



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 204**

51 Int. Cl.:
A61K 31/403 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03752754 .6**
86 Fecha de presentación : **16.05.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1505964**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Compuestos pirrólicos recocidos como inhibidores de la bomba de protones para el tratamiento de la úlcera.**

30 Prioridad: **17.05.2002 EP 02011081**
17.05.2002 US 380928 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **MERCKLE GmbH**
Graf-Arco-Strasse 3
89079 Ulm, DE

72 Inventor/es: **Smolka, Adams, J.;**
Hammond, Charles, E. y
Gupta, Sandeep

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos pirrólicos recocidos como inhibidores de la bomba de protones para el tratamiento de la úlcera.

La presente invención se refiere a la utilización del compuesto pirrólico recocido ML3000, de una sal o de un éster del mismo como inhibidor de la bomba de protones.

Antecedentes de la invención

Las úlceras pépticas son una de las enfermedades más prevalentes en los países industrializados.

Los inhibidores de la secreción de ácido se encuentran entre los medicamentos más prescritos, lo que refleja el adagio fisiológico “no ácido, no úlcera”. La interrupción farmacológica o patofisiológica de las barreras de la mucosa gástrica para hacer retroceder la difusión de HCl conduce a una erosión rápida de la monocapa epitelial gástrica y, como consecuencia, a una ulceración de la mucosa. La inhibición de la secreción ácida mediante un antagonista del receptor H_2 de la histamina en células parietales (cimetidina), o por derivatización covalente directa e inactivación de la bomba de protones gástrica (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol) es habitual para mejorar y promover la cicatrización de úlceras gástricas. La bomba de protones gástrica es una enzima también conocida como H^+/K^+ -ATPasa. Se localiza en la membrana de las células parietales gástricas y es responsable del transporte de protones desde la sangre al lumen, lo que a su vez resulta en una disminución del pH del contenido del estómago.

De hecho, el omeprazol mismo es un promedicamento que, bajo condiciones ácidas, se convierte en el medicamento activo, a saber su sulfenamida correspondiente. El mecanismo de acción del omeprazol ha sido bien estudiado y se sabe que involucra un ataque nucleofílico de uno (o dos) grupo(s) tiol de la H^+/K^+ -ATPasa en el átomo de azufre de la sulfonamida químicamente activa. La modificación química resultante del(los) grupo(s) tiol de la enzima (formación de un enlace disulfuro entre el azufre de H^+/K^+ -ATPasa y el azufre de la sal de piridinio de bencimidazol) provoca la inhibición de la bomba de protones observada. No obstante, se ha de recalcar que la conversión del promedicamento en un inhibidor de la enzima activo únicamente se puede producir en medios ácidos, lo que resulta también en la degradación sustancial de la sulfenamida activa. En resumen, la inestabilidad del omeprazol en ambientes ácidos, que es un prerequisite para su activación en un inhibidor de la bomba de protones, es el mayor inconveniente de este medicamento.

Además de la secreción ácida, la secreción de interleucina-8 representa otra función de la mucosa gástrica, la cual juega un papel importante en la ulceración gástrica.

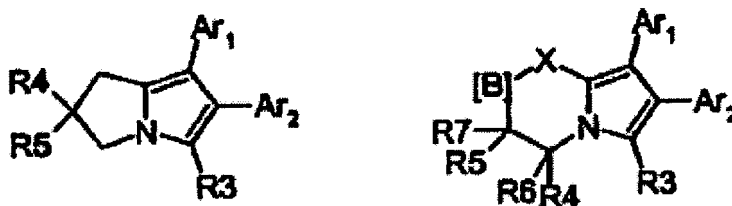
Se ha demostrado que la bacteria ulcerogénica *Helicobacter pylori* incrementa la velocidad y amplía la secreción de IL-8 tanto *in vitro* como *in vivo* y que regula la expresión del gen para IL-8. Se observan efectos prosecretorios similares para IL-8 como resultado de la estimulación con el IL-1b de las células epiteliales gástricas.

En el ámbito clínico son ampliamente utilizados los antiflogísticos no esteroideos (NSAIDs), por ejemplo ácido acetilsalicílico (ASA), diclofenaco, indometacina, ibuprofeno y naproxeno. Desde un punto de vista farmacológico, actúan como inhibidores de la ciclooxigenasa (COX).

Las propiedades antiinflamatorias de los NSAIDs se relacionan con su supresión de la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, la supresión de prostaglandinas gástricas disminuye el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, lo que conlleva una sensibilidad de la mucosa al daño tóxico generado diversos irritantes. La ulceración gástrica inducida por los NSAIDs limita de manera significativa la utilidad de estos medicamentos.

Las pirrolizinas, que actúan de una forma farmacológicamente similar, son conocidas de numerosas publicaciones. Por ejemplo, se describen pirrolizinas antiflogísticamente activas en Arch Pharm 319, 65-69 (1986); 319, 231-234 (1986); 318, 661-663 (1985); 318, 663-664 (1985); 310, 500-505 (1986); 319, 749-755 (1986); 327, 509-514 (1994); 330, 307-312 (1997), así como en J. Med. Chem. 1987, 30, 820-823 y 1994, 37, 1894-1897.

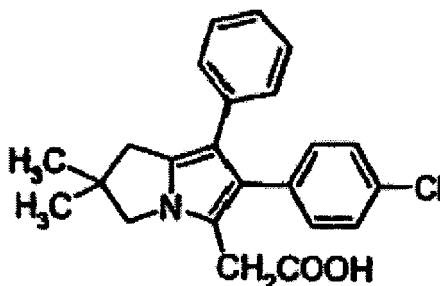
Se pueden encontrar otras pirrolizinas en la US 5.260.451 (correspondiente a la EP 0397175), así como en WO 95/32970; WO 95/32971; y WO 95/32972. Estos compuestos vienen representados por las fórmulas estructurales:



y comparten una porción diarilpirrol recocida, así como un tercer residuo ácido R3. Los compuestos están caracterizados por su alta lipofiliadad, buena biodisponibilidad y vida media en un intervalo medio, véase Drugs of the Future, 1995, 20 (10):1007-1009.

Se describen otras pirrolizinas de constitución similar en DE 198 45 446.6 y WO 01/05792. Además, se indica que las pirrolizinas sustituidas con alquilsulfinilbenzoílo y alquilsulfonilbenzoílo, de acuerdo con la US 4.232.038, tienen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Según la DE 196 24 290.8 y la DE 196 24 289.4, ciertos compuestos de este tipo tienen una acción lípido-reductora.

El ML-3000 (ácido [2,2-dimetil-6-(4-clorofenil)-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético), de fórmula (Ia)

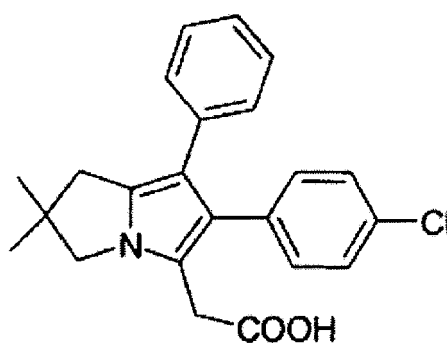


es un inhibidor dual equilibrado no antioxidante de COX y 5-lipoxigenasas (5-LO) (1). El medicamento es un inhibidor no selectivo de COX, inhibiendo tanto COX-1 como COX-2. Este medicamento tiene actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria y se ha demostrado que tiene una potente acción antiinflamatoria en muchos modelos animales, incluyendo el edema plantar en la pata inducido por carragenina en la rata y artritis adyuvante en la rata (2). La WO 96/41626 describe combinaciones de inhibidores de COX-2 con inhibidores de 5-LO (como ML3000) para el tratamiento de la inflamación y de trastornos asociados a inflamación. Además, se ha reportado que ML3000 muestra una excelente tolerancia gastrointestinal (12, 13). No obstante, no se han observado propiedades gastroprotectoras (11).

Sorprendentemente, se ha descubierto que ML-3000 tiene un efecto gastroprotector significativo. Este fenómeno se asocia no sólo con una inhibición significativa de la bomba de protones gástrica, sino también con la inhibición de la secreción de IL-8 en las células epiteliales gástricas.

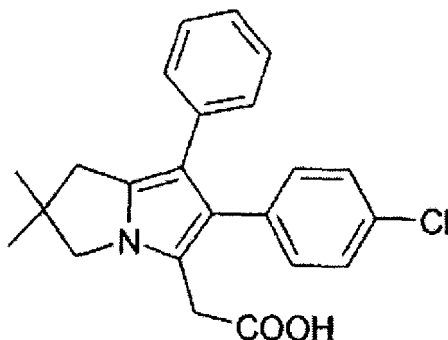
Sumario de la invención

Por tanto, la presente invención se refiere a la utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético (ML-3000), representado por la fórmula (Ia):



de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar lesiones de la mucosa gástrica; para tratar o evitar la gastritis erosiva; para tratar o evitar la gastritis no erosiva; para tratar o evitar la ulceración gástrica; o, para tratar o evitar el *Ulcus duodeni* (úlcera duodenal) o el *Ulcus ventriculi* (úlcera gástrica).

La presente invención se refiere también a una combinación de (i) ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético, de fórmula (Ia)



de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo, con (ii) uno o más agentes ulcerogénicos antiinflamatorios, para su utilización en terapia, en la que el agente ulcerogénico antiinflamatorio se selecciona de entre el grupo consistente en ácido acetilsalicílico (ASA), salicilato sódico, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelona, nabumetona, tenidap, alclofenaco, antipirina, aminopirina, dipirona, aminopirona, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, bencidamina, bucolome, cincofeno, clonixina, ditrazol, epirizol, fenoprofeno, floctafenina, ácido flufenámico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindac, suprofeno, tolmetina, nabumetona, tiaramida, procuazona, bufexamac, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, fentiazac, tilomisole, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, pirprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, tenoxicam,

o de una composición farmacéutica que comprende (i), (ii) y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las sales fisiológicamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas o básicas.

Las sales de adición ácidas son aquellas sales de los compuestos de fórmula (Ia) con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos, en particular ácidos carboxílicos, por ejemplo los ácidos acético, tartárico, láctico, cítrico, málico, mandélico, ascórbico, maleico, fumárico, glucónico o sulfónico, por ejemplo ácido metanosulfónico, ácido fenilsulfónico y ácido toluensulfónico.

Las sales de adición de base son aquellas sales de los compuestos de fórmula (Ia) con bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio o de potasio o con bases orgánicas tales como mono-, di- o tri-etanolamina.

Los ésteres fisiológicamente hidrolizables de los compuestos de fórmula (Ia) incluyen, en particular, los promediamientos de los compuestos de fórmula (Ia), que se reconvierten *in vivo* en los compuestos de fórmula (Ia) o en una forma activa de los mismos (metabolito). Ejemplos son alquil ésteres (que comprenden la funcionalidad COOalquilo), aralquil ésteres (que comprenden la funcionalidad COOalcarilo, por ejemplo COOalquilfenilo), pivaloiloximetil, acetoximetil, ftalidil, indanil y metoximetil ésteres de los compuestos de fórmula (Ia).

El término “alquilo” incluye grupos alquilo lineales o ramificados, tales como CH₃, C₂H₅, n-propilo, CH(CH₃)₂, n-butilo, CH(CH₃)-C₂H₅, isobutilo, C(CH₃)₃, n-pentilo o n-hexilo, en particular CH₃, C₂H₅ ó CH(CH₃)₂, preferentemente, salvo que se establezca de otra manera, de 1 a 8 átomos de carbono, en especial de 1 a 6 y en particular de 1 a 4 átomos de carbono.

“-COOalquilo” significa alcóxicarbonilo, tal como CO-OCH₃, CO-OC₂H₅, CO-OCH₂-C₂H₅, CO-OCH(CH₃)₂, n-butoxicarbonilo, CO-OCH(CH₃)-C₂H₅, CO-OCH₂-CH(CH₃)₂, CO-OC(CH₃)₃, en particular CO-OCH₃, CO-OC₂H₅, CO-OCH(CH₃)₂ ó CO-OCH₂-CH(CH₃)₂.

“-COOalquilfenilo” significa un grupo alcóxicarbonilo sustituido en la parte alquilo con fenilo, tal como benciloxycarbonilo.

“Arilo” significa preferentemente naftilo y en particular fenilo.

El término “inhibidor de la bomba de protones” tal como se utiliza se entiende en referencia a aquellos compuestos que inhiben la actividad gástrica de la H⁺,K⁺-ATPasa. Esta actividad puede determinarse mediante ensayos bien conocidos, por ejemplo en términos de liberación de fosfato inorgánico del sustrato ATP (Hongo T. y col., J.J. Pharmacol. 52: 295 (1990)). Son preferentes aquellos compuestos de fórmula (Ia) que tienen una concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) de 50 μM o inferior. La utilización de estos compuestos de fórmula (Ia) con una IC₅₀ de 5 μM o inferior puede resultar ventajoso según la invención. Los inhibidores de la bomba de protones de fórmula (Ia) más eficaces tienen una IC₅₀ de 0,5 μM o inferior. Según otro aspecto, son preferentes aquellos compuestos de fórmula (Ia)

que inhiben la bomba de protones de forma reversible. Según otro aspecto, son preferentes aquellos compuestos de fórmula (Ia) cuya actividad inhibidora de la bomba de protones es esencialmente independiente del pH en un rango de pH de aproximadamente 3 a 8.

Estos compuestos se pueden identificar entre los compuestos de fórmula (Ia) utilizando procedimientos de screening bien conocidos, por ejemplo procedimientos de screening de alto rendimiento (HTS). Un procedimiento típico comprende ensayar la inhibición gástrica de la H^+, K^+ -ATPasa con cada uno de los muchos compuestos candidatos de fórmula (Ia) e identificar aquellos que tienen la actividad deseada. También se apreciará que estos compuestos inhibidores de la bomba de protones puedan tener también una acción antiinflamatoria.

