



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 305 741**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/94 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04717679 .7**
⑧6 Fecha de presentación : **05.03.2004**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1604211**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

⑤4 Título: **Identificación de compuestos terapéuticos.**

③0 Prioridad: **07.03.2003 GB 0305153**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

⑦3 Titular/es: **Cambridge Biotechnology Ltd.**
P O Box 230
Cambridge CB2 1XJ, GB

⑦2 Inventor/es: **Richardson, Peter**

⑦4 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Identificación de compuestos terapéuticos.

Esta invención se relaciona con la identificación de agentes terapéuticos potenciales.

En tejidos normales de mamífero, el pH extracelular está estrechamente regulado entre pH 7,35 y 7,45. Algunos tejidos experimentan valor más bajos de pH, particularmente el lumen del estómago (pH entre 2 y 3) y las superficies de algunos epitelios (por ejemplo, el pH de la superficie del pulmón es aproximadamente de 6,8, Jayaraman, S. y colaboradores, (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1504-1511).

En tejidos patológicos, por ejemplo durante una inflamación, isquemia y otros tipos de lesiones, ocurre una reducción en el pH. Por ejemplo, en la articulación artrítica, se observan típicamente reducciones en el pH hasta de 1 unidad (Andersson, S. E. y colaboradores, (1999) *J. Rheumatol.* 26, 2018-2024). Se ha observado recientemente que el cartílago en articulaciones osteoartíticas experimenta valores de pH tan bajos como 5,0 (Konttinen, Y. T. y colaboradores, (2002) *Arth. Rheum.* 46, 953-960). La actividad neuronal excesiva también puede resultar en una reducción en el pH extracelular. Por ejemplo, las descargas epilépticas y la sobreestimulación de la médula espinal han sido asociadas con cambios en el pH extracelular (Chesler, M. *Prog. Neurobiol.* (1990) 34, 401-427). En forma similar, se han observado reducciones en el pH extracelular en tumores sólidos donde se han observado valores de pH tan bajos como 5,5, probablemente como consecuencia de una pobre perfusión y la predominancia de metabolismo glicolítico (Thistlethwaite, A. J. y colaboradores, *Radiation Oncology Biol. Phys.* (1985) 11, 1647-1652). En la isquemia la falta de suministro de sangre resulta en una caída en el pH (Iminke, D. C. & McCleskey, E. W. (2001) *Nature Neurosci.* 4, 869-870) y en la posterior activación inflamatoria de la célula.

Un factor común en todas estas enfermedades y condiciones es que las demandas de energía de los tejidos involucrados supera al suministro. Esto resulta en metabolismo anaeróbico con la producción de ácidos lácticos y pirúvico. Otro factor que contribuye a los cambios de pH es el vaciamiento de las vacuolas secretoras (por ejemplo en las terminaciones nerviosas de las células inflamatorias) dentro del espacio extracelular, ya que los contenidos de estas vacuolas se mantienen a pH bajo. La reducción en el pH puede ayudar a proteger el tejido. Por ejemplo, el receptor NMDA en el CNS, que ha estado fuertemente implicado en el daño isquémico, se inhibe a un pH de 6,8.

Otro factor común en las enfermedades anteriores es la adenosina. La adenosina es una hormona/neurotransmisor local omnipresente que actúa sobre cuatro receptores conocidos, los receptores A1, A2A, A2B y A3 de adenosina. La adenosina generalmente sirve para balancear el suministro y la demanda de energía en los tejidos. Por ejemplo, en el corazón la adenosina liberada lo enlentece por medio de una acción mediada por el receptor A1 en los nodos y el atrio (Belardinelli, L. & Isenberg, G. *Am. J. Physiol.* 224, H734-H737), mientras simultáneamente dilata la arteria coronaria para incrementar el suministro de energía (esto es, glucosa, grasa y oxígeno) (Knabb y colaboradores, *Circ. Res.* (1983) 53, 33-41). En forma similar, durante la inflamación, la adenosina sirve para inhibir la actividad inflamatoria, mientras que en condiciones de excesiva actividad nerviosa (por ejemplo epilepsia) la adenosina inhibe la activación nerviosa (Klitgaard y colaboradores, *Eur J. Pharmacol.* (1993) 242, 221-228). Este sistema, o una variación sobre él, están presentes en todos los tejidos. De esta forma, bajo condiciones donde el pH cae, la adenosina local sirve para balancear el suministro de energía y la demanda, restituyendo así la función y el pH normales del tejido.

La adenosina por si misma puede ser utilizada para diagnosticar y tratar la taquicardia supraventricular. Se sabe que los agonistas del receptor A1 de adenosina actúan como potentes analgésicos (Sawynok, *Eur J Pharmacol.* (1998) 347, 1-11). Se sabe que los agonistas del receptor A2A de adenosina actúan como agentes antiinflamatorios (por ejemplo, a partir de la patente estadounidense No. 5.877.180 y WO 99/34804). En animales experimentales, los agonistas del receptor A2A han mostrado ser efectivos contra una amplia variedad de condiciones incluidas sepsis, artritis, y lesión por isquemia/reperfusión surgidas por oclusión renal, coronaria o de la arteria cerebral. El factor común en estas condiciones es una reducción en la respuesta inflamatoria causada por el efecto inhibitorio de este receptor sobre la mayoría, si no todas, las células inflamatorias.

Sin embargo, la distribución omnipresente de receptores de adenosina significa que la administración de agonistas del receptor de adenosina causa efectos secundarios adversos. Esto generalmente ha evitado el desarrollo de terapias con base en adenosina. Los agonistas selectivos del receptor de A1 causan bradicardia. El primer agonista selectivo del receptor A2A (2-[4-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina, o CGS21680), fue analizado en un ensayo clínico en Fase 2A como un antihipertensivo potencial. Sin embargo, la administración causó una caída grande en la presión sanguínea y un incremento en la salida cardíaca.

FR2162128 divulga qué derivados de adenosina (incluidos los derivados de 2-alcoxi adenosina que contienen un grupo alquilo inferior de no menos de dos átomos de carbono) tienen actividad hipotensora y vasodilatadora coronaria.

Bartlett y colaboradores (*J. Med. Chem.* 1981, 24, 947-954) divulga la evaluación de análogos de 1-metilisoguanosina. Estos análogos incluyen 2-metoxiadenosina (también conocida como espongosina). Este y otros compuestos fueron analizados por sus efectos relajantes del músculo esquelético, hipotérmicos, cardiovasculares y antiinflama-

torios en roedores después de administración oral. La 2-metoxiadenosina causó un 25% de inhibición de la inflamación inducida por carragenina en ratas con 20 mg/kg po. Sin embargo, también se observaron reducciones en la presión sanguínea promedio (41%), y el ritmo cardíaco (25%) después de la administración de este compuesto con esta dosis.

Kirk y Richardson (British Journal of Pharmacology (1995) 114, 537-543) describe la caracterización de los sitios de enlazamiento de [3H]-CGS 21680 en el striatum y la corteza de rata.

WO 96/38728 divulga un método para medir la actividad de enlazamiento del receptor A2a de compuestos de interés farmacológico por medio del uso del ligando tritiado (³H)-SCH 58261.

Jiang y colaboradores (J. Med. Chem. 1997, 40, 2588-2595) describe el uso de mutagénesis dirigida al sitio en los dominios helicoidales transmembrana del receptor A_{2A} de adenosina humana para el estudio de las relaciones estructura-actividad para el enlazamiento del ligando.

Ribeiro y colaboradores (Progress in Neurobiology 68 (2003) 377-392) es una revisión de los receptores de adenosina en el sistema nervioso y comenta que los efectos secundarios periféricos asociados con los agonistas del receptor de adenosina limitan su utilidad terapéutica.

Existe, por lo tanto, la necesidad de proveer agonistas del receptor de adenosina que puedan ser administrados con efectos secundarios mínimos.

Askalan y Richardson (J. Neurochem. (1994) 63:1477-1484), describen el papel de los residuos de histidina en el sitio de enlazamiento del ligando del receptor A2A de adenosina. En particular, se examinó la dependencia con el pH del enlazamiento de los ligandos. Se observó un incremento en afinidad de dos a cuatro veces para algunos ligandos con la disminución del pH ambiental de 7,0 a 5,5. Sin embargo, no se estudió la acción de los receptores A2A de adenosina.

Hiley y colaboradores (British Journal of Pharmacology (1995) 116, 2641-2646) investigaron los efectos del pH sobre las respuestas a la adenosina en el lecho arterial mesentérico superior aislado inundado por perfusión de una rata. Reduciendo el pH del perfusato a 6,8 mejora 10 veces las respuestas dilatadoras a la adenosina.

El solicitante ha encontrado ahora en forma sorprendente que, con valores relativamente bajos de pH dentro del rango fisiológico, algunos compuestos tienen una afinidad sustancialmente superior (aproximadamente 100 veces superior) y/o eficacia de acción en los receptores de adenosina que a valores de pH más altos. Se cree que esto es debido a que los receptores cambian su conformación en respuesta a los cambios en el pH.

El solicitante ha apreciado que la sensibilidad al pH de los receptores de adenosina puede ser aprovechada para identificar a otros ligandos del receptor de adenosina que únicamente tienen alta afinidad y/o eficacia por el receptor bajo condiciones de bajo pH. Las acciones de tales ligandos del receptor de adenosina pueden ser luego dirigidas a regiones de bajo pH, tal como tejidos patológicos sin provocar los serios efectos secundarios asociados con la administración de ligandos conocidos del receptor de adenosina.

De acuerdo con la invención, se provee un método para identificar un agente terapéutico potencial, que comprende determinar la afinidad y/o eficacia de un compuesto de prueba para un receptor de adenosina a un pH más alto de al menos 7,4, y también a un pH menor, desde 5,5 hasta 7,2, o desde 5,0 hasta 7,0, e identificar al compuesto como a dicho agente si la afinidad y/o la eficacia al pH más bajo es mayor que aquella al pH más alto.

Se prefiere que la diferencia entre la afinidad del agente terapéutico potencial para, y/o su eficacia de acción con el receptor de adenosina al pH más bajo y más alto sea la mayor posible. Donde exista una gran diferencia en afinidad y/o eficacia, se espera que el agente pueda ser administrado a una dosis a la cual tenga efectos terapéuticos benéficos, y se pueda evitar o minimizar cualquiera de los efectos secundarios asociados con dosis más altas del agente. Preferiblemente, la afinidad y/o la eficacia al pH más bajo son más de 10 veces, más preferiblemente más de 100 veces, lo más preferible más de 1000 veces, superiores que la afinidad y/o la eficacia al pH más alto.

Los agonistas que tienen afinidad y/o eficacia más altas a pH más bajo pueden ser útiles en terapia, por ejemplo en la prevención, tratamiento, o alivio del dolor, particularmente dolor inflamatorio crónico o neuropático y artritis. La selectividad de estos agonistas significa que ellos pueden ser dirigidos a tejidos patológicos, por ejemplo a articulaciones artríticas, permitiendo por lo tanto una administración efectiva de dosis menores que las sugeridas por el estado del arte, y minimizar los efectos secundarios.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para identificar ligandos que únicamente se enlazan al receptor A2A de adenosina con alta afinidad a pH bajo, cuando se cree que el receptor adopta una conformación diferente de aquella existente a pH 7,4. Ya que estos ligandos son únicamente agonistas efectivos a bajo pH, ellos pueden actuar únicamente en sitios dentro del cuerpo donde el pH está deprimido, más notablemente en la cápsula de la articulación de la artritis y en sitios similares con dolor inflamatorio.

Los métodos de la invención pueden ser utilizados para identificar ligandos que únicamente enlazan al receptor A1 de adenosina con alta afinidad a pH bajo. Se espera que tales ligandos sean útiles en la reducción de la actividad excesiva del tejido, por ejemplo la actividad nerviosa, y para tener efectos secundarios reducidos comprados con agonistas conocidos del receptor A1 de adenosina. Los efectos secundarios de los agonistas conocidos incluyen bradicardia y arteritis.

Los métodos de la invención pueden ser utilizados para identificar ligandos que únicamente enlazan al receptor A3 de adenosina con alta afinidad a pH bajo. Se espera que tales ligandos sean útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Con base en la información suministrada aquí, alguien normalmente capacitado en el tema puede identificar agentes activos adecuados para el tratamiento de estados específicos de una enfermedad. Estos agentes serían selectivamente activos en el tejido patológico, reduciendo así la probabilidad y severidad de los efectos secundarios asociados con receptores en tejido normal.

