



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 695**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7076 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01974088 .5**
86 Fecha de presentación : **26.07.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1305037**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Medicamento analgésico.**

30 Prioridad: **04.08.2000 IT MI00A1827**

73 Titular/es: **Medestea Internazionale S.p.A.**
Via Cernaia 31
10121 Torino, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

72 Inventor/es: **Ferrero, Maria, Elena**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Medicamento analgésico.

5 La presente invención se refiere al uso de adenosin-5'-trifosfato-2',3'-dialdehído (oATP) en la preparación de medicamentos analgésicos.

La molécula de oATP se obtiene del ATP mediante oxidación de los hidroxilos presentes en las posiciones ribosa 2' y 3' a dialdehídos. Dicha oxidación puede realizarse con una sal ácida peryódica, como se describe en el documento P. N. Lowe y col., "Preparation and chemical properties of periodate-oxidized adenosine triphosphate and some related compounds", Biochemical Society Transactions, Vol. 7: 1131-1133, 1979.

El derivado de ATP 2',3'-dialdehído se usa tradicionalmente como marcador de afinidad para sitios nucleotídicos enzimáticos (Easterbrook-Smith, B., Wallace, J.C. & Keech, D. B. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 125-130), puesto que es capaz de reaccionar con los restos de lisina no protonada presentes en los sitios nucleotídicos, para formar bases de Schiff o derivados de dihidromorfolino (Colman, R. F. (1990) en The Enzymes - Sigman, D. S., and Boyer, P. D., eds. - Vol 19, págs. 283-323, Academic Press, San Diego). La molécula de oATP también se ha usado para estudiar la activación de plaquetas y para inhibir la estimulación del músculo esquelético de pollo mediante ATP (Pearce, P. H., Wright, J. M. Egan, C. M. & Scrutton, M. C. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 543-554; Thomas, S. A., Zawisa, M. J., Lin, X. & Hume, R.I. (1991) Br. J. Pharmacol. 103, 1963-1969). Además, los estudios sobre líneas celulares de macrófagos demostraron que oATP es capaz de bloquear el efecto de permeabilización de la membrana plasmática inducido por ATP, para reducir el nivel de hidrólisis de ATP exógeno por ecto-ATPasas de membrana, y de inhibir los efectos de hinchazón, vacuolización y tisis celular inducidos por ATP (Murgia y col. The Journal of Biological Chemistry, (1993) de The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, inc., Vol. 268, N° 11, pág. 8199). Se ha sugerido que oATP tiene actividad antagonista sobre purinoceptores P2zIP2X7. De hecho, la liberación de IL-113 (interleuquina 113) dependiente de LPS (= lipopolisacárido) desde células microgliales que expresan P2zIP2X7 está inhibida de forma selectiva por oATP (Ferrari D. y col., J. Exp. Med. (1997) Vol. 185, N. 3, Pág. 579-582).

Se ha descubierto actualmente que oATP ejerce *in vivo* notables efectos anti-inflamatorios y antinociceptivos. Como modelo experimental, se ha usado una inflamación unilateral en pata trasera de rata, después de la inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (FCA). La pata controlateral de animales tratados, así como la de animales no tratados, se usaron como controles. La inflamación inducida por FCA se demostró, a partir de las 3 h hasta 24-28 h después de la inyección, mediante el aumento del volumen de la pata, hipertemia e hiperalgesia. Esta última se evaluó mediante un ensayo algesiométrico (ensayo de presión de la pata) capaz de evaluar el umbral nociceptivo. La inyección intraplantar de oATP redujo de forma significativa la sensación de dolor (nocicepción), es decir elevó el umbral nociceptivo. Diferentes dosis de oATP indujeron siempre un efecto analgésico significativo, dependiente de la dosis, que duraba aproximadamente 12-24 horas, con un efecto máximo ya una hora después de la administración. Además, las patas de ratas tratadas con oATP mostraron reducción de los otros signos de inflamación (hinchazón e hipertemia). En un ensayo adicional, la comparación entre oATP y diclofenac, un conocido fármaco anti-inflamatorio usado en patologías artríticas, demostró que oATP induce un efecto analgésico significativamente mayor que diclofenac. Un ensayo en el que se pretrataron las ratas con fucoidina, un inhibidor de diapédesis de leucocitos, demostró que la actividad de oATP es independiente del reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación. Los niveles de ATP en los sitios de inflamación fueron significativamente mayores en animales no tratados, lo que sugiere que oATP puede bloquear en parte la producción de ATP exógeno, previniendo de este modo su actividad pro-inflamatoria.