Así, según un aspecto particular, la presente invención se refiere a la utilización de inhibidores de la bomba de protones que se seleccionan de entre los compuestos de fórmula (Ia). Estos compuestos de fórmula (Ia) son eficaces como inhibidores de la secreción de ácidos gástricos.

Los compuestos se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de estados relacionados con los ácidos gástricos, en mamíferos y especialmente en el ser humano, seleccionados de entre gastritis, duodenitis, ulceración gástrica, en especial úlcera gástrica y úlcera duodenal. La gastritis puede ser erosiva o no erosiva, aguda o crónica. En particular, los compuestos son útiles como agentes antiúlceras.

Según un aspecto particular, la invención se refiere a la utilización de los compuestos gastroprotectores de fórmula (Ia). El término “gastroprotector” tal como se emplea aquí se entenderá en referencia a aquellos compuestos que son capaces, en particular, de reducir la sensibilidad de la mucosa gastrointestinal, y en particular la mucosa gástrica, de lesiones tóxicas. Estas lesiones tóxicas pueden ser causadas por agentes irritantes. Según un aspecto particular de la invención, dichos agentes irritantes se seleccionan de entre el grupo compuesto esencialmente por NSAIDs e inhibidores COX.

El mayor hallazgo patológico anterior en la ulcerogénesis es la erosión de la monocapa epitelial gástrica. Con el avance de dicha erosión, la integridad de la mucosa gástrica se reduce y segmentos de la mucosa gastrointestinal penetran en la mucosa muscular.

Los cambios en la defensa y reparación de la mucosa normal por ciertos factores como los NSAIDs y *H. pylori*, desempeñan también un papel en la patología de la enfermedad de úlcera péptica.

Según un aspecto de la presente invención, el uso de los compuestos de fórmula (Ia) se dirige al tratamiento o la prevención del daño mucosal mediado por los ácidos y de la ulceración posterior. En particular, dicho uso se orienta al tratamiento o prevención de los cambios patológicos involucrados en el mismo.

La presente invención proporciona los usos y las composiciones farmacéuticas útiles en estos casos, así como el envasado adecuado para las mismas, siendo aplicables a los mamíferos que padecen un estado tal como los definidos anteriormente o que puedan padecer en el futuro de gastritis erosiva, gastritis no erosiva, ulceración gástrica, *Ulcus duodeni* o *Ulcus ventriculi*.

La utilización de los compuestos de fórmula (Ia) ofrece ventajas particulares con respecto a otros NSAIDs, especialmente frente a aquellos que están más establecidos en su uso, que pueden exacerbar realmente el progreso de las lesiones mucosales y en particular la ulceración gástrica, especialmente cuando se indica una aplicación a largo plazo. Los compuestos de fórmula (Ia) sirven para tratar estas lesiones mucosales y en particular la ulceración gástrica.

La capacidad de los compuestos de fórmula (Ia) para evitar e invertir el proceso de la enfermedad, que finalmente conduce a la destrucción de la mucosa, tiene implicaciones de mucho alcance para el tratamiento seguro y eficaz de los mamíferos, en especial de aquellos que necesitan una terapia antiinflamatoria a largo plazo.

Tal como se utiliza aquí, el término “mamífero(s)” indica cualquier mamífero, preferentemente seres humanos, gatos, perros o caballos, de los que existen muchas razas diferentes.

Según la presente invención, el tratamiento o la prevención comprende especialmente la mejora, disminución, tratamiento activo, inversión o prevención de un estado tal como los definidos anteriormente. La expresión “tratamiento o prevención” tal como se emplea aquí con referencia a la administración de los compuestos gastroprotectores de la presente invención pretende referirse tanto al objetivo terapéutico de dicha administración como a los resultados terapéuticos realmente logrados por dicha administración. Tal como se ha expuesto anteriormente, el alcance de la terapia realizada por la administración de dichos compuestos puede oscilar entre una mejora y una disminución notable del curso de la enfermedad, y más allá del tratamiento activo de la enfermedad, que incluye una inversión del proceso de enfermedad.

El tratamiento o la prevención de dichos estados puede comprender también la administración adicional de uno o más compuestos de fórmula (Ia), uno o más elementos seleccionados de entre el grupo compuesto esencialmente de agentes antibacterianos activos, otros agentes gastroprotectores tales como otros inhibidores de protones y antagonistas de los receptores H_2 , agentes antiácidos, alginatos y agentes procinéticos.

Las combinaciones con agentes antibacterianos activos son especialmente útiles en el tratamiento de individuos con resultado positivo a *H. pylori* (terapia anti-*H. pylori*). Los agentes antibacterianos activos, por ejemplo claritromicina más metronidazol o amoxicilina, en combinación con los inhibidores de la bomba de protones producen altas tasas de erradicación en cuanto a las infecciones por *H. pylori*. Otros agentes antibacterianos activos adecuados que se pueden 5 mencionar son antibióticos β -lactama, por ejemplo penicilinas (tales como bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, propicilina, azidicilina, dicloxacilina, flucloxacilina, oxacilina, amoxicilina, bacampicilina, ampicilina, meziocilina, piperacilina o aziocilina), cefalosporinas (tales como cefadroxil, cefaclor, cefalexina, cefalexina, cefuroxima, cefetamet, cefadroxil, ceftibuten, cefpodoxim, cefotetán, cefazolina, cefoperazon, ceftizoxima, cefotaxima, ceftazidima, cefamandol, cefepima, cefoxitina, cefodizima, cefsulodina, ceftriaxona, cefotiam o cefmenoxima) u otros antibióticos 10 β -lactama (por ejemplo aztreonam, loracarbef o meropenem); inhibidores enzimáticos, por ejemplo sulbactam, tetraciclina, por ejemplo tetraciclina, oxitetraciclina, minociclina o doxiciclina; aminoglicósidos, por ejemplo tobramicina, gentamicina, neomicina, estreptomina, amikacina, netilmicina, paromomicina o espectinomicina; anfenicoles, por ejemplo cloranfenicol o tianfenicol; lincomicina y antibióticos macrólidos, por ejemplo clindamicina, lincomicina, eritromicina, claritromicina, espiromicina, roxitromicina o azitromicina; antibióticos polipeptídicos, por ejemplo colistina, polimixina B, teicoplanina o vancomicina; inhibidores de girasa, por ejemplo norfloxacin, cinoxacin, ciprofloxacina, ácido pipemídico, enoxacin, ácido nalidíxico, pefloxacina, fleroxacin u ofloxacina; nitroimidazoles, por ejemplo metronidazol; u otros antibióticos, por ejemplo fosfomicina o ácido fucídico, en los que estas sustancias antibacterianas activas se administran por sí mismas o, como alternativa, se combinan entre sí.

Se pueden mencionar los siguientes compuestos principales como otros inhibidores de la bomba de protones: omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, leminoprazol, nepaprazol y pantoprazol.

Para su uso en la presente invención, los compuestos de fórmula (Ia) se pueden combinar también con otros ingredientes terapéuticamente activos que serían fácilmente evidentes para los especialistas en este campo, lo cual 25 será determinado normalmente según las circunstancias a las cuales se deba administrar el agente terapéutico de la presente invención. Ejemplos de estos otros ingredientes terapéuticamente activos incluyen los agentes anteriores.

Otros ejemplos de estos otros ingredientes terapéuticamente activos incluyen agentes antiinflamatorios, en particular NSAIDs y clases adicionales de agentes antiinflamatorios, ejemplos de los mismos incluyen, por ejemplo, antagonistas de los receptores H_1 ; antagonistas de los receptores B_1 y B_2 de cinina; inhibidores de prostaglandina tales como los antagonistas de los receptores PGD-, PGF-PGI₂- y PGE-; inhibidores de tromboxano A_2 (TXA₂-); antagonistas del receptor PAF; oro en forma de un grupo aurotio junto con varios grupos hidrofílicos; agentes inmunosupresores, por ejemplo ciclosporina, azatioprina y metotrexato; glucocorticoides antiinflamatorios, por ejemplo dexametasona; antibióticos antiparásitos de amplio espectro, por ejemplo avermectinas y milbemicinas; penicilamina; hidroxicloroquina; agentes antigota, por ejemplo colchicina; inhibidores de la xantina-oxidasa, por ejemplo alopurinol; y agentes uricosúricos, por ejemplo probenecid, sulfipirazona y benzbromarona.

Según un aspecto particular de la presente invención, se combina uno o más compuestos de fórmula (Ia) con un agente ulcerogénico antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios son ulcerogénicos cuando inhiben la ciclooxigenasa, en particular la ciclooxigenasa 1, y como consecuencia, la producción de ciertas prostaglandinas, en particular la prostaglandina E_2 . Agentes ulcerogénicos antiinflamatorios son ácido acetilsalicílico (ASA), salicilato de sodio, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelona, nabumetona, tenidap, alclofenaco, antipirina, aminopirina, dipirona, aminopirina, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, bencidamina, bucolome, cincofeno, clonixina, ditrazol, epirizol, fenoprofeno, 45 floctafenina, ácido flufenámico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindac, suprofen, tolmetina, nabumetona, tiaramida, procuazona, bufexamac, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, etodolac, fentiazac, tilomisole, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, piroprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, tenoxicam. Según una realización particular, el ácido acetilsalicílico se combina con uno o más compuestos de fórmula (Ia).

En consecuencia, este tipo de medicación proporciona un medio para tratar eficazmente estados inflamatorios al mismo tiempo que tiene propiedades gástricas concretas. Esto es particularmente ventajoso en situaciones en las que la administración del agente ulcerogénico antiinflamatorio involucra el tracto gastrointestinal, por ejemplo en el caso de administración oral o de estados gastrointestinales inflamatorios.

Según un régimen que se utilizaría de acuerdo con la invención, se contempla que los compuestos de fórmula (Ia) se administren en combinación con otras medicaciones utilizadas como una base regularmente programada. También se plantea que la administración combinada podría asumir una cantidad de distintas formas y se encontraría todavía dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (Ia) se pueden formular simplemente con uno o más de los demás agentes terapéuticos que deben formar la combinación pretendida, en una forma de dosificación adecuada, tal como una pastilla oral, que contenga la totalidad de los medicamentos que forman la combinación. La variación de las vidas medias de los distintos medicamentos podría ser determinada por el especialista en la preparación de formulaciones mediante la creación de formas de liberación controlada de dichos medicamentos con distintos tiempos de liberación para que se consigan dosificaciones relativamente uniformes. Un suministro terapéutico utilizado como forma de dosificación también se podría preparar de acuerdo con los principios bien conocidos en la técnica de las formulaciones, donde los medicamentos utilizados en la combinación están simplemente presentes conjuntamente en una mezcla de adición en la composición a suministrar. La presente invención contempla también la coadministración, en la que la combinación de medicamentos se logra mediante la administración simultánea de

los medicamentos que se deben de dar combinados. Esta coadministración podría realizarse incluso por medio de distintas formas de dosificación y vías de administración. La presente invención contempla también el uso de estas combinaciones de acuerdo con unas planificaciones de dosificación distintas pero regulares y continuas, gracias a las cuales se mantienen los niveles en plasma deseados de los medicamentos involucrados, en el mamífero que se esté tratando, aunque los medicamentos individuales que componen la combinación no se administren a dicho mamífero simultáneamente. Todas estas combinaciones se encontrarían completamente dentro del estado de la técnica a idear y administrar.

Cuando los compuestos de fórmula (Ia) deban emplearse como ingredientes activos según la presente invención, se pueden incorporar en formas estándar de dosificación farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas útiles comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz para inhibir la bomba de protones de un compuesto de fórmula (Ia) tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, son útiles cuando se administran en aplicaciones sistémicas o locales, orales o parenterales y, con este propósito, se combinan con los excipientes, diluyentes y adyuvantes farmacéuticos usuales, por ejemplo materiales vehículo orgánicos e inorgánicos inertes tales como agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, gomas, polialquilenglicoles, etc. Estas preparaciones farmacéuticas se pueden emplear en forma sólida, por ejemplo como pastillas, cápsulas, y especialmente en combinación con o para una mezcla de adición con un elemento alimenticio sabroso adecuado para los mamíferos; o se pueden administrar en forma líquida, por ejemplo como soluciones y elixires. Los excipientes y adyuvantes farmacéuticos que se pueden añadir incluyen conservantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos y demás estabilizantes; agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión y compuestos antiaglutinantes; aditivos colorantes y aromas; composiciones para mejorar la compresibilidad o para generar la liberación retardada, sostenida o controlada del ingrediente activo; y diversas sales para cambiar la presión osmótica de la preparación farmacéutica o para actuar como tampones. Las formas particulares de dosificación que han sido utilizadas con éxito incluyen una solución de micelas mixtas al 5% de ML3000 para inyección intravenosa, un 3% de pasta palatable y pastillas orales.

Se puede administrar de forma sistémica a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (Ia) tal como se ha definido, donde dicha administración sistémica comprende: (1) la inyección o infusión en los tejidos o cavidades adecuadas del cuerpo de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto en forma líquida apropiada, tal como una solución acuosa, una emulsión o una suspensión, para el suministro intraarterial, intra- o trans-dérmico (incluido subcutáneo) o intraespinal, en especial intratecal y de forma más común intramuscular o intravenoso del mismo; o en forma de depósito para el suministro del mismo; (2) instilación en los tejidos o cavidades adecuadas del cuerpo de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto en forma sólida apropiada, por ejemplo comprendiendo una matriz de materiales biocompatibles y bioerosionables donde se dispersan las partículas de un compuesto gastroprotector sólido de fórmula (Ia) o donde, posiblemente, se encierran los glóbulos o células aisladas de un compuesto gastroprotector líquido de fórmula (Ia), para servir de composición sólida de implante para un suministro con liberación retardada, sostenida y/o controlada del mismo; o (3) ingestión o administración de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto adecuado en forma sólida o líquida para el suministro transdérmico del mismo, por ejemplo en parche transdérmico o implante subepidérmico (subcuticular), para el suministro peroral del mismo.

