



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 631**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/517** (2006.01)

**A61K 31/485** (2006.01)

**A61P 25/04** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02734980 .2**

96 Fecha de presentación : **20.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1387685**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2004**

54

Título: **Composición analgésica que comprende un opiáceo y un bloqueante de los canales del sodio.**

30

Prioridad: **18.05.2001 CN 01 1 18098**

73

Titular/es: **Wex Medical Limited**  
**Unit A, 34/F, Manulife Tower**  
**169 Electric Road**  
**North Point, Hong Kong, CN**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.09.2010**

72

Inventor/es: **Ku, Baoshan y**  
**Shum, Frank, Hay, Kong**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.09.2010**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 344 631 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Composición analgésica que comprende un opiáceo y un bloqueante de los canales del sodio.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende una combinación analgésica sinérgicamente eficaz de un agente analgésico opiáceo y un compuesto que se une específicamente a la subunidad SS1 o SS2 de un canal de sodio en un vehículo farmacéuticamente adecuado, para usar en producir analgesia en un mamífero que experimenta dolor.

**Antecedentes de la invención**

Según la patente de EE.UU. n° 6.150.524 los analgésicos opiáceos, tales como morfina, son los analgésicos más poderosos para tratar dolor crónico y agudo severo. Un ejemplo de dolor crónico, es el dolor experimentado por pacientes con cáncer. Un ejemplo de dolor agudo, es el experimentado tras operaciones quirúrgicas. La actividad calmante del dolor de los agentes opiáceos incluye un efecto depresor sobre sistema nervioso central. La actividad analgésica de los analgésicos opiáceos, tal como morfina y deltorfina II se puede mediar a través de diferentes receptores opiáceos, por ejemplo a través de receptores opiáceos  $\mu$  y receptores opiáceos  $\delta$ . Los analgésicos opiáceos son invaluable para el tratamiento de dolor crónico y agudo severo, como por ejemplo, puede ocurrir en enfermedades degenerativas de huesos y cáncer. Son fáciles de administrar y proporcionan eficaz alivio del dolor en la mayoría de pacientes. Debido a la excelente tolerabilidad general de los opiáceos, las dosis de morfina y otros opiáceos fuertes puede aumentarse a niveles relativamente altos.

Los opiáceos usados para tratar dicho dolor son en efecto altamente eficaces, pero presentan un número de efectos secundarios desagradables y/o indeseables (por ej., corta duración de la actividad, depresión respiratoria, náusea, estreñimiento, diuresis y euforia, y también crean adicción). En algunos pacientes, particularmente en enfermos crónicos, los efectos secundarios de los opiáceos hace imposible administrar dosis continuas lo suficientemente altas, para controlar adecuadamente el dolor durante el período de tiempo necesario. También, hay algunas enfermedades dolorosas que no responden suficientemente al tratamiento del dolor sólo con opiáceos. Por consiguiente, existe una constante necesidad de encontrar combinaciones analgésicas que contengan opiáceos mejoradas con mayor actividad analgésica, que comprenda agentes opiáceos y no opiáceos analgésicamente activos, que ofrezcan la posibilidad de reducir la dosis de opiáceos necesaria para lograr un eficaz alivio del dolor, reduciéndose, por tanto, también los efectos secundarios de los opiáceos, que de lo contrario se producirían empleando mayores dosis de opiáceos.

Recientemente, Hartmann (patente de EE.UU. n° 6.150.524) y Nagase (patente de EE.UU. n° 6.177.438) han descubierto derivados de morfina, a través de modificar la estructura de la morfina, para reducir los efectos adversos asociados con el uso de la morfina. Sin embargo, los resultados basados en estudios con animales, son todavía insuficientes para corroborar el uso farmacéutico en humanos con seguridad y eficacia aceptables.

Por otra parte, los compuestos bloqueadores de canal de sodio que se unen a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio, particularmente tetrodotoxina y saxitoxina, se ha encontrado que poseen una potente propiedad analgésica (solicitud de patente de EE.UU. n° 09/695.053). Tetrodotoxina es eficaz en todos los dolores crónicos severos. Tetrodotoxina es capaz de proporcionar analgesia en un mamífero que experimenta dolor agudo o crónico.

En una realización, se encontró que la tetrodotoxina (TTX) era un analgésico aproximadamente 300 veces más potente que la morfina. Además, la TTX no produce adicción. Adicionalmente, ensayos en humanos revelaron que la TTX también proporciona una duración de la acción mucho más prolongada que la morfina. La TTX proporciona una acción analgésica significativa del dolor a partir de estimulación química. Sin embargo, una dosis mayor parece ser necesaria para suprimir el dolor inducido por calor. En estudios sobre el uso de la TTX para tratar la adicción, los experimentos sugieren una curva dosis/toxicidad empinada para la TTX. Por tanto, existe la necesidad de mejorar la seguridad reduciendo la dosis de TTX necesaria para un eficaz alivio del dolor.

Fairbanks (patente de EE.UU. n° 6.208.271), introdujo la coadministración de un agente analgésico opiáceo y moxonidina, como agente no-opiáceo, para producir analgesia sinérgica en mamíferos, esperando proporcionar una reducida propensión para causar efectos secundarios indeseados. La moxonidina es conocida por ser un receptor agonista de imidazolina/ $\alpha$   $\gamma$ -adrenérgico ( $I_1/\alpha_2$ -AR) y se usa clínicamente en medicaciones contra la hipertensión. Moxonidina es conocida por tener actividad analgésica, pero no es comparable a TTX, la cual es más potente y proporciona larga duración de alivio del dolor en pacientes con cáncer. La TTX es también no adictiva, como se muestra a través de diversos estudios en una variedad de animales.

**65 Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de acción analgésica en mamíferos, en particular en humanos, coadministrando cantidades sinérgicamente eficaces de (1) un compuesto bloqueador de canal de sodio que se une

## ES 2 344 631 T3

específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio, tal como tetrodotoxina o saxitoxina, o sus análogos; y (2) un agente analgésico opiáceo. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas analgésicas que comprenden cantidades sinérgicamente eficaces, de un compuesto bloqueador de canal de sodio unido específicamente a la unidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio, seleccionado del grupo que consiste en tetrodotoxina o saxitoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, deoxitetrodotoxina, aminotetrodotoxina y ácido tetrodónico, y un agente analgésico opiáceo.

Es un objeto de esta invención, proporcionar una composición analgésica potente que contiene un compuesto bloqueador de canal de sodio analgésico de larga duración que se une específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio, seleccionado del grupo que consiste en tetrodotoxina o saxitoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, deoxitetrodotoxina, aminotetrodotoxina y ácido tetrodónico, y un agente analgésico opiáceo, con una reducida propensión a causar efectos adversos indeseados.

