

COMPUESTOS CON PROPIEDADES DE SENSACIÓN REFRESCANTE

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con una clase particular de compuestos capaces de activar los canales iónicos de TRPM8. Se relaciona además con el uso de tales compuestos para inducir una sensación de frío y con productos de consumo que comprenden estos compuestos.

Antecedentes de la Invención

TRPM8 (miembro 8 del receptor potencial transitorio de melastatina, también conocido como Trp-p8 o MCR1) se activa mediante un enfriamiento inofensivo y, por lo tanto, desempeña un papel importante como sensor de temperatura. Los canales están ampliamente distribuidos en diferentes tejidos (tal como la piel y las mucosas humanas (como la mucosa oral, la mucosa de la garganta y la mucosa nasal), el tracto urogenital masculino, las células del epitelio pulmonar y los miocitos arteriales). Son canales catiónicos no selectivos, permeables al Ca^{2+} , que exhiben mecanismos de activación polimodal, y se activan mediante temperaturas inocuas de frío a frío, despolarización de la membrana y moléculas que se conocen como agentes refrescantes, que incluyen compuestos naturales y sintéticos. El receptor fue descrito por primera vez en 2002 como receptor del frío en varias publicaciones.

La presente invención se basa en el hallazgo de que se

puede usar una clase particular de compuestos para impulsar una respuesta de enfriamiento cuando se ponen en contacto con el receptor TRPM8 *in vitro* e *in vivo*.

Los compuestos que proporcionan una sensación refrescante han desempeñado durante mucho tiempo un papel importante en la industria de los sabores y las fragancias para producir una asociación con la frescura y la limpieza. Los compuestos refrescantes se usan ampliamente en una variedad de productos tales como alimentos, productos de tabaco, bebidas, dentífricos, enjuagues bucales, pastas dentales y artículos de tocador. La sensación refrescante proporcionada contribuyó al atractivo y la aceptabilidad de los productos de consumo. En particular, los productos para el cuidado bucal, tal como los dentífricos y los enjuagues bucales, están formulados con refrigerantes porque proporcionan efectos refrescantes para el aliento y una sensación de frescura y limpieza en la boca.

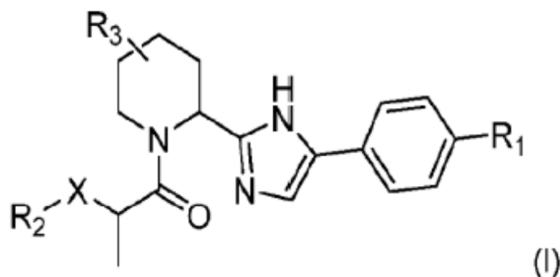
Se han descrito un gran número de compuestos que proporcionan sensaciones refrescantes. El compuesto natural más conocido es el mentol, en particular L-mentol. Entre los compuestos sintéticos que proporcionan sensaciones refrescantes, muchos son derivados o están estructuralmente relacionados con el mentol, es decir, que contienen el radical ciclohexano y derivatizado con grupos funcionales que incluyen carboxamida, cetol, éster, éter y alcoholes.

Sorprendentemente, el solicitante encontró una nueva

clase de compuestos químicos que difieren significativamente estructuralmente de los moduladores TRPM8 conocidos hasta ahora. Se descubrió sorprendentemente que esta clase de compuestos químicos, como se describe con más detalle en el presente, pueden proporcionar un enfriamiento duradero en la piel y/o mucosa humana en concentraciones muy bajas.

Breve Descripción de la Invención

En un primer aspecto, se proporciona un oxalato de un compuesto de la fórmula (I) (en particular para usar para proporcionar sensaciones refrescantes).



en donde:

R_1 se selecciona de metilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$ y $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$,

R_2 se selecciona de metilo, etilo y $-\text{CH}_2-\text{OH}$,

R_3 se selecciona de hidrógeno y $-\text{OH}$, y

X se selecciona de CH_2 , S , $>\text{S}=\text{O}$ y $>\text{SO}_2$.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método de modulación (modulación *in vitro* e *in vivo*) del miembro 8 de melastatina potencial del receptor transitorio (TRPM8) que comprende poner el receptor en contacto con un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), o un solvato.

En un tercer aspecto, se proporciona un método para

inducir una sensación refrescante en un ser humano o animal, que comprende poner en contacto al ser humano o animal con un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), o solvato del mismo.

5 En un cuarto aspecto se proporcionan productos de consumo, en particular productos de consumo que entran en contacto con la piel y/o mucosa humana, que comprenden un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), o un solvato del mismo.

10 En un quinto aspecto, se proporciona una composición que comprende una sensación refrescante, en la que la composición comprende un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), o solvato del mismo, y un compuesto refrescante adicional.

 En un sexto aspecto, se proporciona una composición
15 farmacéutica que comprende un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), o un solvato del mismo.

 En un séptimo aspecto se proporciona un método de purificación por cristalización de un compuesto de la fórmula (I), que comprende la etapa:

20 a) mezclar un compuesto de la fórmula (I) con ácido oxálico en presencia de un solvente alcohólico (por ejemplo, 1-butanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, isobutanol)

 b) seguido de la adición de un anti-solvente (por
25 ejemplo, n-heptano), y

c) separación del oxalato del compuesto de la fórmula (I).

Los detalles, ejemplos y preferencias proporcionados en relación con uno o más aspectos particulares de la presente invención se describirán con más detalle en la presente y se aplicarán por igual a todos los aspectos de la presente invención. Cualquier combinación de las modalidades, ejemplos y preferencias descritas en la presente en todas sus posibles variaciones, está abarcada por la presente invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

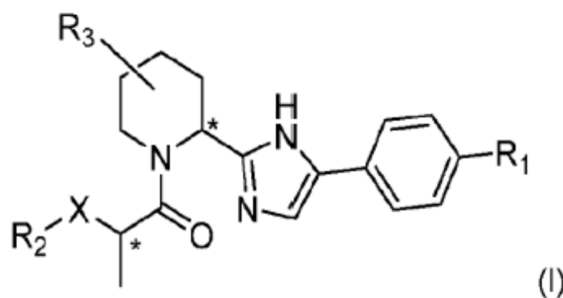
Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el sorprendente hallazgo de una nueva clase de compuestos químicos que difieren significativamente en términos estructurales de los moduladores de TRPM8 conocidos hasta ahora, que son capaces de activar el canal iónico TRPM8, lo que provoca una liberación de influjo de Ca^{2+} en las neuronas sensibles al frío. La señal eléctrica resultante se percibe finalmente como una sensación de frío. Sorprendentemente, el solicitante descubrió que esta clase de compuestos químicos, como se describe con más detalle en la presente, puede proporcionar un enfriamiento duradero en la piel y/o mucosa humana en concentraciones muy bajas.