Se pueden formular una amplia cantidad de formas de dosificación descritas aquí para proporcionar una liberación controlada, sostenida y/o retardada del ingrediente activo a partir de dicha forma de dosificación.

Una forma útil de dosificación de liberación controlada de ML3000 es aquella que mantiene un nivel de ML3000 en plasma superior a 100 ng/ml durante la mayor parte del día después de una única dosis oral de 5 mg/kg. Las formas orales preferentes de dosificación de liberación controlada de ML3000 son aquellas que mantienen una concentración de ML3000 en plasma superior a 100 ng/ml durante un período de tiempo superior al período durante el que una forma de dosificación de liberación inmediata de ML3000 mantiene un nivel comparable en plasma, cuando dicha forma de dosificación de liberación inmediata y forma de dosificación de liberación controlada son administradas a la misma dosis.

Formas de dosificación de ML3000 de liberación inmediata que contienen dosis de 2,5 y 5 mg/kg mantienen una concentración en plasma de ML3000 por encima de 100 y 200 ng/ml respectivamente durante 8 horas.

Las formas preferentes de dosificación peroral para la administración sistémica son sólidas, por ejemplo composiciones orales palatables tales como obleas de disolución rápida, pastillas, cápsulas, comprimidos oblongos, etc., y líquidas, por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, etc. Se pueden utilizar composiciones farmacéuticas de tipos especiales adecuados para la administración oral a los mamíferos, e incluyen elementos a modo de pasta oral que se debe suministrar debajo de la lengua del mamífero que se esté tratando, una forma granular que se suministra mediante su incorporación en la comida del mamífero y una forma masticable en la que el ingrediente activo se consume junto con la masa sabrosa masticable, o una forma masticable que puede suministrar el ingrediente activo extrayéndolo del cuerpo de la masa masticable, que no se consume, durante la masticación por el mamífero que se esté tratando.

Dicha cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (Ia) tal como se ha definido se puede administrar también de forma local a dicho mamífero, donde dicha administración local comprende: (1) la inyección o infusión localizada en el estado asociado al ácido gástrico de una composición farmacéutica que contiene dicho com-

puesto de fórmula (Ia) en su forma líquida adecuada para el suministro, incluidos los componentes que proporcionan la liberación retardada, controlada y/o sostenida de dicho compuesto en dicho sitio local; o en forma de depósito para su suministro, donde dicha composición proporciona el almacenamiento de dicho compuesto y después la liberación retardada, sostenida y/o controlada del mismo; o (2) la instilación de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto en forma sólida adecuada para servir de implante sólido para su suministro, proporcionando opcionalmente dicha composición la liberación retardada, sostenida y/o controlada de dicho compuesto a tal sitio local.

Las inyecciones también pueden estar compuestas de composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto gastroprotector de fórmula (Ia), en las que la composición farmacéutica se encuentra en una forma de liberación retardada, controlada o sostenida. Estas formulaciones de composición reconocida pueden ser geles sólidos, semisólidos u otras combinaciones de líquidos/sólidos en las que se utiliza una matriz erosionable o una serie de recubrimientos para proporcionar una liberación continua del compuesto de fórmula (Ia) a una velocidad predeterminada o a diversas velocidades si se desea. Los términos “liberación prolongada” y “acción prolongada”, así como otros, se emplean para describir estas formulaciones. Todas ellas emplean varias combinaciones de polímeros bioerosionables, por ejemplo varios polímeros celulósicos, y materiales naturales, por ejemplo almidón de maíz y estearato de magnesio, para obtener la distribución lenta y/o uniforme del compuesto de fórmula (Ia) contenido dentro de la matriz.

La cantidad terapéuticamente eficaz para tratar o evitar enfermedades asociadas al ácido gástrico del compuesto de fórmula (Ia) se administra a un mamífero a tratar en una cantidad expresada en miligramos por kilogramo de peso corporal de dicho mamífero al día: “mg/kg/día”. La expresión “al día” tal como se utiliza aquí no se debe interpretar como que es forzosamente necesario administrar alguna forma particular de dosificación diaria al mamífero que se está tratando. La expresión “al día” es simplemente una indicación del segmento de tiempo más pequeño adecuado, pero arbitrario, que se está utilizando como parte de la unidad total para medir la dosis de compuesto gastroprotector que se está administrando. La dosis, es decir la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (Ia) para tratar o evitar enfermedades asociadas al ácido gástrico, oscilará normalmente entre 0,1 mg/kg/día y 20,0 mg/kg/día, preferentemente entre 0,1 mg/kg/día y 12,0 mg/kg/día, en especial entre 0,5 mg/kg/día y 10,0 mg/kg/día, y con especial preferencia entre 0,5 mg/kg/día y 8,0 mg/kg/día. Las formas y cantidades típicas de dosificación para ML3000 incluyen la administración oral de ML3000 a una velocidad de dosificación de 2,5-5,0 mg/kg/día de peso corporal. Se pueden necesitar algunos requisitos especiales para los pacientes que tienen el síndrome de Zollinger-Ellison, tal como la necesidad de dosis más altas que para un paciente medio.

Es necesario que el especialista no sólo determine la vía preferente de administración y la forma y cantidad correspondientes de dosificación, sino que dicho especialista determine también el régimen de dosificación, es decir la frecuencia de dosificación. En términos generales, es más probable que la elección se sitúe entre una dosificación de una vez al día (s.i.d.) y una dosificación de dos veces al día (b.i.d.), y que la primera proporcione una terapia más rápida y profunda, mientras que la última proporcionará una terapia menos profunda pero más sostenida. Sin embargo, esta generalización no tiene en cuenta importantes variables, como son el tipo específico de enfermedad asociada al ácido gástrico involucrada, el agente terapéutico específico involucrado y su farmacocinética, ni tampoco el paciente específico (mamífero) involucrado. Para un producto aprobado en el mercado, gran parte de esta información ya está disponible gracias a los resultados de los estudios clínicos que se llevaron a cabo para obtener dicha aprobación. En otros casos, se puede obtener dicha información de una manera clara de acuerdo con las enseñanzas y directivas contenidas en la presente especificación, tomadas a la luz del conocimiento y la técnica del especialista. Los resultados que se obtienen se pueden correlacionar también con los datos procedentes de las evaluaciones correspondientes de un producto aprobado en los mismos ensayos.

El método de la presente invención se puede definir además por el hecho que comprende dos pasos básicos: (I) establecer la condición de un mamífero candidato como encontrándose actual o eventualmente en un estado de enfermedad asociada al ácido gástrico, confirmando así que dicho mamífero necesita tal tratamiento; y por tanto (II) tratar o evitar dicho estado mediante la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz, para tratar o evitar dicha enfermedad asociada al ácido gástrico, de un compuesto gastroprotector de fórmula (Ia). Los distintos aspectos del Paso (II) han sido expuestos anteriormente en detalle. En consecuencia, los aspectos del Paso (I) se expondrán ahora en detalle.

En lo que se refiere al diagnóstico, es conveniente establecer la condición de un mamífero candidato al tratamiento según la presente invención en cuanto a si éste se encuentra o no, actual o eventualmente, en un estado de enfermedad asociada al ácido gástrico. La expresión “actual o eventualmente” tal como se emplea aquí pretende significar que, según los métodos expuestos más abajo para llegar a esta determinación, es posible identificar un mamífero candidato como necesitando actualmente dicho tratamiento o como necesitando muy probable o supuestamente dicho tratamiento en un futuro a corto plazo. La eventual necesidad de tratamiento puede ser establecida por la determinación de factores positivos, los cuales, partiendo de la experiencia del especialista, conducen directamente al estado de enfermedad asociada al ácido gástrico. Por ejemplo, el especialista puede establecer, a partir del examen clínico de un mamífero, que tiene una enfermedad asociada al ácido gástrico, y puede confirmar esta conclusión con otra evidencia a partir de la cual se puede determinar, de acuerdo con los métodos de medida establecidos, que el mamífero desarrollará una enfermedad asociada al ácido gástrico en un futuro a corto plazo.

En particular, la condición de dicho mamífero como encontrándose actual o eventualmente en dicho estado de enfermedad asociada al ácido gástrico, y por tanto necesitado de dicho tratamiento, se determina mediante los resultados positivos procedentes del examen clínico y de la evaluación del tracto gastrointestinal del mamífero candidato,

por ejemplo por medio de procedimientos no invasivos, incluyendo la endoscopia fibróptica, imágenes por resonancia magnética (IRM) y métodos radiográficos tales como rayos X con bario de doble contraste. Otros síntomas y sintomatología clínica incluirían las que se obtienen a partir del examen directo de la mucosa gástrica del mamífero candidato, por ejemplo por biopsia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de ML3000 sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 2: Efecto del omeprazol sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 3: Efecto del pH sobre la inhibición por ML3000 de la H,K-ATPasa gástrica;

Figura 4: Efecto de la dilución de ML3000 sobre la inhibición de la H,K-ATPasa gástrica;

Figura 5: Efecto del ácido araquidónico sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 6: Efecto de PGE₂ sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 7: Efecto de TEDBC sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 8: Efecto de ZD-2138 sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 9: Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 10: Efecto de NS 398 sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 11: Efecto de naproxeno sobre la actividad microsomal la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 12: Efecto de la indometacina sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 13: Efecto del leucotrieno B₄ sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa del cerdo;

Figura 14: Efecto del leucotrieno D₄ sobre la H,K-ATPasa gástrica;

Figura 15: Efecto de ML3000 sobre la acificación estimulada por histamina en las glándulas gástricas del conejo;

Figura 16: Efecto de ML3000 sobre la acidificación estimulada por forskolina en las glándulas gástricas del conejo;

Figura 17: Efecto de ML3000 en la línea base de la secreción de IL-8 por las células epiteliales gástricas humanas;

Figura 18: Efecto de ML3000 sobre la secreción de IL-8 por las células epiteliales gástricas humanas estimuladas por IL-1 β .

Figura 19: Efecto de ZD 2138 sobre la línea base de la secreción de IL-8 por las células epiteliales gástricas humanas.

Figura 20: Efecto de ZD 2138 sobre la secreción de IL-8 por las células epiteliales gástricas humanas estimuladas por IL-1 β .

Descripción de las realizaciones preferentes

Con el fin de demostrar además los métodos y composiciones de la presente invención, se presentan en los párrafos siguientes ejemplos descriptivos específicos de los procedimientos típicos que se pueden emplear para llevar a cabo dichos métodos. Se pretende que dichos ejemplos sean ilustrativos.

Ejemplo 1

Efectos de ML3000 sobre la actividad microsomal gástrica de la H,K-ATPasa estimulada por K⁺, sensible a SCH28080

Estrategia

Se preparó la H,K-ATPasa microsomal gástrica a partir de homogenatos mucosales gástricos de cerdo mediante centrifugación diferencial. Brevemente, se lavaron estómagos de cerdo obtenidos en un matadero 1 hora post mortem con 0,25 M de sacarosa enfriada con hielo y se diseccionó el fondo de las regiones cardiaca y antral. Todos los procedimientos posteriores se realizaron a 4°C. La mucosa se sumergió en NaCl saturado y la mucosidad superficial y las células superficiales se retiraron con servilletas de papel. Se raspó la mucosa del tejido conectivo subyacente, se suspendió (10% peso/volumen) en un tampón de aislamiento (0,25 M de sacarosa, 20 mM de HEPES, pH 7,4, 1

mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y se rompió mediante dos descargas de 10 segundos a la potencia máxima en un equipo Tissumizer (Tekmar, Cincinnati, OH). Se centrifugó el homogenato a 20.000g durante 30 minutos y se centrifugó el sobrenadante a 10^5 g durante 1 hora. El gránulo microsomal resultante se resuspendió en el tampón de aislamiento y se aplicó un gradiente discontinuo de Ficoll al 7% peso/volumen y un 34% de sacarosa (ambos en el tampón de aislamiento). Después de 3 horas a 32.500 rpm (rotor Sorvall AH 629), la banda microsomal (G1) recuperada de la superficie de contacto del Ficoll al 7% se resuspendió a 10 mg/ml en 15 mM de PIPES-Tris, pH 6,8, se diluyó 1:1 con un 60% de sacarosa fría, se liofilizó en partes alícuotas de 0,5 ml y se almacenó a -70°C . Los microsomas G1 tenían un diámetro de aproximadamente 0,1 micras, se enriquecieron con actividad H,K-ATPasa y más del 80% de su contenido en proteína se bandeó a 94 kDa por SDS-PAGE. La actividad hidrolítica de ATP de los microsomas se cuantificó en términos de liberación de fosfato inorgánico desde el sustrato ATP y se midió en concentraciones graduadas (que oscilaban entre 10^{-9}M y 10^{-4}M) de ML3000 y un amplio rango de otros compuestos. Las mezclas de reacción para el ensayo de la actividad de la ATPasa estimulada por K^{+} en membranas microsomales gástricas del cerdo contenían 5 μg de proteína de membrana, 100 mM de Tris-acetato, pH 7,0, 1 mM de MgCl_2 , 1 mM de NaNa, 0,1 mM de EGTA, 5 μM de ATP (γ - ^{32}P -ATP, 10 Ci/mmol, NEN, Boston, MA), 0-10 mM de KCl y 0-100 μM de SCH 28080. Después de 20 minutos de incubación a 37°C , se interrumpieron las reacciones por la adición de un 10% peso/volumen de carbón vegetal activado (Sigma), un 5,5% en peso/volumen de ácido tricloroacético, se agitó fuertemente y se centrifugó a 14.000g durante 10 minutos a 4°C . El contenido en fosfato inorgánico (γ - ^{32}P) del sobrenadante se midió por conteo de escintilación. Se calculó la actividad específica de la H,K-ATPasa como diferencia en las actividades microsomales de la ATPasa en presencia y ausencia del inhibidor SCH28080 gástrico específico de H,K-ATPasa, y se expresó en mmoles Pi/mg de proteína/h; la descripción gráfica de los datos muestra el porcentaje de inhibición de la actividad de la H,K-ATPasa en función de las concentraciones del compuesto. Los gráficos con barras de error estándar presentan la divergencia de los datos entre ensayos en tres ensayos independientes en cada uno de los cuales se midieron las actividades de ATPasa bajo tres condiciones de reacción separadas pero idénticas. Los gráficos sin barras de error estándar representan las actividades medias de ATPasa en tres condiciones de reacción separadas pero idénticas en uno de al menos tres ensayos independientes; se muestran los datos típicos en estos casos.