Es también un objeto de la invención, proporcionar un bloqueador de canal de sodio no adictivo con actividad analgésica que muestra sinergia con la actividad analgésica del opiáceo, y proporcionar composiciones analgésicas que comprenden un agente analgésico opiáceo, tal como morfina y sus derivados, y dicho bloqueador de canal de sodio no adictivo sinérgicamente eficaz, que permite reducir la cantidad de opiáceo necesario para lograr un eficaz alivio del dolor.

### Descripción detallada de las figuras

La Figura 1, muestra el efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina observado en ensayos de dolor inflamatorio inducido por Formalina en ratas.

La Figura 2, muestra el efecto analgésico real y teórico de TTX a 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coadministrado con morfina, observado en el ensayo de dolor inflamatorio inducido por Formalina en ratas.

La Figura 3, muestra el efecto analgésico real y teórico de TTX a 0,39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coadministrado con morfina, observado en el ensayo por Formalina en ratas.

La Figura 4, muestra el efecto analgésico real y teórico de TTX a 0,39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coadministrado con morfina, observado en el ensayo del coletazo en ratones.

La Figura 5, muestra el efecto analgésico real y teórico de TTX a 0,79  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coadministrado con morfina, observado en el ensayo del coletazo en ratones.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la producción de acción analgésica en mamíferos, en particular en humanos, coadministrando cantidades sinérgicamente eficaces de (1) un compuesto bloqueador de canal de sodio unido específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio, seleccionado del grupo que consiste en tetrodotoxina o saxitoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, deoxitetrodotoxina, aminotetrodotoxina y ácido tetrodónico; y (2) un agente analgésico opiáceo. En dicha combinación, el agente opiáceo o uno de sus derivados o sales farmacéuticamente aceptable, se pueden administrar en una baja dosis de analgésico, o incluso de por sí, en una dosis subanalgésica. La composición puede contener, un compuesto bloqueador de canal de sodio unido específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio seleccionado del grupo especificado y el agente opiáceo, ambos conjuntamente en forma de una dosis, o cada uno en forma de dosis separadas.

Tetrodotoxina y saxitoxina, son conocidos por ser compuestos bloqueadores de canal de sodio que se unen específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio.

La tetrodotoxina y sus sales farmacéuticamente aceptables, son especies derivadas de octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5,9:7,10a-dimetano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pirimidina-4,7,10,11,12-pentol, que se pueden utilizar según la invención. El nombre químico de la tetrodotoxina y otros datos relacionados, se muestran a continuación:

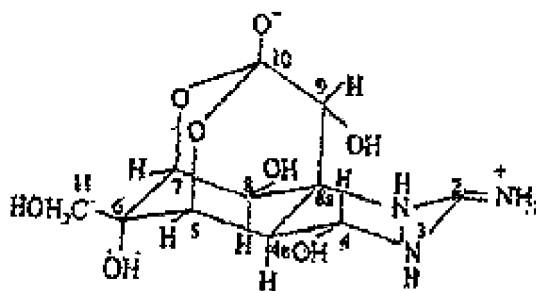
Nombre químico: octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5,9:7,10a-dimetano-10aH-[1,3] dioxocino[6,5-d]pirimidina-4,7,10,11,12-pentol

Fórmula molecular:  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$

Peso molecular: 319,27

## ES 2 344 631 T3

Estructura:



Los compuestos de TTX se pueden fabricar de una manera conocida, esencialmente según el procedimiento descrito en las solicitudes de patente de EE.UU. 09/695.711, 09/818.775 y 09/818.863, o de una manera similar a estos procedimientos.

El nombre químico de la saxitoxina y otros datos relacionados, se muestran a continuación:

Nombre químico: 2,6-diamino-4-((aminocarbonil)oxi)metil-3a,4,8,9-tetrahidro-1H, 10H-pirrol(1,2-c)purina-10,10-diol(3aS-(3a-a-a-4-a,10-aR\*))

Fórmula molecular:  $C_{10}H_{17}N_7O_4$

Peso molecular: 299,3.

Uno de los descubrimientos en esta invención, es que la tetrodotoxina sinergiza con la actividad analgésica de los opiáceos, en particular con opiáceos tales como la morfina, cuando la tetrodotoxina y dicho analgésico opiáceo se coadministran para el tratamiento del dolor. Esta coadministración da como resultado, un efecto aditivo superior.

Según la solicitud de patente de EE.UU. n° 09/695.053, TTX y STX poseen modos similares de acción y toxicidad. Por lo tanto, los autores de la invención sugieren que la STX es también sinérgica con la actividad analgésica de los opiáceos en similares intervalos de dosis.

Opiáceo es un término general para referirse a sustancias naturales o sintéticas, que se unen a receptores específicos ("receptores opiáceos") en el sistema nervioso central, produciendo una acción agonista. En el presente, se conocen dos tipos de receptores  $\mu$  y  $\delta$ . También se conocen dos subtipos de receptores  $\mu$ , que son  $\mu 1$  y  $\mu 2$ . Los analgésicos opiáceos son extremadamente útiles contra el dolor agudo severo, dolor postoperatorio y dolor crónico que incluye el dolor por cáncer. Los típicos analgésicos opiáceos son morfina, codeína, metadona y fentanilo. Estos analgésicos se pueden usar en la invención. También se pueden usar en la invención, los agonistas opiáceos con actividad receptora a opiáceo, tales como morfina y compuestos relacionados estructuralmente con morfina, tal como la deltorfina II, o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables. Fentanilo, remifentanilo y demás, son otros ejemplos adicionales de analgésicos opiáceos usados en el tratamiento clínico que se pueden emplear. La morfina es preferiblemente el opiáceo más usado. Sales de opiáceos farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen hidrocloruros, hidrobromuros, hidroyoduros, sulfatos, bisulfatos, fosfatos, acetatos, nitratos, citratos, tartratos, bitartratos, tereftalatos, succinatos, malatos, maleatos, fumaratos, pectinatos y pamoatos. Preferiblemente, la sal farmacéuticamente aceptable de morfina es un hidrocloruro, un sulfato o un tartrato.

La nocicepción, es una reacción de procesamiento del sistema nervioso central en la transmisión de estimulación de nociceptores. Los estímulos nocivos pueden causar depolarización en las terminaciones nerviosas perceptoras primarias como para excitar a los receptores. Los nociceptores son de hecho las terminaciones nerviosas de neuronas que tienen sus cuerpos celulares fuera de la columna vertebral en el ganglio de la raíz dorsal. Las verdaderas neuronas nociceptoras, son las fibras mielinizadas ( $A\delta$ ) y fibras no mielinizadas (fibras C). La nocicepción actúa también como alarma para inducir reacciones de escape o defensa contra estímulos nocivos.