La presente invención se refiere al uso de oATP como medicamento para el tratamiento de afecciones dolorosas. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen oATP como ingrediente activo, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. Formas adecuadas para administración oral, tópica o parenteral son, por ejemplo, comprimidos, píldoras revestidas de azúcar, cápsulas, granulados, polvos, supositorios, jarabes, soluciones, suspensiones, cremas, pomadas, geles, pastas, lociones, emulsiones, pulverización. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con lo descrito en el documento Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., NY, USA, XVII Ed. La cantidad de ingrediente activo por dosificación unitaria puede variar entre 0,05 y 100 mg por kg de peso corporal, para administrar una o más veces al día dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar y de las condiciones del paciente. La dosificación diaria variará normalmente entre 1 y 300 mg, preferiblemente entre 10 y 100 mg.

El compuesto de la invención también puede usarse junto con otros fármacos anti-inflamatorios que se usan en la actualidad.

El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

*Actividad farmacológica de oATP*5 *Inducción de inflamación en ratas*

Se usaron ratas Fisher macho de la misma estirpe (Charles River Italy, Calco, Lecco, Italia) que pesaban aproximadamente 250 g. Las ratas, anestesiadas brevemente con isoflurano recibieron una inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (FCA) (0,15 ml) en la pata trasera derecha. Esta inyección indujo una inflamación unilateral (a partir de 3 h hasta 24-48 h después de la inyección), demostrada por un aumento en el volumen de la pata, hipertemia e hiperalgesia. La hiperalgesia se evaluó mediante un ensayo algesiométrico, usando un analgesiómetro (Ugo Basile, Comerio, Italia) para determinar el umbral de presión de la pata, expresado en gramos, concretamente la presión necesaria para provocar la retirada de la pata, lo que indica el valor del umbral nociceptivo. Se usaron de 6 a 8 ratas para cada ensayo. Durante estos ensayos, los animales se trataron de acuerdo con las "directrices éticas convencionales" (NIH, 1985).

Tratamiento con oATP

La pata de rata inflamada recibió, 24 horas después de la inyección de FCA, inyecciones intraplantares de diferentes dosis de oATP (56 a 336 μ M), considerando tiempo 0 como el momento de la inyección de oATP. Los valores de umbral nociceptivo obtenidos se muestran en la siguiente tabla 1.

TABLA 1

25 *Umbral nociceptivo 0 "umbral de presión de la pata"*

	OATP 56 μ M	112 μ M	224 μ M	336 μ M
30 0'	60 \pm 1,6	65 \pm 2,0	50 \pm 1,5	60 \pm 1,9
30' 30'	120 \pm 2,1*	140 \pm 3,5*	350 \pm 5,4*	300 \pm 3,5*
60'	190 \pm 2,3*	180 \pm 4,2*	400 \pm 10,3*	=> 750 * 1
35 90'	85 \pm 2,5*	150 \pm 3,8*	300 \pm 11,2	=> 750 * 2
120'	75 \pm 1,8*	100 \pm 3,0*	185 \pm 7,1*	600 \pm 20,8*
240'	75 \pm 2,6	105 \pm 4,3	180 \pm 8,9*	550 \pm 18,4*

40 * 1,2 = límite

Los datos se expresan como media \pm D. E. M. del umbral de presión de la pata (evaluada en g) p < 0,05 frente a tiempo 0' (pata inflamada sin tratar)

45 * ensayo de Mann-Whitney.