Resultados

La actividad gástrica de la H,K-ATPasa fue inhibida por ML3000 dependiendo de la dosis, con una concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de 15 μM (Figura 1). La actividad inhibidora de ML3000 se comparó con la de un inhibidor clásico de la bomba de protones (PPI), un omeprazol benzimidazol sustituido. La Figura 2 muestra el efecto del omeprazol sobre la actividad de la H,K-ATPasa en condiciones de ensayo idénticas a las de la Figura 1; la IC_{50} estimada para el omeprazol era de 1 μM . Estos datos muestran que ML3000 y el omeprazol presentan una IC_{50} comparable con respecto a la actividad gástrica de H,K-ATPasa, al menos con arreglo a este ensayo *in vitro* particular bajo condiciones específicas. La IC_{50} revelada para el omeprazol con respecto a la actividad gástrica de la bomba de protones oscila entre 470 nM y 36 μM , dependiendo de las condiciones del ensayo (3,4,5). Para otros PPI, la IC_{50} del picoprazol es de 2 μM (6), la IC_{50} del rabeprazol es de 72 nM (3) y la IC_{50} del lansoprazol es de 2,1 μM (7).

El amplio rango de los valores de IC_{50} de PPI publicados para la H,K-ATPasa microsomal refleja la necesidad mecanística para que la acidificación del compuesto permita la formación de un intermedio sulfóxido reactivo frente a tiol que luego derivatiza irreversiblemente la H,K-ATPasa en residuos de una subunidad de cisteína que lleva a la inhibición enzimática. El omeprazol a un pH neutro o mayor no ejerce efectos inhibidores sobre la H,K-ATPasa gástrica. Las preparaciones de vesículas microsomales varían mucho en su tensión iónica, lo que afecta el punto hasta el que el pH interno puede bajar por la producción de H,K-ATPasa y, por tanto, el punto hasta el que la difusión del omeprazol en la vesícula se puede acidificar y activar. Como alternativa, antes de que la acidificación *in vitro* del omeprazol asegure la inducción de sus propiedades inhibidoras, en los ensayos llevados a cabo es esencial la utilización de preparaciones de H,K-ATPasa microsomal permeable a los iones. Por esta razón, los datos inhibidores del omeprazol mostrados en la Figura 2 se obtuvieron utilizando omeprazol acidificado a pH 6,1 e incubado con la enzima durante 30 minutos al mismo pH (8).

Para determinar si ML3000 presentaba propiedades comparables de activación de ácido, se valoró una concentración inhibidora semimáxima de ML3000 a distintos pHs y se midieron los efectos sobre la actividad de la H,K-ATPasa. Como se muestra en la Figura 3, la acidificación de ML3000 no tuvo un efecto notable sobre su perfil inhibidor de la H,K-ATPasa. Estos datos indican que aunque el ML3000 y el omeprazol tengan IC_{50} comparables para la H,K-ATPasa, el ML3000, a diferencia del omeprazol, no necesita acidificación alguna para la inducción de la actividad inhibidora.

Dado que los PPI son inhibidores irreversibles de la actividad de H,K-ATPasa, que se unen covalentemente a la subunidad- α catalítica, se determinó si la inhibición de ML3000 de la H,K-ATPasa era reversible o irreversible. Se trataron los microsomas gástricos enriquecidos con H,K-ATPasa con una concentración inhibidora máxima de ML3000 y luego se diluyeron con un gran exceso de tampón para reducir la concentración de ML3000 de 100 μM a 3,3 μM . Los resultados mostrados en la Figura 4 indicaban que la dilución de ML3000 restituía la actividad de la H,K-ATPasa, y son coherentes con que ML3000 inhibe la actividad de la H,K-ATPasa de una manera reversible, es decir que ML3000 no derivatiza covalentemente la subunidad de la H,K-ATPasa gástrica *in vitro*.

El ácido araquidónico y la prostaglandina E2 (PGE_2) también inhibían, dependiendo de la dosis, la actividad de la H,K-ATPasa, con una IC_{50} de 30 μM y 45 μM respectivamente (Figuras 5 y 6). Los datos de PGE_2 contradicen un estudio anterior en el que no se encontró ningún efecto inhibidor de PGE_2 sobre la H,K-ATPasa gástrica del cerdo (9). Las

diferencias en el ensayo específico de la ATPasa utilizada en aquel estudio pueden explicar esta discrepancia. Como ML3000 y el ácido araquidónico son anfífilos aniónicos, sus efectos inhibidores podrían resultar de las interacciones específicas con los sitios de unión de la subunidad de H,K-ATPasa o de interacciones hidrofóbicas menos específicas con los lípidos de la membrana microsomal asociada a la H,K-ATPasa o a una combinación de ambos factores.

Como ML3000 muestra también la inhibición de 5-lipoxigenasa, se estudiaron los efectos de dos inhibidores de lipoxigenasa sobre la actividad microsomal de la H,K-ATPasa. La Figura 7 muestra que 2-(1-tienil)etil 3,4-dihidroxibencilidencianoacetato (TEDBC), inhibidor potente de 5- 12- y 15-lipoxigenasas, inhibía la actividad microsomal de la H,K-ATPasa con una IC_{50} de 3,3 μ M. Por contraste, el inhibidor específico de 5-lipoxigenasa, 6-((3-fluor-5-(metoxi-3,4,5,6-tetrahydro-2H-piran-4-il)fenoxi)metil)quinolina (ZD-2138) tenía un efecto mínimo sobre la actividad de la H,K-ATPasa (inhibición de 20% a 10^{-6} M) (Figura 8). Estos datos son coherentes con las 12- y 15-lipoxigenasas microsomales gástricas que desempeñan un papel en la activación de H,K-ATPasa o con la interacción directa de TEDBC con las subunidades de H,K-ATPasa que alteran la conformación enzimática y, por tanto, la actividad.

Con el fin de comparar el efecto inhibidor de la H,K-ATPasa de ML3000 con otros NSAIDs, se midieron los efectos del ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina y un inhibidor selectivo de COX-2, NS 398, sobre la actividad de la bomba de protones. Los cuatro NSAIDs no tenían efectos inhibidores sobre la actividad microsomal de H,K-ATPasa a concentraciones de hasta 10^{-4} M (10^{-3} M en el caso del ácido acetilsalicílico) (Figuras 9, 10, 11 y 12). Se ha reportado anteriormente que la indometacina inhibía la H,K-ATPasa gástrica a una concentración algo más alta ($K_i = 0,67 \times 10^{-3}$ M) (10). Estos datos distinguen claramente el ML3000 de otros NSAIDs en términos de su efecto inhibidor sobre la actividad gástrica de la H,K-ATPasa.

Con el fin de establecer si la inhibición de ML3000 de la H,K-ATPasa gástrica reflejaba los efectos del compuesto sobre las vías metabólicas funcionales putativas del leucotrieno presentes en los microsomas gástricos del cerdo, se estudiaron los efectos del leucotrieno B4 y D4 sobre la actividad de la H,K-ATPasa. Cuestiones de solubilidad impidieron estudiar concentraciones de LTB4 o LTD4 superiores a 1 μ M. Tal como se muestra en las Figuras 13 y 14, ninguno de los leucotrienos mostró actividad inhibidora alguna contra la H,K-ATPasa a concentraciones fisiológicas (10^{-9} - 10^{-8} M); solamente a concentraciones no fisiológicas superiores a 10^{-7} M apareció alguna atenuación notable de la actividad de la H,K-ATPasa.

Ejemplo 2

Efectos de ML3000 y demás compuestos sobre la acumulación de ácido estimulada por histamina en células parietales gástricas

Estrategia

Se aislaron las células parietales gástricas de conejos blancos de Nueva Zelanda por digestión con pronasa/colagenasa de la mucosa fúndica seguido de enriquecimiento de las células con gradientes continuos Nycodenz de una forma conocida *per se*. Se valoró la acumulación de aminopirina en células parietales en placas filtrantes de 96 pocillos con membranas Durapore. Brevemente, se preincubaron las células con [14 C]-aminopirina y luego se incubaron 100.000 células/200 μ l por pozo sin o con los compuestos de prueba, durante 15 minutos antes de la incubación durante otros 30 minutos en ausencia o presencia de 100 μ M de histamina. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. La acumulación basal de aminopirina se determinó como acumulación de aminopirina en las células no tratadas sustraídas de la acumulación en presencia de KSCN (reflejo de la captura de isótopos no específicos). La descripción gráfica de los datos muestra un porcentaje de inhibición de acumulación de ácido estimulada por histamina en las células en función de las concentraciones del compuesto.

Resultados

El ML3000 inhibía, dependiendo de la dosis, la acumulación de ácido estimulada por histamina en las células parietales gástricas del conejo, con una concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de 40 μ M (Figura 15). El ML3000 también inhibía, dependiendo de la dosis, la acumulación de ácido estimulada por forskolina en las células parietales gástricas de conejo, con una concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de 45 μ M (Figura 16). Estos datos indican que el ML3000 afecta a los mecanismos secretores de ácido en las células parietales aguas abajo de la movilización de cAMP inducida por la activación del receptor H2 de histamina. Los datos son coherentes con la inhibición por ML3000 de la secreción de ácido en las células parietales, lo que resulta de la interacción directa del ML3000 con la H,K-ATPasa gástrica. Sin embargo, la discrepancia entre la IC_{50} de ML3000 en las vesículas microsomales (15 μ M) y en las células parietales aisladas (40-45 μ M) sugiere que el acceso de ML3000 al compartimento intracelular de H,K-ATPasa en las células parietales puede ser ralentizado por el condicionante de permeabilidad de la membrana plasmática.

Igualmente, tal como se descubrió con la H,K-ATPasa microsomal, otros NSAIDs, como ácido acetilsalicílico, naproxeno y NS 398 (hasta concentraciones de 10^{-4} M) no tenían efecto alguno sobre la acumulación de ácido en células parietales aisladas de conejo.

Ejemplo 3

Efectos de ML3000 sobre la secreción de IL-8 inducida por IL-1 β e inducida por *Helicobacter pylori* en células del adenocarcinoma gástrico humano (AGS)

Estrategia

Se incubaron células de AGS con los compuestos de prueba, estimulados con IL-1 β , y se midió la secreción posterior de IL-8 en el medio de cultivo mediante el ensayo inmunosorbente de unión enzimática; la descripción gráfica de los datos muestra el porcentaje de inhibición de la secreción de IL-8 estimulada o no estimulada en función de las concentraciones de un compuesto.

Resultados

Sin estimulación por IL-1 β y en ausencia de ML3000 o ZD2138, las células de AGS (5×10^4 en μ l de medio de cultivo) secretaron IL-8 durante un período de 6 horas hasta una concentración de 225 pg/ml (Figuras 17 y 19). Cuando está estimulada por IL-1 β (20 ng/ml), la secreción de IL-8 por las células de AGS durante un período de 6 horas aumentó 27 veces, hasta una concentración de 6.000 pg/ml (Figuras 18 y 20). ML3000 inhibió la secreción de IL-8 tanto estimulada por IL-1 β (Figura 18) como en la línea base (Figura 17), a una IC₅₀ de 0,75 μ M y 30 μ M respectivamente.

El inhibidor específico de 5-lipoxigenasa (ZD-2138), que no tenía ningún efecto sobre la actividad microsomal de la H⁺,K⁺-ATPasa, mostraba una inhibición, dependiendo de la dosis, de la secreción de IL-8 de línea base por las células de AGS (Figura 19), con una IC₅₀ de 0,4 μ M. Por contraste, ZD-2138 no tenía ningún efecto sobre la secreción de IL-8 estimulada por IL-1 β por las células de AGS (Figura 20). La inhibición de la H⁺,K⁺-ATPasa por ML3000, lo que se ha demostrado anteriormente, no sirve de base a la inhibición secretora de IL-8 en este modelo, ya que las células de AGS no expresan la H⁺,K⁺-ATPasa.

En la medida en que IL-8 es un mediador inflamatorio potente de la mucosa gástrica, el descubrimiento de que ML3000 inhibe profundamente la línea base y la secreción de IL-8 estimulada por IL-1 β en las células epiteliales gástricas sugiere que la inhibición no se debe a la actividad inhibidora de la 5-lipoxigenasa de ML3000.