La tetrodotoxina ha sido largamente considerada interesante por su acción para alterar el dolor causado por la nocicepción. Según Catterall, en modelos animales de dolor neuropático en ratas, la tetrodotoxina inhibe las descargas ectópicas originadas en los ganglios de la raíz dorsal relacionados (DRG, del inglés dorsal root ganglia) y cuerno dorsal (DH, del inglés dorsal horn) de la médula espinal e hiperexcitabilidad de neuronas, y aumenta el umbral de reacción de los receptores del dolor. Como señalaron Kostyun *et al.*, existen al menos dos tipos de canales de sodio dependientes de voltaje en las neuronas ganglionares de la raíz dorsal de un mamífero, es decir, el canal de sodio TTX-S que es sensible a tetrodotoxina y manifiesta corrientes iónicas hacia el interior rápidas, y el canal TTX-R que es resistente a tetrodotoxina y manifiesta corrientes iónicas hacia el interior más lentas.

La aplicación periférica de TTX bloqueó los potenciales postsinápticos excitatorios rápidos (EPSP, del inglés excitatory postsynaptic potentials) evocados por estimulación eléctrica, pero fallaron en bloquear los potenciales postsinápticos excitatorios lentos evocados eléctricamente (Srdija Jeftinija). Este descubrimiento proporciona una explicación del resultado de que TTX produjo sólo 71,7% de inhibición incluso a una dosis de 2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en el modelo de ensayo con Formalina en ratas.

La morfina, como analgésico clásico, produce inhibición del dolor primordialmente a través de receptores  $\mu$  (Besse, D *et al.*). Un estudio reciente muestra que la morfina puede bloquear la corriente excitatoria de la membrana mediada por amino ácido en motoneuronas ambiguas de la rata, produce hiperpolarización en el potencial de la membrana, y causa que los EPSP desaparezcan (Zhang, M. *et al.*).

North concluyó que la morfina puede aumentar la conductividad del potasio y produce hiperpolarización excitando los receptores  $\mu$ . Además, la desaparición de los EPSP puede producirse por la inhibición de la entrada de iones de calcio y sodio. Estudios adicionales realizados por Hung *et al.*, muestran que la inhibición por morfina de canales de sodio no es causada por estimulación directa de los receptores opiáceos y que más bien se relaciona con el retraso en la tasa de recuperación de canales de sodio inactivados.

Sin limitación debida a cualquier teoría de la invención, en vista de la acción bloqueadora de TTX y morfina en los canales de sodio, los autores de la invención creen que el efecto analgésico sinérgico de coadministrar un cantidad traza de TTX y una pequeña dosis de morfina, ocurre debido a que la tetrodotoxina inhibe la transmisión de estimulación nociva a la médula espinal, mientras que la morfina produce un bloqueo central de las corrientes de sodio.

Los autores de la invención estudiaron la acción analgésica sinérgica en dos modelos de dolor en animales. Según la invención, coadministrar un opiáceo con una cantidad traza de tetrodotoxina, se puede lograr efectos de alivio del dolor equivalentes en dosis sustancialmente reducidas, si se compara con las dosis necesarias cuando el opiáceo se administra sólo. En el modelo de dolor inflamatorio inducido por formaldehído (Formalina) en ratas, la dosis media de inhibición  $\text{ID}_{50}$  de morfina se redujo 16 veces. Como se muestra en la Figura 2, se observó una clara acción sinérgica cuando se administró TTX a una dosis de 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (1/100  $\text{LD}_{50}$ ) en combinación con morfina a dosis de 0,08, 0,15, 0,20, 0,60, 1,25, 2,5  $\text{mg}/\text{kg}$ , respectivamente. TTX a dosis de 0,39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  coadministrada con morfina a 0,15  $\text{mg}/\text{kg}$  también produjo un efecto sinérgico (Fig. 3).

En el otro modelo de dolor nociceptivo, el coletazo en ratones inducido por calor, la  $\text{ED}_{50}$  de morfina se redujo de 2 a 5 veces, y la duración de la acción se prolongó significativamente.

Por tanto, la combinación de tetrodotoxina y morfina producirá, bien una acción analgésica sinérgica positiva o al menos producirá un efecto analgésico igual con inferiores niveles de dosis en ambos, estableciendo la viabilidad de la presente invención.

La tetrodotoxina produce efectos farmacéuticos sobre el sistema cardiovascular, analgesia y anestesia local. En particular, proporciona alivio significativo de diversos dolores sordos y dolores punzantes sin causar adicción. Basado en los descubrimientos de la presente invención, la seguridad y eficacia de TTX se puede mejorar disminuyendo la dosis necesaria para tratar el dolor a través de la acción sinérgica. Los agentes analgésicos opiáceos, tales como morfina, son de uso limitado porque inducen rápidamente tolerancia, dependencia y adicción. Coadministrando pequeñas cantidades de morfina y cantidades trazas de TTX, esta invención proporciona una nueva solución que mejora notablemente el efecto anestésico y reduce sustancialmente los efectos adversos indeseados. En términos de peso, las proporciones de bloqueador de canal de sodio y opiáceo para coadministrar serán preferiblemente de 1:100 a 1:30.000, más preferiblemente de 1:200 a 1:5.000, aún más preferiblemente de 1:500 a 1:2.000.

Como compuestos, las combinaciones preferidas de bloqueador de canal de sodio y opiáceo, son TTX ó STX combinado con morfina, o codeína, o fentanilo.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos y composiciones de la invención, pero de ninguna manera pretenden limitar la invención.

### Ejemplo 1

#### *Ensayo de dolor inflamatorio inducido por Formalina en ratas*

En este ejemplo, el efecto analgésico sinérgico producido coadministrando tetrodotoxina y morfina se observó en un ensayo con Formalina en ratas.

# ES 2 344 631 T3

## 1. Materiales y métodos

### 1.1 Animal

5 Ratas macho Wistar con un peso corporal entre 180-300 gramos, primera clase, QA n° 013056, disponible de Experimental Animal Center of Medical Branch, Beijing University.

### 1.2 Artículo de ensayo y reactantes

10 Tetrodotoxina en polvo, pureza 95%, de Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co, LTD, lote n° 0324C. Antes de usar, el polvo se disolvió en una disolución de ácido acético a las concentraciones requeridas y se almacenó a 4°C en un refrigerador.

15 Hidrocloruro de morfina en polvo, lote n° 960802, de Qinghai Pharmaceutical Plant.

Formaldehído (Formalina), lote n° 9401002, de Beijing n° 3 Chemical Plant. Preparado a la concentración adecuada antes de usar.

