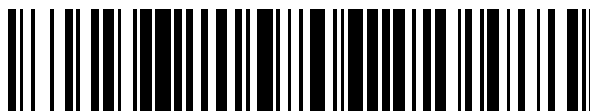


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 855**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/485 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2018** **E 18000462 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021** **EP 3403674**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para tratar el dolor**

30 Prioridad:

20.05.2017 JP 2017100431

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2021

73 Titular/es:

**FOREVER CHEER INTERNATIONAL LIMITED
(100.0%)
Unit 1405-1406, Dominion Centre 43-59, Queen's
Road East
Wan Chai, HK**

72 Inventor/es:

ZHUO, MIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 886 855 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

Composiciones farmacéuticas para tratar el dolor

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un uso novedoso de una composición farmacéutica para preparar un medicamento en el tratamiento de la adicción y tolerancia inducidas por opioides, en particular al uso del inhibidor de AC1 NB001 y los inhibidores mixtos de AC1 y 8 NB010 y NB011 para preparar un medicamento en el tratamiento

Antecedentes de la invención

El término "opiáceo" se ha usado para designar alcaloides farmacológicamente activos derivados del opio, por ejemplo, morfina, codeína y muchos congéneres semisintéticos de la morfina. Después del aislamiento de compuestos peptídicos con acciones similares a la morfina, se introdujo el término opioide para referirse genéricamente a todos los fármacos con acciones similares a la morfina. Entre los opioides se incluyen diversos péptidos que presentan actividad similar a la morfina, tales como endorfinas, encefalinas y dinorfinas. Sin embargo, algunas fuentes utilizan el término "opiáceo" en un sentido genérico y, en tales contextos, opiáceo y opioide son intercambiables. Además, el término opioide se ha usado para referirse a antagonistas de fármacos similares a la morfina, así como para caracterizar receptores o sitios de unión que se combinan con tales agentes.

Generalmente, se emplean opioides como analgésicos, a menudo se usa morfina para aliviar parte del dolor intenso, sin embargo, el uso clínico de la morfina está limitado por el desarrollo de tolerancia a los analgésicos, dependencia física y adicción. Se sabe que la administración a largo plazo de morfina puede inducir tolerancia en humanos y animales, pero no desensibiliza los receptores μ . Por el contrario, el uso a largo plazo de morfina puede conducir a hipersensibilización de la adenilil ciclasa (AC), lo que contribuye a la tolerancia a y dependencia de los opioides (Nestler, 1997; 2001a, b; 2002). Se han notificado cambios a largo plazo en la actividad de la adenilil ciclasa en varias regiones del cerebro, tales como el área tegmental ventral (VTA) y el área del núcleo accumbens (NAc) (siendo ambas críticas para consolidar el medicamento de opio) dentro del mesencéfalo, así como en el locus cerúleo y el núcleo dorsal (críticos para la abstinencia del opio) (Nestler y Aghajanian, 1997; Jolas *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Chao y Nestler, 2004).

Aunque se ha sugerido el papel de las AC en la modulación de los opioides, la falta de inhibidores específicos para definir el papel de las diferentes isoenzimas de AC ha conducido a un progreso relativamente lento en la investigación. Hasta la fecha, se han clonado genes de 10 AC, cada uno con un patrón de expresión diferente en el sistema nervioso central y el sistema nervioso sensorial periférico (Xia y Storm, 1997). Entre ellos, AC1 y AC8 se estimulan exclusivamente por Ca²⁺/calmodulina en el cerebro. AC1 y AC8 están ampliamente distribuidas en diferentes regiones del cerebro, incluyendo VTA, NAc, locus cerúleo y núcleo del rafe dorsal (Zhuo, 2012).

Además, muchos estudios han implicado a CREB en la adicción a las drogas (Guitart *et al.*, 1992; Hyman, 1996; Maldonado *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 2001). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostró un aumento de la expresión de CREB o CREB fosforilado (pCREB) en animales tolerantes a la morfina (Li *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004). Los ratones con CREB mutado mostraron síntomas de abstinencia menos graves después de que se interrumpiera el tratamiento con morfina (Maldonado *et al.*, 1996). Además, el receptor opioide M de receptor acoplado a proteína G (MOR), que esencialmente media en los efectos fisiológicos de la morfina, comprende elementos CRE y se ha demostrado que se activa por medio de la ruta mediada por CREB (Min *et al.*, 1994; Nestler, 1997. Lee *et al.*, 2003). En el sistema nervioso central, se sabe que AC1 y AC8 actúan sobre proteínas de señalización clave aguas arriba para regular CREB en neuronas (Wei *et al.*, 2002; Zhuo, 2012). A través del uso de ratones deficientes (*knockout*, KO) en AC1 y AC8, y ratones DKO, se notifica que no hay diferencia en el efecto analgésico de la morfina a corto plazo en los ratones deficientes en AC1 o AC8, o ratones DKO y ratones de tipo natural (Li *et al.*, 2006). Los ratones DKO en AC1 y 8 y los ratones deficientes en AC8 continuaron induciendo una tolerancia reducida mediante inyecciones diarias de morfina (10 mg/kg de peso corporal). En ratones DKO tratados con morfina de manera continua, el comportamiento de abstinencia se redujo significativamente (Li *et al.*, 2006). Un estudio reciente usando un inhibidor de AC1 ST034037 encontró que la actividad de AC1 requiere sensibilización de AC inducida por la activación crónica de MOR, lo que sugiere que la inhibición de AC1 puede ser beneficiosa para superar la tolerancia crónica inducida por morfina y otras respuestas (Brust *et al.*, 2017).

Durante el tratamiento del dolor mediante el uso de opioides, la disminución de la eficacia a menudo se explica por mecanismos de tolerancia farmacológica (o exacerbación de la afección original), y la dosis debe aumentarse para mantener la eficacia original. Estudios recientes han confirmado que los opioides, además de producir efectos analgésicos, también pueden activar los mecanismos *in vivo* de promoción de daño, conduciendo a un aumento de la sensibilidad corporal al dolor, concretamente, hiperalgesia inducida por opioides (OIH). El inicio de la sensibilidad al dolor se observó temprano en la respuesta de abstinencia de opioides. La evidencia más reciente sugiere que la sensibilidad al dolor también puede producirse durante el tratamiento con opioides. En otras

palabras, la interrupción de los opioides y la administración continuada de opioides dan como resultado ambas un aumento de la sensibilidad al dolor, lo que es claramente contradictorio. Por tanto, es probable que la disminución del efecto analgésico de los opioides sea el papel de OIH (el mecanismo de promoción de daño), y no solo el mecanismo de tolerancia farmacológica. Entre ellos, se producen tanto procesos de sensibilización como procesos de desensibilización. OIH tiene su mecanismo celular único que implica dinorfina endógena, sistemas glutamatérgicos y mecanismos de facilitación descendente. Curiosamente, el mecanismo de la OIH se superpone en gran medida con el mecanismo del dolor neuropático y la tolerancia a los opioides. Por ejemplo, la lesión de nervios periféricos y la administración repetida de opioides pueden activar la misma ruta celular glutamatérgica.

