition of CYP2D6 by haloperidol metabolites: stereoselective inhibition by reduced haloperidol

Jae-Gook Shin, Khadidjatou Kane & David A. Flockhart

Division of Clinical Pharmacology, Departments of Medicine and Pharmacology, Georgetown University Medical Center, Washington, DC, USA

Aims We evaluated the inhibitory effect of haloperidol and its metabolites on CYP2D6 activity in order to better understand the potential role of these metabolites in drug interactions involving haloperidol.

Methods The inhibitory effects of haloperidol and five of its metabolites on dextrophan formation from dextromethorphan, a marker probe of CYP2D6 activity, were measured in human liver microsomal preparations. Apparent kinetic parameters for enzyme inhibition were determined by nonlinear regression analysis of the data.

Results Racemic reduced haloperidol and its metabolite, RHPTP competitively inhibited dextromethorphan O-demethylation with estimated K_i values (0.24 μM and 0.09 μM , respectively) that were substantially lower than that of haloperidol (0.89 μM). The inhibitory effect of S(-)-reduced haloperidol was more potent than the R(+)-enantiomer, with estimated K_i values of 0.11 μM and 1.1 μM , respectively. The pyridinium metabolite of haloperidol, HPP⁺ inhibited the enzyme activity noncompetitively with a K_i value of 0.79 μM . The N-dealkylated metabolites of haloperidol (FBPA and CPHP) had a diminished inhibitory potency. While FBPA showed no notable inhibitory effect on dextrophan formation, CPHP showed moderate competitive inhibition with a K_i value of 20.9 μM .

Conclusions The principal metabolites of haloperidol inhibit CYP2D6, suggesting that they might contribute to the inhibitory effects of the drug. Reduced haloperidol seems to inhibit CYP2D6 activity in an enantioselective manner with the physiologically occurring S(-) enantiomer being more potent.

Keywords: CYP2D6, enantiomer, haloperidol, inhibition, interaction, metabolites, reduced haloperidol

Introduction

Haloperidol is widely used for the treatment of schizophrenia and other psychiatric disorders. It is not unusual for haloperidol to be coadministered with other drugs including other antipsychotics, antidepressants, and benzodiazepines [1]. Many authors have reported that antipsychotics including haloperidol increase the plasma concentrations of coadministered drugs that are known substrates of CYP2D6 [2–4]. Haloperidol has strong inhibitory effects on CYP2D6 catalysed dextromethor-

phan O-demethylation *in vitro*, but extrapolation of these data to clinical inhibition *in vivo* has raised the possibility that reported *in vivo* interactions of haloperidol with CYP2D6 substrates [2, 4, 5] might result from the high accumulation of haloperidol in liver tissue and/or a contribution of haloperidol metabolites. In a study with haloperidol *in vitro*, preincubation increased the inhibition of CYP2D6, suggesting a possible contribution of haloperidol metabolites to this inhibitory action of the drug on this enzyme and/or mechanism-based inhibition by haloperidol or some of its metabolites. Most antipsychotics are extensively metabolized to many active or inactive metabolites [8]. For example, chlorpromazine has been postulated to have 168 theoretical metabolites in humans [9].

Haloperidol undergoes oxidative N-dealkylation, oxidation to several pyridinium metabolites, glucuronidation,

Correspondence: Dr D. A. Flockhart, Division of Clinical Pharmacology, Georgetown University Medical Center, 3900 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20007, Tel.: 202-687-1483; Fax: 202 6870330; E-mail: flockhad@gusun.georgetown.edu

Received 18 February 2000, accepted 2 October 2000.