Se obtuvieron resultados similares usando oATP 35 pm en lugar de oATP 56 pm, o induciendo el proceso inflamatorio (inyección de FCA) durante 6 o 12 h en lugar de 24 h. Además, las patas tratadas con oATP eran menos dolorosas y también mostraban reducción de los signos inflamatorios (hinchazón, hipertemia) en comparación con patas no tratadas.

Se demostró un efecto de oATP dependiente de la dosis, aunque ya se conseguían efectos significativamente altos a la dosis mínima usada. Las dosis más bajas tenían sin embargo un efecto analgésico de menor duración en el tiempo, posiblemente debido a la saturación incompleta de los receptores P2X7.

El efecto de la dosis máxima usada de oATP se ensayó en un conjunto adicional de experimentos, durante periodos de tiempo más prolongados, en patas de rata en las que se había inducido el proceso inflamatorio 48 h antes (tabla 2). Los datos demuestran que la inyección de oATP eleva de forma significativa los valores del umbral nociceptivo durante un periodo de tiempo extremadamente largo, aunque estos disminuyen de forma progresiva con el tiempo.

TABLA 2

Umbral nociceptivo 0 "umbral de presión de la pata"

5		OATP 336 μ M
	0'	55 \pm 2,0
	30'	210 \pm 10,7
10	60'	360 \pm 25,8
	90'	395 \pm 30,2
15	120'	450 \pm 38,1
	180'	550 \pm 45,9
	240'	690 \pm 56,6
20	12 horas	400 \pm 29,7
	24 horas	210 \pm 7,2
	26 horas	190 \pm 3,3
25		

Los valores del umbral nociceptivo de las patas de control (patas no tratadas y controlaterales no inflamadas) fueron de aproximadamente 100-150, expresados como umbral nociceptivo o umbral de presión de la pata y evaluados en g.

La inyección intraplantar de ATP (0,9 mmoles) (el ATP extracelular es citolítico y por lo tanto posiblemente sea capaz de iniciar una señal nociceptiva), indujo una reducción del umbral nociceptivo significativamente mayor en patas no inflamadas que en patas inflamadas (valores de 120 \pm 3,2 a 25 \pm 3,0 descubiertos en patas no inflamadas, 240' después de la inyección intraplantar de ATP) en comparación con una disminución de 65 \pm 4,2 a 50 \pm 4,1 en patas inflamadas. Este resultado indica posiblemente que el ATP citolítico ya está presente en mayores cantidades en patas inflamadas que en patas no inflamadas. Por otro lado, el oATP era eficaz para elevar el umbral nociceptivo, durante un corto periodo de tiempo, también en patas no inflamadas, siendo ya eficaz a la concentración de oATP más baja (= 56 μ M). Las curvas de dosis/efecto en patas no inflamadas eran de hecho superponibles (hasta 120' después de la administración de oATP) usando diferentes concentraciones de la molécula. Para determinar si el efecto analgésico de oATP estaba relacionado en parte con la activación de células inflamatorias capaces de producir β -endorfinas endógenas, se inyectó fucoidina (10 mg/kg) por vía intravenosa a algunas ratas. La fucoidina inhibe, de hecho la diapédesis de los leucocitos y su acumulación en el sitio de inflamación. El pretratamiento con fucoidina se realizó en ambas patas, 30' antes de la inyección de FCA en una de las patas de rata. El umbral de presión de la pata (PPT) se midió en patas no inflamadas e inflamadas, antes y después de la inyección de oATP (224 μ m). Los resultados obtenidos se presentan en los gráficos de la Figura 1. La inyección de oATP no modificó de forma significativa los valores de PPT en patas no inflamadas, mientras que en patas inflamadas el tratamiento con oATP restauró los niveles de PPT que se habían reducido bruscamente mediante la inyección de FCA pro-inflamatorio. El efecto analgésico de oATP era por lo tanto independiente del reclutamiento de leucocitos.