La disminución de la eficacia de la analgesia farmacológica durante la terapia con opioides se considera una tolerancia farmacológica o un aumento del estado de dolor existente. Por tanto, la adición de dosis de fármacos se da por sentada como la única opción para la reconstitución de los efectos farmacológicos. Sin embargo, según una evidencia contradictoria proporcionada por el instituto de investigación clínica y de laboratorio para el dolor inducido por opioides, el inventor debe reconsiderar la explicación de este fenómeno. Por un lado, si la disminución de la eficacia de los opioides está relacionada con el mecanismo de tolerancia farmacológica, entonces es obviamente irreproachable aumentar la dosis; por otro lado, si la disminución se debe a la OIH, aumentar la dosis a ciegas solo potenciará el proceso *in vivo* para promover daño, aumentando de ese modo el dolor y la tolerancia.

Por consiguiente, es significativamente importante la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos o preparaciones de combinación con el fin de prolongar el alivio del dolor de los opioides y superar la tolerancia a los analgésicos, la dependencia física y la adicción en aplicaciones clínicas.

Bibliografía de la técnica anterior

Bibliografía no de patentes

Brust *et al* (2017) Identification of a selective small-molecule inhibitor of type 1 adenylyl cyclase activity with analgesic properties. Science signaling 10.

Bibliografía de patentes

Publicación de patente estadounidense n.º US2011/0098295

Sumario de la invención

Problemas técnicos que van a solucionarse mediante la invención

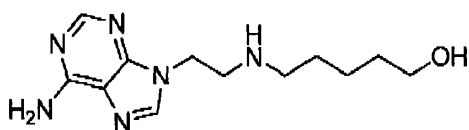
En vista de los problemas de tolerancia a los analgésicos, dependencia física y adicción de los opioides anteriormente mencionados, la presente invención se refiere al desarrollo de un medicamento novedoso o preparación de combinación para reducir o mejorar el problema de tolerancia a los analgésicos, dependencia física y adicción provocados por el uso a largo plazo de opioides, es decir, para reducir las reacciones adicionales provocadas por el uso a largo plazo de morfina y otros opioides.

Se sabe que los opioides activan la producción de AMPc en células, y el uso a largo plazo de opioides conduce a hipersensibilización de la enzima adenililo. Además, la ruta de señalización dependiente de AMPc tiene una influencia clave sobre los efectos a largo plazo relacionados con los opioides incluyendo tolerancia, dependencia y otros factores (véase Li *et al.*, 2006; Brust *et al.*, 2017).

Medios técnicos para los problemas

Para completar la invención anterior, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente en la investigación tres compuestos NB001, NB010 y NB011 de la presente divulgación que pueden usarse para reducir reacciones adicionales provocadas por el uso a largo plazo de opioides.

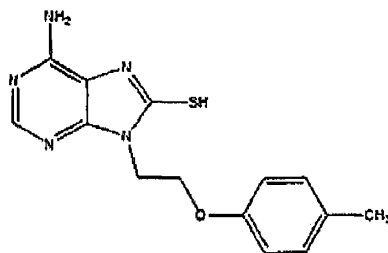
NB001 de la presente divulgación, es decir, 5-((2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etil)amino)pentano-1-ol, tiene la siguiente estructura:



5-((2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)etil)amino)pentan-1-ol

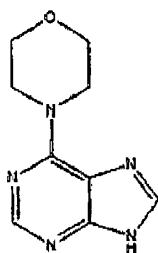
NB010 de la presente divulgación, es decir, 6-amino-9-(2-p-toliloxi-etil)-9H-purina-8-tiol tiene la siguiente estructura

química:



5 **6-Amino-9-(2-p-toliloxi-etil)-9H-purina-8-tiol**

NB011 de la presente divulgación, es decir, 4-(9H-purin-6-il)morfolina (también conocida como 6-morfolin-4-il-7H-purina) tiene la siguiente estructura química:



10 **6-Morfolin-4-il-7H-purina**

Según la presente invención, NB001 tiene un efecto potenciado sobre el efecto analgésico del uso crónico de morfina u otros compuestos opiáceos y puede reducir la tolerancia. La combinación con morfina puede reducir la dosis de morfina requerida para producir niveles similares de alivio del dolor.

El tratamiento de la presente invención puede usarse también para potenciar el efecto analgésico de la morfina y/o reducir la tolerancia a la morfina en pacientes tratados con morfina. La tolerancia a la morfina (pérdida de analgesia de la morfina) puede producirse en pacientes con el uso a largo plazo de morfina. El uso repetido de morfina a lo largo de varios días o semanas en seres humanos y animales da como resultado una reducción de la analgesia.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y los ejemplos que no se encuentran bajo estas reivindicaciones son para fines de referencia solo.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a compuestos novedosos NB010 y NB011 como inhibidores de AC1 y 8. Esto es particularmente importante porque la actividad de tanto AC1 como AC8 se ha propuesto como clave para la sensibilización inducida por opiáceos. Por consiguiente, la inhibición de la actividad de AC1 y AC8 puede ser una opción ideal para reducir la tolerancia, adicción y otros efectos inducidos por el opio. En la presente divulgación, se propone asumir el principio de acción de NB001, NB010 y NB011 porque las actividades de AC1 y AC8 se suprimen eficazmente, mientras que no todos los compuestos que inhiben AC1 y AC8 tienen los efectos de la presente divulgación.

NB010 y NB011 pueden usarse para aumentar la analgesia del uso crónico de morfina u otros compuestos opiáceos para reducir la tolerancia. La combinación con morfina puede reducir la dosis de morfina requerida para producir niveles similares de alivio del dolor.