Referencias

1. Laufer S, Tries S, Augustin J, Dannhardt G. Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* 1994;44:629-36.
2. Laufer S, Tries S, Augustin J, Elsasser R, Albrecht W, Guserle R, *et al.* Acute and chronic anti-inflammatory properties of [2,2-dimethyl-6-(4-chlorophenyl)-7-phenyl-2,3-dihydro-1 H-pyrrolizine-5-yl]-acetic acid. *Arzneimittelforschung* 1995;45:27-32.
3. Morii M, Takata H, Fujisaki H, Takeguchi N (1990) The potency of substituted benzimidazoles such as E3810, omeprazole, Ro 18-5364 to inhibit gastric H,K-ATPase is correlated with the rate of acid-inactivation of the inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 39(4):661 -667;
4. Beil W, Sewing KF (1984) Inhibition of partially-purified H,K-ATPase from guinea-pig isolated and enriched-parietal cells by substituted benzimidazoles. *Br J Pharmacol* 82(3):651-657;
5. Keeling DJ, Fallowfield C, Milliner KJ, Tingley SK, Ife RJ, Underwood AH (1985) Studies on the mechanism of action of omeprazole. *Biochem Pharmacol*, 34(16):2967-2973;
6. Wallmark B, Sachs G, Mardh S, Fellenius E. Inhibition of gastric H,K-ATPase by the substituted benzimidazole, picoprazole. *Biochim Biophys Acta*, 728:31-38, 1983.
7. Nagaya H, Inatomi N, Nohara A, Satoh H (1991) Effects of the enantiomers of lansoprazole (AG-1749) on H, K-ATPase activity in canine gastric microsomes and acid formation in isolated canine parietal cells. *Biochem Pharmacol*, 42(10):1875-1878;
8. Wallmark B, Jaresten B-M, Larsson H, Ryberg B, Brandstrom A, Fellenius E (1983a) Differentiation among inhibitory actions of omeprazole, cimetidine, and SCN⁻ on gastric acid secretion. *Am J Physiol* 245 (Gastrointest Liver Physiol 8): G64-G71;
9. Im WB, Blakeman DP (1982) Inhibition of gastric H,K-ATPase by unsaturated long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 692:355-360;
10. Spenny JG and Mize KS (1977) Inhibition of gastric K-ATPase by phenylbutazone and indomethacin. *Biochem Pharmacol*, 26:1241-1245.

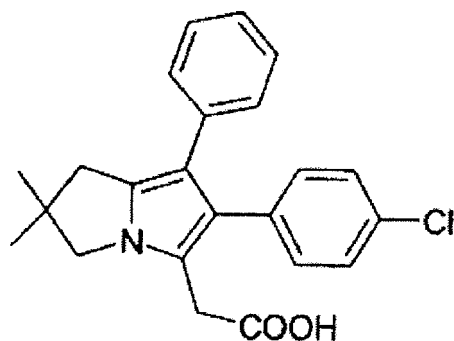
11. **Wallace JL, Carter L, McKnight W, Tries S, Laufer S** (1994) ML3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *European Journal of Pharmacology* 271: 525-531.

12. **Laufer S, Tries S, Augustin I, Elsäßer R, Algate DR, Atterson PR, Munt PL** (1994) Gastrointestinal Tolerance of [2,2-Dimethyl-6-(4-chlorophenyl)-7-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-5-yl]-acetic Acid in the Rat. *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 44 (II): 1329-1333.

13. **Tries S and Laufer S** (2001) The pharmacological profile of ML3000: A new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Inflammopharmacology* 9: 113-124.

REIVINDICACIONES

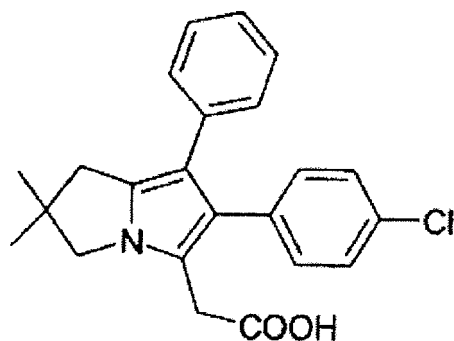
1. Utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia):



(Ia)

de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar una lesión de la mucosa gástrica.

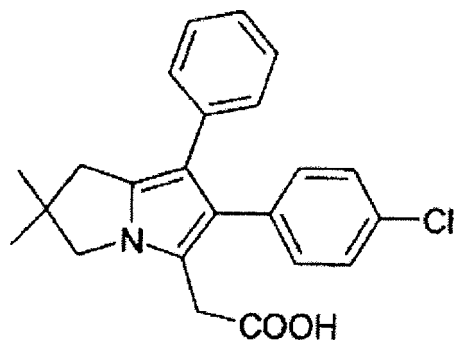
2. Utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia):



(Ia)

de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir la gastritis erosiva.

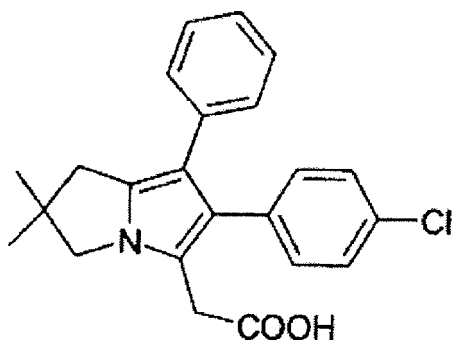
3. Utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia):



(Ia)

de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir la gastritis no erosiva.

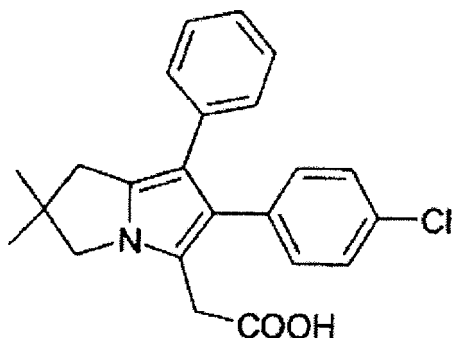
4. Utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1H-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia):



(Ia)

de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir la ulceración gástrica.

5. Utilización de ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1H-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia):



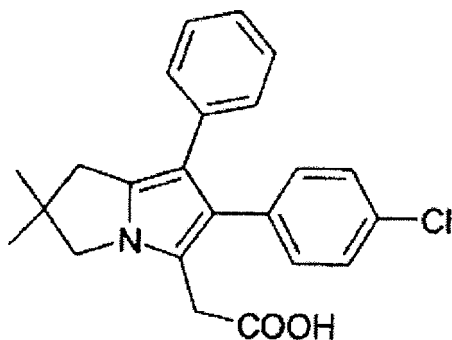
(Ia)

de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir el *Ulcus duodeni* o el *Ulcus ventriculi*.

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye, además del compuesto de fórmula (Ia), una sal fisiológicamente aceptable del mismo o un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo, el uso de uno o más elementos seleccionados de entre el grupo compuesto por agentes antibacterianos activos, otros agentes gastroprotectores tales como otros inhibidores de protones y antagonistas de los receptores H_2 , agentes antiácido, alginatos y agentes procinéticos.

7. Combinación de:

(i) ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1H-pirrolizin-5-il]acético de fórmula (Ia)



(Ia)

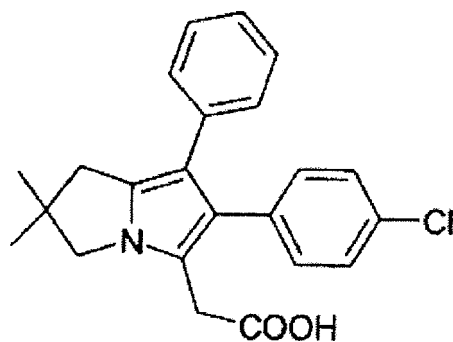
o de una sal fisiológicamente aceptable del mismo o de un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo con

(ii) uno o más agentes ulcerogénicos antiinflamatorios para su uso en terapia,

caracterizada porque el agente ulcerogénico antiinflamatorio se selecciona de entre el grupo compuesto por ácido acetilsalicílico (ASA), salicilato de sodio, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelona, nabumetona, tenidap, alclofenaco, antipirina, aminopirina, dipirona, aminopirona, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, bencidamina, bucolome, cincofeno, clonixina, ditrazol, epirizol, fenoprofeno, floctafenina, ácido flufenámico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindac, suprofeno, tolmetina, nabumetona, tiaramida, procuazona, bufexamac, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, fentiazac, tilomisole, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, pirprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, tenoxicam.

8. Composición farmacéutica que comprende:

(i) ácido [6-(4-clorofenil)-2,2-dimetil-7-fenil-2,3-dihidro-1*H*-pirrolizin-5- il]acético de fórmula (Ia)



(Ia)

una sal fisiológicamente aceptable del mismo o un éster fisiológicamente hidrolizable del mismo,

(ii) uno o más agentes ulcerogénicos antiinflamatorios para su uso en terapia, y opcionalmente

(iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

caracterizada porque el agente ulcerogénico antiinflamatorio se selecciona de entre el grupo compuesto por ácido acetilsalicílico (ASA), salicilato de sodio, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, cetoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelona, nabumetona, tenidap, alclofenaco, antipirina, aminopirina, dipirona, aminopirona, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, bencidamina, bucolome, cincofeno, clonixina, ditrazol, epirizol, fenoprofeno, floctafenina, ácido flufenámico, glafenina, indoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindac, suprofeno, tolmetina, nabumetona, tiaramida, procuazona, bufexamac, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, fentiazac, tilomisole, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, pirprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, tenoxicam.