### 1.3 Método

Se siguió el método descrito por Vogel *et al.* Con un peso corporal entre 180-220 gramos, 228 ratas macho Wistar se dividieron aleatoriamente en 24 grupos. No se les proporcionó alimento, sólo agua *ad libitum* durante las 12 horas previas a la dosis. A las ratas se les aplicó las dosis intramuscularmente con una disolución salina normal (control), hidrocloreuro de morfina o TTX a 0,39 µg/kg ó 0,19 µg/kg; o coadministrando intramuscularmente TTX a 0,39 µg/kg + morfina, o TTX a 0,19 µg/kg + morfina a ambos lados de la rata. El volumen de la inyección fue 0,1 mL/100 gramos de peso corporal. A 40 minutos tras la dosis, a cada rata se le administró subcutáneamente 0,06 mL de Formalina a 2,5% en la superficie plantar de la pata derecha. A continuación, el animal se puso en una caja de polimetilmetacrilato de 12 cm x 12cm x 12 cm para observar. Sus reacciones al dolor se monitorizaron durante los 5 minutos siguientes. El efecto analgésico se manifiesta si el animal pone todas sus patas en el suelo sin indicar ninguna preferencia por la pata tratada: signos paramétricos incluyeron sacudir, levantar, lamer o roer la pata trasera tratada. Los resultados de la respuesta al dolor se calcularon mediante la siguiente fórmula. Tiempo de lamido/mordido (seg) x 3 + frecuencia de sacudidas x 2/3 + tiempo de levantamiento de pata (seg).

35 Los resultados de respuesta de dolor de los grupos TTX se compararon con los de los grupos de control, y se usó la siguiente fórmula para calcular la tasa de inhibición de TTX en respuestas al dolor:

40 
$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = \frac{\text{el promedio de los resultados de respuesta al dolor del grupo control} - \text{el del grupo TTX}}{\text{el promedio de los resultados de respuesta al dolor del grupo control}} \times 100\%$$

La dosis media de inhibición, ID<sub>50</sub> se calculó por el método Logit.

### 1.4 Resultados

45 Durante los ensayos preliminares no se observaron diferencias significativas entre los resultados con disolución tampón salina normal y disolución tampón salina normal plus. Por tanto, se usó sólo disolución salina normal como control en los ensayos formales. Ni la administración en ambos lados del animal ni la variación del volumen de las inyecciones, se tomaron en consideración para coadministrar los grupos.

55 Como se muestra en la Tabla 1 y Figura 1, la dosis media de inhibición (ID<sub>50</sub>) de morfina en el modelo de dolor inducido por Formalina en ratas fue 2,30 mg/kg de peso corporal. Una cantidad traza de TTX 0,19 µg/kg o 1/100 de LD<sub>50</sub>, produjo una tasa de inhibición de 11,6% cuando se utilizó sola, pero afectó significativamente la analgesia cuando se coadministró con una pequeña dosis de morfina, por ejemplo, aumentando la tasa de inhibición a 63,7% en combinación con 0,30 mg/kg de morfina. La morfina usada sola, a 0,30 mg/kg sólo produjo una inhibición de 10,2%. La combinación de TTX a 0,19 µg/kg con morfina a 2,50 mg/kg aumentó la tasa de inhibición a 86,7% de 34,9% cuando esta última se usó sola. La TTX a una dosis de 0,39 µg/kg (1/50 de LD<sub>50</sub>) produjo una tasa de inhibición de 32,9% cuando se usó sola y de 66,2% en combinación de a 0,15 mg/kg de morfina, mientras que esta última sólo produjo una tasa de inhibición de 7,2% cuando se usó sola. El efecto analgésico aumentó con las dosis de morfina en otros grupos pero no significativamente.

65

# ES 2 344 631 T3

TABLA 1

*Efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina: Ensayo con Formalina en ratas*

Fármaco de ensayo	Dosis (mg/kg)	nº de animal	Resultado de reacción de dolor	Tasa de inhibición (%)	ID <sub>50</sub> de morfina (mg/kg)
Disolución Salina normal		8	252,3±105,4		
TTX	0,19x10 <sup>-3</sup>	10	223,0±58,3	11,6	2,30 (1,38~4,26)
	0,39x10 <sup>-3</sup>	10	169,1±47,2	32,9	
Morfina	0,08	8	243,8±36,4	3,4	
	0,15	8	234,0±26,9	7,2	
	0,30	8	226,5±73,5	10,2	
	0,60	8	274,3±119,5	11,0	
	1,25	8	190,3±129,9	24,6	
	2,50	8	164,3±82,0	34,9	
	5,0	8	49,8±34,1	80,2	
TTX (0,39 x 10 <sup>-3</sup> mg/kg) + morfina	0,08	8	162,9±55,4	35,4	
	0,15	20	85,3±54,2	66,2	
	0,30	14	138,0±50,7	45,3	
	0,60	14	119,5±38,3	52,6	
	1,25	14	109,3±64,4	56,7	
	2,50	8	71,6±44,2	71,6	
TTX (0,19 x 10 <sup>-3</sup> mg/kg) + morfina	0,08	8	132,0±39,3	47,7	
	0,15	10	94,1±43,9	62,7	
	0,30	8	91,6±51,3	63,7	
	0,60	8	146,8±66,6	41,8	
	1,25	8	139,4±68,9	44,7	
	2,50	8	36,6±16,3	86,7	
	5,00	8	24,4±12,1	90,3	

## Ejemplo 2

*Ensayo de latencia de coletazo inducido por calor en ratones*

En este ejemplo, el efecto analgésico sinérgico producido por coadministrar tetrodotoxina y morfina se observó a través de un ensayo del coletazo inducido por calor en ratones.

# ES 2 344 631 T3

## 1. Materiales y métodos

### 1.1 Animal

5 Ratones Kunming con un peso corporal entre 12-22 gramos, primera clase, QA n° 013056, disponible de Experimental Animal Center of Medical Branch, Beijing University.

### 1.2 Artículo de ensayo y reactantes

10 Tetrodotoxina en polvo, pureza 95%, de Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co, LTD, lote n° 0324C. Antes de usar, el polvo se disolvió en una disolución de ácido acético a las concentraciones requeridas y se almacenó a 4°C en un refrigerador.

Hidrocloruro de morfina en polvo, lote n° 960802, de Qinghai Pharmaceutical Plant.