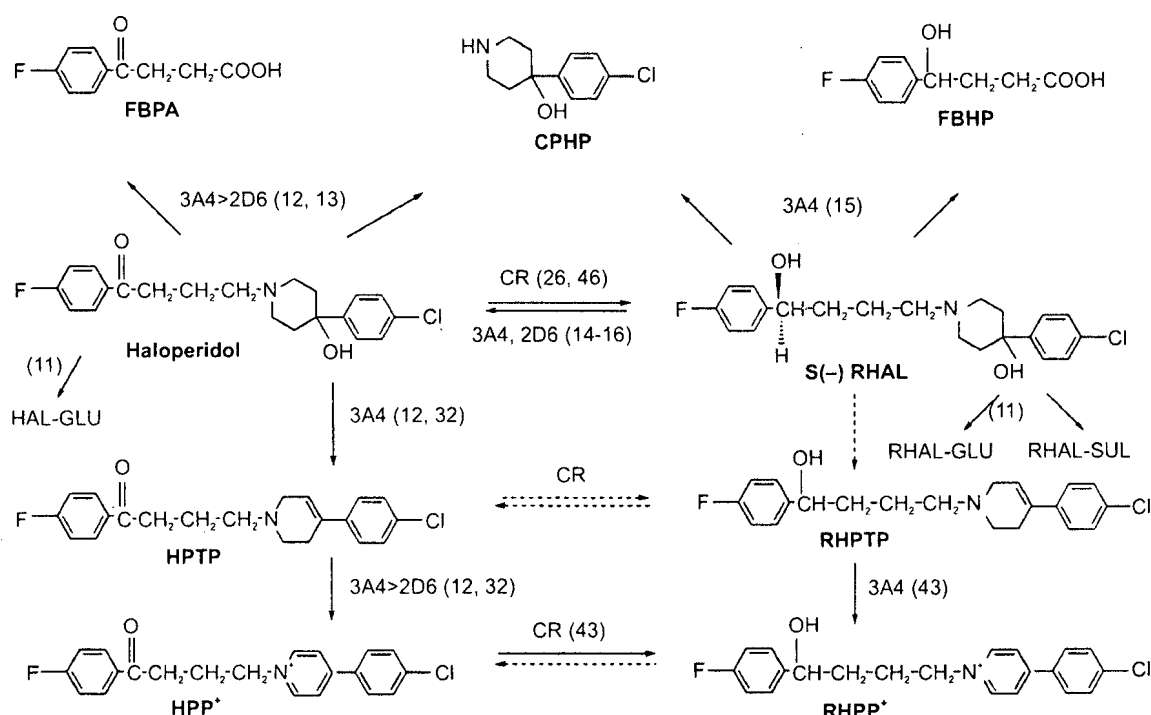


Figure 1 Metabolic pathways of haloperidol. Values in parentheses indicate the reference number. Solid arrows indicate the known metabolic pathways and dotted arrows metabolic pathways for which the enzymes involved have not been reported yet. HPTP and RHPTP are found *in vitro*, but not detected in *in vivo* studies [44]. Abbreviations are: FBPA: *p*-fluorobenzoyl propionic acid, CPHP: 4-chlorophenyl-4-hydroxypiperidine, FBHP: 4-(*p*-fluorophenyl)-4-hydroxybutyric acid, HAL-GLU: haloperidol glucuronide, S(-)RHAL: S(-) reduced haloperidol enantiomer, RHAL-GLU: reduced haloperidol glucuronide, RHAL-SUL: reduced haloperidol sulphate, HPTP: 4-(4-(chlorophenyl)-1-[4-(fluorophenyl)-4-oxybutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine, HPP⁺: 4-(4-(chlorophenyl)-1-[4-(fluorophenyl)-4-oxybutyl]-pyridinium, RHPTP: 4-(4-(chlorophenyl)-1-[4-(fluorophenyl)-4-hydroxybutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridine, RHPP⁺: 4-(4-(chlorophenyl)-1-[4-(fluorophenyl)-4-hydroxybutyl]-pyridinium; CR, carbonyl reductase.

and carbonyl reduction via CYP3A4, CYP2D6 and a carbonyl reductase (Figure 1) [10–13]. The oxidation of reduced haloperidol to haloperidol appears to be mediated by CYP3A4 and CYP2D6 [14–16]. Some of these metabolites have significant pharmacological effects (e.g. high affinity binding to haloperidol-sensitive sigma receptor binding sites in the brain, increase of prolactin secretion and homovanillic acid concentration, and inhibition of apomorphine induced stereotypy in rats by reduced haloperidol) [17–20]. Toxic effects of haloperidol metabolites have also been reported (e.g. MPP⁺-like neurotoxic effects of haloperidol pyridinium metabolites) [21–23]. However, no information exists about the contribution of haloperidol metabolites to drug interactions involving CYP2D6.

Reduced haloperidol has been found to be a major metabolite of haloperidol in humans, but most pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on reduced haloperidol have been performed using synthetic racemates. Unlike its parent molecule haloperidol, reduced haloperidol exists as two enantiomeric forms with an asymmetric chiral centre (Figure 1) [24]. Only the S(-)-enantiomer of reduced haloperidol is formed from

haloperidol by carbonyl reductase in human tissue [25]. In the present study, we compared the inhibitory effect of S(-)- and R(+)-reduced haloperidol enantiomers and of the other principal metabolites of haloperidol on CYP2D6 catalysed dextromethorphan O-demethylation *in vitro* using human liver microsomal preparations.

Methods

Haloperidol, dextromethorphan hydrobromide, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, β -NADP and EDTA were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Racemic reduced haloperidol, 3-(*p*-fluorobenzoyl)propionic acid (FBPA) and 4-(*p*-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidine (CPHP) were obtained from Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Levallorphan was purchased from U.S.P.C. (Rockville, MD, USA). The haloperidol pyridinium species, 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP⁺) and the reduced 1,2,3,6-tetrahydropyridine derivative (RHPTP) were generous gifts from Dr Neal Castagnoli, Jr. (Department of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State

113

University, Blacksburg, VA, USA). All other chemicals and reagents used were of the highest commercially available quality.

Reduced haloperidol enantiomers were separated according to the method of Eyles & Pond [25]. Briefly, the reduced haloperidol racemate (*rac*-reduced haloperidol) was dissolved in methanol, and then separated using a Chiralcel OJ cellulose chiral column (J.T. Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA). The mobile phase, composed of hexane: isopropanol (95:5, v/v), was delivered at a flow rate of 1.4 ml min⁻¹. The S(-)- and R(+)-enantiomers of reduced haloperidol were detected using a Waters 996 Photodiode Array Detector set at a wavelength of 245 nm and eluted at 22 and 27 min, respectively. The separated enantiomers were collected in glass tubes and concentrated in a Speedvac SC110 model RH40-12 (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). The complete separation of each enantiomer was confirmed through repeated injection of the concentrated harvest. The final concentrations of each enantiomer collected were measured from a standard curve obtained from *rac*-RHAL with a Spectronic® Genesys™ 5 u.v. spectrophotometer (Milton Roy, Rochester, NY, USA) set at a wavelength of 245 nm.