La presente divulgación proporciona además un tratamiento de seres humanos para la tolerancia a la morfina mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la actividad de AC1 o AC1 y 8 al ser humano que lo necesita. Habitualmente, un ser humano de este tipo ha desarrollado tolerancia a la morfina durante el tratamiento del dolor crónico usando morfina. Puede usarse NB010/NB011 para reducir las reacciones aditivas provocadas por el uso a largo plazo de morfina y otros opiáceos. En el dolor crónico tal como dolor neuropático, dolor por cáncer, los pacientes pueden tomar medicamentos para el dolor durante mucho tiempo. Además, el efecto secundario del tratamiento con morfina puede ser prurito. Puede usarse NB010/NB011 para reducir la respuesta de prurito provocada por el uso crónico de morfina. Puede usarse NB010/NB011 para reducir la depresión/ansiedad emocional provocada por una lesión. Pueden usarse NB010 y NB011 para reducir el prurito que puede estar provocado por el uso crónico de opiáceos (tales como morfina) o el daño. La presente invención puede abarcar el uso de NB010 y NB011 en general para combatir el prurito.

Se sabe que tanto AC1 como AC8 están implicadas en la sensibilidad inducida por etanol (Maas *et al.*, 2005) y,

por consiguiente, pueden usarse NB010 y NB011 para tratar la adicción, sensibilidad y otros síntomas relacionados con el etanol.

Se ha notificado que AC1 y AC8 están implicadas en la sensibilización a la cocaína (DiRocco *et al.*, 2009), y por consiguiente, la presente divulgación propone el uso de NB010 y NB011 para tratar comportamientos de adicción relacionados con el uso crónico de cocaína y similares.

Los compuestos de la presente invención de la divulgación pueden estar presentes también en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Para su uso en medicina, las sales de los compuestos de esta invención se denominan "sales farmacéuticamente aceptables" no tóxicas (Ref International J. Pharm., 1986, 33, 201-217; J. Pharm. Sci., 1997 (enero), 66, 1, 1). Sin embargo, otras sales bien conocidas por los expertos en la técnica pueden ser útiles en la preparación de los compuestos según esta divulgación o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los ácidos orgánicos o inorgánicos representativos incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, perclórico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, propiónico, glicólico, láctico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, benzoico, mandélico, metanosulfónico, hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, oxálico, pamoico, 2-naftalenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, salicílico, sacarínico o trifluoroacético. Las bases orgánicas o inorgánicas representativas incluyen, pero no se limitan a, sales básicas o catiónicas tales como benzatina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaina, aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc.

La composición farmacéutica según la presente invención puede estar presente en la forma usada para administración parenteral, oral, rectal, de sustitución o transdérmica.

Por tanto, se presentarán en forma de disoluciones o suspensiones inyectables o viales de múltiples dosis en forma de comprimidos normales o recubiertos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas de obleas, cápsulas de gel, píldoras, sellos, polvos, supositorios o cápsulas rectales, para uso transdérmico en disolventes polares, o para uso fijo.

Los excipientes adecuados para esta aplicación son celulosa o derivados de celulosa microcristalina, carbonatos de metales alcalinotérreos, fosfatos de magnesio, almidones, almidones modificados y lactosa en forma sólida.

Para uso rectal, un excipiente preferido es manteca de cacao o estearato de polietilenglicol. Para uso parenteral, agua, disoluciones acuosas, solución salina fisiológica y disoluciones isotónicas son los portadores más adecuados para su uso.

También resultará evidente para un experto en la técnica que la dosis terapéuticamente eficaz para los compuestos activos de la divulgación o una composición farmacéutica de los mismos variará según el efecto deseado. Por tanto, las dosificaciones óptimas que van a administrarse pueden determinarse fácilmente y variarán con el compuesto particular usado, el modo de administración, la concentración de la preparación y el avance del estado patológico. Además, factores asociados con el sujeto particular que está tratándose, incluyendo la edad, el peso, la dieta del sujeto y el momento de administración, darán como resultado la necesidad de ajustar la dosis a un nivel terapéutico apropiado. Las dosificaciones anteriores son, por tanto, a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales donde se justifiquen intervalos de dosificación más altos o más bajos, y estos están dentro del alcance de esta divulgación.

Los compuestos de la presente divulgación pueden administrarse en cualquiera de las composiciones y regímenes de dosificación anteriores o por medio de aquellas composiciones y regímenes de dosificación establecidos en la técnica siempre que se requiera el uso de los compuestos de la presente divulgación como analgésicos para un sujeto que lo necesita.

La presente divulgación también proporciona un kit o paquete o farmacéutico o veterinario que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas y veterinarias de la divulgación. Opcionalmente asociado con tal(es) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos.

Los compuestos de la presente divulgación pueden usarse para tratar el dolor de leve a intenso en animales de sangre caliente tales como seres humanos mediante la administración de una dosis analgésicamente eficaz. El intervalo de dosificación sería de desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 15.000 mg, en particular desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 3500 mg o, más particularmente, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 1000 mg de principio activo en un régimen de aproximadamente 1 a 4 veces al día para un ser humano promedio (70 kg); aunque resulta evidente para un experto en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz para los compuestos activos de la presente divulgación variará al igual que los tipos de dolor que están tratándose.

Para administración oral, una composición farmacéutica se proporciona preferiblemente en forma de comprimidos que contienen 0,01, 10,0, 50,0, 100, 150, 200, 250 y 500 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que va a tratarse. Los ejemplos de dolor tal como se menciona en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, dolor inflamatorio, dolor mediado centralmente, dolor mediado periféricamente, dolor visceral, dolor relacionado con lesión estructural o de tejidos blandos, dolor relacionado con enfermedad progresiva, dolor neuropático y dolor agudo tal como provocado por una lesión aguda, traumatismo o cirugía y dolor crónico tal como cefalea y el provocado por afecciones neuropáticas, afecciones posteriores a un accidente cerebrovascular, cáncer y migraña.

Los compuestos de la presente divulgación también son útiles en el tratamiento del dolor provocado por osteoartritis, artritis reumatoide, fibromialgia, migraña, cefalea, dolor de muelas, quemaduras, quemaduras solares, mordedura de serpiente (en particular, mordedura de serpiente venenosa), mordedura de araña, picadura de insecto, vejiga neurogénica, hipertrofia prostática benigna, cistitis intersticial, rinitis, dermatitis de contacto/hipersensibilidad, prurito, eccema, faringitis, mucositis, enteritis, celulitis, causalgia, neuritis ciática, neuralgia de la articulación mandibular, neuritis periférica, polineuritis, dolor de muñón, dolor de miembro fantasma, íleo posoperatorio, colecistitis, síndrome de dolor posmastectomía, dolor neuropático oral, dolor de Charcot, distrofia simpática refleja, síndrome de Guillain-Barré, meralgia parestésica, síndrome de boca ardiente, neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, cefalea en racimos, cefalea migrañosa, neuropatía periférica, neuropatía periférica bilateral, neuropatía diabética, neuralgia postherpética, neuralgia del trigémino, neuritis óptica, neuritis posfebril, neuritis migratoria, neuritis segmentaria, neuritis de Gombault, neuronitis, neuralgia cervicobraquial, neuralgia craneal, neuralgia geniculada, neuralgia del glossofaríngeo, neuralgia migrañosa, neuralgia idiopática, neuralgia intercostal, neuralgia mamaria, neuralgia de Morton, neuralgia nasociliar, neuralgia occipital, eritromelalgia, neuralgia de Sluder, neuralgia esplenopalatina, neuralgia supraorbitaria, neuralgia vidiana, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cefalea sinusal, cefalea tensional, parto, alumbramiento, calambres menstruales y cáncer.