15 Formaldehído, lote n° 9401002, de Beijing n° 3 Chemical Plant. Preparado a la concentración adecuada antes de usar.

### 1.3 Método

20 Se usó el método del coletazo por estimulación de calor en ratones para evaluar el efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina. El aumento en uno del umbral/latencia del dolor se adoptó como criterio para determinar la dosis de morfina usada, bien sola o en combinación con TTX a 0,79 µg/kg (1/25LD<sub>50</sub>) y 0,39 µg/kg (1/50 LD<sub>50</sub>) y ED<sub>50</sub> se calcularon por el método Probit. Para coadministrar, TTX y morfina se aplicaron intramuscularmente a ambos lados del animal.

#### Determinación de dosis:

30 Cuando se proporcionó morfina sola, los límites superiores e inferiores de dosis y una relación de progresión se determinaron a través de ensayos preliminares para poder calcular la dosis para cuatro grupos de animales. De manera similar, las dosis de morfina se determinaron coadministrando con TTX a dosis de 0,79 µg/kg (1/25 LD<sub>50</sub>) y 0,39 µg/kg (1/50 LD<sub>50</sub>), respectivamente.

#### Grupos de animales:

40 Se dividieron aleatoriamente 320 ratones analizados, la mitad hembras y la mitad machos, en 16 grupos. No se les proporcionó alimento, sólo agua 12 horas antes de la dosis. A las ratas se les suministraron la dosis con una disolución salina como control, hidrocloruro de morfina, TTX X2 a 0,79 µg/kg (1/25 LD<sub>50</sub>) y 0,39 µg/kg (1/50 LD<sub>50</sub>) y 12 grupos a los que se les coadministró TTX a 0,79 µg/kg en combinación con morfina y TTX a 0,39 µg/kg en combinación con morfina, respectivamente. El medidor de analgesia en el ensayo de coletazo, por calor incluye una fuente de calor que consiste en una lámpara de proyector de 8,75 mm, de 12 V, 50 vatios. El rayo de luz proveniente de la fuente de calor se enfocó y dirigió hacia un punto en la cola de un ratón sometido a ensayo, a una distancia de 1-2 mm más 1/3 de la longitud de la cola hasta el final de la cola.

50 Los fármacos de ensayo se aplicaron intramuscularmente. TTX, morfina o una mezcla de ambas se inyectaron en el glúteo a cada lado del animal con un volumen de 0,1 mL/10 g de peso corporal. Los períodos de latencias en el ensayo del coletazo se midieron y registraron a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 min tras la dosis. Para cada medición, se realizaron tres lecturas consecutivas cada un minuto, y la media obtenida se registró como período de latencia. El ensayo en un animal se terminó cuando no se observó coletazo durante 20 segundos, y el período de latencia se registró como 20 segundos. La tasa de inhibición del dolor se calculó según la siguiente fórmula con el propósito de evaluar la potencia de la analgesia:

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = \frac{[(\text{período de latencia observado} - \text{período de latencia control}) / \text{tiempo de desactivación de la luz}] \times 100.}{55}$$

### 1.4 Estadísticas

60 Los resultados fueron procesados con un programa estadístico SPSS. La dosis media eficaz (ED<sub>50</sub>) y la dosis media inhibitoria (ID<sub>50</sub>) se calcularon por el método Probit. La acción sinérgica de TTX y morfina se evaluó por un isoblograma.

65

## ES 2 344 631 T3

### 2. Resultados

Como se mostró en las tablas 2 y 3, la ED<sub>50</sub> para morfina usada sola fue 0,41 mg/kg a 45 min tras la dosis, proporcionando el criterio de un aumento del período de latencia en una vez para el ensayo de coletazo inducido por calor en ratones. Coadministrada con TTX a una dosis de 1/25 LD<sub>50</sub> (0,79 μg/kg), la ED<sub>50</sub> de la morfina disminuyó a 0,07 mg/kg. Cuando se coadministró con TTX a una dosis de 1/50 LD<sub>50</sub> (0,39 μg/kg), la ED<sub>50</sub> de la morfina disminuyó a 0,21 mg/kg.

Proporcionando el periodo de latencia básico como criterio, la ID<sub>50</sub> para morfina usada sola fue 0,33 mg/kg a 45 min tras la dosis. Coadministrada con TTX a pequeñas dosis de 0,79 μg/kg y 0,39 μg/kg, la ID<sub>50</sub> de la morfina disminuyó respectivamente a 0,08 mg/kg y 0,15 mg/kg, o sólo 1/4 y 1/2 de ID<sub>50</sub> para el uso de morfina sola.

TABLA 2

*Efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina: ID<sub>50</sub> (ensayo de coletazo inducido por calor en ratones, media de latencia ±SD, n=20) comparado con el ID<sub>50</sub> de morfina usada sola*

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia antes de la dosis	Latencia tras la dosis	Tasa de inhibición (%)	ID <sub>50</sub> y 95% de límites de confianza
Control (disolución salina normal)		5,36±0,96	5,43±0,89	1,29	
TTX	0,79×10 <sup>-3</sup>	5,25±0,59	6,04±0,76	12,6	
	0,39×10 <sup>-3</sup>	5,56±0,81	5,88±1,00	5,44	
Hidrocloruro de Morfina	0,01	5,48±1,44	6,35±1,87	13,70	0,33 (0,21~0,55)
	0,06	5,83±1,49	8,67±2,54	32,76	
	0,33	5,21±1,39	10,04±2,49	48,11	
	1,80	5,63±1,31	18,94±1,02	70,27	
TTX (0,79 μg/kg) + hidrocloruro de morfina	0,004	5,83±1,26	7,22±1,14	19,25	0,08 (0,05~0,14)
	0,016	6,37±1,08	9,96±2,40	36,04	
	0,073	5,78±1,29	11,82±2,65	51,09	
	0,330	6,31±1,10	17,21±2,23	63,33	
TTX (0,39 μg/kg) + hidrocloruro de morfina	0,01	5,76±0,89	8,17±1,94	29,50	0,15 (0,08~0,33)
	0,05	5,84±0,73	10,16±1,85	42,52	
	0,28	5,55±0,88	12,50±3,46	55,60	
	1,50	5,61±0,86	16,28±2,53	65,54	

## ES 2 344 631 T3

TABLA 3

*Efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina: ID<sub>50</sub> (ensayo de coletazo inducido por calor en ratones, n=20); ID<sub>50</sub> de morfina por comparación con latencias a 45 min tras la dosis*

Grupo	Dosis (mg/kg)	Incidencias positivas	Porcentaje de incidencias positivas (%)	ED <sub>50</sub> y 95% de límites de confianza	ED <sub>95</sub> y 95% de límites de confianza
Control (disolución salina normal)					
TTX	0,79x10 <sup>-3</sup> 0,39x10 <sup>-3</sup>				
Hidrocloruro de Morfina	0,01 0,06 0,33 1,80	0 2 7 20	0 10 35 100	0,41 (0,30~0,84)	0,77 (0,54~1,91)
TTX (0,79 µg/kg) + hidrocloruro de morfina	0,004 0,016 0,073 0,330	0 2 10 20	0 10 50 100	0,07 (0,06~0,10)	0,13 (0,10~0,22)
TTX (0,39 µg/kg) + hidrocloruro de morfina	0,01 0,05 0,28 1,50	1 2 14 20	5 10 70 100	0,21 (0,16~0,29)	0,42 (0,33~0,62)

Para un uso práctico de la interacción sinérgica entre un agente analgésico opiáceo y un compuesto que se une a subunidades SS1 ó SS2 de un canal de sodio, es útil caracterizar la toxicidad resultante de su coadministración, y subsiguientemente obtener las proporciones analgésicas óptimas en la combinación o sus composiciones. Por tanto, los protocolos de ensayo son diseñados con este fin, como se muestra en Ejemplos 3-6.