Human liver tissues designated HL-7, HL-10, and HL-13 were obtained under the auspices of the Washington Regional Transplant Consortium (Washington, DC) and human liver microsomes were prepared as described previously [26]. Protein concentrations were measured by the Bradford method of Pollard *et al.* [27].

The activity of CYP2D6 was determined from the rate of O-demethylation of dextromethorphan to dextrorphan [28] and was expressed as the quantity of the latter formed per unit of protein concentration and time. Inhibition experiments were performed as described previously [29]. Briefly, dextromethorphan (10–75 µM) without and with haloperidol or one of its metabolites (0.5–50 µM) were prewarmed at 37°C for 5 min in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and an NADPH regenerating system (1.3 mM β-NADP, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 3.3 mM MgCl₂ and 1 U ml⁻¹ glucose-6-phosphate dehydrogenase). The reaction was started by adding human liver microsomes (final concentration 0.25 mg ml⁻¹) and was terminated, after 30 min incubation, by adding 20 µl of 60% perchloric acid and 40 µl of 16 µM levallorphan, as internal standard, on ice. After centrifugation at 16 000 × g in a microfuge for 5 min, 50 µl of supernatant was injected into the h.p.l.c. system. Dextrorphan, dextromethorphan and levallorphan were separated on a Dupont Zorbax SB-phenyl column (150 × 4.6 mm). The mobile phase of acetonitrile: methanol: 10 mM potassium phosphate buffer (23:20:57, v/v) with 0.114% of triethylamine, pH 4.0, was delivered at 0.5 ml min⁻¹. Chromatograms were generated by a Spectrovision FD-300 Dual Monochro-

mator Fluorescence detector (Groton Technology Inc., Concord, MA) set at an excitation wavelength of 200 nm and emission wavelength of 304 nm. Under these conditions, dextrorphan, levallorphan, and dextromethorphan were eluted at 5.2, 7.6, and 10.2 min, respectively. The standard curve for dextrorphan was linear between 40 and 830 ng ml⁻¹ and the interday coefficient of variation of the assay was between 1.4% and 11.6%.

The apparent kinetic parameters for dextrorphan formation (V_{max} , K_m) and enzyme inhibition by haloperidol and its metabolites (IC_{50} , K_i) were determined by nonlinear least square regression analysis using WinNonlin Version 1.5 (Scientific Consulting, Inc., Apex, NC). Different models of enzyme inhibition, i.e. pure and partial competitive inhibition, noncompetitive inhibition, mixed type inhibition, and uncompetitive inhibition [30], were fitted to the data. The best model of inhibition was determined by the following criteria: visual inspection of Lineweaver-Burk, Dixon and secondary plots of the Lineweaver-Burk plots (the ordinate intercept of Lineweaver-Burk plots against inhibitor concentration); the size of the sum of squares of the residuals, AIC (Akaike Index Criteria) and SC (Schwartz Criteria) values, the standard error and 95% confidence interval of the parameter estimates, and the random distribution of the residuals from nonlinear regression analysis. The simplest model was chosen if more than one model met the above criteria. All incubations in all livers were carried out in duplicate and the estimated kinetic parameters and values for the extent of inhibition are represented as mean ($\pm$ s.d.) data from the three microsomal preparations. The estimated V_{max} and K_m values of the three microsomal preparations used ranged from 0.19 to 0.46 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein and from 12.0 to 21.3 µM, respectively.

Results

Rac-reduced haloperidol and haloperidol pyridinium metabolites (HPP⁺, RHPTP) strongly inhibited dextromethorphan O-demethylation (Figure 2). They decreased the dextrorphan formation rate to 24.0%, 18.5%, and 12.5% of control activity at 10 µM, respectively, which was comparable with that of parent haloperidol, which reduced CYP2D6 activity to 36.3% of control at the same concentration. When 10 µM dextromethorphan was used, the estimated mean IC_{50} values of *rac*-reduced haloperidol, HPP⁺ and RHPTP were 0.89 ± 0.3 , 0.34 ± 0.07 , and 1.34 ± 0.37 µM, respectively, which were lower than that of haloperidol (5.70 ± 0.91 µM). The *N*-dealkylated metabolite CPHP showed moderate inhibition with a mean IC_{50} of 40.4 ± 1.7 µM, while the other haloperidol metabolite generated by the same