Descripción de las figuras

Figura 1. Inhibición de pre-LTP y post-LTP en ACC usando el inhibidor de AC1 y 8 NB010.

Figura 2. El efecto de la inhibición de AC1/8 por diferentes reactivos sobre pre-LTP en ACC.

Figura 3. La tolerancia a la morfina inducida por inyecciones repetidas de morfina (10 mg/kg) se redujo usando el inhibidor de AC1 NB001 (5 mg/kg).

Figura 4. NB010 y NB011 produjeron efectos significativos en la reversión de la tolerancia a la morfina.

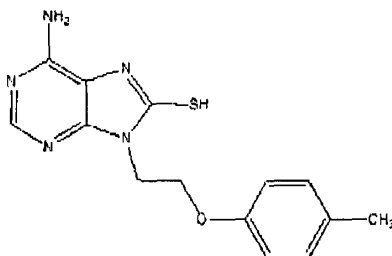
Figura 5. El resultado del experimento de preferencia de lugar condicionada.

Figura 6. El efecto de diferentes agentes sobre la ansiedad provocada por una lesión nerviosa.

Figura 7. El resultado de la prueba de respuesta al prurito.

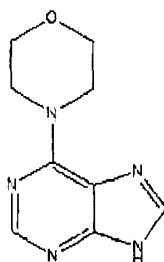
Descripción detallada de las realizaciones preferidas

NB001, 5-((2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etil)amino)pentano,-1-ol, tiene la fórmula molecular C₁₂H₂₀N₆O, y un peso molecular de 264,33. Disponible de Sigma 686301-48-4. NB010, 6-amino-9-(2-p-toliloxi-etil)-9H-purina-8-tiol tiene la siguiente estructura química:



Un producto disponible de Asinex LTD como BAS03384.

NB01 1,4-(9H-purin-6-yl)morfolina (también conocida como 6-morfolin-4-yl-7H-purina) tiene la siguiente estructura química:



Un producto disponible de la empresa Maybridge como JFD02793.

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen las fórmulas químicas indicadas se encuentran en las definiciones de compuesto A y compuesto B.

Ejemplo 1. Cribado de inhibidores mixtos de AC1 y 8

- 10 Se realizaron un conjunto de pruebas de cribado bioquímicas para buscar posibles coinhibidores de AC1 y AC8 (o denominados inhibidores de AC1 y 8). Se sometieron líneas celulares que expresan AC1 o AC8 a ensayos de AMPc, ensayos de activación génica (pCREB) y experimentos fisiológicos integrativos para cribar posibles compuestos A y B que actúan sobre AC1 y AC8. Se encontró que tanto NB010 como NB011 produjeron una inhibición significativa de la actividad de AC1 así como de AC8 a 100 μ M (véase la tabla 1). Con respecto a los métodos de prueba, véase Wang, H.S., *et al.*, Identification of an Adenylyl Cyclase Inhibitor for Treating Neuropathic and Inflammatory Pain. Science Translational Medicine, 2011. 3(65).

| Tabla 1. Efectos de NB010 y NB011 sobre la actividad de adenilil ciclasa subtipo 8 y 1 | | |
|--|----------------------------|--------------|
| | Porcentaje de inhibición | |
| | AC8 | AC1 |
| NB010 (100 μ M) | 88 \pm 2 % de inhibición | 96 \pm 4 % |
| NB011 (100 μ M) | 86 \pm 2 | 91 \pm 3 % |

Ejemplo 2. Evaluación de NB010 y NB011 sobre LTP cortical relacionada con ansiedad

- 20 Estudios previos han indicado que se requiere la actividad de AC1 y AC8 para LTP sináptica inducida por estimulación repetida (Zhuo, 2016). Para evaluar los efectos de NB010 y NB011 sobre la actividad de AC1 y AC8 en neuronas, se registraron dos formas de LTP en cortes corticales de ACC de ratones adultos.
- 25 Tal como se mencionó anteriormente, la estimulación por ráfagas θ indujo potenciación de las respuestas sinápticas durante al menos 40 min (figura 1A, n = 8 cortes). La inducción de LTP en ACC puede bloquearse mediante pretratamiento con NB010 (25 μ M) (figura 1A, n = 5 cortes). Se encontraron resultados similares con NB011 (figura 2, n = 6 cortes). En cambio, un inhibidor de AC no selectivo SQ22356 en la misma dosis no provocó una disminución significativa en pre-LTP (figura 2, n = 5). En cambio, no se bloqueó pre-LTP mediante el uso de GABA_A (25 μ M) (n = 5).

Un informe reciente para ACC (Chen *et al.*, 2014) también encontró que la GABA_A no afecta a LTP en ACC. Curiosamente, la forskolina (10 μ M) dio como resultado un ligero aumento de pre-LTP (figura 2), indicando que la activación de AC es crítica para pre-LTP. Estos hallazgos indican que tanto NB010 como NB011 pueden inhibir la actividad de AC1 y AC8 en neuronas de ratones adultos. Esto demuestra que pueden usarse NB010 y NB011 para tratar la ansiedad provocada por una lesión.

Estudios recientes han indicado que la ansiedad provocada por una lesión puede estar relacionada con pre-LTP (Koga *et al.*, 2015; Zhuo, 2016), por tanto, los presentes inventores decidieron someter a prueba el efecto de NB010 y NB011 sobre pre-LTP. Y se encontró que ambos compuestos inhiben pre-LTP (figura 1). Para el proceso detallado de la prueba, véase Koga, K., *et al.*, Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain. Neuron, 2015. 85(2): págs. 377-389.

Figura 1. Inhibición de pre-LTP y post-LTP en ACC usando el inhibidor de AC1 y 8 NB010, donde (A) se indujo post-LTP en los cortes de control (círculos negros; n = 8), mientras que se bloqueó post-LTP mediante la aplicación de disolución de NB010 (25 μ M) (n = 5); (B) se indujo pre-LTP en los cortes de control (círculos negros; n = 8); mientras que se bloqueó pre-LTP mediante la aplicación de disolución de NB010 (25 μ M) (n = 5).