Finalmente, la eficacia antinociceptiva del oATP se comparó con la de un conocido fármaco anti-inflamatorio y analgésico, diclofenac. Después de la evaluación del umbral del dolor basal, se indujo la inflamación unilateral de la pata trasera de ratas mediante la inyección de FCA. 3 horas después de la inyección, se dividió a los animales en dos grupos, los cuales se trataron uno localmente con oATP (336 μ M) y el otro con diclofenac (15 mg). La eficacia analgésica del oATP era significativamente mayor que la del diclofenac (los resultados de un ensayo típico se muestran en la Figura 2). Las concentraciones de oATP y diclofenac se seleccionaron para permitir buena disolución de la molécula en solución salina estéril, antes de la inyección intraplantar en ratas.

Finalmente la inyección intravenosa de oATP en ratas, a las dosis intraplantares ensayadas, indujo alivio del dolor dependiente de la dosis durante aproximadamente dos horas, aunque los reflejos parecían seguir estando presentes.

El contenido de ATP se evaluó en patas de rata tratadas con oATP y patas controlaterales no tratadas. Se retiró tejido subcutáneo de la pata de patas inflamadas y no inflamadas y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de tejido congelado se pesaron, se homogenizaron en tampón fosfato y después se trataron con K₂CO₃ se neutralizaron y finalmente se centrifugaron. Se usó el sobrenadante para ensayo de ATP, después del procedimiento de luminiscencia.

Los valores e ATP eran significativamente mayores en homogenados de patas no tratadas que en ratas tratadas con oATP (1050 \pm 90 nmoles/g de tejido fresco en animales no tratados frente a 320 \pm 22 nmoles/g de tejido fresco en animales tratados con oATP - cada valor es la media \pm D.E.M. de 7 experimentos). Esto indica que el oATP bloquea

la producción de ATP exógeno por alguna estructura tisular uniéndose a sus receptores de membrana, reduciendo de este modo el daño inducido por ATP exógeno.

Ejemplo 2

Modificación del contenido de ATP en tejidos subcutáneos periféricos después del tratamiento con ATP

- Ensayo del contenido de ATP en pata de rata

Se determinaron en un grupo diferente de ratas las modificaciones en el contenido de ATP inducidas en el tejido plantar por el proceso inflamatorio y/o mediante tratamiento con oATP. En momentos establecidos, se retiraron tejidos subcutáneos de la pata y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, con el fin de bloquear cualquier actividad metabólica. El tejido congelado se homogeneizó con un polytron (Kinematica GmbH, Luzern, Suiza) en HClO₄ al 6% (p/v) enfriado con hielo para extraer nucleótidos. El homogenado se centrifugó y el sobrenadante se usó para la determinación de ATP, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Marni y col., Transplantation (1988), 46: 830-835). El ensayo de ATP se realizó mediante el procedimiento de luminiscencia (Ferrero y col., Res Commun Chem Payh Pharmac 1984; 45: 55-67).

Resultados

Se midieron los niveles de ATP en patas inflamadas (mediante tratamiento con FCA durante 24 h) y no inflamadas tratadas con oATP, a las 6 y 12 h después de la administración de oATP, y en patas no tratadas controlaterales. Como se muestra en la figura 3, en tejidos no inflamados el tratamiento con oATP no modificó significativamente los niveles de ATP: los datos podrían expresar los niveles intracelulares del metabolito, que no se modifican significativamente mediante tratamiento con oATP. Por el contrario, los niveles de ATP en tejidos inflamados, significativamente mayores que en tejidos no inflamados, se redujeron de forma significativa mediante el tratamiento con oATP. De hecho, la liberación de ATP (ATP extracelular) de las células requiere que estén dañadas y se produce durante procesos inflamatorios u otros procesos degenerativos. La unión de oATP con los receptores situados en muchas células y también en muchas terminales nerviosas sensoriales podría bloquear de forma competitiva la unión de ATP extracelular a estas mismas estructuras, limitando de este modo la citotoxicidad relacionada con el ATP e induciendo el alivio del dolor. Los resultados indican también que el tratamiento con oATP en tejidos inflamados limita la producción adicional de ATP por células inflamatorias u otras células, posiblemente a través de un bloqueo de su activación.