Por lo tanto, en un primer aspecto se proporciona un

oxalato de un compuesto de la fórmula (I) (en particular para usar para proporcionar sensaciones refrescantes).

5



en donde:

R_1 se selecciona de metilo, $-CH_2OH$ y $-C(O)OH$,

10 R_2 se selecciona de metilo, etilo y $-CH_2-OH$,

R_3 se selecciona de hidrógeno y $-OH$, y

X se selecciona de CH_2 , S, $>S=O$ y $>SO_2$.

Ejemplos no limitantes son oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) en donde X es S, R_1 se selecciona de metilo, $-CH_2OH$ y $-C(O)OH$, y R_2 se selecciona de metilo y etilo.

15

Otros ejemplos no limitantes son oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) en donde R_2 es metilo, R_1 se selecciona de metilo, $-CH_2OH$ y $-C(O)OH$, y X se selecciona de S, $>S=O$, y $>SO_2$.

Otros ejemplos no limitantes son oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) en donde R_1 es metilo, R_2 se selecciona de metilo y etilo, y X se selecciona de S, $>S=O$ y $>SO_2$.

20

Otros ejemplos no limitantes son oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) en donde R_3 es hidrógeno.

Otros ejemplos no limitantes son oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) en donde R_1 es metilo, R_2 se selecciona de

25

metilo y etilo, R_3 es hidrógeno y X se selecciona de S, $>S=O$ y $>SO_2$.

Como ejemplo específico de un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), se puede citar carboxiformato de 2-(1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-il)-5-(p-tolil)-1H-imidazolio (oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona).

Otros ejemplos no limitantes son el oxalato de un compuesto de la fórmula (I) seleccionado del grupo que consiste de:

1-(2-(5-(4-(hidroximetil)fenil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)-2-(metiltio)propan-1-ona;

ácido 4-(2-(1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-il)-1H-imidazol-5-il)benzoico;

2-(metilsulfinil)-1-(2-(5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona;

1-(2-(5-(4-(hidroximetil)fenil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)-2-(metilsulfinil)propan-1-ona;

ácido 4-(2-(1-(2-(metilsulfinil)propanoil)piperidin-2-il)-1H-imidazol-5-il)benzoico;

2-(metilsulfonil)-1-(2-(5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona;

1-(2-(5-(4-(hidroximetil)fenil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)-2-(metilsulfonil)propan-1-ona; y

ácido 4-(2-(1-(2-(metilsulfonil)propanoil)piperidin-2-

il)-1H-imidazol-5-il)benzoico.

Por "oxalato" nos referimos a la sal de ácido oxálico en la que la relación molar de ácido oxálico al compuesto de la fórmula (I) es 1:1 ó 2:1.

5 Los compuestos definidos por la fórmula (I) comprenden varios centros quirales (dos de los cuales están indicados por * en la fórmula (I)) y como tales pueden existir como una mezcla de estereoisómeros o pueden resolverse como formas isoméricamente puras. La resolución de los estereoisómeros
10 aumenta la complejidad de la manufactura y purificación de estos compuestos y por eso se prefiere usar los compuestos como mezclas de sus estereoisómeros simplemente por razones económicas. Sin embargo, si se desea preparar estereoisómeros individuales, esto se puede lograr según métodos conocidos en
15 la técnica, por ejemplo, HPLC preparativa y GC, cristalización o síntesis estereoselectiva. Los compuestos definidos por la fórmula (I) también pueden existir en diversas formas tautoméricas, incluida la forma 1H-imidazol - 3H-imidazol. En consecuencia, las estructuras químicas representadas en la
20 presente abarcan todos los estereoisómeros y formas tautoméricas posibles de los compuestos ilustrados.

Los oxalatos de los compuestos definidos por la fórmula (I) son "agonistas de TRPM8", lo que significa que tienen un efecto agonista sobre la permeabilidad celular del ion Ca^{2+} de
25 los canales de TRPM8. Por consiguiente, por "agonista de TRPM8"

se entiende cualquier compuesto que, cuando se pone en contacto con el receptor de TRPM8, produce un aumento de la fluorescencia con respecto al fondo, usando el método FLIPR como se describe, por ejemplo, por Klein *et al.*, (Chem. Senses 36: 649-658, 2011), que también se describe con más detalle en la parte experimental.

Por consiguiente, se proporciona en un segundo aspecto un método de modulación (modulación *in vitro* e *in vivo*) del miembro 8 de melastatina potencial de receptor transitorio (TRPM8) que comprende poner el receptor en contacto con un oxalato de un compuesto de la fórmula (I).

En algunas modalidades del segundo aspecto de la invención, el método de modulación es un método *in vitro*.

En un tercer aspecto se proporciona un método no médico para inducir una sensación refrescante en un ser humano o animal, que comprende poner en contacto al ser humano o animal con un oxalato de un compuesto de la fórmula (I).

En algunas modalidades, el método es un método para lograr un efecto refrescante en la piel o mucosa, que comprende poner en contacto la piel o mucosa con un producto que comprende un oxalato de un compuesto de la fórmula (I).

El oxalato de un compuesto de la fórmula (I) se puede aplicar directamente o como una solución o suspensión, que comprende una cantidad eficaz de un oxalato de un compuesto de la fórmula (I). La cantidad que debe ser efectiva depende,

entre otras cosas, del área objetivo de TRPM8 del cuerpo, pero también de la potencia refrescante del compuesto o mezcla de compuestos.

En un cuarto aspecto se proporcionan productos de consumo,
5 en particular productos de consumo que entran en contacto con la piel y/o mucosa humana, que comprenden un oxalato de un compuesto de la fórmula (I).

Los productos de consumo que entran en contacto con la mucosa incluyen, pero no se limitan a, productos alimenticios,
10 bebidas, gomas de mascar, tabaco y productos sustitutivos del tabaco, productos para el cuidado dental, productos para el cuidado personal, incluidos productos para el cuidado de los labios, productos para la salud sexual y el cuidado íntimo.

En algunas modalidades, los productos para el cuidado
15 dental son productos para el cuidado bucal, productos para el cuidado de los dientes, limpiadores para prótesis dentales, adhesivos para prótesis dentales y similares.