En tejido aislado y en preparaciones celulares, se puede medir con precisión la sensibilidad al pH. Por lo tanto, después de que se ha obtenido evidencia en modelos animales de patología (por ejemplo, dolor inflamatorio), los compuestos que reúnen el criterio apropiado servirán como "aciertos" para el subsiguiente descubrimiento de una droga.

Los compuestos identificados utilizando métodos de la invención se espera que sean de uso en la terapia, incluyendo profilaxis, de diferentes condiciones. Estas incluyen enfermedades o condiciones cuya prevención, tratamiento, o alivio de la enfermedad o condición esté mediada por la activación de receptores de adenosina. Los ejemplos incluyen enfermedades o condiciones en las cuales la demanda local de energía del tejido excede el suministro y/o disminuye el pH, tal como inflamación, lesión por isquemia-reperusión, actividad neuronal excesiva (por ejemplo en epilepsia, o dolor crónico o hiperalgesia, incluido dolor inflamatorio y neuropático), sepsis, choque séptico, neurodegeneración (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), y otras condiciones donde la demanda de energía excede el suministro, por ejemplo fatiga muscular o calambre de atletas.

Los compuestos identificados utilizando métodos de la invención pueden ser efectivos en la prevención, tratamiento, o alivio del dolor, en particular los siguientes tipos de dolor: dolor intestinal, dolor pancreático, dolor pélvico/perineal, dolor de espalda, dolor en la parte baja de la espalda, dolor de pecho, dolor cardíaco, dolor pélvico/PID, dolor en las articulaciones (por ejemplo, asociado con tendinitis, bursitis, artritis aguda), dolor de cuello, dolor obstructivo (trabajo de parto u operación de cesárea), dolor por cáncer, dolor por VIH, dolor de miembro fantasma, dolor postoperatorio, dolor neuropático crónico, dolor de cirugía fallida de espalda, dolor físico post trauma (incluido el dolor causado por una herida por arma de fuego, un accidente automovilístico, o una quemadura), dolor por tejido cicatrizal, dolor por herpes Zoster agudo, dolor por avance de pancreatitis aguda (cáncer), neuralgia post herpes, neuralgia trigeminal.

Los compuestos identificados utilizando métodos de la invención pueden ser efectivos en la prevención, tratamiento, o alivio del dolor neuropático u otro tipo de dolor causado por, o asociado con neuropatía diabética, polineuropatía, fibromialgia, síndrome de dolor miofascial, osteoartritis, artritis reumatoide, ciática o radiculopatía lumbar, estenosis espinal, trastorno de la articulación temporomandibular, cólico renal, dismenorrea/endometriosis.

Los compuestos identificados utilizando métodos de la invención pueden ser efectivos en la prevención, tratamiento, o el alivio del dolor inflamatorio o de otro tipo causado por, o asociado con condiciones artríticas tales como osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, artritis gotosa, o asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis, esclerosis múltiple, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, choque gran negativo, choque tóxico, choque hemorrágico, síndrome de angustia respiratoria en adulto, malaria cerebral, rechazo de trasplante de órganos, dolor secundario por cáncer, VIH, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcosis pulmonar, enfermedades de reabsorción ósea, lesión por reperusión, rechazo de un injerto por el huésped, esclerosis múltiple, miastenia grave, rechazos de trasplantes de donantes de la misma especie, fiebre y mialgia debida a infección, complejo relacionado con el SIDA (ARC), formación de queloide, formación de tejido cicatrizal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y piresis, síndrome de intestino irritable, osteoporosis, malaria cerebral, meningitis bacteriana, o efectos adversos del tratamiento de amfotericina B, tratamiento con interleuquina-2, tratamiento con OKT3, o tratamiento con GM-CSF.

Los compuestos identificados por medio de un método de la invención pueden ser particularmente efectivos para la prevención, el tratamiento o el alivio de tipos particulares de inflamación, incluyendo artritis (particularmente en la cápsula de la articulación de la artritis), asma, soriasis, e inflamación intestinal.

Los compuestos identificados por medio de un método de la invención pueden ser particularmente efectivos para la prevención, el tratamiento o el alivio de artritis reumatoide, síndrome de intestino irritable u osteoartritis.

La utilidad de un compuesto se puede determinar por medio de un ensayo de radioligando descrito más abajo. El incremento en afinidad se puede medir por el sitio de enlazamiento de alta afinidad (esto es, el sitio activo del agonista), mientras que la eficacia del agonista a diferentes valores de pH se puede determinar evaluando la diferencia en la afinidad en la afinidad de los estados de baja y alta afinidad. Esto puede hacerse utilizando

do GTP y análogos estables del mismo, que convierten el estado de alta afinidad del receptor al estado de baja afinidad imitando por lo tanto la activación del receptor por agonistas. Los ligandos sin eficacia (esto es, antagonistas) no diferencian entre estos estados de afinidad diferente. Alternativamente, los agonistas que tienen diferentes afinidades y/o eficacias a diferentes valores de pH se pueden identificar en ensayos funcionales, tal como la medición de una segunda producción o remoción del mensajero (por ejemplo, estimulación o inhibición de la acumulación de cAMP, renovación del fosfato de inositol, señalización de fosfato, activación de quinasa, etc.).

La afinidad de un compuesto de prueba por un receptor de adenosina se puede determinar por cualquiera de los siguientes métodos:

- i) enlazamiento de concentraciones múltiples de compuestos de prueba marcados (incluyendo compuestos de prueba radiomarcados) a receptores de adenosina presentes en tejidos, rebanadas de tejido, células intactas, células rotas o membranas derivadas de células;
- ii) desplazamiento de un compuesto marcado enlazado a partir de receptores de adenosina por incubación con un compuesto de prueba no marcado utilizando tejidos, rebanadas de tejido, células intactas, células rotas o membranas derivadas de células que soportan a tales receptores. El compuesto marcado puede ser ya sea el compuesto de prueba, o un ligando selectivo para el receptor.

Se apreciará que la eficacia de un agonista refleja su habilidad para activar su receptor. Los agonistas con alta eficacia producen una respuesta receptora máxima, y los agonistas parciales producen una respuesta menor. La eficacia de la acción de un compuesto de prueba con un receptor de adenosina se puede determinar por medio de cualquiera de los siguientes métodos:

- i) determinado la acción del receptor de adenosina por medio de la medición de la acumulación o el agotamiento de moléculas de señalización incluidas cAMP, IP3 y calcio libre en tejidos, rebanadas de tejido, células intactas o células parcialmente rotas;
- ii) uso de membranas biológicas para evaluar la activación del receptor de adenosina en respuesta a un compuesto de prueba por medio de la medición de la activación de la proteína G (por ejemplo por medio del uso de nucleótidos de guanina radiomarcados), o por medio de la medición de actividad enzimática (por ejemplo, adenilil ciclasa, fosfodiesterasa, fosfolipasa o proteína quinasa), o por medio de la medición de un flujo iónico a través de canales iónicos activados por el receptor de adenosina (por ejemplo canales de calcio o de potasio);
- iii) determinando la acción del receptor de adenosina por medio de la medición de la actividad de la proteína quinasa en tejidos, rebanadas de tejido, células intactas, células rotas o membranas derivadas de células;
- iv) determinando la acción del receptor de adenosina por medio de la medición de la actividad de la fosfolipasa (por ejemplo, fosfolipasa C, fosfolipasa A2, fosfolipasa D) en tejidos, rebanadas de tejido, células intactas, células rotas o membranas derivadas de células;
- v) determinando la acción del receptor de adenosina por medio de la medición de la fosforilación de la proteína y desfosforilación en tejidos, rebanadas de tejido, células intactas, células rotas o membranas derivadas de células.

El nivel de actividad de un compuesto (esto es, su eficacia intrínseca) puede variar dependiendo del efecto deseado. Por ejemplo, se pueden utilizar agonistas de baja eficacia útiles en reducir la probabilidad de insensibilización del receptor, o en conferir una dimensión extra de reconocimiento, esto es, para aquellos tejidos con gran reserva receptora. La actividad es preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos tan grande como aquella para cualquiera de los agentes activos reportados más abajo. La diferencia se observa preferiblemente entre pH fisiológico (7,4) y pH 5,5 o superior, por ejemplo 6,2 (extremo para tejido isquémico), 6,5, 7,0 (típico en áreas de inflamación crónica) ó 7,2. Alternativamente, se pueden utilizar agonistas de baja eficiencia parcial como antagonistas funcionales, para enlazamiento al receptor y prevenir el enlazamiento del transmisor/hormona endógena (por ejemplo, adenosina).

Si se identifica un agente terapéutico potencial, se puede determinar luego si el agente tiene un efecto terapéutico, por ejemplo contra dolor o inflamación (particularmente cualquiera de las enfermedades o condiciones enlistadas anteriormente). Preferiblemente, se utiliza un modelo animal no humano para determinar si el agente identificado tiene un efecto terapéutico. Se puede utilizar cualquier modelo animal adecuado. Los ejemplos incluyen artritis inducida por inyección de colágeno II, o dolor neuropático inducido por diabetes inducida por estreptozotocina.

Preferiblemente, se determina el efecto terapéutico del agente identificado en una concentración por debajo del valor de EC50 del agente con el receptor de adenosina a pH 7,4. Más preferiblemente, se determina el efecto terapéutico

a una concentración que es de una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima, del valor de EC50.

Para confirmar que se puede administrar el agente identificado con efectos secundarios minimizados, se pueden determinar los efectos secundarios (tales como bradicardia, hipotensión o taquicardia) causados por el agente identificado. Preferiblemente, éstos se determinan en una concentración por debajo del valor de EC50 del agente con el receptor de adenosina a un pH de 7,4. Más preferiblemente, se determinan los efectos secundarios en una concentración que es de una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima, del valor de EC50.

Se han identificado una cantidad de compuestos que son agonistas del receptor A1 o A2 de adenosina. Estos compuestos tienen afinidad más alta por el receptor A1 o A2 de adenosina a pH más bajo. Se cree que los receptores cambian su conformación en respuesta a los cambios en pH. El mecanismo preciso por medio del cual ocurre este cambio es desconocido, pero se piensa que involucra residuos de histidina que han sido implicados en el enlazamiento del agonista a estos receptores y que tienen valores de pK en el rango fisiológico.

La Figura 1 ilustra el incremento en afinidad observado con 2-metoxiadenosina en la medida en que el pH en un experimento de enlazamiento del ligando se redujo desde pH 7,4 hasta pH 5,5. La Figura 2 demuestra que el mismo incremento en afinidad fue observado a pH 7,0 y pH 6,8, pero que el agonista arquetípico del receptor A2A, CGS21680, no muestra este efecto. Otra consecuencia sorprendente de los cambios de afinidad fue que la eficacia de la 2-metoxiadenosina con el receptor A2A de adenosina se incrementó aproximadamente 100 veces (Figura 3). En contraste, la 3'-desoxi-2-metoxiadenosina mostró una disminución en afinidad con el receptor A1 cuando se disminuyó el pH desde 7,4 hasta 6,2. Los valores de K_i determinados para los sitios de alta afinidad en el desplazamiento de [^3H]-DPCPX del receptor A1 humano fueron 158 ± 85 nM a pH 7,4 y 405 ± 114 nM a pH 6,2. Por lo tanto, parece que los agonistas del receptor de adenosina y los agonistas parciales pueden ser profundamente afectados por cambios locales en el pH del tejido y, sorprendentemente, que la eficacia de estos ligandos puede ser o bien incrementada o disminuida. Los compuestos que muestran una disminución en la eficacia probablemente actúan como agonistas parciales de baja eficacia.

El solicitante ha estimado que los agentes terapéuticos potenciales se pueden identificar también por medio de la administración de un compuesto de prueba *in vivo* o *in vitro* con una dosis menor que aquella esperada para activar (a pH 7,4) una proporción significativa de receptores de adenosina (esto es, receptores de adenosina suficientes para producir un efecto terapéutico benéfico), y luego evaluar la diferencia en la dosis requerida para activar a los receptores en el tejido patológico comparado con el tejido normal.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se provee un método para identificar un agente terapéutico potencial que comprende poner en contacto a un compuesto de prueba con un receptor de adenosina (un receptor de adenosina A1, A2A, A2B, o A3) en un tejido patológico, célula, o membrana y un tejido normal correspondiente, célula, o membrana en una concentración por debajo del valor de EC50 del compuesto de prueba con el receptor de adenosina a pH 7,4, y determinar si existe alguna diferencia en acción del receptor de adenosina en respuesta al contacto con el compuesto de prueba entre el tejido normal y el tejido patológico.