### Ejemplo 3

#### *Toxicidad de TTX y morfina coadministradas por inyección intramuscular en ratas*

El objeto de este ensayo es medir la interacción de toxicidad de TTX y morfina a través de determinar y comparar las dosis medias de muertes (LD<sub>50</sub>) de morfina, TTX y morfina coadministradas. La LD<sub>50</sub> de TTX es conocida por la solicitud de patente de EE.UU. n° 09/695.053. El método fue según el ensayo para determinar toxicidad aguda. La toxicidad de la combinación de TTX y morfina se examinará en dos proporciones para obtener los valores LD<sub>50</sub>, respectivamente.

## ES 2 344 631 T3

Ratas Wistar, con un peso corporal de 200-220 gramos cada uno, se dividieron aleatoriamente en 12 15 grupos de 10, la mitad hembras y la mitad machos; y cada fármaco o combinación de ensayo se usó en 4 5 grupos de animales. No se les permitió acceso a alimento, sólo agua *ad libitum* durante las 12 horas antes de la dosis. Para determinar LD<sub>50</sub> de TTX o morfina individualmente, cada animal recibió una administración del fármaco de ensayo. Para coadministrar TTX y morfina, a cada animal se le aplicó TTX y morfina a cada lado (en forma de dosis separadas) o una administración de TTX y morfina en forma de una sola dosis. Tras administrar las dosis, los animales fueron monitorizados para determinar reacciones tóxicas y muerte durante siete días consecutivos. La autopsia se llevó a cabo inmediatamente en cada animal muerto, con análisis general para determinar reacciones tóxicas en órganos vitales.

Consecuentemente, los valores de LD<sub>50</sub> se determinaron por el método Bliss. Si LD<sub>50</sub> aumenta significativamente por comparación con el aditivo teórico, la toxicidad de la coadministración es inferior a la de TTX o morfina usadas individualmente, indicando una seguridad mejorada debido a la acción analgésica sinérgica entre TTX y morfina. Incluso si LD<sub>50</sub> permanece inalterada, el uso combinado de TTX y morfina puede ser aún deseado.

### Ejemplo 4

*Perfil Isobolográfico de la interacción entre TTX y morfina por el modelo de dolor por inflamación inducida con Formalina en ratas*

El isoblograma es una técnica comúnmente usada para determinar efectos superadictivos, subadictivos o meramente adictivos producidos por la administración de dos compuestos. El diseño de este ensayo sigue el método de Tallarida, el cual fue también adoptado por la solicitud de patente de EE.UU. n° 5.468.744. Como se mencionó antes, el propósito es obtener las proporciones analgésicas óptimas de las combinaciones o composiciones de TTX y morfina, debido a los descubrimientos de interacciones de toxicidad en el Ejemplo 3. El modelo de dolor del ensayo con Formalina en ratas se usa para evaluar los efectos analgésicos del fármaco o combinaciones de ensayo, particularmente, determinar las dosis media inhibidora (ID<sub>50</sub>). Para determinar la ID<sub>50</sub> de TTX o morfina individualmente, cada animal recibió una administración del fármaco de ensayo. Para coadministrar la TTX y morfina, a cada animal se le aplicó TTX y morfina a cada lado (en forma de dosis separadas) o una administración de TTX y morfina en forma de una sola dosis. Las proporciones de TTX y morfina en términos de peso para coadministrar es entre 1:200, 1:5.000. El número de particulares proporciones y grupos de animales se determinaron basándose en estos intervalos de proporciones, de manera que un experto con uso cotidiano de la técnica puede disponer de datos sólidos y suficientes para representar e interpretar isoblogramas.

### Ejemplo 5

*Toxicidad de saxitoxina (STX) y morfina coadministradas por inyección intramuscular en ratas*

Como en el Ejemplo 3, el objeto de este ensayo es medir la interacción de toxicidad de STX y morfina a través de determinar y comparar las dosis medias de muertes (LD<sub>50</sub>) de STX, morfina, y STX y morfina coadministradas. La toxicidad de la combinación de STX y morfina se examinarán en dos proporciones, para obtener los valores de LD<sub>50</sub>, respectivos.

Ratas Wistar, la mitad hembras y la mitad machos, con un peso corporal entre 200-220 gramos cada uno, se dividieron aleatoriamente en 16 20 grupos de 10, y cada fármaco o combinación de ensayo se usó en 4 5 grupos de animales. El método y procedimiento de ensayo siguieron el Ejemplo 3, al igual que el análisis de la interacción de toxicidad entre STX y morfina, y la viabilidad de su uso combinado.

### Ejemplo 6

*Perfil Isobolográfico de la interacción entre STX y morfina por el modelo de dolor por inflamación inducida con Formalina en ratas*

El método siguió el Ejemplo 4, reemplazando TTX con STX.

En términos de peso, las proporciones de STX y morfina coadministradas fueron preferiblemente entre 1:200 y 1:5.000.

### Referencias

En la presente invención se citan diversos artículos de la bibliografía científica y de patentes. Cada uno de dichos artículos se incorpora en la invención de manera íntegra y para todos los fines citados.

1. **Hartmann, et al.**, Morphine derivatives with analgesic activity, patente de EE.UU. n° 6.150.524, (2000).
2. **Nagase, et al.**, Morphine derivatives and pharmaceutical use thereof, patente de EE.UU. n° 6.177.438, (2001).