La figura 2 mostró el efecto de la inhibición de AC1/8 por diferentes reactivos sobre pre-LTP en ACC. Donde los datos mostraron que la inducción de pre-LTP se potenció en los últimos 5 minutos durante 45 minutos. * indica una

diferencia significativa en comparación con el grupo de control (donde NB010 y NB011 dieron como resultado una disminución mientras que la forskolina dio como resultado un aumento).

Ejemplo 3. Efectos conductuales de los inhibidores de AC1 y de AC1 y 8 sobre la tolerancia a la morfina

En primer lugar, los presentes inventores pretendían examinar si en ratones deficientes en AC1 estará afectada la tolerancia a la morfina provocada por inyecciones repetidas de morfina. Según informes previos de los inventores, se inyectó morfina (10 mg/kg, s.c.) diariamente durante 7 días para medir la tolerancia inducida por morfina. Se encontró que, en ratones deficientes en AC1, la morfina produjo grandes efectos analgésicos significativos en comparación con ratones de tipo natural tratados con solución salina (n = 5 - 8 ratones: día 7: ratones de control, MPE 18 ± 6%, AC1 KO, 40 ± 8%; P<0,05). Estos resultados indican que la inhibición de la actividad de AC1 puede ser beneficiosa para reducir la tolerancia a la morfina. A continuación, se usó un inhibidor de AC1 selectivo NB001 (5 mg/kg, i.p.) para tratar ratones de tipo natural con morfina. Se registraron tanto las latencias de respuesta de placa caliente nociceptiva como de retirada de la cola. Se encontró que la coaplicación de NB001 produjo un efecto significativo sobre las latencias de respuesta tras el tratamiento crónico con morfina (p<0,005) (figura 3).

Estudios previos de ratones doblemente deficientes en AC1 y AC8 encontraron que la tolerancia a la morfina se redujo significativamente (Li *et al.*, 2006). Los inventores esperaban que los inhibidores de AC1 y 8 pudieran producir también efectos beneficiosos en la reducción de la tolerancia a la morfina. De manera similar, el pretratamiento con NB010 o NB011 (5 mg/kg, i.p.) produjo en ambos casos mayores efectos analgésicos significativos a los 7 días tras las inyecciones con morfina (n = 5-8 ratones, p<0,05 en comparación con el tratamiento de control en cada caso). Para métodos de prueba detallados, véase Li, S., Lee, ML, Bruchas, MR, Chan, GC, Storm, DR y Chavkin, C. (2006). Calmodulin-stimulated adenylyl cyclase gene deletion effects morphine responses. *Mol Pharmacol* 70, 1742 - 1749.

La figura 3 mostró que la tolerancia a la morfina inducida por inyecciones repetidas de morfina (10 mg/kg) se redujo usando el inhibidor de AC1 NB001 (5 mg/kg).

Por consiguiente, los inventores esperaban que tanto el inhibidor de AC1 NB001 como los inhibidores de AC1 y 8 NB010 y NB011 pudieran ser útiles para potenciar el efecto analgésico de la morfina, permitiendo de ese modo el uso repetido de morfina.

Tal como se muestra en la figura 4, NB010 y NB011 produjeron efectos significativos en la reversión de la tolerancia a la morfina a los 7 días tras la inyección de morfina (10 mg/kg) (n = 5-7 ratones). En cambio, 100 mg/kg de GABA_A no produjeron un efecto significativo (n = 6 ratones). Además, el efecto del inhibidor de AC no selectivo SQ22356 también se sometió a prueba y no se encontró un efecto significativo a la misma dosis, indicando que la inhibición selectiva de AC1/AC8 es crítica.

Para someter a prueba adicionalmente el papel de AC1/AC8 en la tolerancia a la morfina, se aplicó el activador de AC forskolina y se encontró que la morfina produjo una tolerancia más rápida en ratones (n = 3 ratones) 3 días tras la administración repetida de morfina.

Para el inhibidor de AC1 NB001 (5 mg/kg) y el inhibidor de AC1/AC8 NB010 o NB011 (5 mg/kg), la tolerancia a la morfina inducida por inyecciones repetidas de morfina (10 mg/kg) 7 días tras inyecciones repetidas de morfina se redujo. GABA_A (100 mg/kg) o SQ22356 (5 mg/kg) no produjeron ningún efecto significativo.

Para someter a prueba posibles efectos relacionados con la dosis, se aplicó el compuesto NB a una dosis inferior de 1 mg/kg; no se encontraron efectos significativos con NB001/NB010/NB011, indicando que el efecto producido estaba relacionado con la dosis.

Ejemplo 4. Preferencia de lugar condicionada (CPP) a la morfina

Se usó la preferencia de lugar condicionada (CPP) para verificar la respuesta reducida de ratones mutantes para CREB a los efectos beneficiosos de la morfina (Walters y Blendy, 2001). Posteriormente, se indujo CPP a la morfina en ratones tratados con solución salina y tratados con inhibidor. Se encontró que los ratones tratados con NB001 (5 mg/kg, i.p.) pasaron significativamente menos tiempo explorando el lado de la cámara apareado a la morfina que los ratones tratados con solución salina, indicando que AC1 desempeñaba un papel en las propiedades potenciadas de la morfina (p<0,05). No hay diferencias significativas en su preferencia inicial por cualquier lado de la cámara. Para los métodos de prueba detallados, véase Walters CL, Blendy JA (2001). Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *J Neurosci* 21:9438-9444.

Para el experimento de preferencia de lugar condicionada de la morfina, los inventores encontraron que NB001 provocó una reducción significativa en la preferencia inducida por la morfina. Tanto NB010 como NB011 (5 mg/kg) son similares a NB001 (figura 5). En cambio, un inhibidor de AC no selectivo SQ22356 en la misma dosis no produjo ninguna inhibición (figura 5). Indicaba que la inhibición de AC1 /AC8 es selectiva. El efecto de GABA_A

a 100 mg/kg también se sometió a prueba. Como resultado mostrado en la figura 5, se usó repetidamente morfina (10 mg/kg) para inducir comportamiento de preferencia de lugar después de 9 días, y los efectos de la aplicación del inhibidor de AC1 NB001, el inhibidor de AC1/8 NB010 o NB011 (5 mg/kg) fueron significativos. GABAentina (100 mg/kg) o SQ22356 (5 mg/kg) no produjeron ningún efecto significativo.