En algunas modalidades, los productos alimenticios son productos consumibles helados, tales como helado, sorbete;
20 productos de confitería, tal como caramelos (duros) y chocolates; productos alimenticios que contienen menta o sabor a menta, salsas, productos lácteos, tal como bebidas a base de leche y yogures; y bocadillos.

En algunas modalidades, los productos sustitutivos del
25 tabaco son líquidos o sólidos que son adecuados para consumirse

por medios eléctricos, por ejemplo, líquidos para vapear.

En algunas modalidades, los productos de cuidado personal que entran en contacto con la mucosa son bálsamos labiales, pulverizadores nasales y gotas para los ojos.

5 Los productos de consumo que entran en contacto con la piel humana incluyen, entre otros, productos cosméticos. En algunas modalidades, los productos cosméticos son productos para el cuidado de la piel, especialmente productos para el baño, productos de limpieza y lavado de la piel, productos para
10 el cuidado de la piel, maquillaje de ojos, productos para el cuidado de las uñas, productos para el cuidado de los pies y similares. En algunas modalidades, los productos cosméticos son productos con efectos específicos, especialmente protectores solares, productos repelentes de insectos,
15 productos bronceadores, productos despigmentantes, desodorantes, antitranspirantes, depiladores y productos de afeitado. En algunas modalidades, los productos cosméticos son productos para el cuidado del cabello, especialmente champús para el cabello, productos para el cuidado del cabello,
20 productos para fijar el cabello, productos para dar forma al cabello y productos para teñir el cabello, así como productos para el cuidado del cuero cabelludo, tales como champús y cremas refrescantes para el cuero cabelludo.

En algunas modalidades, el producto de consumo se
25 selecciona de productos para el cuidado del aire, tales como

un ambientador o un ambientador en polvo "listo para usar" que puede usarse en el espacio del hogar (habitaciones, refrigeradores, armarios, zapatos o automóviles) y/o en un espacio público (salas de estar, hoteles, centros comerciales, etc...).

Los productos de consumo pueden tener cualquier forma física, como sólido, semisólido, emplasto, solución, suspensión, loción, crema, espuma, gel, pasta o una combinación de los mismos. La forma física adecuada del producto de consumo depende principalmente de las acciones específicas, tales como limpiar, suavizar, cuidar, enfriar y similares, que debe realizar tal producto de consumo.

En una determinada modalidad, los productos de consumo que entran en contacto con la piel humana son productos para el cuidado de tejidos (tales como detergentes para tejidos, acondicionadores de tejidos (incluyendo toallitas para secadora) y potenciadores de aroma (líquidos o sólidos)) que en una primera etapa se aplican a una tela, por ejemplo, cuando se lava la tela, estas telas pisadas entran entonces en contacto con la piel humana.

El nivel de uso de oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) depende, entre otras cosas, del área objetivo TRPM8 del cuerpo, pero también de la potencia refrescante del oxalato. Por ejemplo, en una aplicación oral de un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), tal como dentífrico, hilo dental,

goma de mascar o tira blanca, los niveles de uso pueden ser de aproximadamente 0.00001% (0.01 ppm) a aproximadamente 0.1% (1000 ppm); de aproximadamente 0.00005% (0.5 ppm) a aproximadamente 0.1% (1000 ppm); de aproximadamente 0.0001% (1 ppm) a aproximadamente 0.05% (500 ppm); o de aproximadamente 0.001% (10 ppm) a aproximadamente 0.01% (100 ppm) en peso de la composición. Cuando se usa un compuesto de la presente invención en un enjuague bucal, el nivel de uso puede ser de aproximadamente 0.000001% (10 ppb) a aproximadamente 0.01% (100 ppm) o de aproximadamente 0.0001% (1 ppm) a aproximadamente 0.001% (10 ppm) en peso de la composición. Cuando un oxalato de un compuesto de la fórmula (I) se administra por vía tópica, por ejemplo, en champús y lociones, los niveles pueden ser de aproximadamente 0.001% (10 ppm) a aproximadamente 0.5% (5000 ppm) en peso de la composición o de aproximadamente 0.01% (100 ppm) a aproximadamente 0.4% (4000 ppm) en peso de la composición.

La potencia refrescante (fuerza) de un compuesto se define por su valor EC_{50} . EC_{50} (concentración efectiva media máxima) se refiere a la concentración de un compuesto que induce una respuesta a la mitad entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición específico. Se usa comúnmente como medida de potencia. EC_{50} es una medida de la concentración, expresado en unidades μM ($\mu molar$), en donde 1 μM equivale a 1 $\mu mol/L$.

Los seres humanos perciben los compuestos con una EC_{50} de 10 μM o menos como refrescantes. Cuanto menor sea el valor de EC_{50} , mayor será la potencia de enfriamiento. Por ejemplo, los compuestos que tienen un valor de EC_{50} de aproximadamente 0.1 μM se perciben como compuestos refrescantes fuertes.

Sin embargo, las propiedades refrescantes de un compuesto no solo se definen por su fuerza (potencia; EC_{50}) sino también por su longevidad, que se refiere al período de tiempo (en minutos) durante el cual se percibe un efecto refrescante. La longevidad puede variar desde unos pocos segundos después del enjuague hasta varias horas o incluso días. En el contexto de los productos para el cuidado bucal, un efecto "duradero" preferido oscila típicamente entre 20 minutos después del enjuague y 3 horas.

Los oxalatos de los compuestos de la fórmula (I) son muy potentes en concentraciones relativamente bajas. Por lo tanto, se podría preparar una solución madre que se diluirá aún más antes de mezclarla con un producto de consumo. Además del agua, son solventes especialmente adecuados la triacetina y el propilenglicol. También se pueden mencionar acetona, alcohol bencílico, dihidrolevo-glucosenona, metiltetrahidrofurano, pentilenglicol, etilenglicol, lactato de etilo, lactato de metilo, lactato de propilo, dimetilsulfóxido, etanol, acetato de etilo, etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol y triacetina, que son solventes adecuados para oxalatos de los

compuestos de la fórmula (I). Pero también se pueden usar otros sistemas solventes que comprenden tensioactivos.

Para modificar el efecto refrescante de un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), el oxalato se puede combinar con
5 un compuesto seleccionado de iones y sales de calcio, iones y sales de magnesio, arginina o cualquier agente quelante que sea capaz de unirse al calcio o magnesio.

Se sabe que estos compuestos pueden modular la concentración de estos iones en el espacio extracelular y, por
10 lo tanto, influyen en la respuesta del canal iónico TRPM8, lo que lleva a un cambio en el efecto de enfriamiento percibido.