## ES 2 344 631 T3

3. **Dong, Q. B. et al.**, A Method of Analgesia, solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/695.053, (2000).
4. **Adams, et al.** Synergistic local anesthetic compositions, patente de EE.UU. n° 4.022.899, (1977).
- 5 5. **Catterall W A.** Cellular and molecular biology of voltage gated sodium channels. *Physiol Rev.* 1992; 72; s15-s18.
6. **Kostyun, P. G., Veselovsky, N. S y Tsyndrenko, A. Y.**, Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons. I. Sodium current, *Neuroscience*, 6(1981) pp. 2423-2430.
- 10 7. **Srdija Jeftinija.** The role of tetrodotoxin-resistant Sodium channels of small primary afferent fibers. *Brain Research* 639 (1994) pp. 125-134.
8. La solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/695.053, (2000).
- 15 9. **Besse, D., Lombard, M-C y Besson, J-M** (1991) Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. *Brain Res.*, 548: pp. 287-291.
- 20 10. **Zhang M, Nie L, Liu L, Wang Y T, Neuman R S, Bieger D.** Morphine blocked the excitatory amino acid mediated membrane current in ambigial motoneurons of the rat. *Acta Physiologica Sinica*, 1995, 47(3), pp. 253-258.
11. **North, R. A. y Williams, J. T.** (1985). On the potassium conductance increased by opiates in rat brains coeruleus neurones. *J. Physiol.*, 364, pp. 265-280.
- 25 12. **C.-F. Hung, C.-H. Tsai y M-J. Su**, Opioid receptor independent effects of morphine on membrane currents in single cardiac myocytes, *British Journal of Anesthesia* 1998; 81, pp. 925-931.
13. **H. Gerhard Vogel, Wolfgang H. Vogel**, Guide to pharmacological tests-new drug discovery and pharmacological evaluation, traducido por Guanhua Du *et al.*, Sciences Publishing of China, 2001, pp. 499-500.
- 30 14. **Duanzheng Xu**, Application of bio-statistics in pharmacology, Sciences Publishing of China, 1986, pp. 357-366.
- 35 15. **Tallarida, R. J. et al.**, Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms, *Life Sci.* 1989; 45, pp. 947-961.
- 40 16. **Zhang, W. et al.**, Statistics and Programs of Pharmacology, Beijing People's Health Publishing Service. 1988; pp. 108-116.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica, que comprende un opiáceo y un bloqueador de canal de sodio que se une específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio seleccionado del grupo que consiste en tetrodotoxina, saxitoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, deoxitetrodotoxina, aminotetrodotoxina y ácido tetrodónico, para usar en producir analgesia en un mamífero que experimenta dolor.
- 10 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el opiáceo y el compuesto que se une específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio están diseñados para ser administrados juntos en forma de una sola dosis.
- 15 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el opiáceo y el compuesto que se une específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio están diseñados para ser administrados en forma de dosis separadas.
- 20 4. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el opiáceo es morfina.
5. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la dosis eficaz de tetrodotoxina o saxitoxina es de 0,01  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal a 20  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal.
- 25 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la dosis eficaz de morfina es de 0,002 mg por kilogramo de peso corporal a 20 mg por kilogramo de peso corporal.
- 30 7. El uso de un compuesto que se une específicamente a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio seleccionado del grupo que consiste en tetrodotoxina, saxitoxina, metoxitetrodotoxina, etoxitetrodotoxina, deoxitetrodotoxina, aminotetrodotoxina y ácido tetrodónico, para la preparación de una composición farmacéutica para producir analgesia en un mamífero que experimenta dolor, la cual está diseñada para ser administrada en combinación con un agente analgésico opiáceo.
- 35 8. El uso según la reivindicación 7, en el que el opiáceo y el compuesto que se une a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio están diseñados para ser administrados juntos en forma de una sola dosis.
9. El uso según la reivindicación 7, en el que el opiáceo y el compuesto que se une a la subunidad SS1 ó SS2 de un canal de sodio están diseñados para ser administrados en forma de dosis separadas.
- 40 10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el opiáceo es morfina.
11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la dosis eficaz de tetrodotoxina o saxitoxina es de 0,01  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal a 20  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal.
- 45 12. El uso según la reivindicación 10, en el que la dosis eficaz de morfina es de 0,002 mg por kilogramo de peso corporal a 20 mg por kilogramo de peso corporal.

45

50

55

60

65

Fig1. Efecto analgésico de coadministrar TTX y morfina: ensayo con Formalina en ratas.

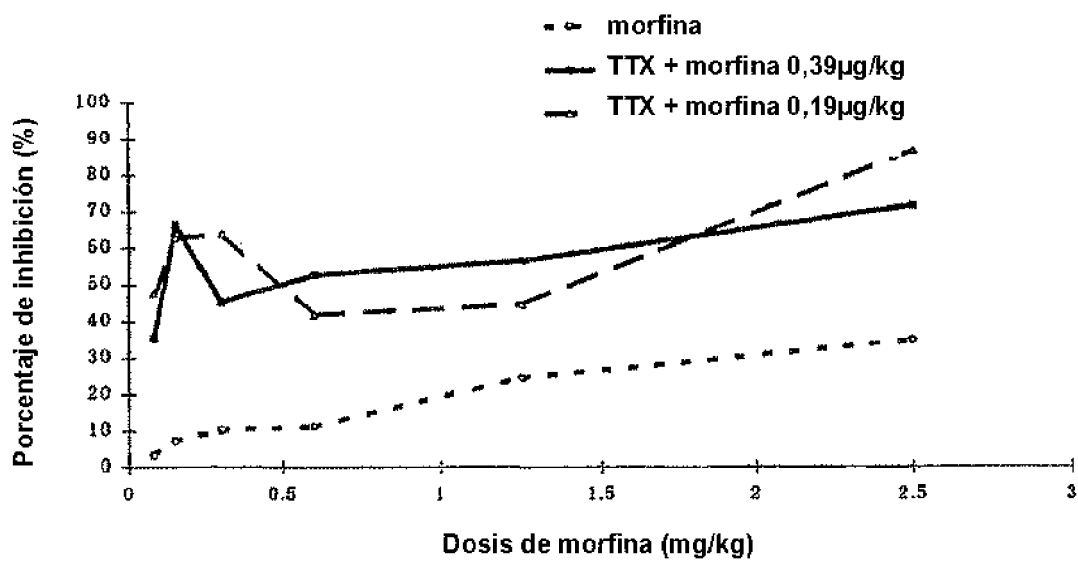


Fig2. Efecto analgésico de coadministrar 0,19µg de TTX y morfina: ensayo con Formalina en ratas.