FIGURA 1

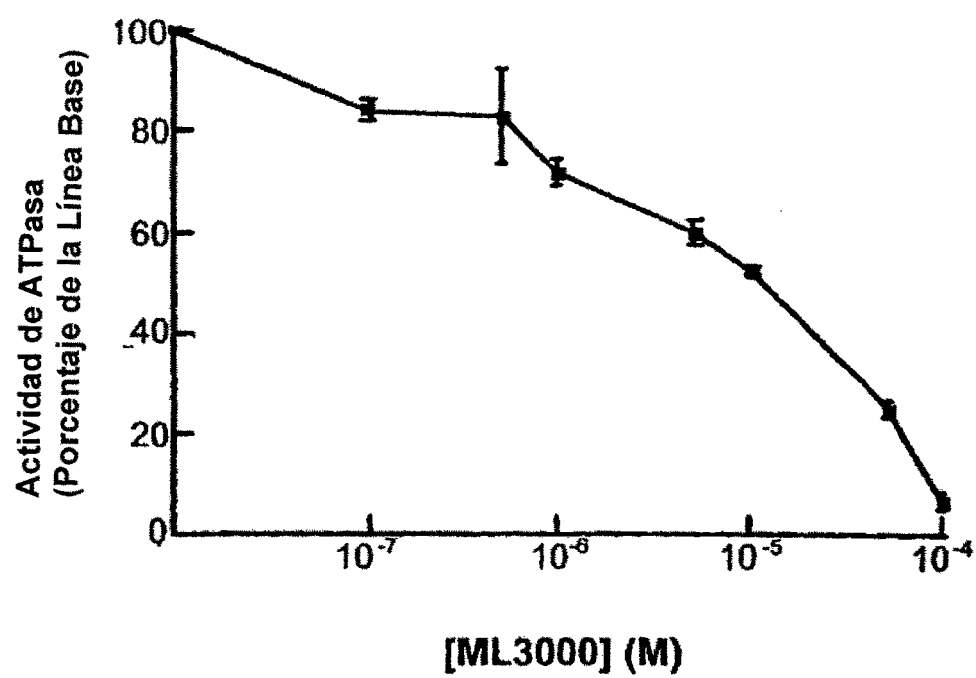


FIGURA 2

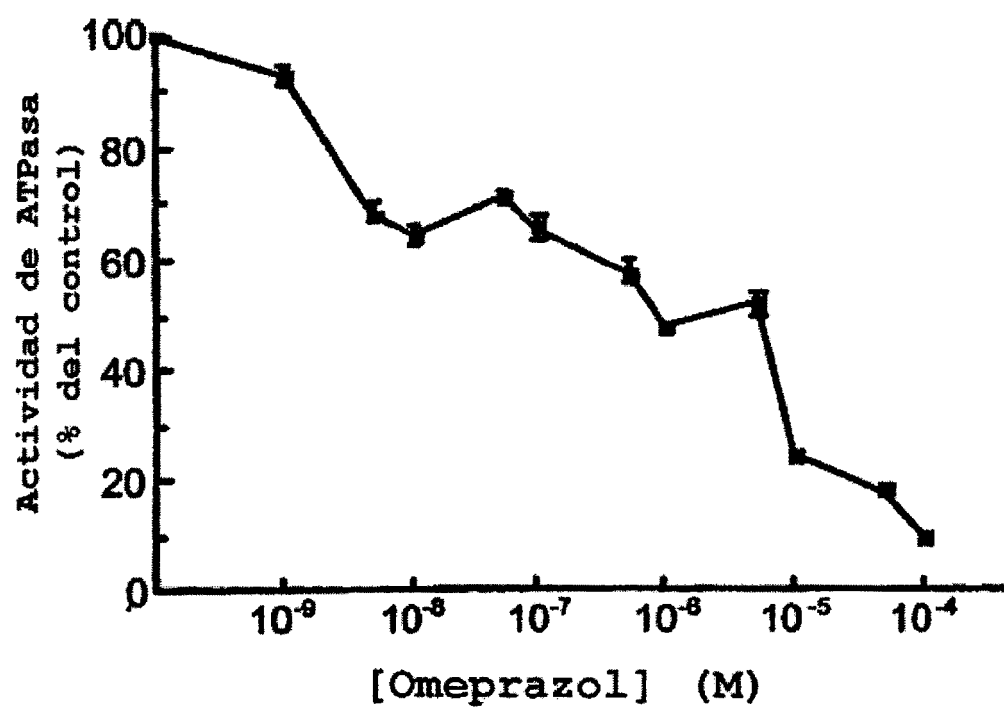


FIGURA 3

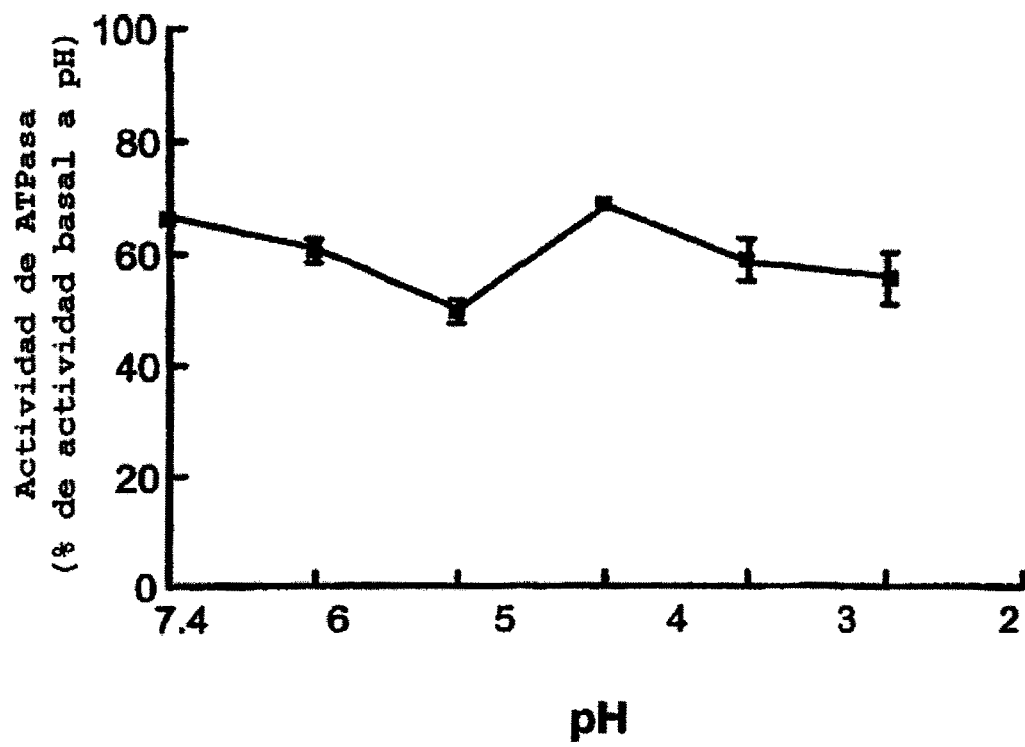


FIGURA 4

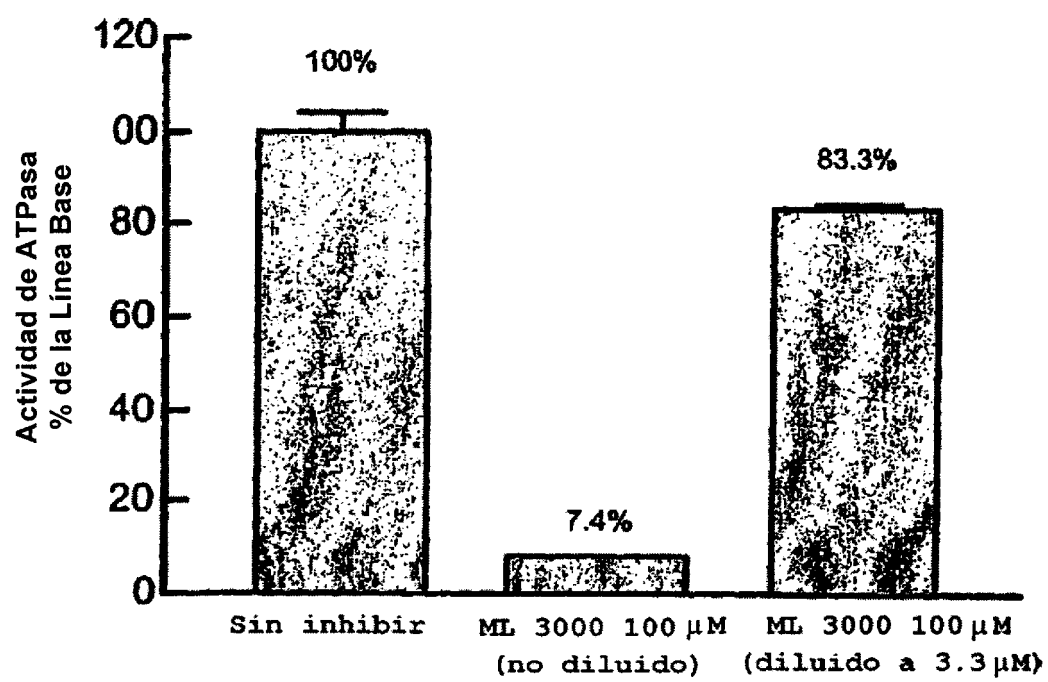


FIGURA 5

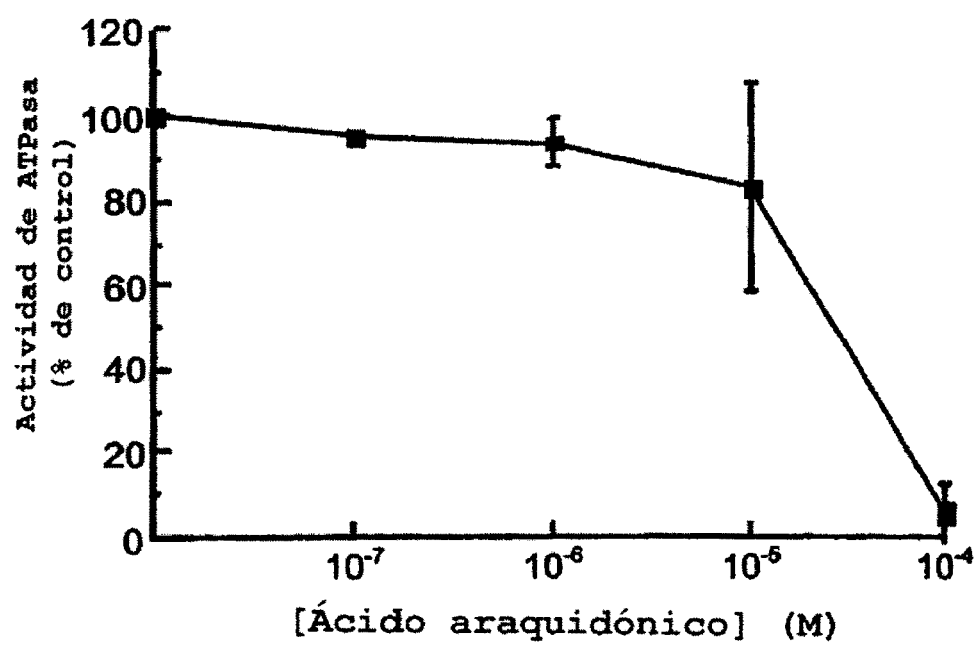


FIGURA 6

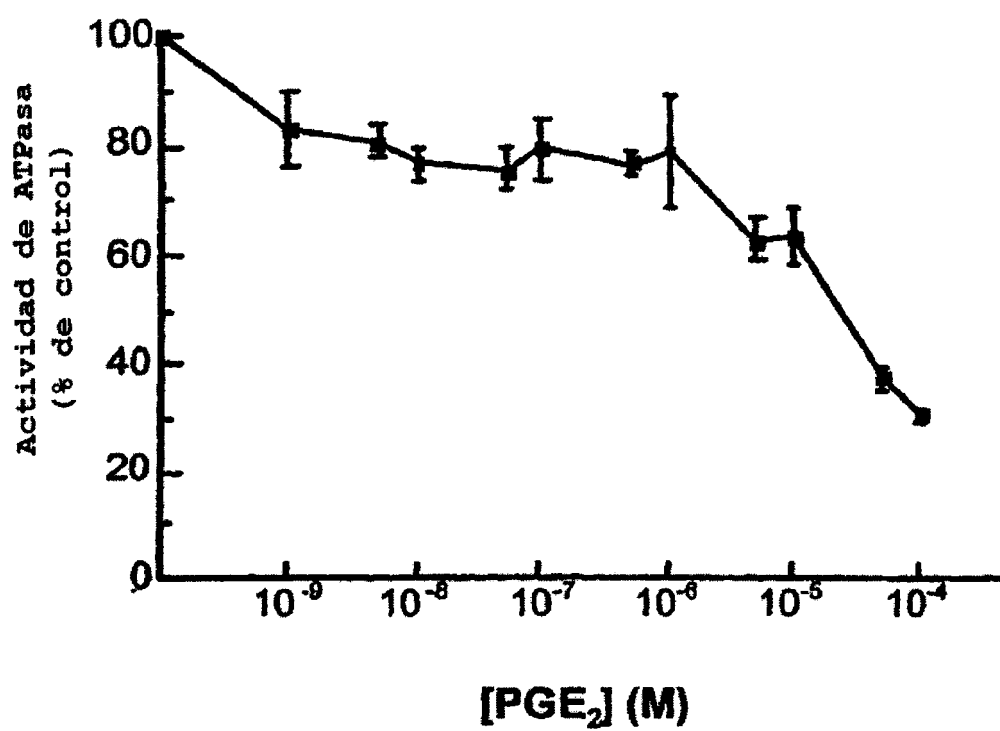


FIGURA 7

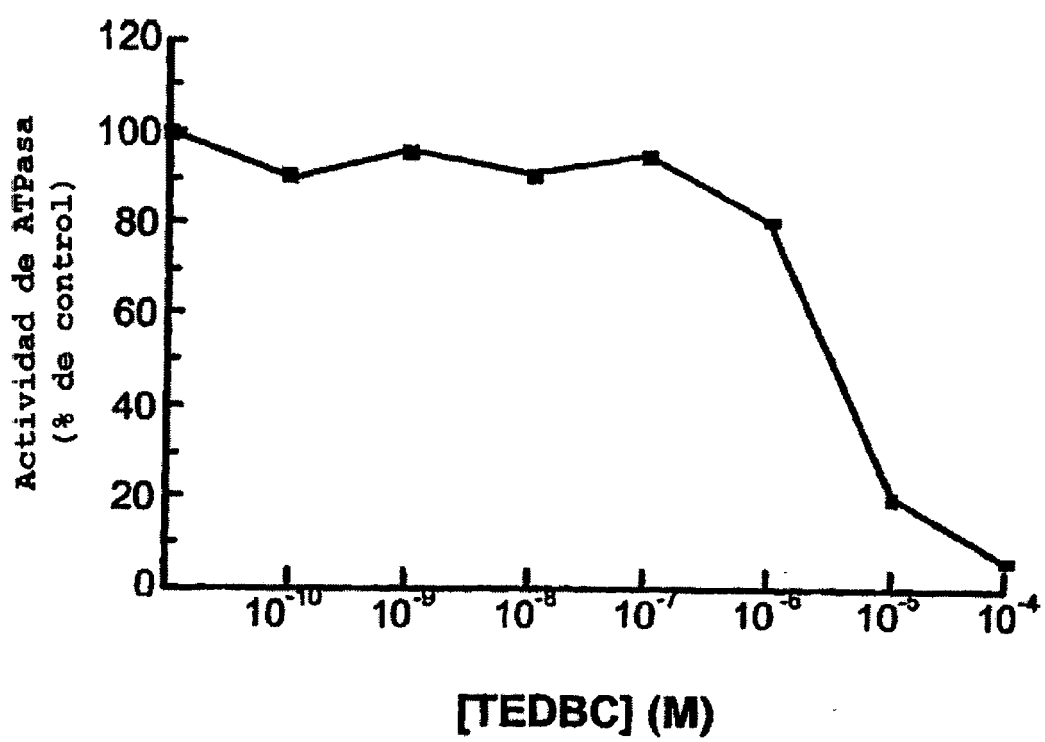