De acuerdo con Kizilbash *et al.* (WO2019/121193 A1) tanto la intensidad refrescante como la intensidad del sabor pueden mejorarse cuando se combinan con agentes que poseen la
15 propiedad de potenciar estos efectos. Por lo tanto, los oxalatos de la presente invención se pueden combinar en una modalidad particular con los agentes potenciadores descritos en WO2019/121193, que se incorpora como referencia, en particular con respecto a los agentes potenciadores.

20 Como agente potenciador adicional se puede citar N-lactoil etanolamina (2-hidroxi-N-(2-hidroxietil)propanamida; CAS 5422-34-4) que se conoce como potenciador para agentes refrescantes, por ejemplo, de la publicación PCT International WO 2008/107137 que se incorpora como referencia, en particular con respecto a
25 las sustancias que mejoran el enfriamiento, tal como se definen

en la fórmula (I).

Los oxalatos de la presente invención podrían usarse en combinación con otros compuestos refrescantes conocidos en la técnica.

5 Por lo tanto, en un quinto aspecto se proporciona una composición que comprende una sensación refrescante en la que la composición comprende por lo menos un oxalato de un compuesto de la fórmula (I) y un compuesto refrescante adicional.

10 En una modalidad particular, los oxalatos de la presente invención se pueden combinar con mentol (por ejemplo, en la forma de aceite de menta y/o aceite de menta verde), mentona, p-mentancarboxamidas, N-2,3-trimetil-2-isopropil-butanamida (WS-23), lactato de mentilo (Frescolat® ML), mentona glicerol
 15 acetal (Frescolat® MGA), 3-(1-mentoxi)-propan-1,2-diol (TK-10), p-mentan-3,8-diol (conocido como Coolact 38D), isopulegol (conocido como Coolact P), succinato de monomentilo (Physcool®), glutarato de monomentilo, o-mentilglicerol, N,N-dimetilsuccinato de mentilo, 2-(sec-butil)ciclohexan-1-ona
 20 (Freskomenthe), N-(pirazol-3-il)-N-(tiofen-2-ilmetil)-2-(p-toliloxi)acetamida, 2-(4-etilfenoxi)-N-(pirazol-3-il)-N-(tiofen-2-ilmetil)acetamida, 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N,N-difenilacrilamida, 4-(2-(4-alil-2,6-dimetoxifenoxi)-1-etoxipropil)-2-metoxifenol, 4-(2-(4-alil-2,6-dimetoxifenoxi)-
 25 1-((2-isopropil-5-metilciclohexil)oxi)propil)-2-metoxifenol

(que incluye 4-(2-(4-alil-2,6-dimetoxifenoxi)-1-(((1S,2R,5S)-2-isopropil-5-metilciclohexil)oxi)propil)-2-metoxifenol) y 4-(2-(4-alil-2,6-dimetoxifenoxi)-1-(((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexil)oxi)propil)-2-metoxifenol), N-(2-Hidroxi-2-feniletíl)-2-isopropil-5,5-dimetilciclohexan-1-carboxamida, N-(4-(cianometil)fenil)-2-isopropil-5,5-dimetilciclohexancarboxamida y N-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-isopropil-5,5-dimetilciclohexancarboxamida.

Ejemplos de p-metancarboxamidas incluyen compuestos, tales como N-etil-p-mentan-3-carboxamida (conocida comercialmente como WS-3), N-etoxicarbonilmetil-p-mentan-3-carboxamida (WS-5), N-(4-metoxifenil)-p-mentan-3-carboxamida (WS-12) y N-ter-butil-p-mentan-3-carboxamida (WS-14), N-(4-(cianometil)fenil)-2-isopropil-5-metilciclohexan-1-carboxamida (conocida comercialmente como Evercool 180), 2-isopropil-5-metil-N-(2-(piridin-2-il)etil)ciclohexan-1-carboxamida (conocida comercialmente como Evercool 190) y (1R,2S,5R)-N-((S)-2-((R)-2-aminopropanamido)-2-feniletíl)-2-isopropil-5-metilciclohexan-1-carboxamida.

Para lograr algo más que un simple efecto refrescante, el oxalato de la presente invención se puede combinar con otros activos, tales como sabores, fragancias y agentes edulcorantes.

Ejemplos de ingredientes saborizantes incluyen sabores naturales, sabores artificiales, especias, condimentos y similares. Los ingredientes saborizantes ejemplares incluyen

aceites saborizantes sintéticos y aromáticos y/o aceites saborizantes, oleorresinas, esencias y destilados, y una combinación que comprende por lo menos uno de los anteriores.

Los aceites aromatizantes incluyen aceite de menta verde,
5 aceite de canela, aceite de gaulteria (salicilato de metilo),
aceite de menta, aceite de menta japonesa, aceite de clavo,
aceite de laurel, aceite de anís, aceite de eucalipto, aceite
de tomillo, aceite de hoja de cedro, aceite de nuez moscada,
pimienta de Jamaica y aceite de salvia, macis, aceite de
10 almendras amargas y aceite de casia; los agentes aromatizantes
útiles incluyen sabores de frutas artificiales, naturales y
sintéticos, tal como vainilla y aceites cítricos que incluyen
limón, naranja, lima, toronja, yuzu, sudachi y esencias de
frutas, que incluyen manzana, pera, durazno, uva, frambuesa,
15 mora, grosella espinosa y arándano, fresa, cereza, ciruela,
ciruela pasa, cola, guaraná, neroli, piña, albaricoque,
plátano, melón, albaricoque, cereza, fruta tropical, mango,
mangostán, granada, papaya, etc.

Sabores ejemplares adicionales impartidos por una
20 composición aromatizante incluyen un sabor a leche, un sabor a
mantequilla, un sabor a queso, un sabor a crema y un sabor a
yogur; un sabor a vainilla; sabores de té o café, tales como
un sabor de té verde, un sabor de té oolong, un sabor de té,
un sabor de cacao, un sabor de chocolate y un sabor de café;
25 sabores de menta, tales como sabor a menta, sabor a menta verde

y sabor a menta japonesa; sabores picantes, tales como un sabor a asafétida, un sabor a ajowan, un sabor a anís, un sabor a angélica, un sabor a hinojo, un sabor a pimienta de Jamaica, un sabor a canela, un sabor a manzanilla, un sabor a mostaza, un sabor a cardamomo, un sabor a alcaravea, un sabor a comino, un sabor a clavo, un sabor a pimienta, un sabor a cilantro, un sabor a sasafrás, un sabor salado, un sabor a Zanthoxyli Fructus, un sabor a perilla, un sabor a baya de enebro, un sabor a jengibre, un sabor a anís estrella, un sabor a rábano picante, un sabor a tomillo, un sabor a estragón, un sabor a eneldo, un sabor a pimienta, un sabor a nuez moscada, un sabor a albahaca, un sabor a mejorana, un sabor a romero, un sabor a hoja de laurel y un sabor a wasabi (rábano picante japonés); un sabor a nuez, tal como un sabor a almendra, un sabor a avellana, un sabor a nuez de macadamia, un sabor a cacahuete, un sabor a nuez pecana, un sabor a pistache y un sabor a nuez; sabores alcohólicos, tales como sabor a vino, sabor a whisky, sabor a brandy, sabor a ron, sabor a ginebra y sabor a licor; sabores florales; y sabores vegetales, tales como sabor a cebolla, sabor a ajo, sabor a col, sabor a zanahoria, sabor a apio, sabor a champiñones y sabor a tomate.