Preferiblemente, se pone en contacto al compuesto de prueba con el receptor de adenosina en una concentración de una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima, del valor de EC50.

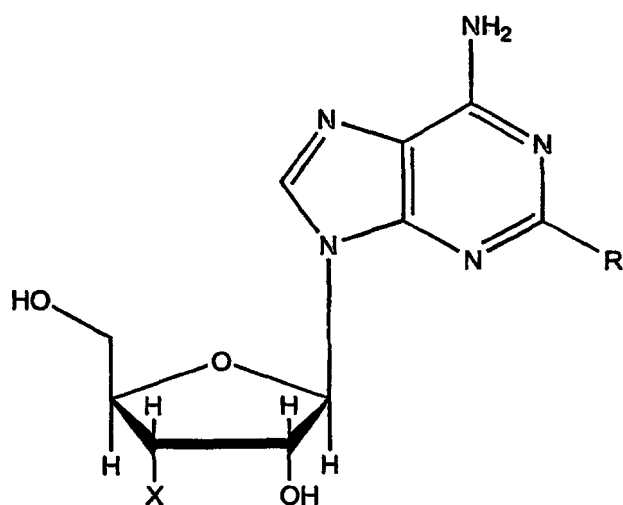
Se identifica al compuesto de prueba como un agente terapéutico potencial si el compuesto de prueba es un agonista del receptor de adenosina, y la acción del receptor de adenosina en respuesta al compuesto de prueba es mayor en el tejido patológico que el tejido normal. Si el tejido patológico comprende tejido epitelial, se pueden identificar compuestos terapéuticos potenciales para el tratamiento de una enfermedad epitelial (por ejemplo psoriasis, asma, COPD).

Los agonistas del receptor de adenosina que tienen diferente afinidad y/o eficacia receptora a diferente pH, o que provocan una acción diferente de receptores de adenosina en tejido patológico comparado con tejido normal, incluyen derivados de adenosina.

Por lo tanto, se apreciará que se pueden utilizar métodos de la invención como métodos de selección, en particular para seleccionar derivados de adenosina. Se prefieren los derivados que tienen baja afinidad (esto es, un K_d para un receptor de adenosina $> 0,5 \mu M$) y/o eficacia a pH 7,4. La selectividad de los derivados para diferentes receptores de adenosina puede cambiar a pH reducido, por lo tanto la selectividad de un compuesto dado se debe determinar tanto a pH normal como a pH reducido.

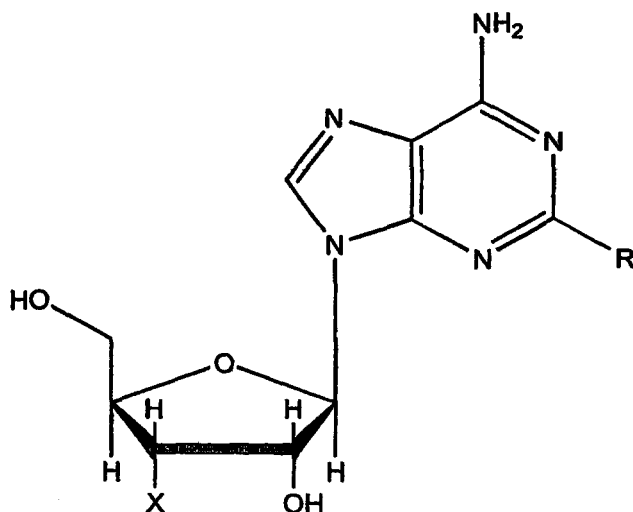
Se han encontrado los compuestos de las siguientes fórmulas generales que no hacen parte de la presente invención, muchos de los cuales se cree que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajo:

(I)



en donde R es alcoxi C_{1-4} y X es OH;

(II)



en donde R es alcoxi C_{1-4} , y X es H.

Se ha encontrado que los compuestos ejemplificados en el Ejemplo 10 tienen una afinidad mayor por los receptores A2A de adenosina a pH más bajo.

Los compuestos de fórmula general (I) o (II) o del Ejemplo 10, que tiene una afinidad mayor por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina a pH menor pueden ser utilizados como medicamentos en la prevención, tratamiento o alivio de diferentes enfermedades o condiciones. Estas incluyen enfermedades o condiciones cuya prevención, tratamiento o alivio es mediada por la activación de receptores de adenosina. Los ejemplos incluyen enfermedades o condiciones en las cuales la demanda local de energía del tejido excede el suministro y/o la caída del pH.

ES 2 305 741 T3

Los compuestos de fórmula general (I) o (II), o del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser utilizados como medicamentos en la prevención, tratamiento, o alivio de diferentes enfermedades o condiciones. Estas incluyen enfermedades o condiciones en las cuales la prevención, el tratamiento o el alivio son mediados por la activación de receptores de adenosina. Los ejemplos incluyen enfermedades o condiciones cuya demanda local de energía del tejido excede el suministro y/o la caída del pH.

Los compuestos de fórmula general (I) o (II), o del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser utilizados en particular para la fabricación de un medicamento para la prevención, el tratamiento, o el alivio de cáncer, inflamación, lesión por isquemia-reperusión, actividad neuronal excesiva (por ejemplo en epilepsia, o dolor crónico o hiperalgesia, incluido dolor inflamatorio y neuropático), sepsis, choque séptico, neurodegeneración (incluida la Enfermedad de Alzheimer), fatiga muscular o calambre muscular (en particular calambre de atletas).

Los compuestos de fórmula general (I) o (II), o del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser efectivos en la prevención, tratamiento, o alivio de los siguientes tipos de dolor: dolor intestinal, dolor pancreático, dolor pélvico/perineal, dolor de espalda, dolor en la parte baja de la espalda, dolor de pecho, dolor cardíaco, dolor pélvico/PID, dolor en las articulaciones (por ejemplo, asociado con tendinitis, bursitis, artritis aguda), dolor de cuello, dolor obstétrico (trabajo de parto u operación de cesárea), dolor por cáncer, dolor por VIH, dolor de miembro fantasma, dolor postoperatorio, dolor neuropático crónico, dolor de cirugía fallida de espalda, dolor físico post trauma (incluido el dolor causado por una herida por arma de fuego, un accidente automovilístico, o una quemadura), dolor por tejido cicatrizal, dolor por herpes Zoster agudo, dolor por avance de pancreatitis aguda (cáncer), neuralgia post herpes, neuralgia trigeminal; dolor neuropático u otro tipo de dolor causado por, o asociado con neuropatía diabética, polineuropatía, fibromialgia, síndrome de dolor miofascial, osteoartritis, artritis reumatoide, ciática o radiculopatía lumbar, estenosis espinal, trastorno de la articulación temporomandibular, cólico renal, dismenorrea/endometriosis; o dolor inflamatorio o de otro tipo causado por, o asociado con condiciones artríticas tales como osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, artritis gotosa, o asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis, esclerosis múltiple, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, choque gran negativo, choque tóxico, choque hemorrágico, síndrome de angustia respiratoria en adulto, malaria cerebral, rechazo de trasplante de órganos, dolor secundario por cáncer, VIH, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcosis pulmonar, enfermedades de reabsorción ósea, lesión por reperusión, rechazo de un injerto por el huésped, esclerosis múltiple, miastenia grave, rechazos de trasplantes de donantes de la misma especie, fiebre y mialgia debida a infección, complejo relacionado con el SIDA (ARC), formación de queloide, formación de tejido cicatrizal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y piresis, síndrome de intestino irritable, osteoporosis, malaria cerebral, meningitis bacteriana, o efectos adversos del tratamiento de amfotericina B, tratamiento con interleuquina-2, tratamiento con OKT3, o tratamiento con GM-CSF.

Los compuestos de fórmula (I), los compuestos de fórmula (II), y los compuestos del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser particularmente efectivos para la prevención, tratamiento, o alivio de tipos particulares de inflamación, incluida la artritis (particularmente en la cápsula de la articulación de la artritis), asma, soriasis, e inflamación intestinal.

Los compuestos de fórmula (I), los compuestos de fórmula (II), y los compuestos del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser particularmente efectivos para la prevención, tratamiento, o alivio de artritis reumatoide, síndrome de intestino irritable u osteoartritis.

Los compuestos de fórmula (I) incluyen: 2-metoxiadenosina, 2-etoxiadenosina, 2-propoxiadenosina, 2-isopropoxiadenosina, y 2-butoxiadenosina. Los compuestos preferidos de fórmula (I) son 2-metoxiadenosina, 2-etoxiadenosina, y 2-butiloxiadenosina.

Los compuestos de fórmula (II) incluyen: 3'-desoxi-2-metoxiadenosina, 3'-desoxi-2-etoxiadenosina, 3'-desoxi-2-propoxiadenosina, 3'-desoxi-2-isopropoxiadenosina, y 3'-desoxi-2-butoxiadenosina. Los compuestos preferidos de fórmula (II) son 3'-desoxi-2-propoxiadenosina, 3'-desoxi-2-isopropoxiadenosina, y 3'-desoxi-2-butoxiadenosina.

Se ha reportado que la 2-metoxiadenosina tiene un valor de EC₅₀ en el receptor A_{2A} de adenosina de 3 μ M (Daly, J.W. y colaboradores, (1993) Pharmacol. 46, 91-100). Sin embargo, este compuesto sorprendentemente tiene una profunda actividad antihiperalgésica y antiinflamatoria con concentraciones en plasma de 0,2 μ M o menores. Con estas bajas dosis, la 2-metoxiadenosina tiene probabilidades reducidas y severidad de efectos secundarios. La actividad de 2-metoxiadenosina como un analgésico es el objetivo de la solicitud internacional de patente no. PCT/GB03/05379 (no publicada a la fecha de presentación de la presente solicitud).

Otros compuestos de fórmula (I) y compuestos de fórmula (II) (y los compuestos del Ejemplo 10) que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajo (y compuestos identificados utilizando métodos de la invención) se cree también que son mucho más efectivos con dosis bajas que otros agonistas del receptor de adenosina. Por lo tanto, se espera que tales compuestos puedan ser efectiva-

mente administrados en dosis a las cuales ellos tengan reducida probabilidad y severidad de efectos secundarios. Estos compuestos pueden alternativamente o adicionalmente tener reducida probabilidad y severidad de efectos secundarios comparados con otros agonistas del receptor de adenosina.

- 5 El dolor tiene dos componentes, cada uno involucrando la activación de neuronas sensoriales. El primer componente es la fase inmediata o temprana cuando se estimula una neurona sensorial, por ejemplo como resultado de calentamiento o presión sobre la piel. El segundo componente es la consecuencia de una mayor sensibilidad de los mecanismos sensoriales que inervan el tejido que han sido previamente dañados. Este segundo componente es mencionado como hiperalgesia, y está involucrado en todas las formas de dolor crónico que surgen del tejido dañado, pero
10 no en la fase inmediata o temprana de percepción del dolor.

- Por lo tanto, la hiperalgesia es una condición de percepción aumentada del dolor causada por daño del tejido. Esta condición es una respuesta natural del sistema nervioso aparentemente diseñada para una protección fortalecida del tejido dañado por parte de un individuo lesionado, para dar tiempo a que ocurra la reparación del tejido. Existen dos
15 causas fundamentales conocidas de esta condición, un incremento en la actividad sensorial de la neurona, y un cambio en el procesamiento neuronal de información nociceptiva que se presenta en la médula espinal. La hiperalgesia puede ser debilitante en condiciones de inflamación crónica (por ejemplo, artritis reumatoide), y cuando ha ocurrido daño del nervio sensorial (esto es, dolor neuropático).

- 20 Los compuestos identificados por métodos de la invención, los compuestos de fórmula (I) o (II), y los compuestos del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos se cree que son efectivos en la percepción de inhibición del dolor en mamíferos que sufren de dolor neuropático e inflamatorio aún cuando se administren en dosis que se espera que produzcan concentraciones muy por debajo de aquellas que se sabe que activan a los receptores de adenosina. Con estas dosis se cree
25 que estos compuestos pueden tratar dolor neuropático e inflamatorio provocando los efectos secundarios significativos asociados con la administración de otros agonistas del receptor de adenosina, y también sin reducir la percepción sensorial normal.

- Los compuestos identificados por métodos de la invención, los compuestos de fórmula (I) o (II), de compuestos del
30 Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser utilizados como antihiperálgicos para la prevención, tratamiento, o alivio del dolor (particularmente hiperalgesia) provocado como resultado de neuropatía, dolor intestinal, dolor de espalda, dolor por cáncer, dolor por VIH, dolor de miembro fantasma, dolor postoperatorio, neuropatía diabética, polineuropatía, neuralgia post herpes, y neuralgia trigeminal.