FIGURA 8

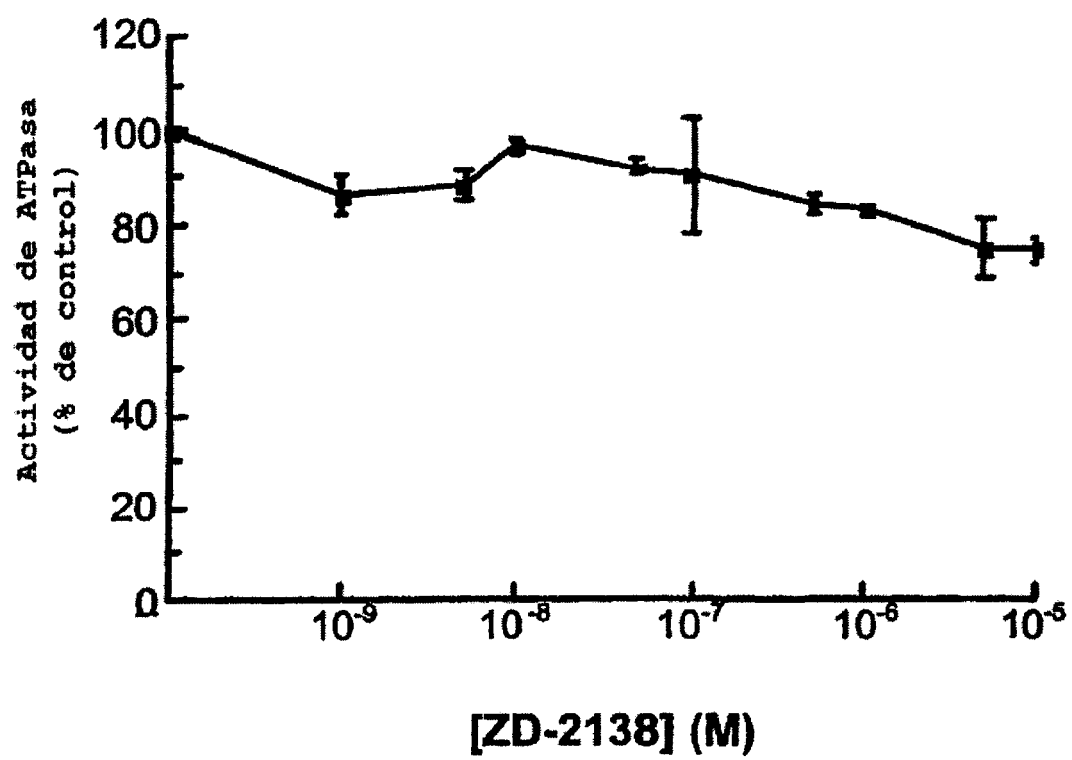


FIGURA 9

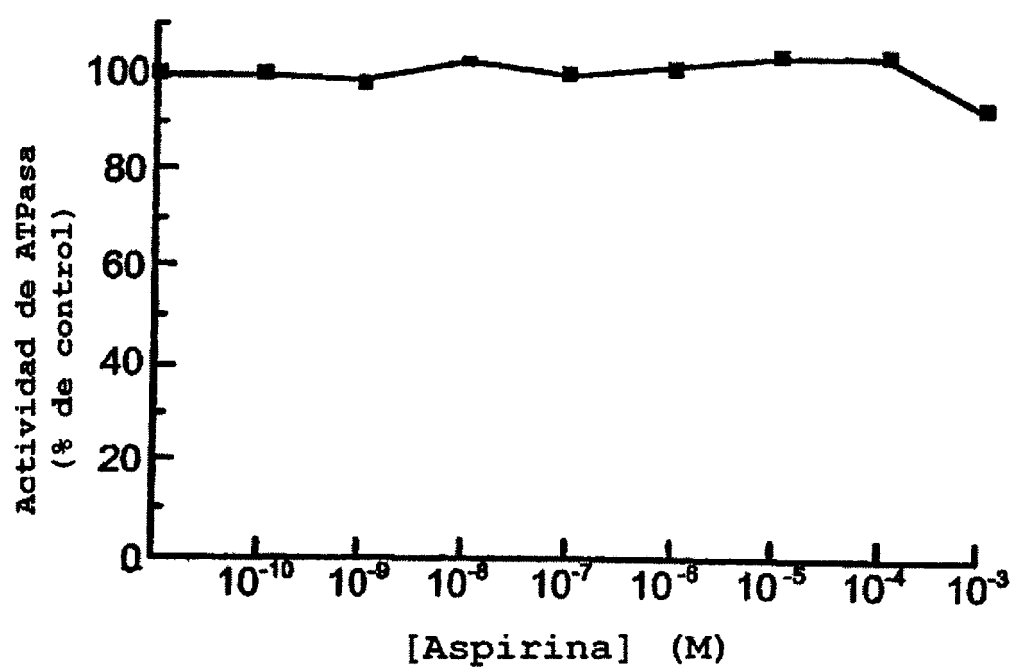


FIGURA 10

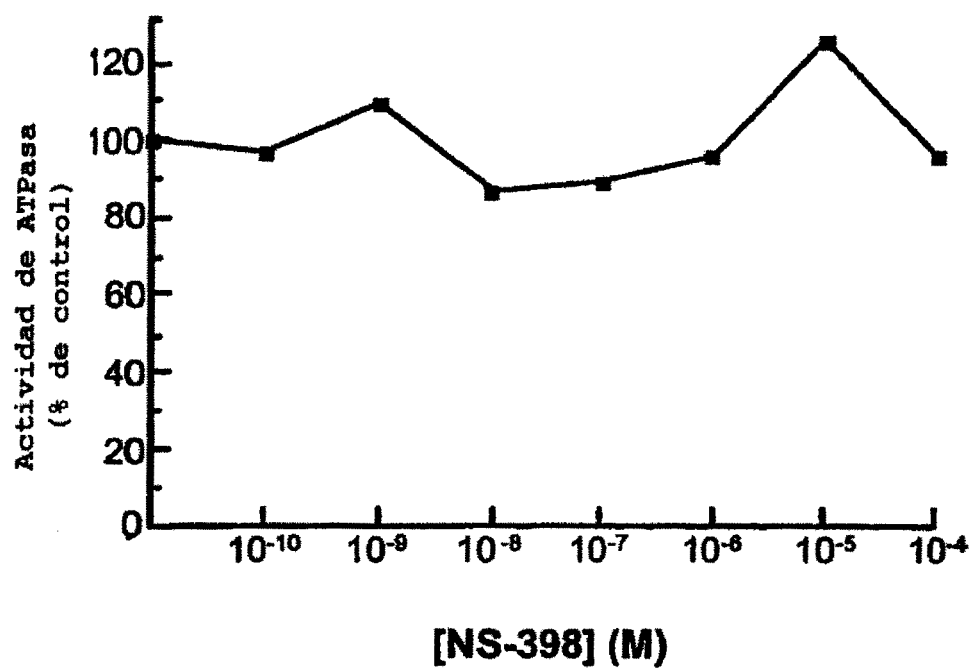


FIGURA 11

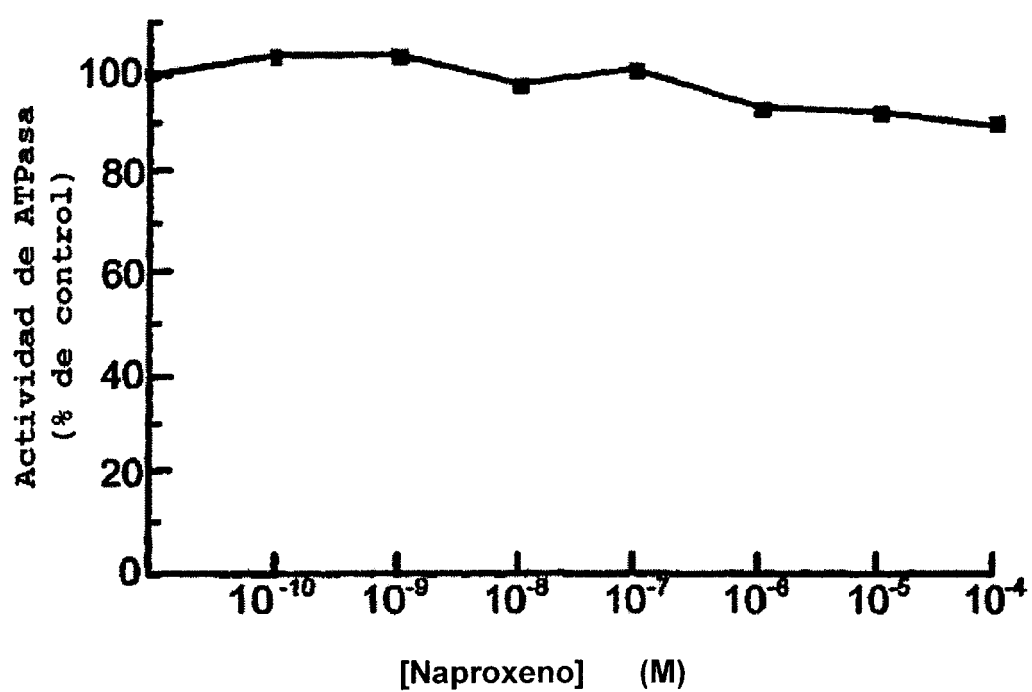


FIGURA 12

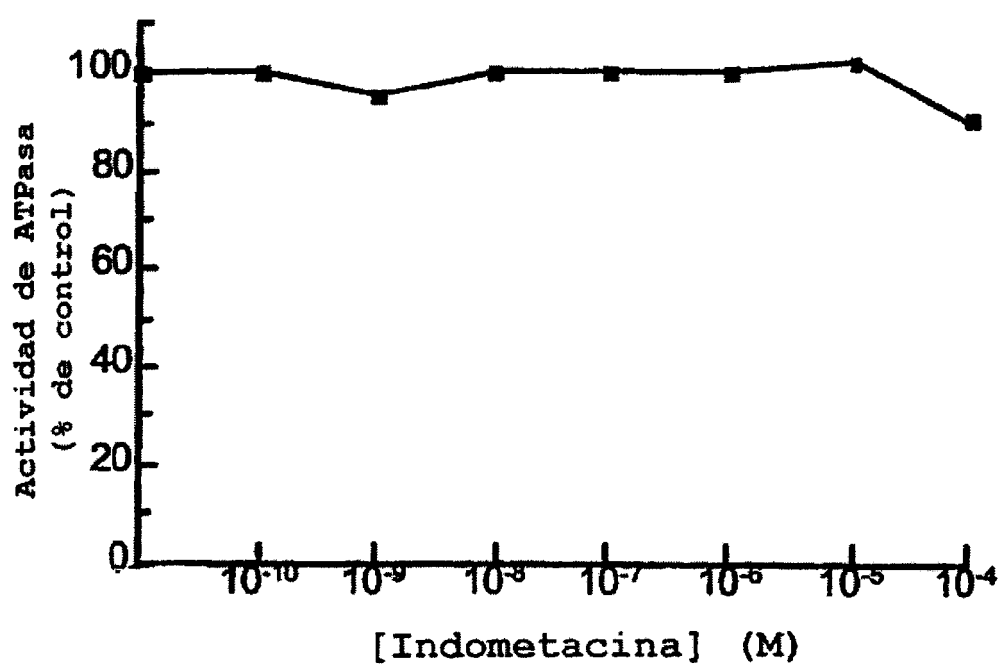
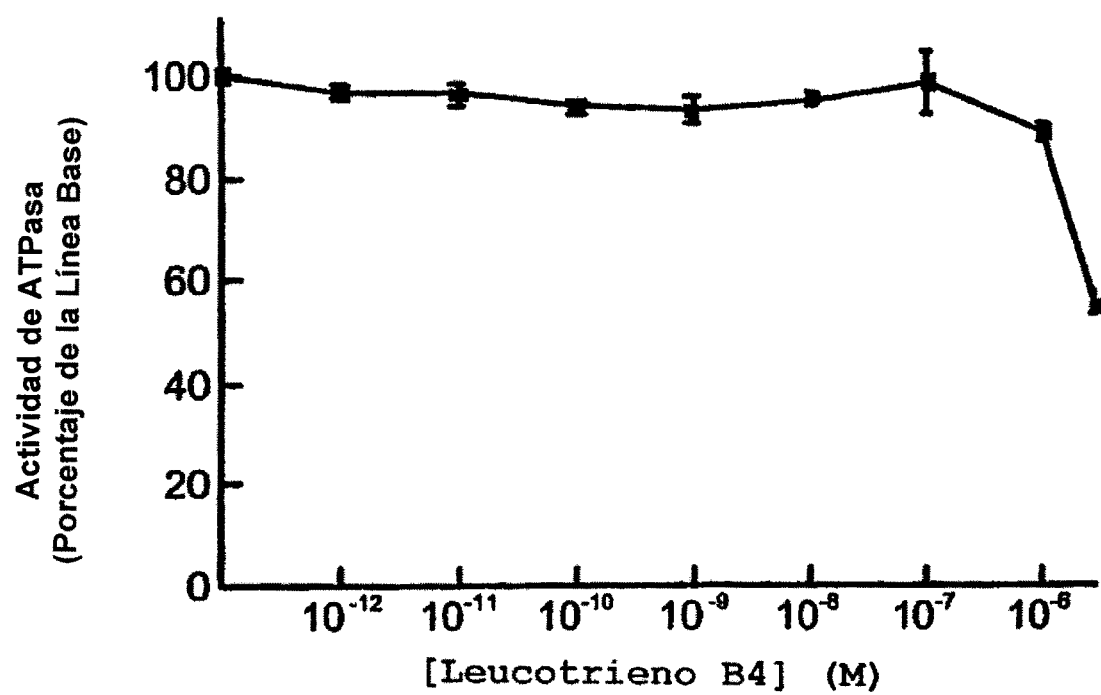
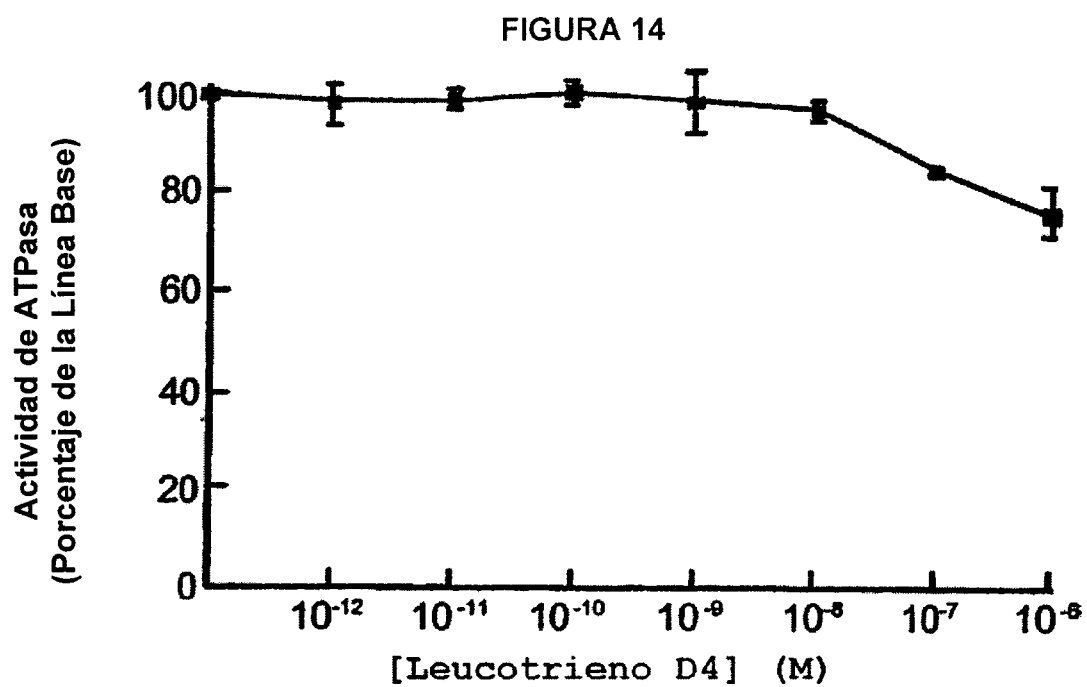