En general, puede usarse cualquier saborizante o aditivo alimenticio (incluyendo colorantes alimentarios), tal como se describe en "Essential guide to food additives", Tercera edición 2008, página 101-321 (ISBN: 978-1-905224-50-0) por

Leatherhead Food International Ltd. La publicación se incorpora en la presente como referencia.

En una modalidad particular, los oxalatos de la presente invención se pueden combinar con anetol, mentol laevo, carvona laevo, etil maltol, vainillina, eucaliptol, eugenol, mentol racémico, cis-3-hexenol, linalol, aceite de menta (por ejemplo, aceite de menta arvensis (por ejemplo, incluyendo aceite de menta japonesa y aceite de menta estadounidense), aceite de piperita de menta, aceite nativo de menta verde, aceite de menta escocés), corilona, butirato de etilo, acetato de cis-3-hexenilo, citral, aceite de eucalipto, etilvainillina, salicilato de metilo, 2'-hidroxipropiofenona, acetato de etilo, metil dihidro jasmonato, geraniol, aceite de limón, acetato de isoamilo, timol, ionona beta, acetato de linalilo, decanal, cis jasmona, hexanoato de etilo, melonal (2,6-dimetilhept-5-enal), citronelol, acetoacetato de etilo, aceite de nuez moscada y aceite de clavo, o mezclas de los mismos.

Los ejemplos de agentes edulcorantes incluyen, entre otros, sacarosa, fructosa, glucosa, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, jarabe de maíz, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, acesulfame potásico, aspartame, neotame, sucralosa y sacarina, y sus mezclas; trilobatina, glucósido de hesperetina dihidrocalcona, naringina dihidrocalcona, mogrósido V, extracto de Luo Han Guo, rubusósido, extracto de rubus,

glicifilina, isomogrósido V, mogrósido IV, siamenósido I, neomogrósido, mukuroziósido IIb, (+)-hernandulcina, 4 β -hidroxihernandulcina, baiyunósido, flomisósido I, briodulcósido, briósido briósido, abrusósidos A-E, 5 ciclocariosido A, ciclocariósido I, albiziasaponinas A-E, glicirricina, araboglicirricina, periandrininas I-V, pterocariósidos A y B, osladina, polipodósidos A y B, telosmósido A8-18, filodulcina, huangqiósido E neoastilbina, monatina, 3-acetoxi-5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona, 2R,3R- 10 (+)-3-acetoxi-5,7,4'-trihidroxi-flavanona, 3-O-acetato de (2R,3R)-dihidroquercetina, 4'-metil éter de 3-O-acetato de dihidroquercetina, brazeína, curculina, mabinlina, monelina, neoculina, pentadina, taumatina y combinaciones de los mismos. Algunos de los compuestos enumerados anteriormente son 15 potenciadores del dulzor y edulcorantes conocidos. Cuando se usan como potenciadores del dulzor, normalmente se usan por debajo de sus umbrales de detección de dulzor.

En algunas modalidades, los oxalatos de la presente invención se pueden combinar con ingredientes adicionales 20 referidos colectivamente a materiales portadores oralmente aceptables.

En algunos aspectos, el vehículo oralmente aceptable puede comprender uno o más excipientes o diluyentes sólidos o líquidos compatibles que sean adecuados para la administración oral tópica. 25 Por "compatible", como se usa en la presente, se entiende que los

componentes de la composición son capaces de mezclarse sin interacción de una manera que reduciría sustancialmente la estabilidad y/o eficacia. Los vehículos pueden incluir los componentes habituales y convencionales de dentífricos, geles no
5 abrasivos, geles sub-gingivales, enjuagues o enjuagues bucales, pulverizadores bucales, gomas de mascar, pastillas y pastillas para el aliento. La elección del vehículo a usar está determinada básicamente por la forma en que se introducirá la composición en la cavidad bucal. Los materiales de vehículo para pasta de
10 dientes, gel dental o similares incluyen materiales abrasivos, agentes espumantes, aglomerantes, humectantes, agentes aromatizantes y edulcorantes, etc., como se describe, por ejemplo, en las patentes de U.S. No. 3,988,433, para materiales Benedict Carrier para formulaciones de dentífricos bifásicos se describen
15 en las patentes U.S. Nos. 5,213,790; 5,145,666 y 5,281,410, todas de Lukacovic *et al.*, y en las patentes U.S. 4,849,213 y 4,528,180 de Schaeffer. Los materiales de vehículos de enjuagues bucales, enjuagues o pulverizadores bucales normalmente incluyen agua, agentes aromatizantes y edulcorantes, etc., como se describe, por
20 ejemplo, en las patentes de U.S. No. 3,988,433 de Benedict. Los materiales de vehículo de pastillas normalmente incluyen una base de caramelo; los materiales portadores de goma de mascar incluyen una base de goma, agentes aromatizantes y edulcorantes, como, por ejemplo, en las patentes U.S. 4,083,955, de Grabenstetter *et al.*,
25 Los materiales de vehículo de bolsitas incluyen típicamente una

bolsita, agentes saborizantes y edulcorantes. Para los geles subgingivales usados para la administración de activos dentro de las bolsas periodontales o alrededor de las bolsas periodontales, se elige un "vehículo de gel subgingival" como se describe, por ejemplo, en la publicación de Patente U.S. Nos. 5,198,220 y 5,242,910 ambas de Damani. Los vehículos adecuados para la preparación de composiciones de la presente descripción son bien conocidos en la técnica. Su selección dependerá de consideraciones secundarias, tal como el sabor, el costo y la estabilidad en almacenamiento, etc.