Figura 3

Efecto de la inyección intraplantar de oATP sobre los niveles de ATP en patas inflamadas o no inflamadas

Contenido de ATP, a las 6 y a las 12 h después de la inyección intraplantar de oATP (35 μ M) en patas de rata: inflamadas (mediante 24 h de administración de FCA) (barras negras), inflamadas tratadas con oATP (barras con rayas oblicuas), no inflamadas (barras vacías), no inflamadas tratadas con oATP (barras con rayas horizontales). *p < 0,005 en comparación con patas no tratadas inflamadas, ensayo de Wilcoxon. Los datos se expresan como medias \pm D. E. M. de 7 experimentos.

REIVINDICACIONES

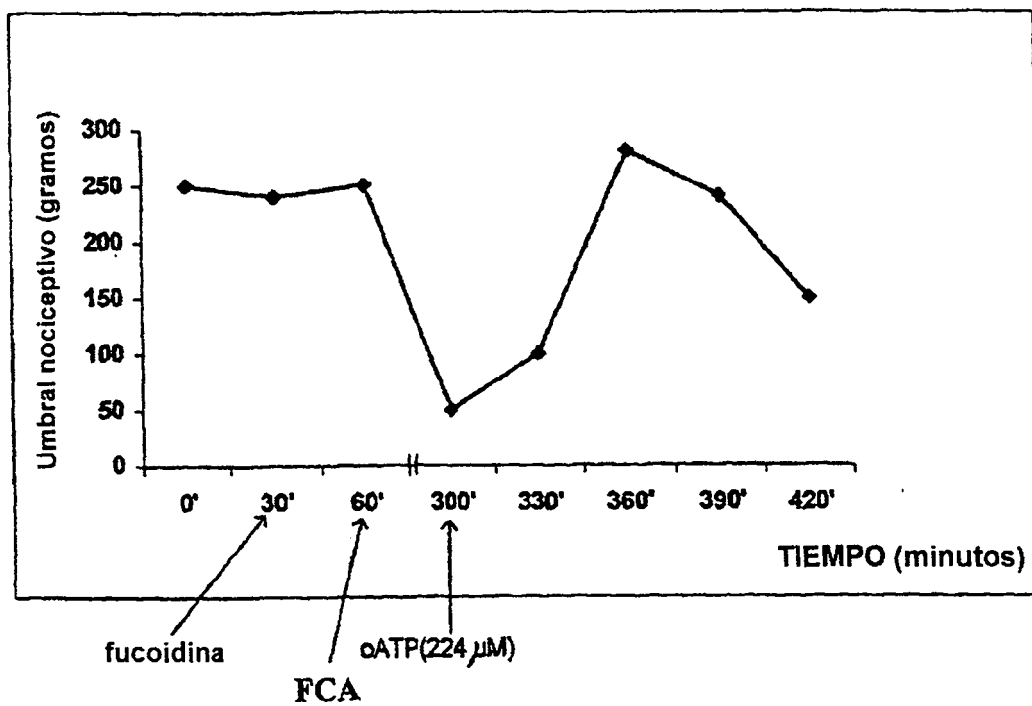
1. El uso de adenosin-5'-trifosfato-2',3'-dialdehído en la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones dolorosas.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es una forma farmacéutica adecuada para administración oral, tópica o parenteral.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se administra adenosin-5'-trifosfato-2',3'-dialdehído a una dosificación diaria que varía entre 1 y 300 mg.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha dosificación varía entre 10 y 100 mg.