113

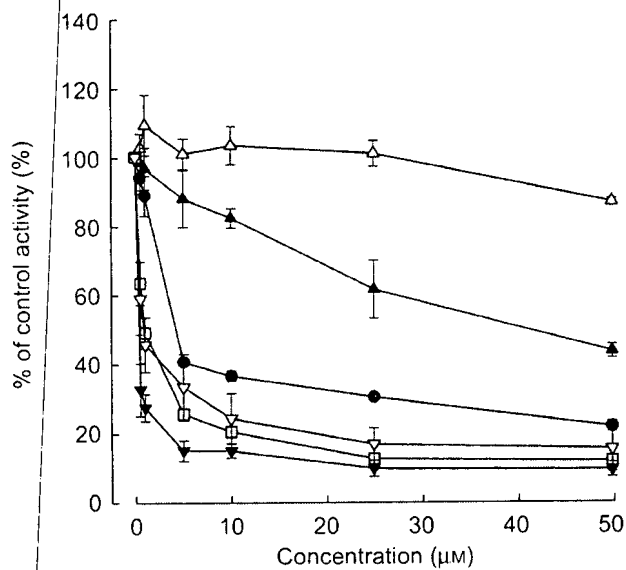


Figure 2 Effect of haloperidol (●) and its metabolites (FBPA; ▲ CPHP; ◻ HPP⁺ ▼ RHPTP; ◊ *rac*-RHAL) on CYP2D6 catalysed dextromethorphan O-demethylation in human liver microsomes. Human liver microsomes were incubated with 25 µM dextromethorphan and haloperidol or its metabolites (0–50 µM) for 30 min. Each data point is the mean ± s.d. of the percent of control activity measured by the dextromethorphan formation rate from three different liver microsomal preparations.

reaction, FBPA showed no remarkable inhibition of dextromethorphan O-demethylation.

The data obtained from all the haloperidol metabolites, except HPP⁺, were best described by a competitive inhibition model (Table 1). Except for FBPA and CPHP, Dixon plots showed nonlinearity, suggesting saturation of inhibition at high concentrations of haloperidol and its metabolites (Figure 3). The inhibition data obtained from these metabolites were best described by a partial

Table 1 Inhibition of CYP2D6 catalysed dextromethorphan O-demethylation in human liver microsomes by haloperidol and its metabolites.

Haloperidol metabolites	K _i (µM)	Type of inhibition
Haloperidol ^a	0.89 ± 0.15	Partial competitive
CPHP	20.9 ± 1.6	Competitive
FBPA	> 500	Competitive
<i>rac</i> -RHAL ^a	0.24 ± 0.07	Partial competitive
S(–) RHAL ^a	0.11 ± 0.01	Partial competitive
R(+) RHAL ^a	1.11 ± 0.16	Partial competitive
RHPTP ^a	0.09 ± 0.03	Partial competitive
HPP ⁺	0.79 ± 0.11	Noncompetitive

Each value indicates mean ± s.d. of data from the three different livers.
^aMean value of α, a factor by which K_m changes when inhibitor occupies the enzyme: Haloperidol, 16.8; *rac*-RHAL, 35.7; S(–) RHAL, 33.3; R(+) RHAL, 22.2; RHPTP, 30.8.

inhibition model (Figure 4, Table 1). RHPTP and *rac*-reduced haloperidol showed the lowest K_i values (0.09 and 0.24 µM, respectively) estimated from this model. The K_i values of RHPTP and *rac*-reduced haloperidol were substantially lower than that of haloperidol (0.89 µM) and CPHP (20.9 µM). Noncompetitive inhibition described the effect of HPP⁺ on CYP2D6 activity, and the mean estimated K_i was 0.79 µM. A 30-min preincubation of HPP⁺ brought about no additional increase in CYP2D6 inhibition (data not shown).

The inhibitory effect of S(–)-reduced haloperidol was consistently more potent than that of the R(+)-enantiomer at all concentrations tested (Figure 5). S(–)- and R(+)-enantiomers decreased the dextromethorphan formation rate to 40.2 and 81.8% of control activity at 0.5 µM, and 30.7 and 69.1% of control activity at 1 µM, respectively. The estimated IC₅₀ values of the S(–)- and R(+)-enantiomers were 0.44 ± 0.08 µM and 4.31 ± 0.58 µM, respectively. The inhibitory effects of both enantiomers were best described by a partial competitive inhibition model, and the estimated K_i value of S(–)-reduced haloperidol was 10 fold lower than that of the R(+)-enantiomer (Table 1).

Discussion

These data clearly demonstrate that haloperidol metabolites are able to inhibit human liver cytochrome P450 2D6 *in vitro* and may contribute to clinical interactions of haloperidol with substrates of this CYP isoform. Although most haloperidol metabolites are formed by CYP3A4 *in vitro* [12, 13, 31], we focused on CYP2D6 in this study because the inhibitory effects of haloperidol on this enzyme have been shown to be much more potent than those on CYP3A [32]. This is not an unusual finding since several drugs have been reported to inhibit CYP isoforms that are not involved in their metabolism, e.g. halofantrine and quinidine [33, 34].

In the present study, *rac*-reduced haloperidol strongly inhibited dextromethorphan O-demethylation, which is consistent with the report of Tyndale *et al.* [6] in which reduced haloperidol strongly inhibited the metabolism of sparteine, a CYP2D6 substrate. Inhibition of CYP2D6 by reduced haloperidol appears to be more potent than that by haloperidol itself, since the estimated K_i value of the former was four fold less than that of the latter. Plasma and tissue concentrations of reduced haloperidol are nearly equal to or higher than those of haloperidol in psychiatric patients [7, 35, 36], suggesting that reduced haloperidol might contribute more to inhibition of CYP2D6 than its parent drug in patients who are taking haloperidol. Recently, it has been shown that only the S(–)-enantiomer of reduced haloperidol is formed in humans [25]. In the present study, S(–)-reduced haloperidol was eight fold

115

more potent an inhibitor of CYP2D6 than the parent drug. It is possible that patients with high carbonyl reductase activity and high concentrations of S(-)-reduced haloperidol may be particularly vulnerable to CYP2D6-mediated drug interactions. It has been reported that the plasma concentration ratio of reduced haloperidol to haloperidol varies widely between patients taking single or multiple doses of haloperidol [37, 47]. Further *in vivo* studies are required to evaluate the contribution of reduced haloperidol to drug interactions with haloperidol.