Otros tipos adecuados de materiales portadores o excipientes oralmente aceptables se listan en WO2010/059289, en particular en las páginas 17-31, que se incorpora como referencia.

La literatura científica señala que la activación de los canales de TRPM8 puede ser útil para el tratamiento de la mayoría de patologías mediadas por TRPM8 (J. Med. Chem. 2016, 59 (22), 10006-10029). Por lo tanto, se puede suponer que los oxalatos de la presente invención también podrían ser adecuados para tratar carcinomas de próstata, debilidad de la vejiga, inflamación o dolor que comprende poner en contacto a un paciente con un oxalato de un compuesto de la fórmula (I) como se define en la presente. También se puede suponer que los oxalatos son adecuados para aliviar los síntomas de tos y resfriado, irritaciones, dolor de garganta o ronquera, así como

para el tratamiento de la disfagia laringofaríngea (Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 4113).

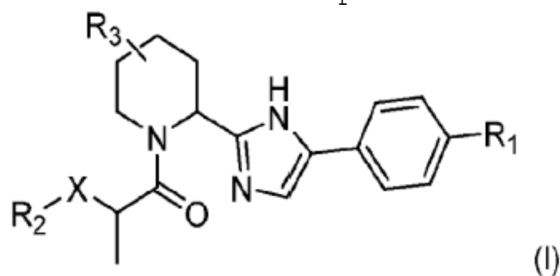
Por lo tanto, en un sexto aspecto se proporciona una composición farmacéutica que comprende un oxalato de un compuesto de la fórmula (I), como se define anteriormente en la presente.

Dependiendo del régimen de tratamiento particular contemplado, las composiciones farmacéuticas que comprenden un oxalato de un compuesto de la fórmula (I) pueden administrarse por vía parenteral, tópica, oral o local. Las composiciones farmacéuticas pueden ser una formulación líquida, suspensiones o sólida.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica es un aerosol nasal, una crema tópica, un aerosol para la piel, un aerosol para la garganta o gotas para los ojos.

Los oxalatos de un compuesto de la fórmula (I) no se describen en la literatura y, por lo tanto, son nuevos por derecho propio.

Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención se proporciona un oxalato de un compuesto de la fórmula (I):



en donde:

R₁ se selecciona de metilo, -CH₂OH y -C(O)OH,

R₂ se selecciona de metilo, etilo y -CH₂-OH,

R₃ se selecciona de hidrógeno y -OH, y

X se selecciona de CH₂, S, >S=O y >SO₂.

5 Los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar generalmente como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/EP2020/079009 (WO 2021074281) que se incorpora como referencia.

Mientras que determinados compuestos de la fórmula (I)
10 son amorfos y, por lo tanto, difíciles de purificar y, por lo tanto, difíciles de dosificar, los oxalatos de los compuestos de la fórmula (I) son accesibles en forma muy pura debido a su forma cristalina a temperatura ambiente.

De esta manera, se proporciona en un séptimo aspecto de
15 la invención, un método de purificación por cristalización de un compuesto de la fórmula (I), que comprende la etapa:

- a) mezclar un compuesto de la fórmula (I) con ácido oxálico en presencia de un solvente alcohólico,
- b) seguido de la adición de un anti-solvente, y
- 20 c) separación del oxalato del compuesto de la fórmula (I).

En una modalidad particular, los compuestos de la fórmula (I) se pueden mezclar con ácido oxálico sin purificación previa. De preferencia, se adiciona por lo menos 1 equivalente molar (por ejemplo, 1.33 equivalentes molares) de ácido oxálico
25 para convertir la cantidad total del compuesto de la fórmula

(I) presente en la mezcla (cruda).

Los solventes alcohólicos adecuados se pueden seleccionar de 1-butanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-pentanol, 3-metil-1-butanol e isobutanol. En una modalidad específica,
5 el solvente alcohólico es butanol (por ejemplo, 1-butanol).

Por "anti-solvente" se entiende un solvente en el que el oxalato del compuesto de la fórmula (I) es menos soluble. Como ejemplos específicos se pueden mencionar hidrocarburos alifáticos y solventes aromáticos, tales como n-heptano,
10 hexano, ciclohexano, pentano, tolueno y xileno, y mezclas de los mismos. En una modalidad específica, el anti-solvente es n-heptano.

El anti-solvente se adiciona en la segunda etapa para mediar en la cristalización. La cantidad de anti-solvente (por
15 ejemplo, n-heptano) adicionada en la etapa b) preferentemente no debe exceder la cantidad de solvente alcohólico (por ejemplo, 1-butanol) adicionado en la etapa a). En una modalidad particular, se debe adicionar solvente alcohólico (por ejemplo, 1-butanol) a aproximadamente 4-5 veces el volumen de la mezcla
20 cruda que comprende el compuesto de la fórmula (I).

Para iniciar la cristalización se puede adicionar una cantidad menor de un oxalato del compuesto de la fórmula (I) después de que el compuesto de la fórmula (I) y el ácido oxálico se hayan disuelto completamente en 1-butanol.

25 La etapa de separación c) se puede realizar mediante, por

ejemplo, filtración del oxalato o evaporación del solvente. Se prefiere la filtración del oxalato a la obtención de cristales más puros.

En una modalidad particular se proporciona un método de purificación por cristalización de un compuesto de la fórmula (I), que comprende la etapa:

- a) mezclar un compuesto de la fórmula (I) con ácido oxálico en presencia de 1-butanol,
- b) seguido de la adición de n-heptano, y
- c) separación del oxalato del compuesto de la fórmula (I).

En esta modalidad particular, la etapa de cristalización b) se inicia preferentemente a aproximadamente 50°C seguido de enfriamiento a aproximadamente 0°C para obtener un oxalato que tiene casi la misma composición de estereoisómeros que el compuesto de la fórmula (I) agregado en la etapa a). Una temperatura inicial más alta, como aproximadamente 60-65°C, podría provocar la pérdida (parcial) de un diastereómero.