- 35 Los compuestos identificados por métodos de la invención, los compuestos de fórmula (I) o (II), o compuestos del Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores de adenosina, a pH más bajos pueden ser utilizados como antihiperálgicos para la prevención, tratamiento, o alivio del dolor (particularmente hiperalgesia) provocado como resultado de enfermedad inflamatoria, incluido dolor intestinal,
40 dolor de espalda, dolor por cáncer, fibromialgia, dolor post operatorio, osteoartritis, y artritis reumatoide.

- Los compuestos identificados por métodos de la invención, los compuestos de fórmula (I) o (II), y compuestos del
Ejemplo 10, que tienen una afinidad más alta por los receptores de adenosina, y/o eficacia de acción con receptores
45 de adenosina, a pH más bajos se espera que tengan ventajas (tales como mayor eficacia y/o efectos secundarios reducidos) cuando se los utiliza para tratar dolor (en particular hiperalgesia) comparados con los compuestos de dos clases principales de analgésicos conocidos. Estos son: (i) drogas antiinflamatorias no esteroideas (las NSAID) y los inhibidores COX-2 relacionados; y (ii) opiáceos con base en morfina. Los analgésicos de ambas clases son efectivos en el control de dolor nociceptivo normal. Sin embargo, son menos efectivos contra algunos tipos de dolor hiperálgico, tal como el dolor neuropático. Muchos médicos son renuentes a prescribir opiáceos en las altas dosis requeridas para
50 afectar el dolor neuropático debido a los efectos secundarios provocados por la administración de estos compuestos, y la posibilidad de que los pacientes puedan hacerse adictos a ellos. Las NSAID son mucho menos potentes que los opiáceos, incluso aunque se requieran dosis altas de estos compuestos. Sin embargo, es indeseable debido a que estos compuestos provocan irritación del tracto gastrointestinal.

- 55 La cantidad de un compuesto identificada por un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, que es administrada a un individuo debe ser una cantidad que de lugar a un pico de concentración en plasma que sea menor que el valor de EC₅₀ del compuesto con los receptores de adenosina a pH 7,4.

- Se apreciará que el valor de EC₅₀ del compuesto es probablemente diferente para diferentes receptores de adeno-
60 sina (esto es, los receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃). La cantidad del compuesto que se va administrar se debe calcular con relación al valor más bajo de EC₅₀ del compuesto con los diferentes receptores.

- El pico de concentración en plasma puede ser de una milésima a un quinto, o de un quinto a un tercio (más preferiblemente una milésima o un veinteavo, una centésima o un cincuentavo a un quinto, un cincuentavo a un
65 décimo, o un décimo a un quinto) del valor de EC₅₀. Preferiblemente, el pico de concentración en plasma es de una diezmilésima a un quinto, o de una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima, del valor de EC₅₀.

Preferiblemente, la cantidad administrada da lugar a una concentración en plasma que se mantiene durante más de una hora entre una milésima y un quinto, más preferiblemente entre una milésima y un veinteavo, o una centésima y un quinto, o un cincuentavo y un quinto, del valor de EC50 del compuesto con los receptores de adenosina a pH 7,4. Más preferiblemente, la cantidad administrada da lugar a una concentración en plasma que se mantiene durante más de una hora entre una diezmilésima y un quinto, o una diezmilésima hasta un veinteavo, o una diezmilésima hasta una centésima, lo más preferible entre una diezmilésima hasta una milésima.

Para evitar cualquier tipo de duda, se define aquí el valor de EC50 de un compuesto como la concentración del compuesto que provoca una respuesta a mitad de camino entre la respuesta básica del receptor y la respuesta máxima del receptor (como la determinada, por ejemplo, utilizando una curva de dosis-respuesta).

El valor de EC50 se debe determinar bajo condiciones estándar (soluciones salinas balanceadas amortiguadas a pH 7,4). Para las determinaciones de EC50 utilizando membranas aisladas, las células y los tejidos estarían en solución salina amortiguada a pH 7,4 (por ejemplo, en medio de cultivo celular), por ejemplo como en Daly y colaboradores (Pharmacol. (1993) 46, 91-100), o preferiblemente en Tilburg y colaboradores (J. Med. Chem. (2002) 45, 91-100). El valor de EC50 se podría determinar también *in vivo* midiendo las respuestas mediadas por el receptor de adenosina en un animal sano normal, o inclusive en un tejido sometido a perfusión bajo condiciones normales (esto es, sangre oxigenada, o medio isotónico oxigenado, también amortiguado a pH 7,4) en un animal sano normal.

Alternativamente, la cantidad de un compuesto identificado por medio de un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, que es administrada puede ser una cantidad que resulta en un pico de concentración en plasma que es una milésima hasta un veinteavo, una milésima hasta un tercio, más preferiblemente una centésima hasta un quinto, o un cincuentavo hasta un décimo del valor Kd con receptores de adenosina. Más preferiblemente la cantidad es una cantidad que resulta en un piso de concentración en plasma que es de una diezmilésima a un quinto, o de una diezmilésima a un veinteavo, o de una diezmilésima hasta una centésima, lo más preferible de una diezmilésima hasta una milésima, del valor Kd con receptores de adenosina.

Se apreciará que el valor Kd de los compuestos probablemente es diferente para diferentes receptores de adenosina (esto es, los receptores de adenosina A1, A2A, A2B, A3). La cantidad del compuesto que se va administrar se puede calcular con relación al valor Kd más alto o más bajo del compuesto para los diferentes receptores.

Preferiblemente, la cantidad del compuesto que se administra es una cantidad que resulta en una concentración en plasma que se mantiene al menos durante una hora entre una milésima y un quinto, más preferiblemente entre una milésima y un veinteavo, o una centésima y un quinto, o un cincuentavo y un quinto, del valor Kd del compuesto con receptores de adenosina. Más preferiblemente la cantidad resulta en una concentración en plasma que se mantiene al menos durante una hora en una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima hasta una centésima, lo más preferible una diezmilésima hasta una milésima, del valor Kd del compuesto con receptores de adenosina.

El valor Kd del compuesto en cada receptor se debe determinar bajo condiciones estándar usando membranas plasmáticas como fuente de los receptores de adenosina derivados ya sea de los tejidos o de las células que expresan endógenamente a estos receptores o a partir de células transfectadas con vectores de ADN que codifican a los genes del receptor de adenosina. Alternativamente, se pueden utilizar las preparaciones de células enteras que utilizan células que expresan a los receptores de adenosina. Los ligandos marcados (por ejemplo, radiomarcados) selectivos para los diferentes receptores se debe utilizar en soluciones salinas amortiguadas (pH 7,4) (ver, por ejemplo, Tilburg y colaboradores, J. Med. Chem. (2002) 45, 420-429) para determinar la afinidad de enlazamiento y por lo tanto el Kd del compuesto en cada receptor.

Alternativamente, la cantidad de un compuesto identificado por un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, que es administrada puede ser una cantidad que es una milésima hasta un quinto, o un cincuentavo a un tercio (preferiblemente una milésima a un veinteavo, o una centésima o un cincuentavo a un quinto) de la dosis mínima del compuesto que da lugar a efectos secundarios de bradicardia, hipotensión o taquicardia en animales de la misma especie que el individuo al cual se le va a administrar el compuesto. Preferiblemente la cantidad es un décimo a un quinto de la dosis mínima que da lugar a los efectos secundarios. Más preferiblemente, la cantidad es una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima de la dosis mínima que da lugar a los efectos secundarios.

Preferiblemente, la cantidad administrada da lugar a una concentración en plasma que es mantenida durante más de 1 hora entre una milésima y un veinteavo, o una centésima o un cincuentavo y un quinto de la concentración mínima en plasma que da lugar a los efectos secundarios. Más preferiblemente, la cantidad administrada da lugar a una concentración en plasma que es mantenida por más de 1 hora en una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima, de la concentración mínima en plasma que da lugar a los efectos secundarios.

Alternativamente, la cantidad de un compuesto identificado por medio de un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, que es administrada puede ser una cantidad que resulta en concentraciones en plasma que

ES 2 305 741 T3

son una milésima hasta un quinto, o un cincuentavo hasta un tercio (preferiblemente una milésima hasta un veinteavo, o una centésima o un cincuentavo hasta un quinto) de la concentración mínima en plasma del compuesto que provoca efectos secundarios de bradicardia, hipotensión o taquicardia en animales de la misma especie que el individuo al cual se le va a administrar el compuesto. Preferiblemente la cantidad que da lugar a concentraciones en plasma que son un

5 décimo a un quinto de la concentración mínima en plasma que da lugar a los efectos secundarios. Más preferiblemente, la cantidad que da lugar a concentraciones en plasma que son una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima de la concentración mínima en plasma que da lugar a los efectos secundarios.

10 Preferiblemente, la cantidad administrada que da lugar a una concentración en plasma que es mantenida durante más de 1 hora entre una milésima y un veinteavo, o una centésima o un cincuentavo y un quinto, de la concentración mínima en plasma que provoca los efectos secundarios. Más preferiblemente, la cantidad que da lugar a una concentración en plasma que es mantenida durante más de una hora en una diezmilésima a un quinto, o una diezmilésima a un

15 veinteavo, o una diezmilésima a una centésima, lo más preferible una diezmilésima a una milésima de la concentración mínima en plasma que da lugar a los efectos secundarios.

La dosis apropiada de un compuesto identificado utilizando un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, variará con la edad, el sexo, el peso, y la condición del paciente, la potencia del compuesto, y la vía de administración, etc. La dosis apropiada puede ser determinada fácilmente por alguien capacitado en el

20 arte.

Se espera que la cantidad de un compuesto identificado utilizando un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, que se administra debe ser de 0,001 a 15 mg/kg, o de 0,01 a 15 mg/kg, por ejemplo de 0,01 a 5 o a 10 mg/kg, o de 0,001 a 0,01 mg/kg. La cantidad puede ser menor a 6 mg/kg, preferiblemente al menos de 0,001, o

25 de 0,01 o de 0,05 mg/kg, por ejemplo de 0,01 a 2 mg/kg. La cantidad puede ser al menos de 0,1 mg/kg, por ejemplo de 0,1 a 1 ó 2 mg/kg, o de 0,2 a 1 mg/kg. Una cantidad típica es de 0,2 o de 0,6 a 1,2 mg/kg.

Una unidad de dosificación de un compuesto identificado por medio de un método de la invención, o de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, contiene típicamente hasta 500 mg (por ejemplo de 1 a 500 mg, preferiblemente de 5 a

30 500 mg) del agente activo. Preferiblemente, el agente activo está en la forma de una composición farmacéutica que contiene al agente activo y un portador, excipiente, o diluyente fisiológicamente aceptable. La dosis preferida es de 0,1 a 2, por ejemplo de 0,5 a 1, típicamente aproximadamente 0,6, mg del agente activo por kg del individuo (humano). A estos niveles, el tratamiento efectivo se puede lograr sustancialmente sin una caída concomitante (por ejemplo, no superior al 10%) en la presión sanguínea.

Las dosis preferidas para un individuo humano de 70 kg son menores a 420 mg, preferiblemente al menos de 0,7 mg, más preferiblemente al menos de 3,5 mg, lo más preferiblemente al menos de 7 mg. Más preferiblemente de 7 a 70 mg, o de 14 a 70 mg.

Las cantidades de las dosis especificadas anteriormente son significativamente menores (aproximadamente hasta 1000 veces menores) de lo que se esperaría que se requiriera (con base en el valor de EC50 de espongina en el receptor A2A de adenosina) para los compuestos que tienen cualquier efecto terapéutico benéfico.

Los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención, o los compuestos de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, se pueden administrar con o sin otros agentes terapéuticos, por ejemplo antiinflamatorios (esteroides, los NSAID, metotrexato), analgésicos (tales como opiáceos, los NSAID, cannabinoides, moduladores de taquicardina, o

45 moduladores de bradiquinina) o antihiperalgésicos (tales como gabapentina, pregabalina, cannabinoides, moduladores del canal de sodio o de calcio, antiepilépticos, o antidepresivos).

En general, un compuesto identificado por medio de un método de la invención o un compuesto de fórmula (I) o (II), o del Ejemplo 10, se pueden administrar por medios conocidos, en cualquier formulación adecuada, por medio de cualquier vía adecuada. Un compuesto se administra preferiblemente en forma oral, parenteral, sublingual, transdérmica, intratecal, o a través de la mucosa. Otras vías adecuadas incluyen una vía intravenosa, subcutánea, inhalada, y

50 tópica. La cantidad de droga administrada será típicamente superior cuando se administra en forma oral, que cuando se administra, digamos, en forma intravenosa.