In the present study, S(-)-reduced haloperidol was a more potent CYP2D6 inhibitor than the R(+)-enantiomer. The estimated K_i of the S(-)-enantiomer was 10 fold lower and the percent inhibition at low concentration was more than three fold greater than that of R(+)-reduced haloperidol, suggesting stereoselective inhibition of CYP2D6 activity by reduced haloperidol. This finding raises the question of whether stereoselectivity in the pharmacokinetics or pharmacodynamics of reduced haloperidol occurs. There are currently no data that allow us to evaluate this question. All previous pharmacological studies of reduced haloperidol have been carried out using the synthetic racemate [17–20, 36–38]. If we consider that S(-)-reduced haloperidol is the only form found in humans [25], pharmacological studies of reduced haloperidol should be performed with S(-)-enantiomer instead of a racemate.

Since the identification of a neurotoxic pyridinium metabolite (HPP⁺) of haloperidol by Subramanyam *et al.* [39], many reports have suggested a possible involvement of these metabolites in the extrapyramidal side-effects of haloperidol by analogy with neurotoxic MPP⁺ [21–23]. In this study, HPP⁺ strongly and noncompetitively inhibited CYP2D6 activity. The estimated K_i value for HPP⁺ was comparable with that of haloperidol. The inhibition of CYP2D6 by HPP⁺ seems not to be mechanism based, because preincubation of HPP⁺ with microsomal preparations had no additional inhibitory effect. The plasma concentration of HPP⁺ is related to the haloperidol daily dose and plasma drug concentration [40]. Igarashi *et al.* [41] have reported that the plasma HPP⁺ concentration measured in schizophrenic patients treated with 3–18 mg day⁻¹ of haloperidol was 10–57 ng ml⁻¹ which is comparable with the concentration of the parent drug [36, 42]. In the present study, the inhibition of RHPP⁺, a pyridinium metabolite of reduced haloperidol, was not evaluated because this compound was not available. However, this metabolite is also expected to have strong inhibition on CYP2D6 if we consider the inhibitory effect of reduced haloperidol and HPP⁺, precursors of RHPP⁺ formation [43] (see Figure 1). Furthermore, the plasma concentration of RHPP⁺ seems to be higher than those of parent drug and HPP⁺ [40]. Together, these findings suggest that haloperidol pyridinium

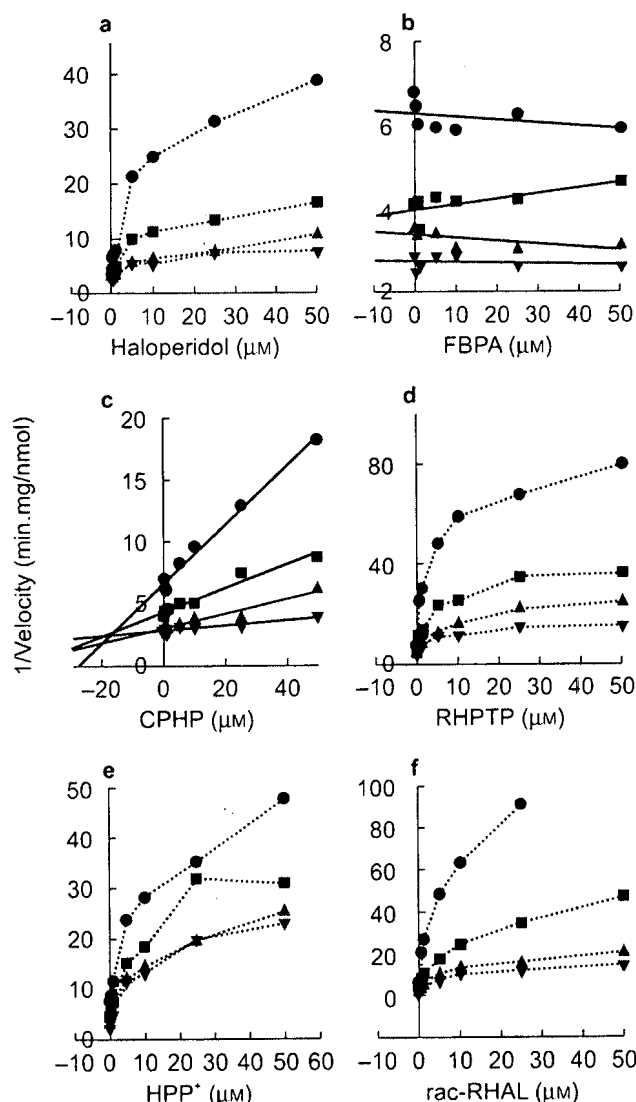


Figure 3 Dixon plots showing the inhibition of CYP2D6 catalysed dextromethorphan O-demethylation by haloperidol and its metabolites. Except for FBPA (b) and CPHP (c), Dixon plots of other haloperidol/metabolites showed nonlinear relationships. Human liver microsomes (HL-10) were incubated with 10 (●), 25 (◆), 50 (▲), and 75 μM (▼) dextromethorphan and haloperidol/metabolites (0–50 μM) for 30 min.

metabolites may be potent and important contributors to the *in vivo* inhibition of CYP2D6 activity.