FIGURA 13





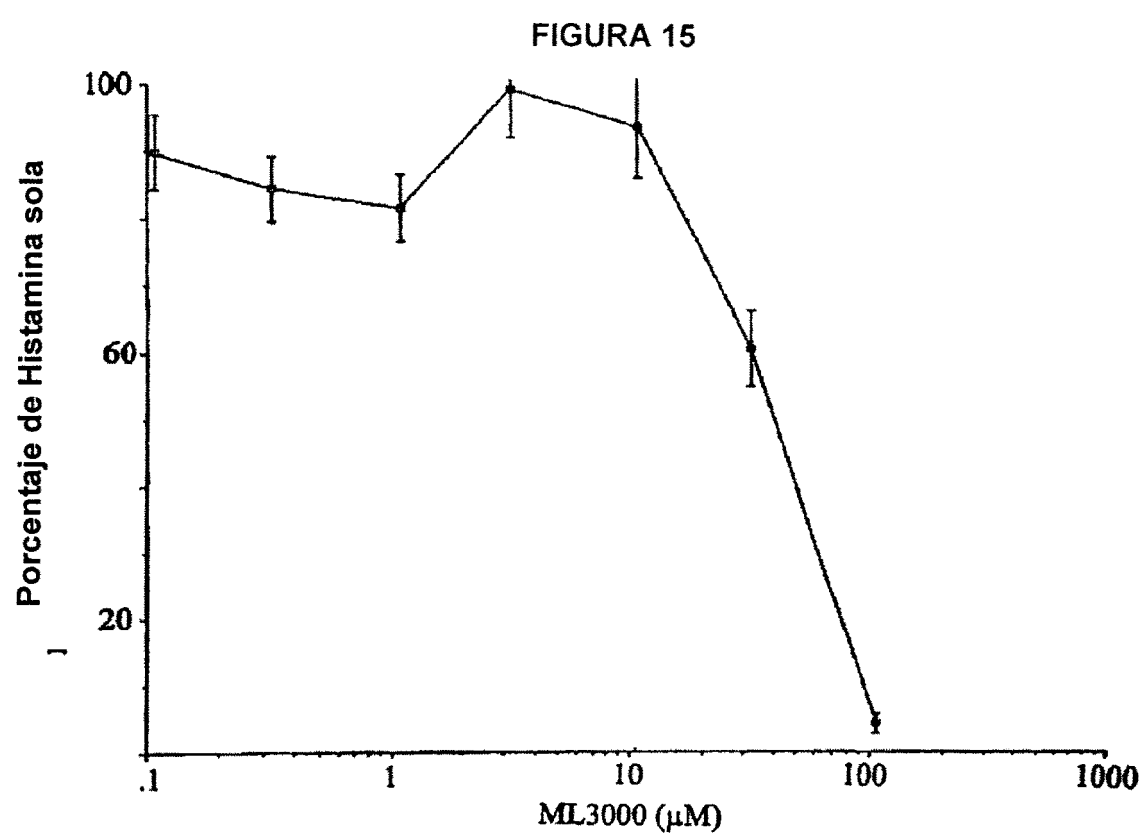


FIGURA 16

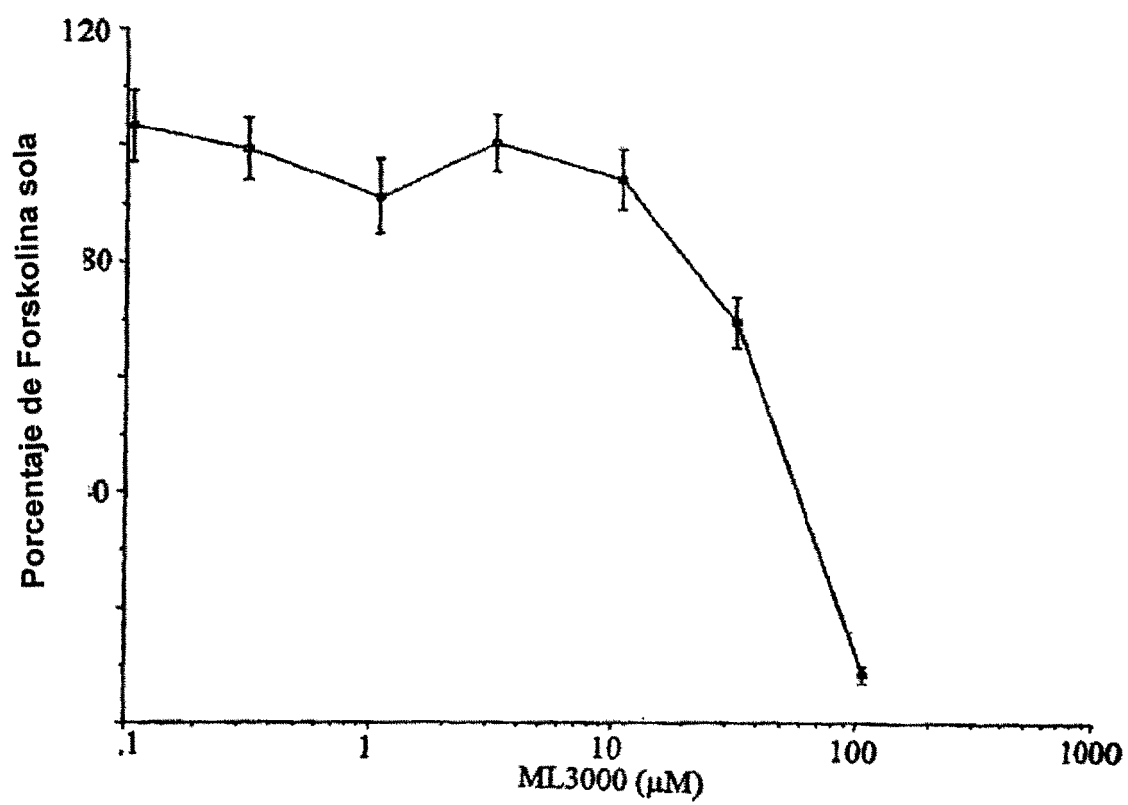


FIGURA 17

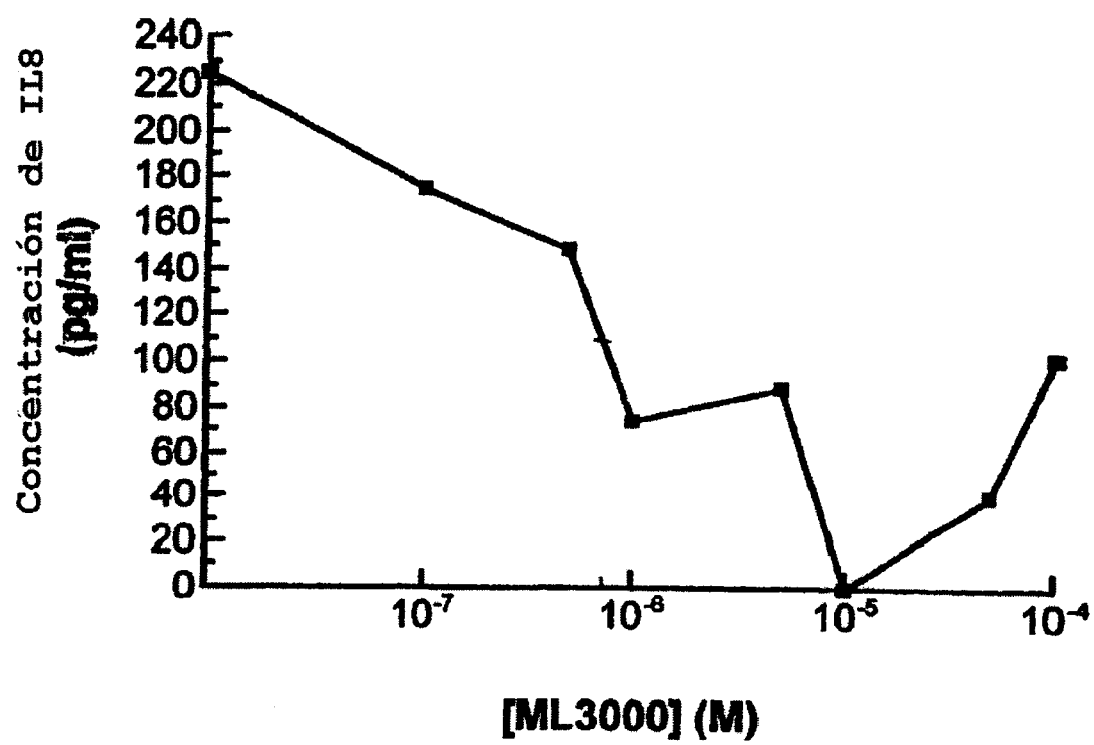


FIGURA 18

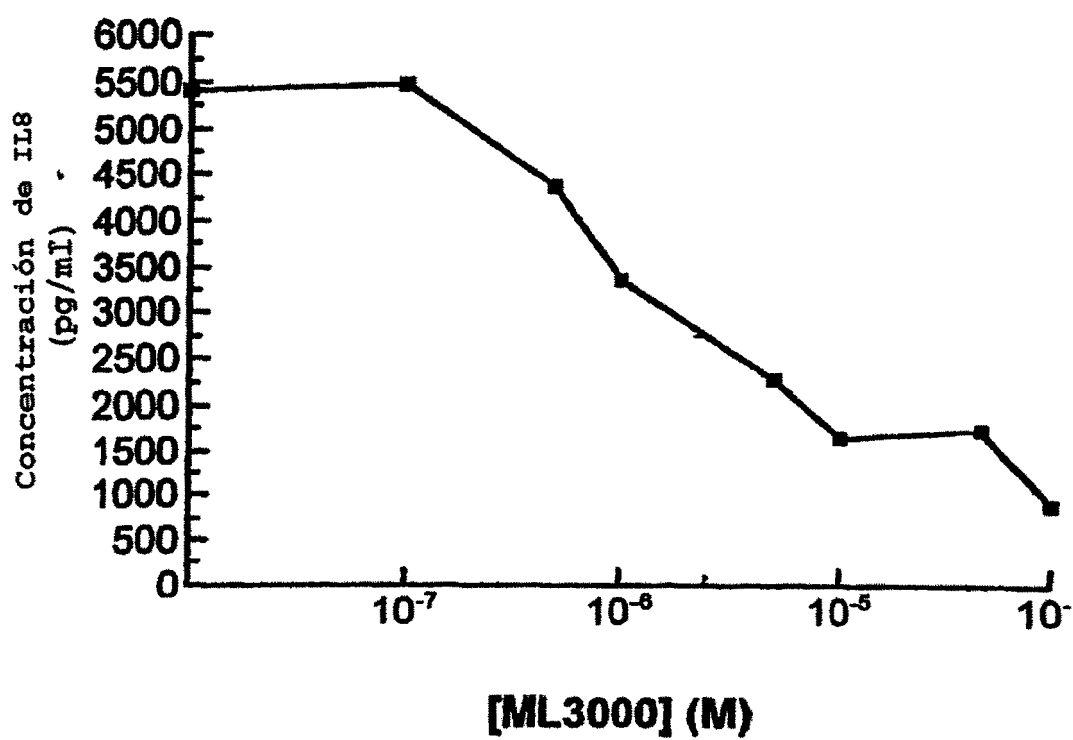


FIGURA 19

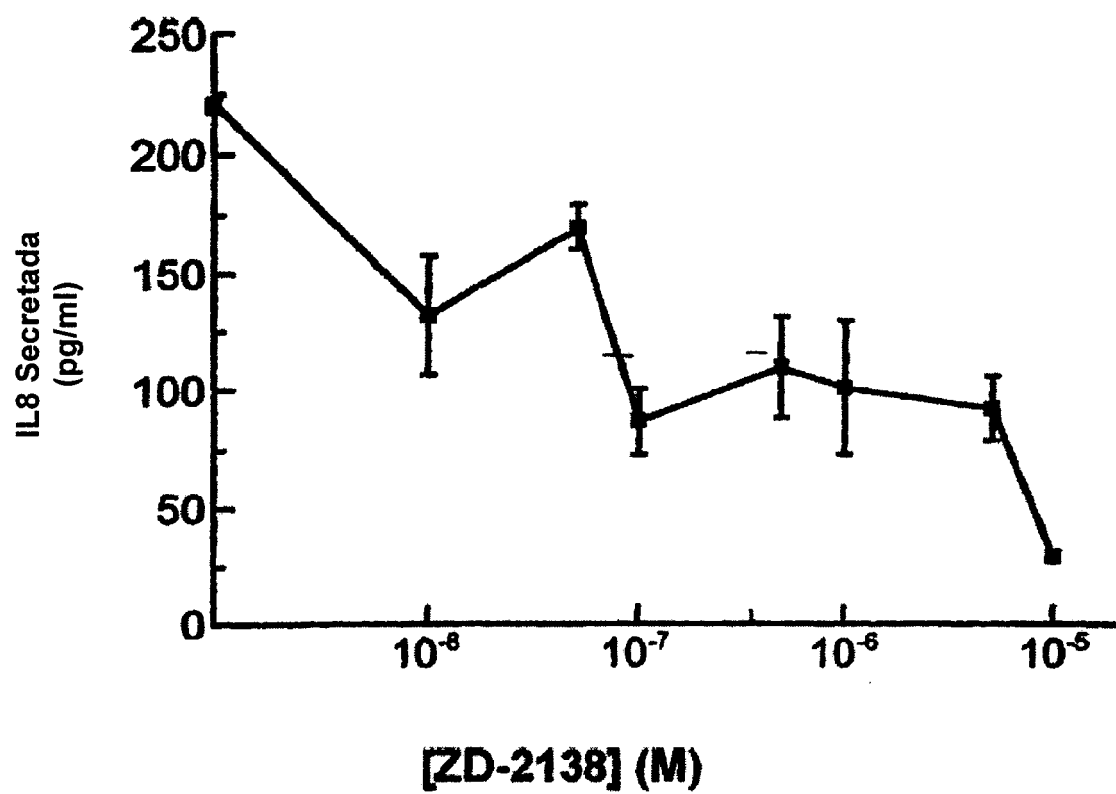


FIGURA 20