Las composiciones adecuadas, por ejemplo para administración oral, incluyen formas de dosificación unitaria sólidas, y aquellas que contienen líquido, por ejemplo, para inyección, tal como tabletas, cápsulas, viales y ampollitas, en los cuales el agente activo se formula, por medio de métodos conocidos, con un excipiente, diluyente o portador fisiológicamente aceptable. Los diluyentes y portadores adecuados son conocidos, e incluyen, por ejemplo, lactosa y

60 talco, junto con agentes apropiados de enlazamiento, etc.

Una frecuencia preferida de administración de compuestos se espera que sea de dos o tres veces por día.

Los compuestos pueden servir también como una base para identificar más drogas efectivas, o drogas que tienen efectos secundarios reducidos adicionales.

ES 2 305 741 T3

Se describen ahora las modalidades de la invención, por medio de ejemplos únicamente, con referencia a los dibujos acompañantes en los cuales:

La Figura 1 muestra el incremento en afinidad de la 2-metoxiadenosina para el receptor A2A de adenosina a pH 5,5 comparado con un pH 7,4;

La Figura 2 muestra que la afinidad de la 2-metoxiadenosina (pero no de CGS21680) para el receptor A2A de adenosina se incrementa en la medida en que se reduce el pH (desde 7,4 hasta 7,0 a 6,8);

La Figura 3 muestra el incremento en eficacia de la 2-metoxiadenosina, pero no de CGS21680, para el receptor A2A de adenosina a pH 7,0 comparado con pH 7,4;

La Figura 4 muestra que la 2-metoxiadenosina inhibe el efecto hiperalgésico de la inflamación inducida por carragenina;

La Figura 5 muestra que la 2-metoxiadenosina (0,624 mg/kg p.o.) no tiene efecto significativo sobre la presión sanguínea o el ritmo cardíaco;

La Figura 6 muestra la acción antihiperalgésica de la 2-metoxiadenosina en el modelo de lesión crónica de constricción del dolor neuropático;

La Figura 7 muestra que la 2-metoxiadenosina (62,4 y 624 μ g/kg intraperitoneal) inhibe la inflamación inducida por carragenina (CGN) con eficacia comparable a la indometacina (3 mg/kg, p.o.), en concentraciones que no afectan la presión sanguínea; y

La Figura 8 muestra el cambio en la concentración en plasma con el tiempo después de la administración de la 2-metoxiadenosina (0,6 mg/kg) a una rata.

Ejemplo 1

La afinidad de la 2-metoxiadenosina por el receptor A2A de adenosina se incrementa en la medida en que se reduce el pH

Se incubaron membranas estriatales de rata durante 90 minutos a 22°C en presencia de [3H]-CGS21680 2 nM, 1 Unidad/ml de adenosina desaminasa y concentraciones crecientes de la 2-metoxiadenosina, antes de filtración y recuento de centelleo líquido. Se ajustaron los datos en curvas de enlazamiento en uno y dos sitios (ver Figura 1):

- representa la cantidad total de enlazamiento específico como un porcentaje;
- representa la proporción de los sitios en el estado de alta afinidad;
- representa el K_i del estado de alta afinidad (N.B. a pH 7,4, la pendiente de Hill (nH) fue cercana a la unidad y el algoritmo de ajuste de la curva para un ajuste en dos sitios fue incapaz de definir las propiedades de acuerdo con la realidad para un estado de alta afinidad); y
- representa el K_i del estado de baja afinidad.

Ejemplo 2

Comparación de la afinidad de la 2-metoxiadenosina y CGS21680 para el receptor A2A de adenosina a diferente pH

El desplazamiento del enlazamiento de [3H]-CGS21680 se llevó a cabo como se describe para el Ejemplo 1. Los resultados, mostrados en la Figura 2, demuestran que la afinidad de la 2-metoxiadenosina (pero no de CGS21680) para el receptor A2A de adenosina de rata se incrementa mientras el pH se reduce (desde 7,4 hasta 7,0 a 6,8).

Ejemplo 3

La eficacia de la 2-metoxiadenosina, pero no de CGS21680, para el receptor A2A de adenosina se incrementa a pH 7,0 comparada con un pH 7,4

El receptor A2A humano se expresó en células HEK293, y la habilidad de los agonistas para estimular la acumulación de cAMP evaluada en presencia de Rolipram para inhibir enzimas fosfodiesterasa. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 4

La 2-metoxiadenosina inhibe el efecto hiperalgésico de la inflamación inducida por carragenina

- 5 La Figura 4 muestra que la 2-metoxiadenosina inhibe el efecto hiperalgésico de la inflamación inducida por carragenina: A. La 2-metoxiadenosina (0,6 mg/kg) inhibe la hiperalgesia térmica inducida por carragenina (CGN) (CITH) con eficacia comparable a la indometacina (3 mg/kg, po). B. Relación concentración-respuesta para la 2-metoxiadenosina 3 horas después de la dosificación.
- 10 Se administró la carragenina (2%, 10 microlitros) dentro de la pata posterior derecha. Se colocó una fuente de calor cerca de las patas posteriores, la tratada y la no tratada, y se muestra la diferencia en las latencias de retiro de la pata. Se administró la 2-metoxiadenosina al mismo tiempo que la carragenina. La 2-metoxiadenosina fue tan efectiva como la indometacina (Indo, 3 mg/kg p.o.).

Ejemplo 5

La 2-metoxiadenosina (a 0,624 mg/kg p.o.) no tiene efecto significativo sobre la presión sanguínea o el ritmo cardíaco

- 20 Se colocó un dispositivo de radiotelemedría implantable en la cavidad abdominal de 6 ratas por grupo. Se insertó el catéter de presión del dispositivo en la aorta abdominal y dos electrodos bajo la piel en una posición de sondeo II (lado izquierdo de la cavidad abdominal/hombro derecho). Se colocaron cada una de las ratas en sus propias jaulas sobre un radioreceptor (DSI) para la adquisición de datos. Se evaluó entonces el efecto de 0,6 mg/kg de la 2-metoxiadenosina o del vehículo (p.o.) sobre la presión sanguínea. Los resultados se muestran en la Figura 5: A: presión sanguínea; B: ritmo cardíaco.

Ejemplo 6

- 30 *La acción antihiperalgésica de la 2-metoxiadenosina en el modelo de lesión crónica de constricción de dolor neuropático*

La 2-metoxiadenosina (0,624 mg/kg p.o.) inhibe la hiperalgesia térmica causada por lesión crónica de constricción del nervio ciático de la rata. Bajo anestesia, se expuso el nervio ciático de la pata derecha, y se hicieron cuatro ligaduras sueltas alrededor del haz nervioso. Aproximadamente después de dos semanas las ratas desarrollaron hiperalgesia térmica en la pata operada como se juzgó por la diferencia en latencias de retiro de la pata, de las patas derecha e izquierda. La administración de la 2-metoxiadenosina redujo la hiperalgesia como se observa por la reducción en la diferencia entre las latencias de retiro. La 2-metoxiadenosina fue tanto, o más efectiva que la carbamazepina (CBZ, 100 mg/kg en forma subcutánea). Los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 7

- 45 *2-metoxiadenosina (62,4 y 624 µg/kg en forma intraperitoneal) inhibe la inflamación inducida por la carragenina (CGN) con eficacia comparable a la indometacina (3 mg/kg. po), en concentraciones que no afectan la presión sanguínea*

Se administró la carragenina (2%, 10 microlitros) dentro de la pata posterior derecha, y se evaluó el volumen de la pata por medio de pletisomometría. Se administró la 2-metoxiadenosina al mismo tiempo que la carragenina. Los resultados se muestran en la Figura 7. La 2-metoxiadenosina fue tan efectiva como la indometacina (Indo, 3 mg/kg p.o.).

Ejemplo 8

- 55 *El cambio de la concentración en plasma con el transcurso del tiempo después de la administración de la 2-metoxiadenosina (0,6 mg/kg) a una rata*

El valor de EC50 de la 2-metoxiadenosina con receptores de adenosina (medido a pH 7,4) es de 900 ng/ml (3 µM). Se puede observar a partir de la Figura 8 que la concentración en plasma permanece por encima del 2% del valor de EC50 durante más de 3 horas. Se han observado efectos antiinflamatorios y antihiperalgésicos (sin cambios en la presión sanguínea) cuando la concentración pico en plasma está entre 1% y 30% del valor de EC50 determinado *in vitro*. Si la concentración pico en plasma alcanza el valor de EC50 se presentan profundas reducciones en la presión sanguínea que duran cuatro horas.

ES 2 305 741 T3

Ejemplo 9

La mayor afinidad de los agonistas del receptor de adenosina a pH más bajo se asoció con un incremento correspondiente en el cambio de GTP, sugiriendo que esos agonistas fueron también más eficaces al pH más bajo. Estos resultados se resumen más abajo.

TABLA 1

*Desplazamiento de 3H-CGS21680 del receptor estriatal A2A de rata
(los valores son de K_i en nM)*

	pH 7,4	pH 5,5
CGS21680	$10,5 \pm 2,1$	$2,8 \pm 1,0$
NECA	$3,5 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,2$
CV1808	170 ± 20	35 ± 9
R-PIA	172 ± 21	$21 \pm 1,4$
S-PIA	1712 ± 423	$271 \pm 4,9$
NECA: 5' N-etilcarboxamidoadenosina; CV1808: 2-fenilamino-adenosina; PIA: fenilisopropiladenosina.		

Todo lo anterior reveló únicamente un estado de afinidad para agonistas, sugiriendo que los estados de alta y baja afinidad son similares en afinidad. Sin embargo, la 2-metoxiadenosina y la 2-etoxiadenosina revelaron dos estados de afinidad aparente con el pH más bajo (Tabla 2). Los estados de alta afinidad correspondieron aproximadamente al 25% del número total de sitios de enlazamiento, y fueron abolidos por la presencia de GTP, sugiriendo que ellos corresponden al estado de enlazamiento del agonista de alta afinidad.

TABLA 2

*Desplazamiento de 3H-CGS21680 del receptor estriatal A2A de rata
(los valores son de K_i en nM)*

2-metoxiadenosina	
pH 7,4: Alta Afinidad no detectable	Baja afinidad 2500 ± 200
pH 5,5: Alta Afinidad $12,1 \pm 2,7$	Baja afinidad 1200 ± 100
2-etoxiadenosina	
pH 7,4: Alta Afinidad 245 ± 76	Baja afinidad 6600 ± 2200
pH 5,5: Alta Afinidad $2,8 \pm 1,2$	Baja afinidad 1200 ± 120

Además se descubrieron compuestos que mostraron afinidad más alta por el receptor A1 de rata a pH más bajo (Tabla 3).

TABLA 3

Desplazamiento de 3H-DPCPX del receptor A1 de la corteza de rata (K_i nM)

2-cloroadenosina	
pH 7,4: Alta Afinidad $4,4 \pm 1,8$	Baja afinidad 1670 ± 346
pH 6,2: Alta Afinidad $3,7 \pm 0,5$	Baja afinidad 1660 ± 40
3'-desoxi-2-cloroadenosina	

ES 2 305 741 T3

TABLA 3 (continuación)

pH 7,4: Alta Afinidad 227 ± 74

Baja afinidad 11.500 ± 850

pH 6,2: Alta Afinidad 17 ± 46

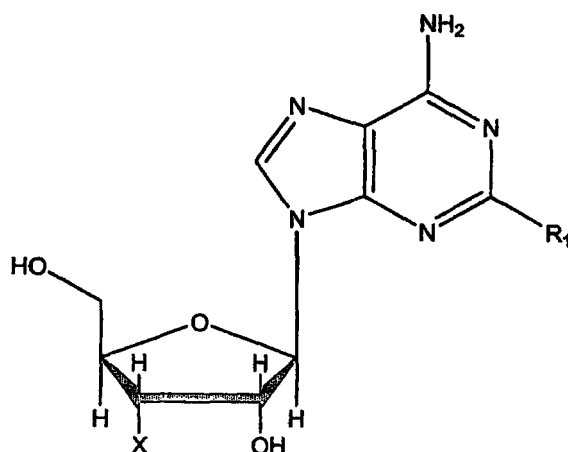
Baja afinidad 13.400 ± 2400

A ambos valores de pH, el análogo estable de GTP (GppNHp) abolió el estado de alta afinidad reconocido por 3'-desoxi-2-cloroadenosina.