Of the haloperidol metabolites tested, RHPTP was the most potent inhibitor with an estimated K_i of 0.09 μM. It appears that the tetrahydropyridine metabolites RHPTP and HPTP (4-(4-chlorophenyl)-1-(4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) are converted from reduced haloperidol and HPP⁺ by CYP3A4 and by carbonyl reductase *in vitro*, respectively [12, 43]. However, Avent *et al.* [44] found no tetrahydropyridine metabolites in human plasma and urine, suggesting that

115

116

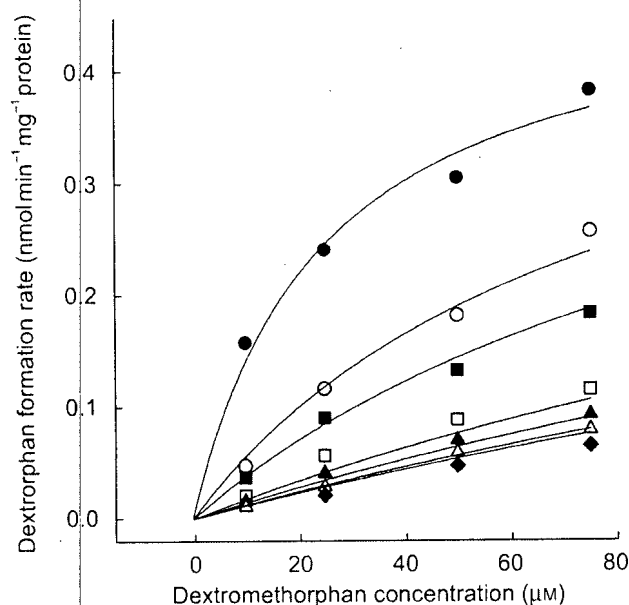


Figure 4 Representative nonlinear regression fit of dextrophan formation rate *vs* dextromethorphan (10–75 μM). Each symbol and solid line indicates the observed and predicted dextrophan formation rate in the absence ($\bullet$) and presence of reduced haloperidol 0.5 ($\circ$), 1 ($\blacksquare$), 5 ($\square$), 10 ($\blacktriangle$), 25 ($\triangle$) and 50 μM ($\blacklozenge$), respectively. The inhibition of dextrophan formation by reduced haloperidol was best described by a partial competitive inhibition model [30] with the following parameter estimates: V_{max} 0.49 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$, K_m 25.09 μM , K_i 0.19 μM and α 17.2.

these are present only transiently at their site of formation and are not released into the circulation.

The *N*-dealkylation of haloperidol seems to result in the loss of much inhibitory effect of CYP2D6 activity. Although one of the metabolites resulting from *N*-dealkylation (CPHP) showed moderate inhibition with a K_i of 20.9 μM , the other metabolite FBPA had no detectable inhibitory effect on CYP2D6 activity. On the other hand, the reduction of the ketone group adjacent to the fluorophenyl ring and oxidation of the piperidinol ring of haloperidol increased inhibitory potency. These findings suggest that reduced haloperidol, and the tetrahydropyridine or pyridinium metabolites but not those resulting from *N*-dealkylation have some characteristics of a pharmacophore proposed by Strobl *et al.* [45] for inhibition of human liver CYP2D6.

In conclusion, the results obtained in the present study demonstrate that haloperidol metabolites have the ability to inhibit CYP2D6. The most potent include reduced haloperidol, and pyridinium and tetrahydropyridine metabolites. Their *in vitro* inhibitory potencies are higher than that of the parent drug, suggesting that these metabolites may contribute significantly to *in vivo* interactions between haloperidol and CYP2D6 substrates. Our data also suggest that the S(–) reduced haloperidol

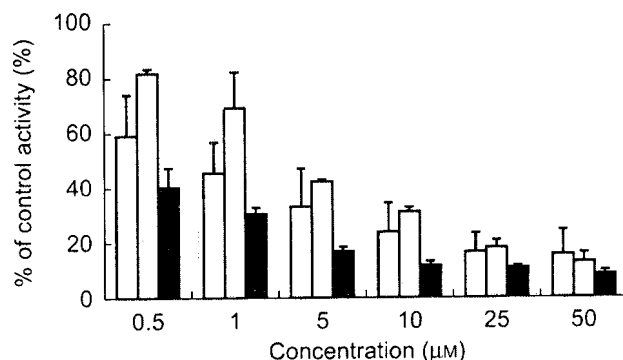


Figure 5 Comparison of inhibition of CYP2D6 catalysed dextromethorphan O-demethylation by *rac*-reduced haloperidol (open columns) with S(–) (closed columns) and R(+) (shaded columns) reduced haloperidol enantiomers. Human liver microsomes were incubated with 25 μM dextromethorphan and *rac*-reduced haloperidol or S(–) or R(+)–reduced haloperidol enantiomer (0–50 μM) for 30 min. Each data point is the mean $\pm$ s.d. percent remaining activity after exposure to each inhibitor with three different liver microsomal preparations.

enantiomer inhibits CYP2D6 activity. Clinically, these findings imply that the interaction between haloperidol and CYP2D6 may be affected by clinical conditions in which the formation and/or the elimination of haloperidol metabolites are changed.