La invención se describe ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y se entiende que un experimentado en la técnica puede realizar variaciones y modificaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona

25	Ejemplo	1a:	ácido	1-(2-
----	---------	-----	-------	-------

(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxílico

Se cargó un reactor Ika de 2,000 mL, equipado con un ajuste de pH automatizado, un termostato y un embudo de goteo con NaOH 2 M (683 mL, 0.6 eq. mol). Se adicionó en porciones
5 ácido pipecólico (300 g, 2.276 mol) seguido de NaOH 2 M adicional (240 mL). La mezcla se enfrió a 5°C y se adicionó cloruro de 2-(metiltio)propanoilo (325 g, 2.276 mol) durante 2 horas mientras se mantenía un pH de 13. La mezcla se agitó a 5°C durante una hora, HCl 2 M (2,500 mL) y la solución acuosa
10 se extrajo con MtBE (2 x 1500 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 1500 mL) y salmuera (500 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. Se obtuvo ácido 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxílico bruto (480 g) en
15 forma de un aceite viscoso de color amarillo. Los productos en bruto combinados de dos lotes (951 g) se recrystalizaron en MtBE para dar ácido 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxílico (570 g, 2.46 mol, rendimiento de 54%) como un sólido blanco.

20 Ejemplo 1b: 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxilato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo

Un matraz de sulfonación de 4,500 mL, equipado con un agitador superior y calentado con un baño de aceite, se cargó con tributilamina (961 g, 5.133 mol) y bromuro de
25 tretrabutylamonio (76 g, 0.234 mol). La mezcla se calentó a

una temperatura interna de 70°C y se adicionó en porciones ácido 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxílico (1197 g, 5.123 mol) durante 30 minutos. Luego se adicionó en porciones 2-cloro-1-(p-tolil)etan-1-ona (815 g, 4.783 mol) durante 20 minutos y la mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a 55°C, se adicionó MtBE (1000 mL) y la reacción se inactivó con agua (1400 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con HCl 2 M (1200 mL) y agua (1500 mL). Después de la adición de NaOH 2 M, la fase orgánica se separó y se lavó con agua (3 x 1500 mL) y salmuera (1000 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y el producto se dejó cristalizar durante 16 horas. Los sólidos se aislaron por filtración, se lavaron con MtBE frío y pentano y se secó a presión reducida para dar 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxilato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo (1409 g, rendimiento 81%) como cristales blancos.

Ejemplo 1c: 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona: 1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-carboxilato de 2-oxo-2-(p-tolil)etilo (550 g, 1.513 mol) en un matraz de sulfonación de 2500 mL equipado con un separador de agua Dean-Stark, agitador mecánico y se calentó mediante un baño de aceite. Se adicionó tolueno (700 mL) y la mezcla se calentó a reflujo (temperatura del baño de aceite 140°C). Se adicionó en una porción acetato de amonio (116 g, 1.513 mol). Se observó un fuerte

desprendimiento de gas y el agua producida por la reacción comenzó a separarse. Después de 45 minutos, se adicionó otra porción de acetato de amonio (145 g, 1.891 mol) seguida de otra porción (145 g, 1.891 mol) 45 minutos más tarde. Después de
 5 agregar un total de 3.5 equivalentes de acetato de amonio, la mezcla se agitó a reflujo durante 1 hora, se enfrió a 60°C y el pH se ajustó a 7 adicionando NaOH 2 M (aproximadamente 800 mL). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con MtBE (500 mL). Las fases orgánicas combinadas se
 10 concentraron luego para dar 565 g de una calidad bruta viscosa de color naranja oscuro de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona. La purificación de una pequeña muestra mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en heptano) proporcionó 2-
 15 (metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona como un sólido blanco.

MS (EI, 70 eV): 343 (2, [M]⁺•), 241 (17), 240 (100), 213 (13), 185 (18), 184 (9), 75 (55), 56 (11), 55 (9), 47 (10), 41 (11). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, mezcla de estereoisómeros y tautómeros) δ 12.07, 11.99, 11.95, 11.76 (brs, 1H), 7.72-7.60 (m, 2H), 7.59-7.42 (m, 1H), 7.26-7.08 (m, 2H), 5.75-5.39 (m, 1H), 4.49-3.00 (m, 3H), 2.71-2.15 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.07-1.96 (m, 3H), 1.94-1.48 (m, 5H), 1.43-1.34 (m, 3H) ppm. ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-d₆, mezcla de estereoisómeros y tautómeros) δ
 20 170.2 (q), 170.2 (q), 170.0 (q), 147.0 (q), 146.8 (q), 146.7
 25

(q), 140.4 (q), 140.3 (q), 139.9 (q), 135.3 (q), 135.2 (q), 135.1 (q), 132.7 (q), 132.6 (q), 132.6 (q), 129.7 (t), 129.3 (t), 124.6 (t), 113.0 (t), 112.6 (t), 112.5 (t), 51.5 (t), 47.3 (t), 47.0 (t), 43.1 (d), 43.0 (d), 38.8 (d), 38.0 (t), 37.6 (t), 37.3 (t), 28.8 (d), 28.6 (d), 28.1 (d), 27.9 (d), 26.1 (d), 25.7 (d), 25.4 (d), 21.2 (s), 20.3 (d), 20.1 (d), 18.3 (s), 18.0 (s), 17.8 (s), 11.9 (s), 11.7 (s), 11.6 (s) ppm.

Ejemplo 1d: Oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona:

10 Se suspendió 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona cruda preparada como se describe en el Ejemplo 1a (48.7 g) en 1-butanol (165 mL, 4.5 volúmenes). La mezcla se calentó a 65°C y se cargó en porciones ácido oxálico (9.56 g, 1.33 equivalentes molares) durante 9 minutos, manteniendo una temperatura de 60-65°C. Tras completar la adición, se aplicó un enjuague del recipiente con 1-butanol (17.5 mL, 0.5 volúmenes) y la solución de color naranja oscuro/café se enfrió a 50°C. Se cargó semilla de carboxiformato de 2-(1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-il)-5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-ilo (365 mg, 1% en peso) y se observó que se mantenía en solución. La mezcla se mantuvo a 50°C durante 1 hora, antes de cargar gota a gota heptano (184 mL, 5 volúmenes) mediante una bomba de jeringa durante 7 horas a 50°C. Tras completar la adición, la mezcla se mantuvo a 50°C durante 1 hora, se enfrió a 0°C durante 12.5 horas y luego se

mantuvo a 0°C durante 1 hora antes de que los sólidos se
aislaran mediante filtración. El recipiente y la torta de
filtración se lavaron con heptano/1-butanol [3:1] (2 x 73 mL,
2 x 2 volúmenes). La torta de filtración se secó al aire a
5 presión reducida durante 60 minutos, los sólidos a granel se
colectaron y se secaron a presión reducida a 65°C para producir
el oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-
il)piperidin-1-il)propan-1-ona (36.8 g, 848 mmol, 79.8% de
recuperación) como cristales blanquecinos.