Figura 1



FCA - pata sin tratar

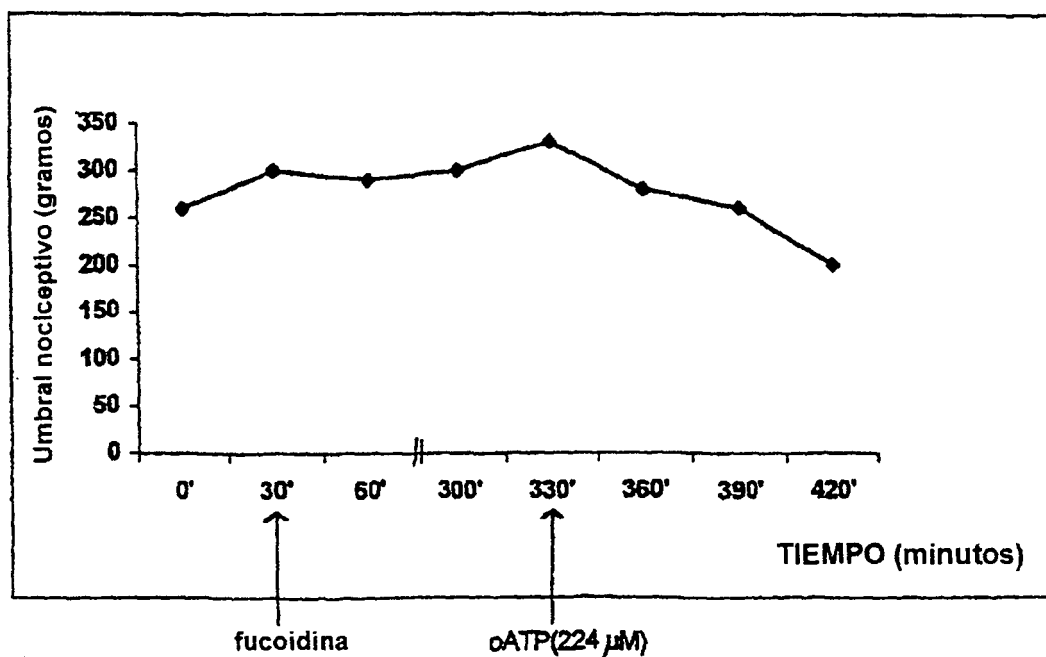


Figura 2

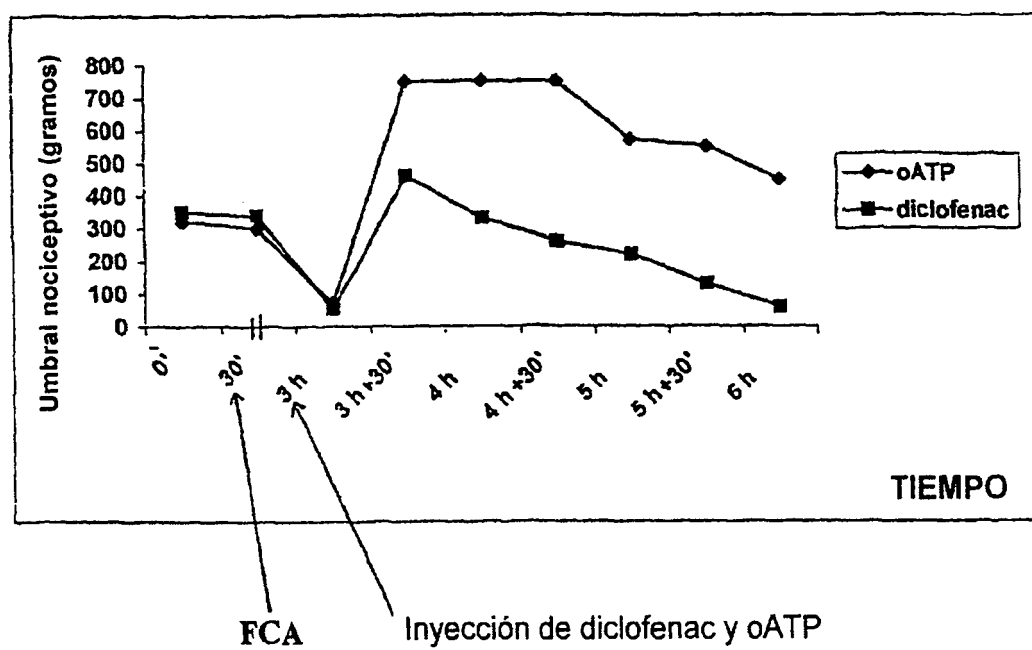


Figura 3