This study was supported in part by a Shannon Director's award (DAF) R55-GM56898, and by grants R01-GM56898-01 and T32-9M08386 from the National Institute of General Medical Sciences, Bethesda, MD. Dr Shin was supported by a Merck Sharp & Dohme International Fellowship Award in Clinical Pharmacology. We thank Dr Neal Castagnoli, Jr. (Department of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA) for the generous gift of HPP⁺ and RHPTP.

References

- 1 Rosholm JU, Hallas J, Gram LF. Concurrent use of more than one major psychotropic drug (polypsychopharmacy) in out-patients – a prescription database study. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **37**: 533–538.
- 2 Mihara K, Otani K, Ishida M, *et al.* Increase of plasma concentration of m-chlorophenylpiperazine, but not trazodon, with low-dose haloperidol. *Ther Drug Monit* 1997; **19**: 43–45.
- 3 Maynard GL, Soni P. Thioridazine interferences with imipramine metabolism and measurement. *Ther Drug Monit* 1996; **18**: 729–731.
- 4 Goff DC, Baldessarini RJ. Drug interactions with antipsychotic agents. *J Clin Psychopharmacol* 1993; **13**: 57–67.
- 5 Dinovo EC, Bost RO, Sunshine I, Gottschalk LA. Distribution of thioridazine and its metabolites in human tissues and fluids obtained postmortem. *Clin Chem* 1978; **24**: 1828–1830.
- 6 Tyndale RF, Kalow W, Inaba T. Oxidation of reduced haloperidol to haloperidol: involvement of human CYP1D6

116

117

- (spartein/debrisoquine monooxygenase). *Br J Clin Pharmacol* 1991; **31**: 655–660.
- 7 Korpi ER, Kleinman JE, Costakos DT, Linnoila M, Wyatt RJ. Reduced haloperidol in the post-mortem brains of haloperidol-treated patients. *Psychiatric Res* 1984; **11**: 259–269.
 - 8 Ereshefsky L. Pharmacokinetics and drug interactions: Update for new antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 1996; **57**(Suppl 11): 12–25.
 - 9 Forrest IS, Usdin E. Phenothiazines with aliphatic side chain. In *Psychotherapeutic drugs*, eds. Usdin E, Forrest IS. New York: Marcel Dekker, Inc., 1977: 699–753.
 - 10 Tsang MW, Shader RI, Greenblatt DJ. Metabolism of haloperidol: Clinical implications and unanswered questions. *J Clin Psychopharmacol* 1994; **14**: 159–162.
 - 11 Someya T, Shibasaki M, Noguchi T, Takahashi S, Inaba T. Haloperidol metabolism in psychiatric patients: Importance of glucuronidation and carbonyl reduction. *J Clin Psychopharmacol* 1992; **12**: 169–174.
 - 12 Fang J, Baker GB, Silverstone PH, Coutts RT. Involvement of CYP3A4 and CYP2D6 in the metabolism of haloperidol. *Cell Mol Neurobiol* 1997; **17**: 227–233.
 - 13 Pan LP, Wijnant P, De Vriendt C, Rosseel MT, Belpaire FM. Characterization of the cytochrome P450 isozymes in the *in vitro* N-dealkylation of haloperidol. *Br J Clin Pharmacol* 1997; **44**: 557–564.
 - 14 Kudo S, Odomi M. Involvement of human cytochrome P450 3A4 in reduced haloperidol oxidation. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; **54**: 253–259.
 - 15 Pan LP, De Vriendt C, Belpaire FM. *In vitro* characterization of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the back oxidation and N-dealkylation of reduced haloperidol. *Pharmacogenetics* 1998; **8**: 383–389.
 - 16 Young D, Midha KK, Fossler MJ, *et al.* Effect of quinidine on the interconversion kinetics between haloperidol and reduced haloperidol in humans: implications for the involvement of cytochrome P45011D6. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; **44**: 433–438.
 - 17 Bowen WD, Moses EL, Tolentino PJ, Walker JM. Metabolites of haloperidol display preferential activity at sigma receptors compared to dopamine D-2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1990; **177**: 111–118.
 - 18 Hays SE, Poland RE, Rubin RT. Prolactin releasing potencies of antipsychotic and related nonpsychotic compounds in female rats: Relation to clinical potencies. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; **214**: 362–367.
 - 19 Chang WH, Jaw SS, Wu HS, Tsai L, Yeh EK. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in guinea pigs. *Psychopharmacol* 1988; **96**: 285–288.
 - 20 Browning JL, Silverman PB, Harrington CA, Davis CM. Preliminary behavioral and pharmacological studies on the haloperidol metabolite reduced haloperidol. *Soc Neuroscience Abstracts* 1982; **8**: 470.
 - 21 Igarashi K, Matsubara K, Kasuya F, Fukui M, Idzu T, Castagnoli N Jr. Effect of a pyridinium metabolites derived from haloperidol on the activities of striatal tyrosine hydroxylase in freely moving rats. *Neurosci Lett* 1996; **214**: 183–186.
 - 22 Fang J, Zuo D, Yu PH. Comparison of cytotoxicity of a quaternary pyridinium metabolites of haloperidol (HPP⁺) with neurotoxin N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) towards cultured dopaminergic neuroblastoma cells. *Psychopharmacol* 1995; **121**: 373–378.
 - 23 Rollema H, Skolnik M, D'Engelbronner J, Igarashi K, Usuki E, Castagnoli N Jr. MPP⁺-like toxicity of pyridinium metabolites derived from haloperidol: In vivo microdialysis and in vitro mitochondrial studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **268**: 380–387.
 - 24 Jaen JC, Caprathe BW, Priebe S, Wise LD. Synthesis of the enantiomers of reduced haloperidol. *Pharm Res* 1991; **8**: 1002–1005.
 - 25 Eyles DW, Pond SM. Stereoselective reduction of haloperidol in human tissues. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 867–871.
 - 26 Harris JW, Rahman A, Kim B-R, Guengerich FP, Collins JM. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: Participation of cytochrome P450 3A4 and unknown P450 enzyme. *Cancer Res* 1994; **54**: 4026–4035.
 - 27 Pollard HB, Menard R, Brandt HA, Pazolzs CJ, Creutz CE, Ramu A. Application of Bradford's protein assay to adrenal gland subcellular fractions. *Anal Biochem* 1978; **86**: 761–763.
 - 28 Broly F, Libersa CL, Lhermitte M, Bechtel P, Dupuis B. Effect of quinidine on the dextromethorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br J Clin Pharmacol* 1989; **28**: 29–36.
 - 29 Ko J-W, Soukhova N, Thacker D, Chen P, Flockhart DA. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitor of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabol Dispos* 1997; **25**: 853–862.
 - 30 Segel IH. *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1975.
 - 31 Igarashi K, Kasuya F, Fukui M, Usuki E, Castagnoli N Jr. Studies on the metabolism of haloperidol (HP): The role of CYP3A in the production of the neurotoxic pyridinium metabolite HPP⁺ found in rat brain following IP administration of HP. *Life Sci* 1995; **57**: 2439–2446.
 - 32 Shin JG, Soukhova N, Desta Z, Flockhart DA. Inhibition of CYP2D6 by antipsychotic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **2**: 188.
 - 33 Halliday RC, Jones BC, Smith DA, Kitteringham NR, Park BK. An investigation of the interaction between halofantrine, CYP2D6 and CYP3A4: studies with human liver microsomes and heterologous enzyme expression systems. *Br J Clin Pharmacol* 1995; **40**: 369–378.
 - 34 Otton SV, Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; **247**: 242–247.
 - 35 Forsman A, Folsch G, Larsson MA. Metabolism of haloperidol. *Curr Ther Res* 1978; **24**: 567–568.
 - 36 Shostak M, Perel JM, Stiller RL, Wyman W, Curran S. Plasma haloperidol and clinical response: a role for reduced haloperidol in antipsychotic activity. *J Clin Psychopharmacol* 1987; **7**: 394–400.
 - 37 Midha KK, Chakraborty BS, Ganes DA, *et al.* Intersubject variation in the pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol. *J Clin Psychopharmacol* 1989; **9**: 98–104.
 - 38 Jann MW, Chang W-H, Davis CM, *et al.* Haloperidol and reduced haloperidol plasma level in Chinese vs. non-Chinese psychiatric patients. *Psychiatry Res* 1989; **30**: 45–52.