10 Confórmero mayor del diastereoisómero 1:

¹H RMN (600 MHz, MeOD-d₄) δ 7.70 (br s, 1H), 7.63-7.58 (m,
2H), 7.32-7.28 (m, 2H), 6.14-6.08 (br m, 1H), 4.13-4.05 (br m,
1H), 3.93 (br q, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.20-3.11 (br m, 1H), 2.57-
2.51 (br m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.98-1.88 (br m,
15 1H), 1.86-1.77 (br m, 2H), 1.72-1.66 (br m, 1H), 1.57-1.48 (br
m, 1H), 1.49 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H) ppm.

¹³C RMN (150 MHz, MeOD-d₄) δ 173.6 (s), 166.3 (2s), 148.4
(s), 140.9 (s), 136.7 (s), 131.0 (2d), 127.2 (2d), 126.2 (s),
116.6 (d), 49.0 (d), 44.8 (t), 38.8 (d), 28.4 (t), 26.0 (t),
20 21.5 (q), 21.2 (t), 17.5 (q), 11.4 (q) ppm.

Confórmero mayor del diastereómero 2 (desplazamientos
parcialmente extraídos de HSQC/HMBC):

¹H RMN (500 MHz, MeOD-d₄) δ 7.72 (br s, 1H), 7.65-7.60 (m,
2H), 7.30-7.26 (br m, 2H), 5.87-5.83 (m, 1H), 4.66-4.59 (br m,
25 1H), 3.85 (br q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.60-2.53 (br m, 1H), 2.36

(s, 3H), 2.24–2.15 (br m, 1H), 2.07 (br s, 3H), 2.06–1.97 (br m, 1H), 1.85–1.76 (br m, 1H), 1.72–1.62 (br m, 1H), 1.59–1.49 (m, 1H), 1.50–1.46 (br m, 3H), 1.49–1.37 (br m, 1H) ppm.

¹³C RMN (150 MHz, MeOD-d₄) δ 171.9 (s), 166.3 (s), 148.0 (s), 140.7 (s), 137.0 (s), 131.0 (2d), 127.2 (2d), 126.2 (s), 116.8 (d), 53.1 (d), 40.8 (t), 38.8 (d), 28.4 (t), 26.3 (t), 21.6 (t), 21.5 (q), 17.7 (q), 11.3 (q) ppm.

Ejemplo 2: Prueba en moduladores de TRPM8

Se generó una línea celular HEK293 que expresa establemente hTRPM8 de acuerdo con Klein *et al.*, (Chem. Senses 36: 649–658, 2011) y la activación del receptor se controló mediante imágenes de calcio en una Flexstation. Para las pruebas de imágenes de Ca de la activación del canal TRPM8, las células se sembraron el día 0 a una densidad de 12,000 células por pozo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 9% en placas de 96 pozos de fondo transparente y negro que habían sido recubierto con polietilenimina al 0.001% (peso molecular = 60,000, Acros Organics). El día 2, se evaluaron los agonistas mediante imágenes de calcio usando Fluo-4. Brevemente, se descartó el medio de crecimiento y las células se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a 37°C en 50 µL de amortiguador de carga que consistía en Fluo-4 AM 2.7 µM (Invitrogen) y probenecid 2.5 µM (Sigma-Aldrich) en DMEM (sin suero). Después de la incubación, las placas se lavaron cinco veces con 100 µl de amortiguador

de prueba (en mM: 130 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂ y 10 glucosa, pH 7.4) y se incubaron adicionalmente en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron cinco veces con 100 µL de amortiguador de prueba y luego se infundieron calcio en diluciones en serie de carboxiformato de 2-(1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-il)-5-(p-tolil)-1H-imidazolio se midió en un Flexstation 3 (Molecular Devices). La activación del receptor se inició tras la adición de 20 µL de una solución madre de ligando concentrada 10 veces, que también se prepara en amortiguador de prueba. La fluorescencia se controló continuamente durante 15 segundos antes de la adición del ligando y durante 105 segundos después de la adición del ligando, para un total de 120 segundos. Se determina la activación máxima del receptor en relación con el control del solvente y en relación con 31.6 µM de mentol. Los datos de diluciones en serie se procesaron con un flujo de trabajo KNIME para ajustar una curva dosis-respuesta sigmoidea y extrapolar los valores de EC50.

El agonista de TRPM8, carboxiformato de 2-(1-(2-(metiltio)propanoil)piperidin-2-il)-5-(p-tolil)-1H-imidazolio, que es el oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)-1H-imidazol-2-il)piperidin-1-il)propan-1-ona" presenta un valor de EC50 menor a 0.01 µM.

Ejemplo 3: Evaluación sensorial en modelo dentífrico

El oxalato de 2-(metiltio)-1-(2-(5-(p-tolil)imidazol-2-

il)piperidin-1-il)propan-1-ona (preparado de acuerdo con el Ejemplo 1d) se disolvió a una concentración de 1% en peso en propilenglicol. Luego, esta solución se dispersó en una cantidad apropiada para obtener la concentración final deseada de 10 ppm (partes por millón) del compuesto de prueba en un modelo de dentífrico sin sabor, cuya fórmula se proporciona a continuación (los ingredientes se obtienen de los proveedores indicados respectivamente entre paréntesis).

		% en peso
10	Fosfato trisódico dodecahidratado	0.2
	Sorbitol	50.0
	Sílice precipitada - Sorbosil™ AC77 (<i>Surfachem</i>)	8.0
	Sílice precipitada - Sorbosil™ TC15 (<i>Surfachem</i>)	9.0
	Carboximetilcelulosa sódica 9M31XF (<i>Ashland</i>)	0.8
15	Dióxido de titanio	1.0
	Lauril sulfato de sodio	1.5
	PEG 1500 (<i>Kilo</i>)	5.0
	Agua Desmineralizada	24.5

Un panel de saboristas capacitados evaluó el dentífrico que contenía oxalato, cepillándose los dientes con 1 g del dentífrico usando un cepillo de dientes durante 60 segundos, seguido de escupir, sin enjuagarse la boca posteriormente durante la evaluación. Los saboristas evaluaron y registraron el rendimiento de enfriamiento, así como otros atributos sensoriales y organolépticos en diferentes momentos durante un

período de 90 minutos. Se registraron las siguientes notas de cata: Buen enfriamiento. Limpio, con un agradable y suave efecto de cosquilleo. Activo en todas las zonas de la boca. De acción rápida (enfriamiento inicial) y el efecto se percibe ya
5 durante el cepillado. Fuerte pico refrescante con efecto duradero de hasta una hora. Sin rasgos negativos ni amargura”.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente
10 descripción de la invención.

15

20

25