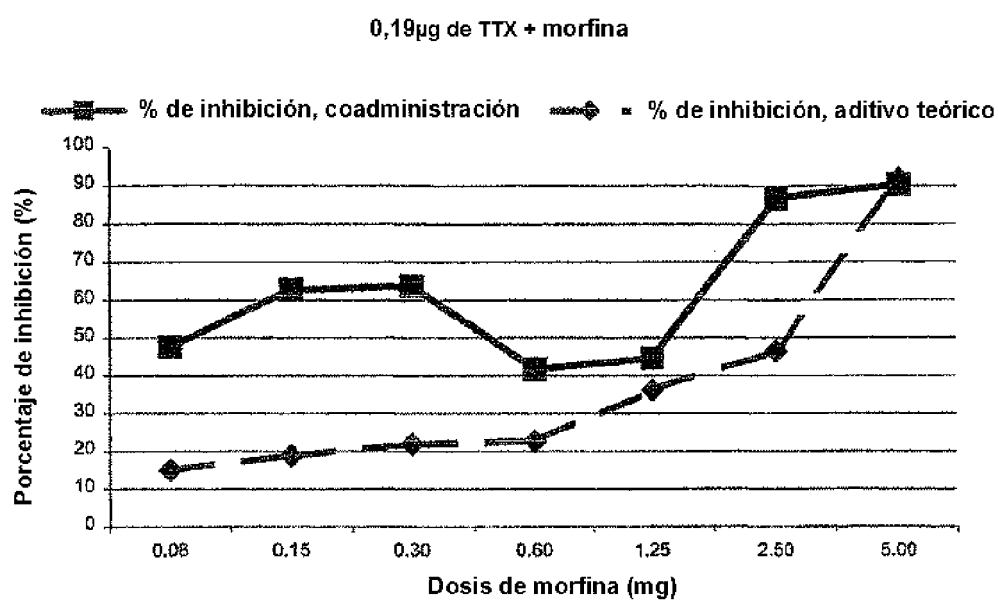


Fig3. Efecto analgésico de coadministrar 0,39µg de TTX y morfina: ensayo con Formalina en ratas.

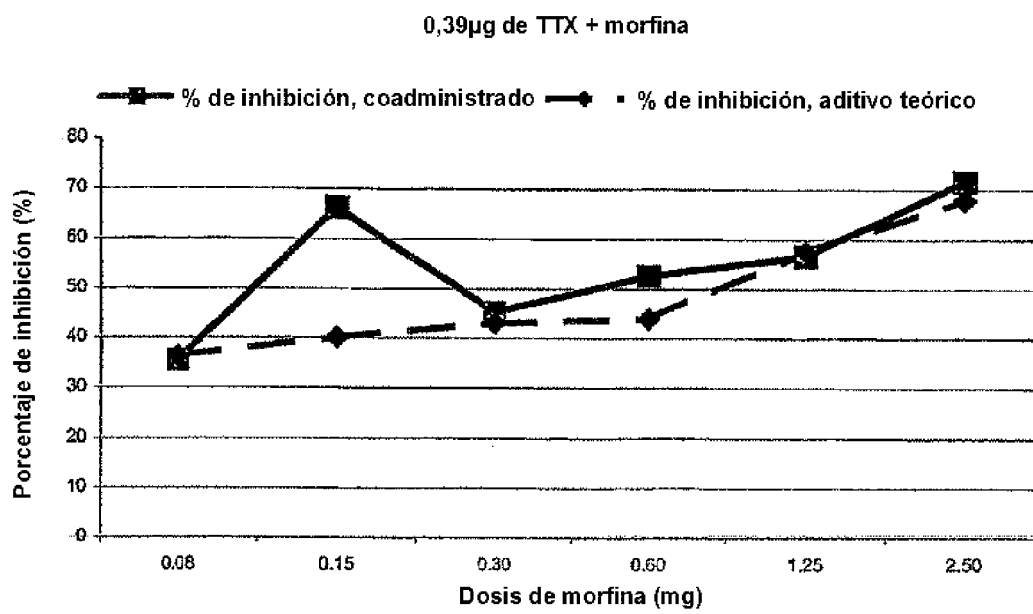


Fig4. Efecto analgésico de coadministrar 0,39µg/kg de TTX y morfina: ensayo del coletazo en ratones.

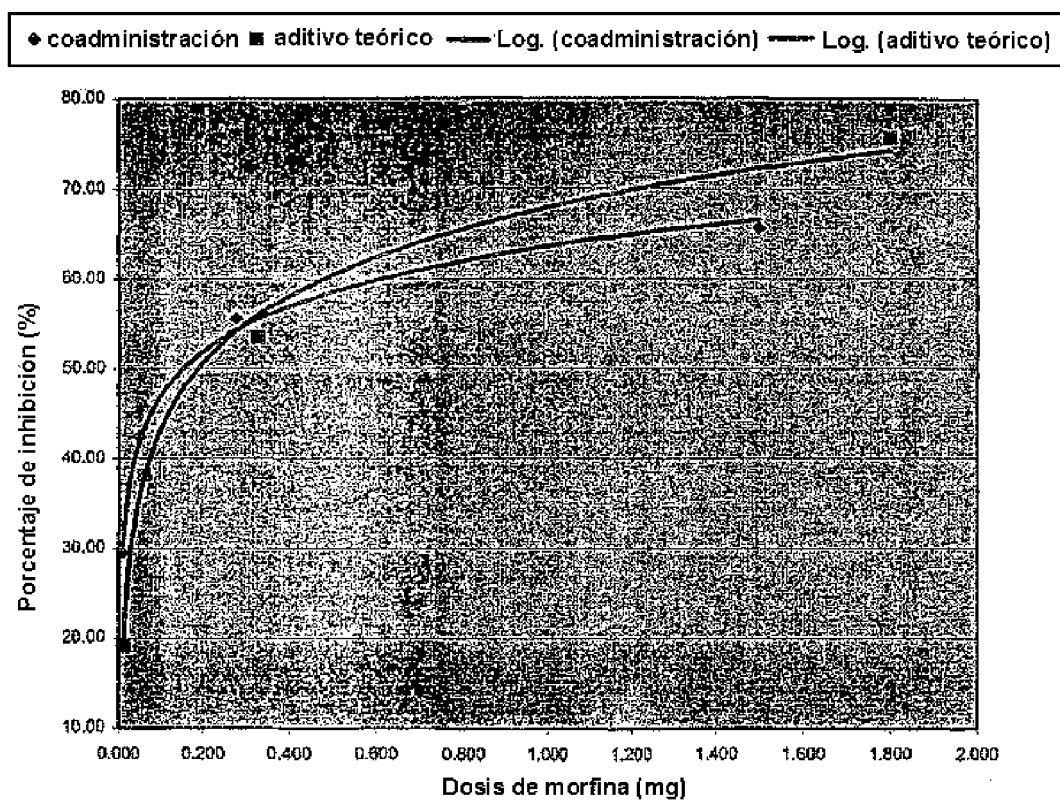


Fig5. Efecto analgésico de coadministrar 0,79µg/kg de TTX y morfina: ensayo del coletazo en ratones.