Ejemplo 10

Compuestos que se encontró que tienen afinidad más alta por los receptores A2A de adenosina a pH más bajo

Los compuestos enlistados más abajo se encontró que tienen afinidad más alta por los receptores A2A de adenosina a pH 5,5 que a pH 7,4. El ensayo de enlazamiento del receptor A2A se llevó a cabo utilizando [3H]-CGS21680 y se analizó como se describe para el Ejemplo 1. Se indican los valores de Ki de los sitios de enlazamiento de alta y baja afinidad detectados a pH 5,5, y el Ki del sitio detectado a pH 7,4.



Estructura R ₁	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
OCH ₃	1,5	380	1300
OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	11	560	280
O CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3	170	1500
OPh	71	1200	2500
O-(4-ciano)Ph	4	380	1300
O-(3-Ph)Ph	0,7	135	620
5-indaniloxi	12	175	760
O-(3-CH(CH ₃) ₂)Ph	16	240	560
NH(CH ₃)	24	2240	1356
NHCH ₂ CH ₃	130	3500	1200
N(CH ₃) ₂	24	21440	13350
NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	0,7	20	290
NHPh	5	2028	160
NH-(4-MeO)Ph	3	180	55
NH-(4-F)Ph	10	150	200

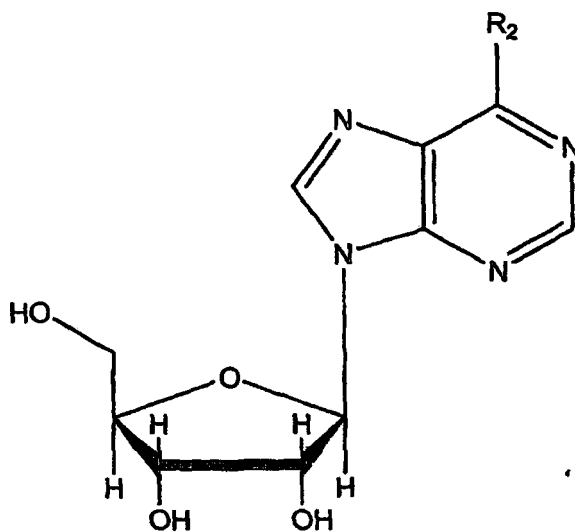
ES 2 305 741 T3

(Continuación)

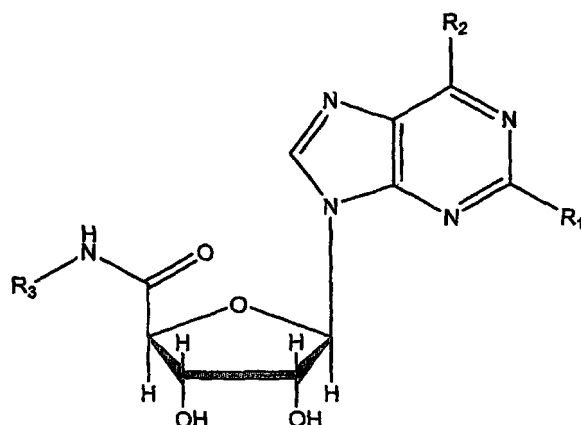
Estructura R ₁	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
NH-ciclopentilo	2	60	420
NH-ciclohexilo	0,4	100	1000
N-CH ₃ , N-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	26	2600	4000
OCH ₂ -ciclopentilo	0,2	54	200
SO ₂ CH ₂ CH ₃	100	5250	39000
OCH ₂ CH ₂ OH	4	164	203
CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	15	630	800

X = H

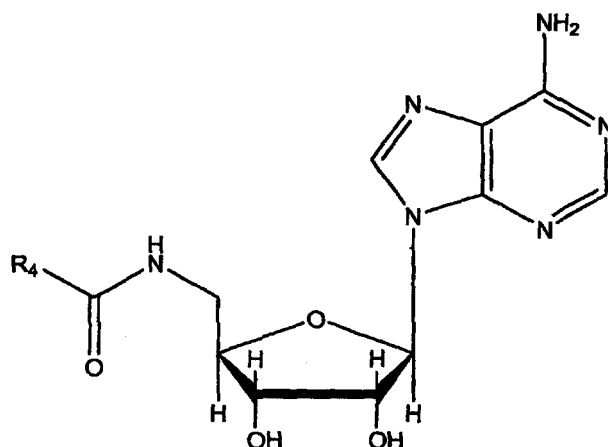
Estructura R ₁	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
O CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	13	440	2990



Estructura R ₂	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
N(CH ₃) ₂	42	9400	450000
NHCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	1.5	380	8600
N-CH ₃ , N-CH ₂ Ph	7	2100	18500
Piperazinilo	38	7000	5000
N-Me, N-(CH ₂ CH ₂ OCH ₃)	13	6470	13000



R ₁	R ₂	R ₃	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
H	NH ₂	CH(CH ₃) ₂	5	190	1930
H	NH ₂	H	9	180	270
H	NHCH ₃	CH(CH ₃) ₂	188	3420	2440
OCH ₃	NH ₂	Ph	230	53400	26100



Estructura R ₄	pH 5,5 (Ki 1) nM	pH 5,5 (Ki 2) nM	pH 7,4 (Ki 2) nM
CH ₂ CH ₂ CH ₃	145	53550	16900
NHCH ₂ CH ₃	40	5900	6570

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5877180 A [0006]
- WO 9638728 A [0011]
- WO 9934804 A [0006]
- GB 0305379 W [0056]
- FR 2162128 [0008]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **JAYARAMAN**, S. y colaboradores, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001, vol. 281, C1504-1511 [0002]
- 5 • **ANDERSSON**, S. E. y colaboradores, *J. Rheumatol.*, 1999, vol. 26, 2018-2024 [0003]
- **KONTTINEN**, Y. T. y colaboradores, *Arth. Rheum.*, 2002, vol. 46, 953-960 [0003]
- **CHESLER**, M. *Prog. Neurobiol.*, 1990, vol. 34, 401-427 [0003]
- 10 • **THISTLETHWAITE**, A. J. y colaboradores, *Radiation Oncology Biol. Phys.*, 1985, vol. 11, 1647-1652 [0003]
- **IMINKE**, D. C.; **MCCLESKEY**, E. W. *Nature Neurosci.*, 2001, vol. 4, 869-870 [0003]
- 15 • **BELARDINELLI**, L; **ISENBERG**, G. *Am. J. Physiol.*, vol. 224, H734-H737 [0005]
- **KNABB** y colaboradores, *Circ. Res.*, 1983, vol. 53, 33-41 [0005]
- **KLITGAARD** y colaboradores, *Eur J. Pharmacol.*, 1993, vol. 242, 221-228 [0005]
- 20 • **SAWYNOK**. *Eur J Pharmacol.*, 1998, vol. 347, 1-11 [0006]
- **BARTLETT** y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 1981, vol. 24, 947-954 [0009]
- 25 • **KIRK; RICHARDSON**. *British Journal of Pharmacology*, 1995, vol. 114, 537-543 [0010]
- **JIANG** y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 1997, vol. 40, 2588-2595 [0012]
- **RIBEIRO** y colaboradores, *Progress in Neurobiology*, 2003, vol. 68, 377-392 [0013]
- 30 • **ASKALAN; RICHARDSON**. *J. Neurochem.*, 1994, vol. 63, 1477-1484 [0015]
- **HILEY** y colaboradores, *British Journal of Pharmacology*, 1995, vol. 1 (16), 2641-2646 [0016]
- 35 • **DALY**, J. W. y colaboradores, *Pharmacol.*, 1993, vol. 46, 91-100 [0056]
- **DALY** y colaboradores, *Pharmacol.*, 1993, vol. 46, 91-100 [0069]
- **TILBURG** y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, 91-100 [0069]
- 40 • **TILBURG** y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, 420-429 [0073]

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente terapéutico potencial, que comprende determinar la afinidad de un compuesto de prueba por un receptor de adenosina con un pH más alto de al menos 7,4, y también un pH más bajo desde 5,5 hasta 7,2, o desde 5,0 hasta 7,0, e identificar el compuesto como dicho agente si la afinidad al pH más bajo es más de 10 veces superior que la afinidad al pH más alto.

2. Un método de acuerdo a la reivindicación 1 en donde determinar la afinidad del compuesto de prueba incluye medir el enlazamiento de concentraciones diferentes de un compuesto de prueba marcado al receptor.

3. Un método de acuerdo a la reivindicación 1 en donde determinar la afinidad del compuesto de prueba incluye medir el desplazamiento de un compuesto enlazado marcado del receptor de adenosina con el compuesto de prueba no marcado.

4. Un método de acuerdo a cualquier reivindicación precedente en donde el receptor de adenosina está en un tejido, una rodaja de tejido, una célula intacta, una célula rota, o una membrana derivada de la célula.

5. Un método para identificar un agente terapéutico potencial, que comprende la determinación de la eficacia de la acción de un compuesto de prueba con un receptor de adenosina a un pH más alto de al menos 7,4, y también a un pH más bajo de 5,5 a 7,2, o de 5,0 a 7,0, e identificar el compuesto como dicho agente si la afinidad al pH más bajo es más de 10 veces superior que la afinidad al pH más alto.

6. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la determinación de la eficacia del compuesto de prueba incluye poner en contacto al compuesto de prueba con un tejido, rebanada de tejido, célula intacta o célula parcialmente rota que contiene al receptor de adenosina, y determinar la acción del receptor de adenosina midiendo la acumulación o el agotamiento de una molécula de señalización en el tejido, rebanada de tejido, célula intacta o célula parcialmente rota.

7. Un método de acuerdo a la reivindicación 6 en donde la molécula de señalización es cAMP, IP3 o calcio libre.

8. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la determinación de la eficacia del compuesto de prueba incluye poner en contacto al compuesto de prueba con una membrana biológica que contiene al receptor de adenosina, y determinar la acción del receptor de adenosina midiendo: la activación de una proteína G; la actividad de una enzima; o el flujo iónico a través de un canal de iones asociado con la membrana biológica.

9. Un método de acuerdo a la reivindicación 8, en donde la activación de la proteína G se mide por medio del uso de un nucleótido de guanina radiomarcado, o en donde la actividad de la enzima medida es actividad de adenilil ciclasa, fosfodiesterasa, fosfolipasa o proteína quinasa, o en donde el canal iónico a través del cual se mide el flujo de iones es un canal de calcio o un canal de potasio.

10. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la determinación de la eficacia del compuesto de prueba incluye poner en contacto al compuesto de prueba con un tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula que contiene al receptor de adenosina, y determinar la acción del receptor de adenosina midiendo la actividad de la proteína quinasa en el tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula.

11. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la determinación de la eficacia del compuesto de prueba incluye poner en contacto al compuesto de prueba con un tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula que contiene al receptor de adenosina, y determinar la acción del receptor de adenosina midiendo la actividad de la fosfolipasa (por ejemplo, fosfolipasa C, fosfolipasa A2, fosfolipasa D) en el tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula.

12. Un método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la determinación de la eficacia del compuesto de prueba incluye poner en contacto al compuesto de prueba con un tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula que contiene al receptor de adenosina, y determinar la acción del receptor de adenosina midiendo la fosforilación de la proteína y/o la desfosforilación en el tejido, rebanada de tejido, célula intacta, célula rota o membrana derivada de célula.

13. Un método de acuerdo a cualquier reivindicación precedente, en donde el pH menor es de 5,5 a 6,5.

14. Un método de acuerdo a cualquier reivindicación precedente, en donde el pH menor es de 5,5 a 6,2.

15. Un método de acuerdo a cualquier reivindicación precedente, en donde el receptor de adenosina es un receptor A2A de adenosina, un receptor A1 de adenosina, o un receptor A3 de adenosina.

16. Un método de acuerdo a cualquier reivindicación precedente que comprende además determinar si el agente identificado tiene un efecto terapéutico.

ES 2 305 741 T3

17. Un método de acuerdo a la reivindicación 16 en el cual se utiliza un modelo animal no humano para determinar si el agente identificado tiene un efecto terapéutico.

18. Un método de acuerdo a la reivindicación 16 ó 17, en donde se determina si el agente identificado tiene un efecto terapéutico contra dolor o inflamación.

19. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde se determina si el agente identificado tiene un efecto terapéutico contra cáncer, lesión por isquemia-reperfusión, actividad neuronal excesiva (por ejemplo en epilepsia, o dolor crónico o hiperalgesia, incluido dolor inflamatorio y neuropático), sepsis, choque séptico, neurodegeneración (incluida la Enfermedad de Alzheimer), fatiga muscular o calambre muscular.

20. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde se determina si el agente identificado tiene un efecto terapéutico contra artritis, asma, psoriasis, inflamación intestinal, artritis reumatoide, síndrome de intestino irritable u osteoartritis.

21. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde se determina si el agente identificado tiene un efecto terapéutico contra hiperalgesia causada como resultado de neuropatía, incluido dolor intestinal, dolor de espalda, dolor por cáncer, dolor por VIH, dolor de miembro fantasma, dolor postoperatorio, neuropatía diabética, polineuropatía, neuralgia post herpes, o neuralgia trigeminal.

22. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde se determina si el agente identificado tiene un efecto terapéutico contra hiperalgesia causada como resultado de enfermedad inflamatoria, incluido dolor intestinal, dolor de espalda, dolor por cáncer, fibromialgia, dolor postoperatorio, osteoartritis, o artritis reumatoide.

23. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 en el cual el efecto terapéutico del agente identificado se determina con una concentración por debajo del valor de ED50, preferiblemente un diezmilésimo a un quinto del valor de ED50, del agente con el receptor de adenosina a pH 7,4.

24. Un método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23 en el cual se determinan los efectos secundarios causados por el agente identificado.

25. Un método de acuerdo a la reivindicación 24 en el cual los efectos secundarios se determinan con una concentración con una concentración por debajo del valor de EC50, preferiblemente un diezmilésimo a un quinto del valor de ED50, del agente con el receptor de adenosina a pH 7,4.

26. Un método de acuerdo a la reivindicación 24 ó 25 en el cual los efectos secundarios son efectos secundarios de bradicardia, hipotensión o taquicardia.

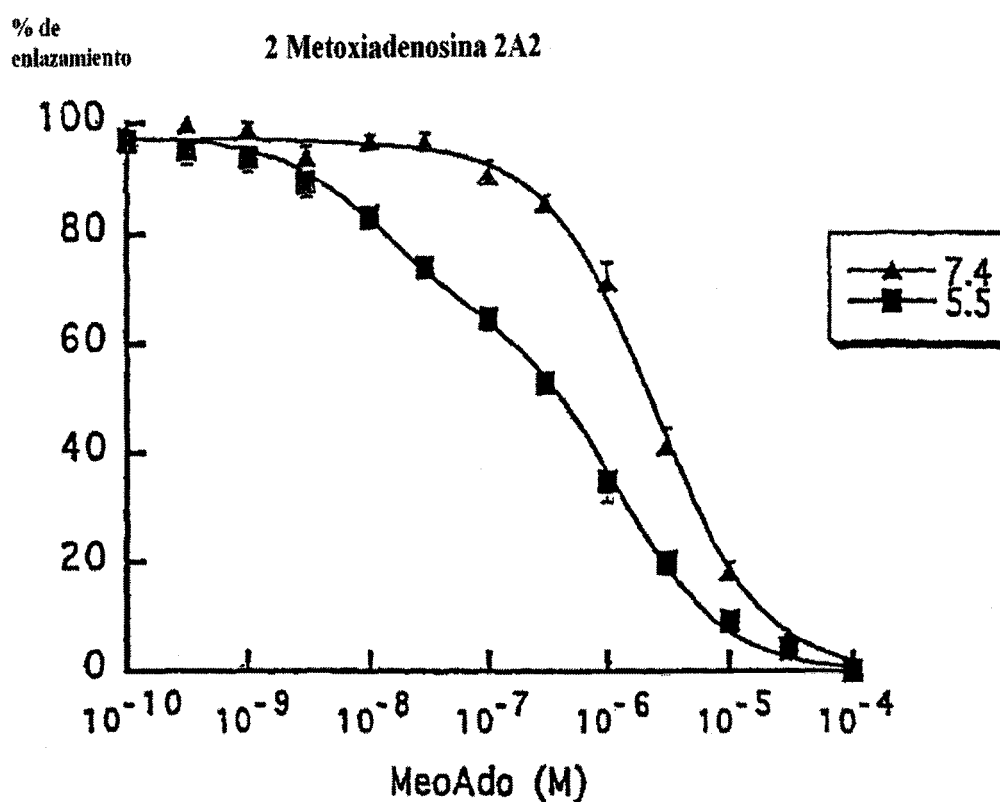
27. Un método para identificar un agente terapéutico potencial que comprende poner en contacto a un compuesto de prueba con un receptor de adenosina en un tejido patológico, célula, o membrana y un tejido normal correspondiente, célula, o membrana con una concentración por debajo del valor de EC50 del compuesto de prueba con el receptor de adenosina a pH 7,4, y determinar si existe alguna diferencia en acción del receptor de adenosina en respuesta al contacto con el compuesto de prueba entre el tejido normal y el tejido patológico.

28. Un método de acuerdo a la reivindicación 27, en donde el compuesto de prueba se identifica como un agente terapéutico potencial si el compuesto de prueba es un agonista del receptor de adenosina, y la acción del receptor de adenosina en respuesta al compuesto de prueba es superior en el tejido patológico que en el tejido normal.

29. Un método de acuerdo a la reivindicación 27 ó 28, en donde el tejido patológico contiene tejido epitelial.

30. Un método de acuerdo a la reivindicación 29 para la identificación de un agente terapéutico para tratar psoriasis, asma, o COPD.

Figura 1



7.4		nH = 0.98
	Valor	Error
a	97.341	1.2299
b	0.010921	0.019883
c	1.7634e-09	1.5018e-08
d	2.3928e-06	1.9792e-07
Chisq	68.506	NA
R	0.99823	NA

5.5		nH = 0.49
	Valor	Error
a	97.402	0.6432
b	0.32887	0.023195
c	1.2105e-08	2.7649e-09
d	1.2248e-06	1.2605e-07
Chisq	26.441	NA
R	0.99937	NA

Figura 2

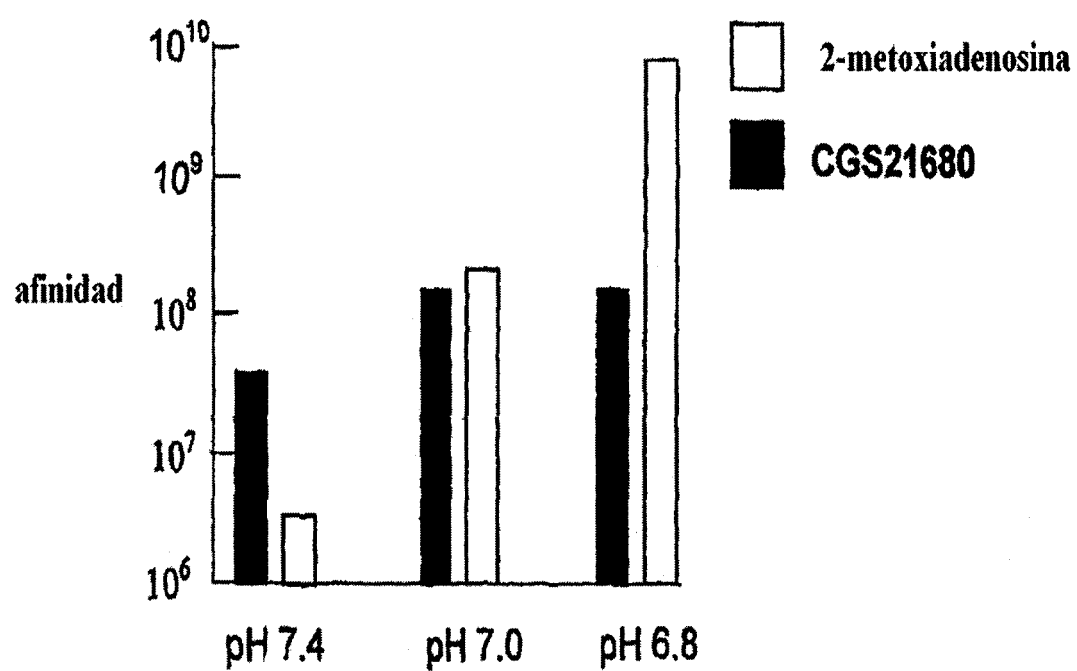
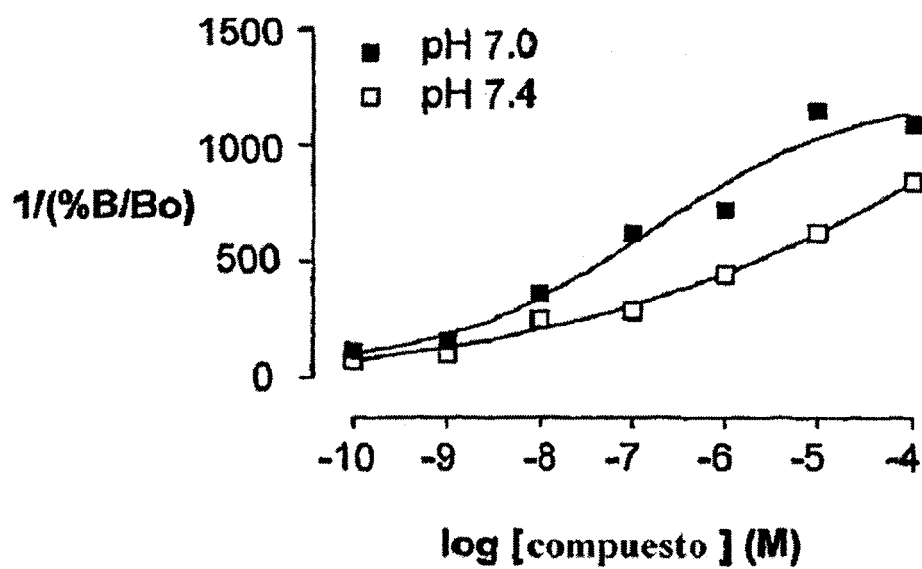


Figura 3



CGS21680

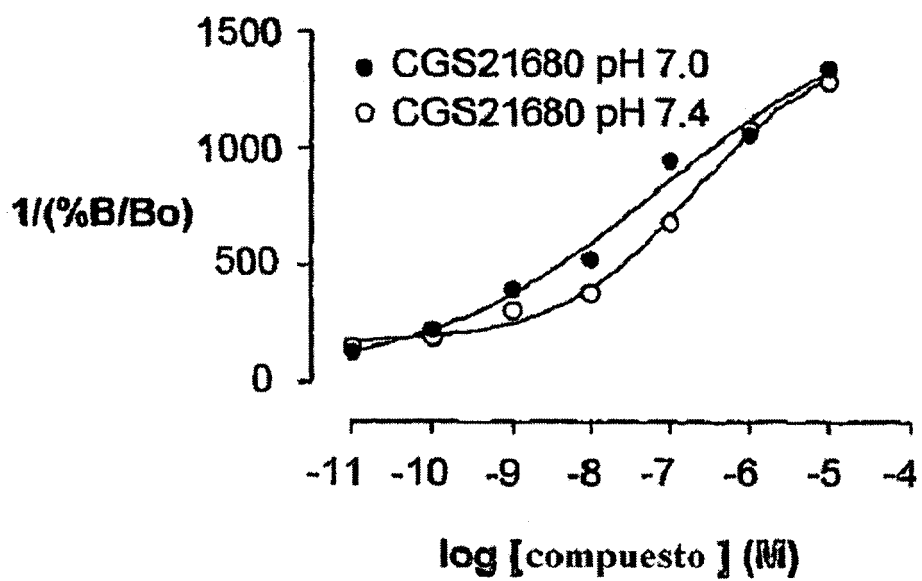
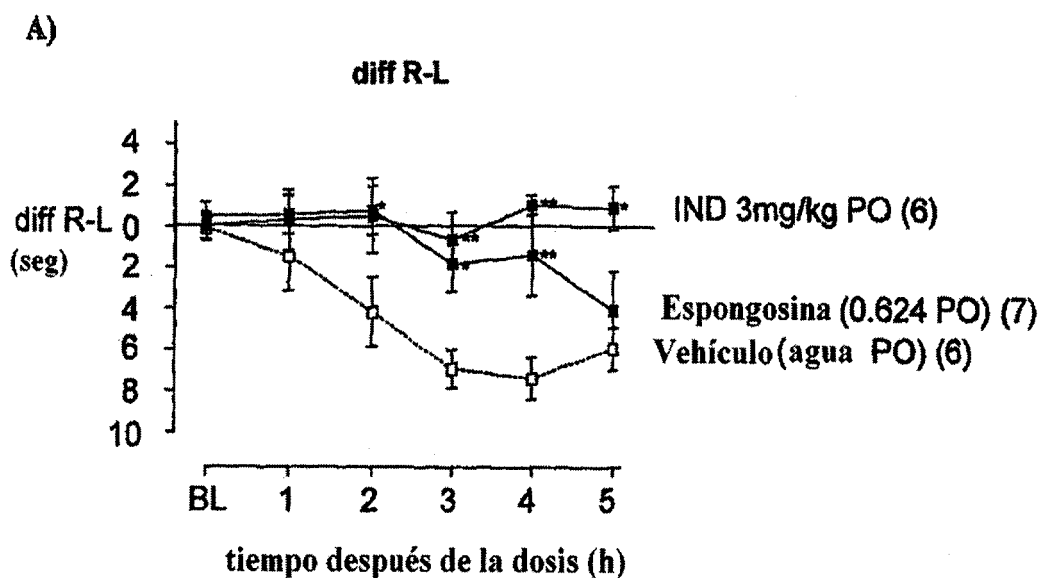