5

Además, los resultados de la prueba también mostraron (no mostrado en la figura) que, cuando la dosis de NB001/NB010/NB011 se redujo hasta 1 mg/kg, no se produjo el efecto esperado, de modo que el efecto de NB001/NB010/NB011 era dependiente de la dosis ($n = 3 - 5$ ratones).

10 Forskolina (5 mg/kg) no produjo ningún efecto inhibitor, y los resultados también mostraron un ligero aumento en el tiempo de selección ($n = 3$ ratones).

Ejemplo 5. Prueba de comportamiento de ansiedad

15 Tal como se mencionó anteriormente, los inventores encontraron que la lesión nerviosa provocaba comportamiento de ansiedad en la prueba de EPM (Koga *et al.*, 2015; véase la figura 6). Los inventores examinaron por tanto si NB010 o NB011 pueden reducir la ansiedad y otros comportamientos, puesto que ambos inhibidores previenen la pre-LTP relacionada con la ansiedad. Tal como se esperaba, NB010 o NB011 (5 mg/kg) produjeron una reducción significativa en las respuestas de ansiedad provocadas por lesión nerviosa ($P < 0,05$ en cada caso, $n = 6$ ratones para cada agente) (véase la figura 6).

20

A dosis inferiores (1 mg/kg), NB010 (véase la figura 6) no disminuyó significativamente. Se obtuvo un resultado similar con NB011 de 1 mg/kg. Ni GABAentina (100 mg/kg, i.p.) ni SQ22356 (5 mg/kg) redujeron significativamente la ansiedad conductual (figura 3). El uso de forskolina (5 mg/kg) no aumentó adicionalmente la ansiedad, lo que

25

Para métodos experimentales detallados, véase Koga, K., *et al.*, Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain. *Neuron*, 2015. 85(2): págs. 377-389.

30 La figura 6 muestra el efecto de diferentes agentes sobre la ansiedad provocada por lesión nerviosa. El uso del inhibidor de AC1 y 8 NB010/NB011 (5 mg/kg, i.p.) redujo la ansiedad provocada por lesión nerviosa (7 días después de la lesión). A dosis bajas de 1 mg/kg, ni NB010 ni NB011 afectaron a la ansiedad. El uso de GABAentina (100 mg/kg) o SQ22356 (5 mg/kg) no tuvo un efecto significativo. Se usó la prueba de EPM en este ejemplo para evaluar el estado de ansiedad.

35

Respuesta de prurito

Se sabe bien que el prurito está provocado a menudo por una variedad de enfermedades, incluyendo el uso crónico de opioides. Para evaluar si la inhibición de AC1 y AC8 puede reducir la respuesta de prurito, los inventores

40 evaluaron el efecto de NB010 y NB011 sobre la respuesta de prurito conductual a la inyección del compuesto A. Un método de prueba específico se refiere a la publicación de patente estadounidense n.º US20110098295 A1, y como resultado, se encontró que las respuestas de rascado totales inducidas por la inyección intradérmica de compuesto 48/80 (100 μ g/50 μ l) se redujeron significativamente en ratones que recibieron la inyección de pretratamiento con NB010 o NB011 ($n = 6$ ratones) en comparación con ratones de tipo natural ($n = 7$) (figura 7).

45 La aplicación de GABAentina (100 mg/kg) no provocó una reducción significativa en la respuesta de prurito (figura 7). SQ22356 tampoco mostró una reducción significativa a la dosis sometida a prueba (5 mg/kg, i.p.). En cambio, la aplicación de forskolina (5 mg/kg) potenció significativamente la respuesta de prurito conductual (figura 7).

La figura 7 muestra el efecto de diferentes agentes que afectan a la ruta de AMPc sobre las respuestas de prurito conductuales en ratones. La aplicación de NB010 o NB011 redujo significativamente la respuesta de prurito inducida por el compuesto que libera histamina 40/80 en ratones adultos. En cambio, ni GABAentina ni SQ22356 producen ningún efecto significativo. La forskolina es un activador de AC que potencia significativamente la respuesta de prurito. * $P < 0,05$ en comparación con el control.

Animales experimentales

Se criaron ratones KO en AC1 y AC8, véase Wei F, Qui CS, Kim SJ, *et al.* Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclase. *Neuron*. 2002; 36(4): 713-726, durante varias generaciones (F8 - F12) con antecedentes C57B1/6. Los ratones de tipo natural (WT) de control fueron ratones

60 CS7B1/6 macho adultos (8 - 12 semanas de edad) de Charles River. Al final del experimento, se trataron los animales con una inhalación en exceso de anestésico (halotano). Los animales se alojaron en un ciclo de luz: oscuridad de 12 h: 12 h con alimento y agua disponibles a voluntad.

Pruebas de cribado bioquímicas para determinar inhibidores novedosos para AC8 y AC1

65

Para la transfección del vector de expresión de AC8 pcDNA3-AC1, se sembraron en placa células HEK293 sobre

una placa Petri de 60 mm de diámetro a una densidad de 1×10^6 por placa, se hicieron crecer durante la noche y se transfectaron con pcDNA3-AC1 (0,8 µg de ADN por placa) mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se seleccionaron clones transfectados estables y se mantuvieron en medios que contenían G418 0,8 mg/ml (Invitrogen, CA). Para la expresión transitoria de otras isoformas de AC en células HEK293, se sembraron las células HEK293 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se transfectaron con plásmido AC5 respectivamente, y se sometieron al experimento 48 horas después de la transfección.

Se recogieron células HEK293 que expresan AC y se lisaron en HCl 0,1 M después de diferentes tratamientos. Se realizaron mediciones directas de AMPc usando un kit de inmunoensayo enzimático directo de AMPc (Assay Designs, MI) y se midieron los valores de densidad óptica a 405 nm mediante un lector de microplacas. Se inhibió la fosfodiesterasa mediante la adición de 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (Sigma, MO) a los cultivos.

Ensayo de gen indicador de CRE luciferasa

Se subcultivaron células HEK293 en placas de 96 pocillos en ausencia de antibióticos y se hicieron crecer durante la noche, y se transfectaron con constructos de pGL3-CRE luciferasa de luciérnaga y pGL3-CMV-luciferasa adrenérgica (0,25 µg de ADN por pocillo) mediante el reactivo Lipofectamine 2000.