117

- 39 Subramanyam B, Pond SM, Eyles DW, Whiteford HA, Fouda HG, Castagnoli N Jr. Identification of potentially neurotoxic pyridinium metabolite in the urine of schizophrenic patients treated with haloperidol. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; **181**: 573–578.
- 40 Eyles DW, McLennan HR, Jones A, McGrath JJ, Stedman TJ, Pond SM. Quantitative analysis of one pyridinium metabolite of haloperidol and identification of another in schizophrenic patients. *Clin Pharmacol Ther* 1994; **56**: 512–520.
- 41 Igarashi K, Kasuya F, Fukui M, Usuki E, Castagnoli N Jr. Simultaneous determination of haloperidol and its neurotoxic metabolite in plasma and brain tissue from schizophrenic patients treated with haloperidol using HPLC and solid-phase extraction. *Jpn J Forensic Toxicol* 1995; **13**: 31–38.
- 42 Ko GN, Korpi ER, Kirch DG. Haloperidol and reduced haloperidol concentrations in plasma and red blood cells from chronic schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1989; **9**: 186–190.
- 43 Eyles DW, McGrath JJ, Pond SM. Formation of pyridinium species of haloperidol in human liver and brain. *Psychopharmacol* 1996; **125**: 214–219.
- 44 Avent KM, Riker RR, Fraser GL, Van der Schyf CJ, Usuki E, Pond SM. Metabolism of haloperidol to pyridinium species in patients receiving high doses intravenously: Is HPTP an intermediate? *Life Sci* 1997; **61**: 2383–2390.
- 45 Strobl GR, Kruehnener S, Stockigt J, Guengerich FP, Wolf T. Development of a pharmacophore for inhibition of human liver cytochrome P4502D6: molecular modeling and inhibition studies. *J Med Chem* 1993; **36**: 1136–1145.
- 46 Inaba T, Kovasacs J. Haloperidol reductase in human and guinea pig livers. *Drug Metab Dispos* 1989; **17**: 330–333.
- 47 Someya T, Takahashi S, Shibasaki M, Inaba T, Cheung SW, Tang SW. Reduced haloperidol/haloperidol ratios in plasma: Polymorphism in Japanese psychiatric patients. *Psychiatry Res* 1990; **31**: 111–120.