Figura 4



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus vehículo (de Sidak)

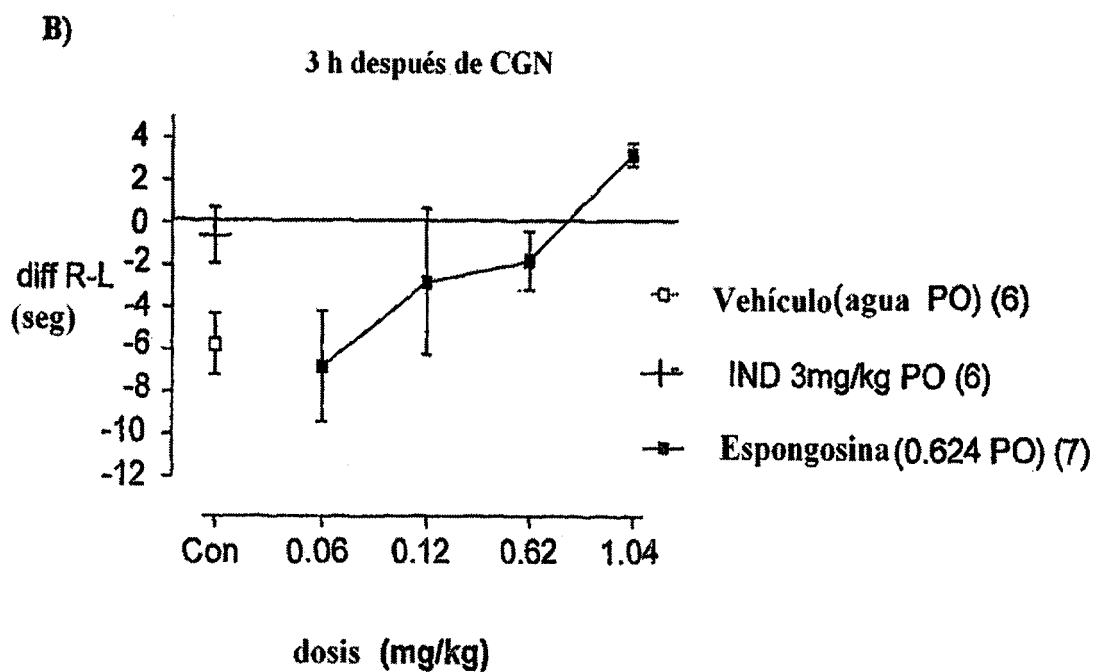
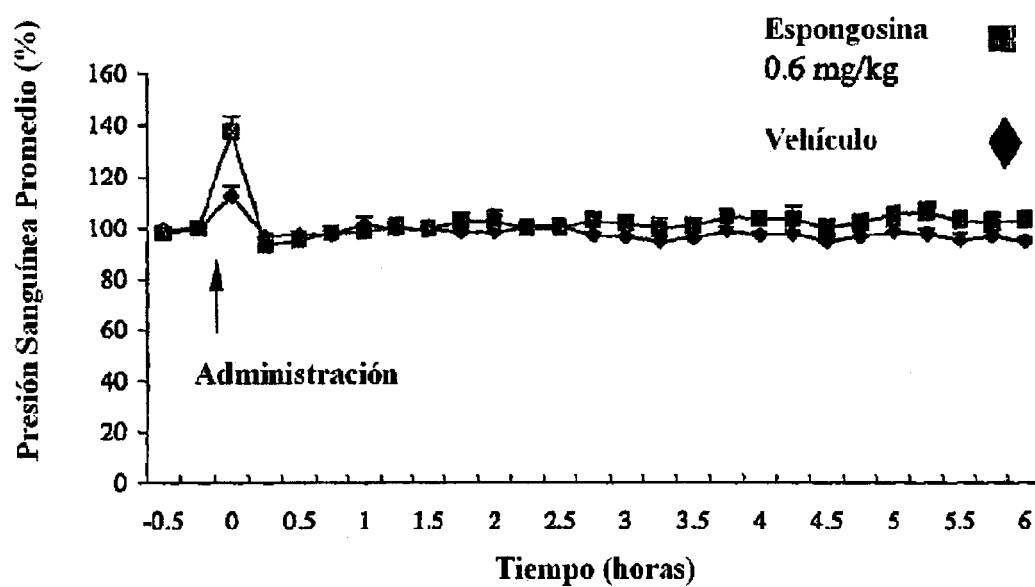


Figura 5

A)



B)

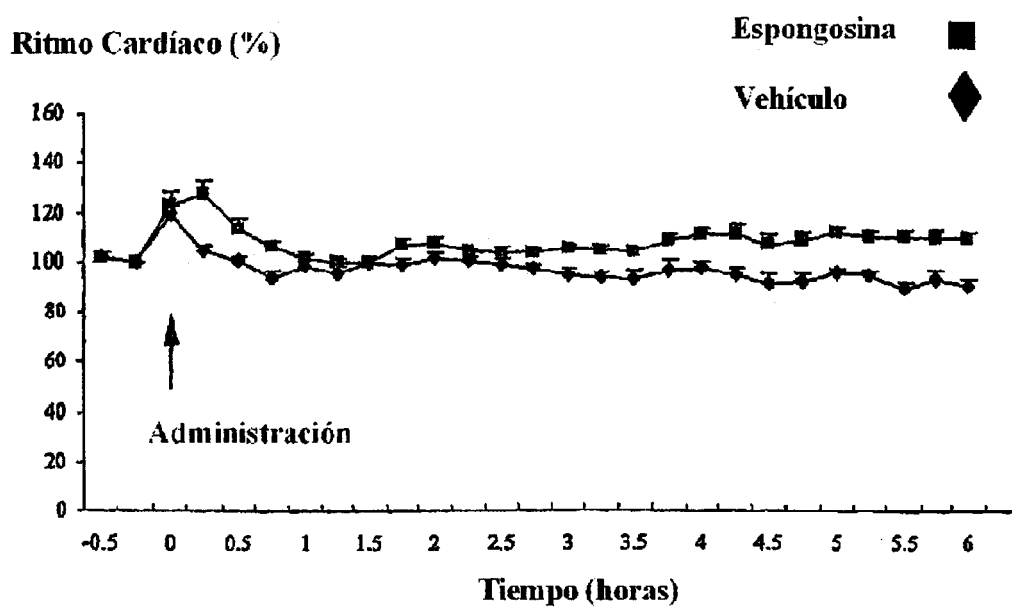
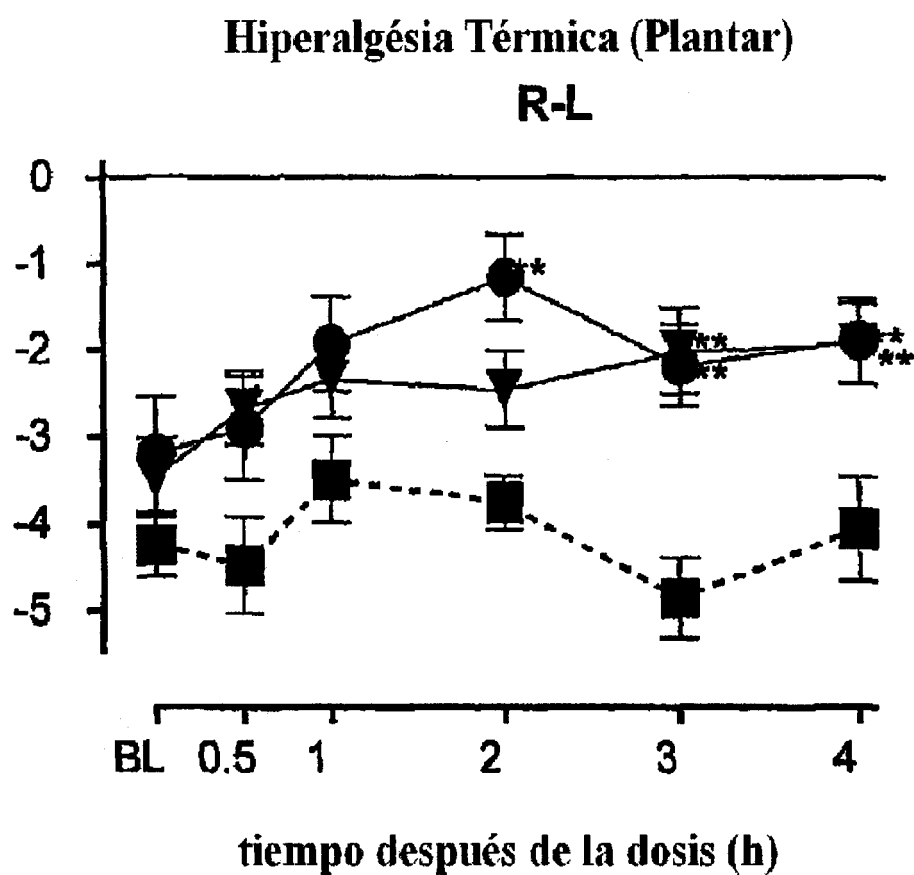


Figura 6

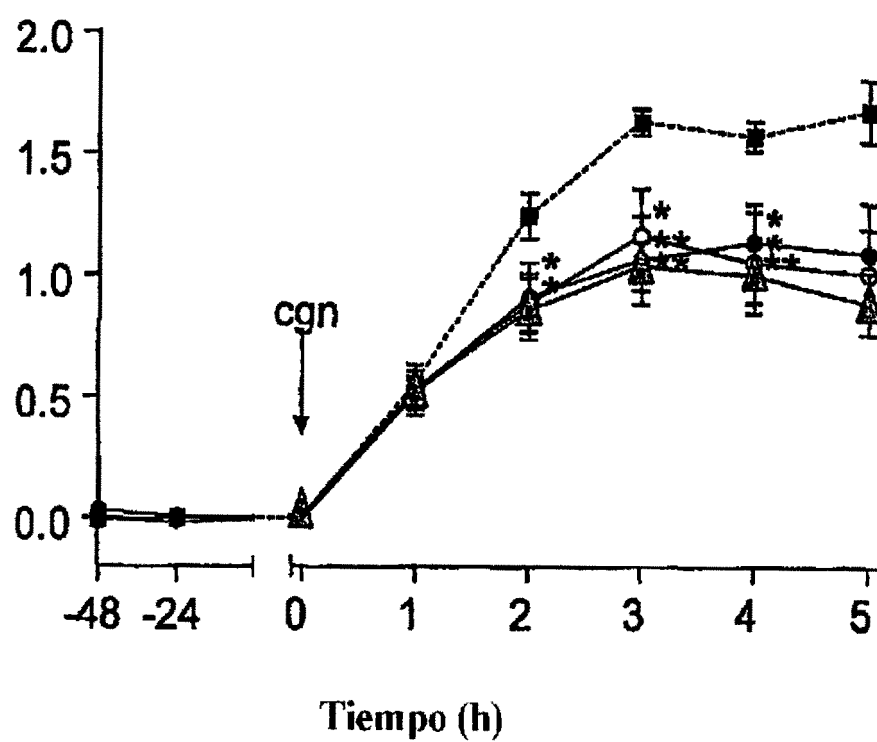


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs veh (ANOVA de Sidak)

● 2-metoxiadenosina (0.624 mg/kg PO)
▼ CBZ (100mg/kg SC)

Figura 7

**Incremento en el
volumen de la pata (ml)**



- solución**
- salina (0.9%, ip)
 - ▲— Indometacina (3mg/kg po)
 - 2MeAd (62.4 µg/kg ip)
 - 2MeAd (624 µg/kg ip)

Figura 8