Las células transfectadas se incubaron durante la noche y se cambió el medio a DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10%. Después de 48 horas, se trataron las células con forskolina 10 µM, A23187 10 µM y CaCl₂ 2 mM, o una combinación de forskolina 10 µM, A23187 10 µM y CaCl₂ 2 mM, en ausencia o presencia de cada sustancia química sometida a prueba a la concentración de 100 µM. Al final de 6 horas, se recogieron las células cultivadas y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa mediante el sistema de ensayo de indicador de luciferasa doble (Promega). Se midieron las unidades de luz relativas usando un luminómetro SIRIUS.

Registro de fijación de voltaje de células completas

Se prepararon secciones coronales de cerebro (300 µm) a nivel de ACC usando métodos convencionales (Wu *et al.*, 2005). Las secciones se transfirieron a una cámara de recuperación por inmersión que contenía oxígeno (el 95% de O₂ y el 5% de CO₂) y líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) (que contenía en mM: NaCl 124, KCl 2,5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄ 1, glucosa 10) a temperatura ambiente durante al menos 1 hora. Se realizaron los experimentos en una cámara de registro sobre una platina de un microscopio BX51W1 equipado con óptica DIC de infrarrojos para la visualización. Se registraron las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) a partir de neuronas de la capa II/III con un amplificador Axon 200B (Axon Instruments, CA), y se suministraron las estimulaciones mediante un electrodo de estimulación de tungsteno bipolar colocado en la capa V del ACC. Se indujeron EPSC mediada por receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metiloxazol-4-propiónico (AMPA) mediante estimulaciones repetidas a 0,05 Hz y se realizó la fijación de voltaje de las neuronas a -70 mV en presencia de AP5 (50 µM). Se llenaron las pipetas de registro (3-5 MΩ) con una disolución que contenía (en mM): gluconato de K 145, NaCl 5, MgCl₂ 1, EGTA 0,2, HEPES 10, Mg-ATP 2, Na₃-GTP 0,1 y fosfocreatina disódica 10 y se ajustó a pH 7,2 con KOH. Se usó la disolución interna (en mM: metanosulfonato de cesio 140, NaCl 5, EGTA 0,5, HEPES 10, MgATP 2, Na₃GTP 0,1, espermina 0,1, bromuro de QX-314 2 y fosfocreatina disódica 10 (ajustada a pH 7,2 con CsOH) en la rectificación del experimento de transmisión mediada por receptor de AMPA. Para los registros de EPSC en miniatura (mEPSC), se añadió TTX 0,5 µM en la disolución de perfusión. Estaba siempre presente picrotoxina (100 µM) para bloquear las corrientes sinápticas inhibitoras mediadas por receptor de GABAA en todos los experimentos. La resistencia de acceso fue de 15-30 MΩ y se monitorizó a lo largo de todo el experimento. Se descartaron los datos si la resistencia de acceso cambió en más del 15% durante el experimento. Se filtraron los datos a 1 kHz, y se digitalizaron a 10 kHz.

Experimento de preferencia de lugar condicionada

Se usó una cámara con dos entornos contextuales distintos (paredes, suelo y olor diferentes) (MED-associates, St. Albans, VT). El primer día de la prueba, se permitió a los animales explorar libremente ambos lados de la cámara durante 30 minutos y se usaron los datos para dividir a los animales en grupos de sesgo aproximadamente igual. Durante los siguientes ocho días, a cada animal se le administraron 10 mg/kg de morfina o un volumen equivalente de solución salina en días alternos en diferentes lados de la cámara. Los animales se confinaron en un lado específico de la cámara durante 30 minutos. Después del condicionamiento, se inyectó solución salina a todos los animales y se les permitió explorar libremente ambos lados de la cámara durante 30 minutos. La preferencia de lugar se definió como un aumento en el tiempo pasado en el lado apareado a la morfina después del condicionamiento en comparación con anteriormente.

Modelo de dolor neuropático

Se indujo un modelo de dolor neuropático conectando un nervio peroneo común (NPC) tal como se describió anteriormente (Li *et al.*, 2010). Brevemente, los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de una mezcla salina de ketamina (0,16 mg/kg; Bimeda-MTC) y xilazina (0,01 mg/kg; Bayer). El CPN era visible entre los

grupos de músculos anterior y posterior que discurren casi transversalmente. El CPN crónico se conectó lentamente a la sutura crómica intestinal 5-0 (Ethicon) hasta que la contracción de los dorsiflexores del pie fue visible como espasmos de los dedos. La prueba de alodinia mecánica se realizó el 3º, 7º y 14º día postoperatorio. El experimento se realizó con ocultamiento e individuos diferentes fueron responsables de la cirugía y las mediciones de la sensibilidad mecánica de los ratones.

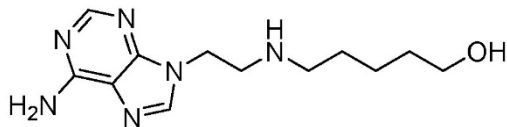
Prueba de alodinia mecánica

Los ratones se colocaron en un recipiente circular y se adaptaron durante 30 minutos antes de la prueba. La alodinia mecánica se evaluó basándose en la capacidad de respuesta de las patas traseras a la aplicación de filamentos de von Frey (Stoelting) en el punto de flexión. Las respuestas positivas incluyeron lamer, morder y retirar repentinamente las patas traseras. Se realizaron experimentos para caracterizar el estímulo umbral. Se encontró que la presión mecánica (fuerza, 0,008 g) de 1,65 filamentos era inocua en ratones sin tratamiento previo. Este filamento se usó luego para someter a prueba la alodinia mecánica.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la siguiente estructura:

[Fórmula química 1]

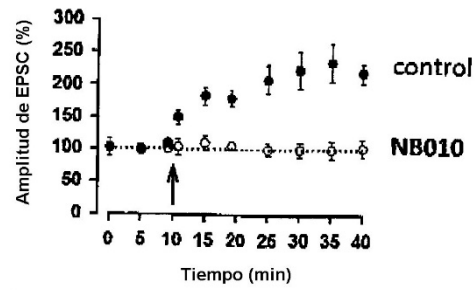


5-((2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etil)amino)pentan-1-ol

o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo como inhibidor de adenilil ciclasa 1 (AC1) para su uso en la potenciación de un efecto analgésico de un opioide o la reducción de la tolerancia asociada con el uso del opioide.

2. Compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que el opioide es morfina.

A post-LTP



B pre-LTP

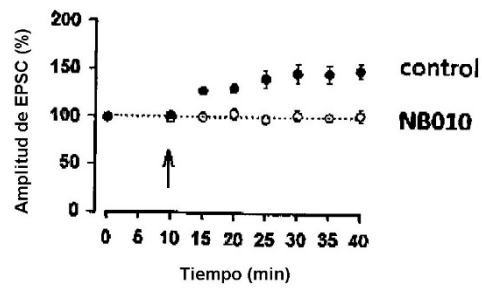


Fig.1

LTP relacionada con ansiedad

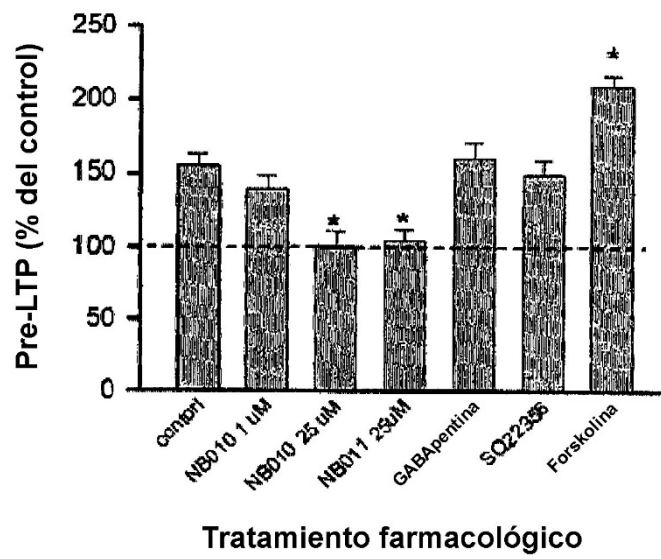


Fig.2

Prueba de tolerancia a la morfina

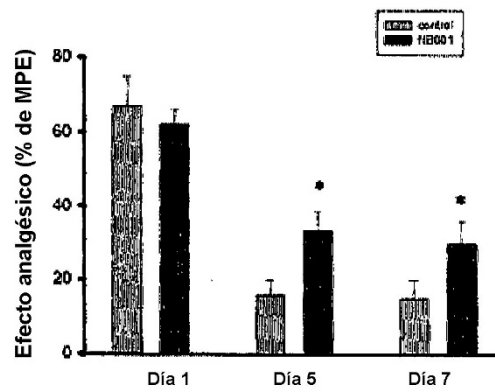


Fig.3

Prueba de tolerancia a la morfina

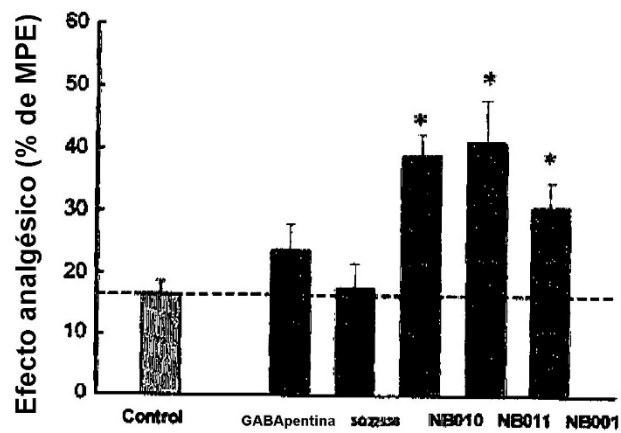


Fig.4

Preferencia de lugar

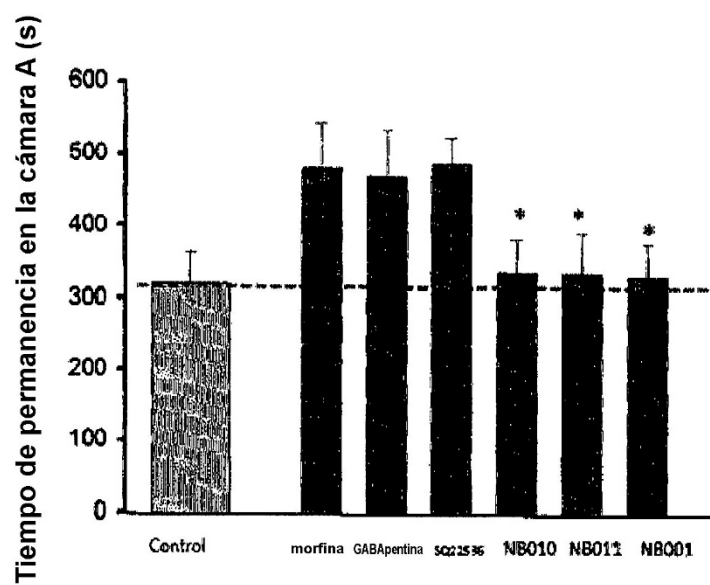
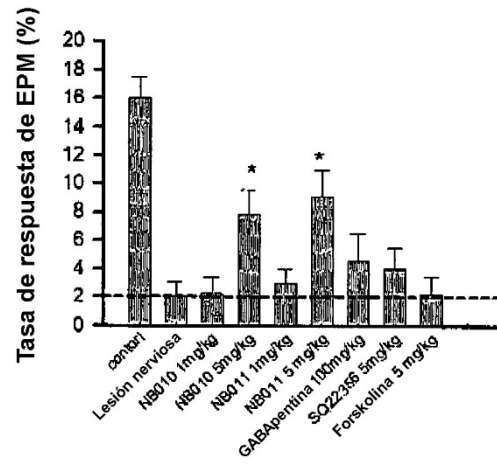


Fig.5

Prueba de ansiedad inducida por lesión nerviosa



Tratamiento farmacológico

Fig.6

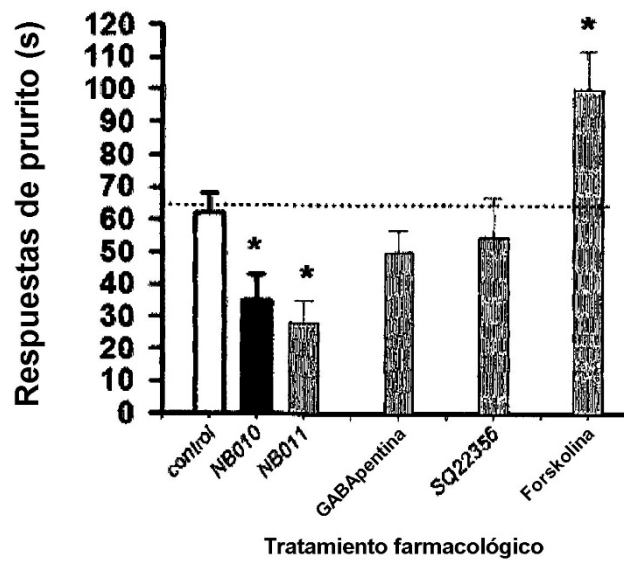


Fig.7