



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 292**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/221 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02728055 .1**
(86) Fecha de presentación : **24.05.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1399141**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

(54) Título: **Uso de acetil L-carnitina para la preparación de un medicamento para la terapia preventiva contra el dolor posquirúrgico.**

(30) Prioridad: **29.05.2001 IT RM01A0293**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.**
Viale Shakespeare, 47
00144 Roma, IT

(72) Inventor/es: **Calvani, Menotti y**
Mosconi, Luigi

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Uso de acetil L-carnitina para la preparación de un medicamento para la terapia preventiva contra el dolor posquirúrgico.

La presente invención se refiere al uso de acetil L-carnitina para la preparación de un medicamento que tiene actividad analgésica, para la terapia preventiva contra el dolor posquirúrgico.

Mediante analgesia se quiere decir una dolencia donde el estímulo del dolor presente en el cuerpo no se percibe como dolor.

Un analgésico es un medicamento capaz de producir analgesia, es decir, desaparición del dolor, interfiriendo con la percepción del estímulo nociceptivo sin inducir anestesia o pérdida de la consciencia.

La administración de un medicamento antes de que el dolor empiece se llama terapia preventiva contra el dolor o analgesia presintomática.

Mediante analgesia presintomática se quiere decir una estrategia terapéutica que implica la administración precoz de una sustancia antes del hecho doloroso, capaz de bloquear el estímulo de dolor antes de que alcance el sistema nervioso central, previniendo de esta manera la respuesta facilitadora producida mediante la entrada nociceptiva en la médula espinal.

Merece que se mencione que la eficacia de un medicamento analgésico presintomático no solo depende del tiempo cuando se realiza el paso de administración antes del hecho doloroso, sino también de la capacidad real del medicamento para prevenir alteraciones de los mecanismos de la sensibilización relacionados con el dolor.

Por lo tanto, este concepto clarifica que la eficacia de una sustancia depende en que sea administrada antes del comienzo del estímulo nociceptivo.

La propiedad analgésica presintomática de la acetil L-carnitina no es conocida, aunque se ha estudiado su actividad antiálgica en neuropatía periférica de etiología diferente. Esta supuesta actividad antiálgica se atribuyó a la acción neurotrófica de la sustancia, esto es, su capacidad de proteger el nervio periférico y/o estimular su regeneración.

Tal uso de la acetil L-carnitina se describe en Clin. Drug Invest. 10(6): 317-322 de 1995. En el mismo estudio, el efecto antiálgico de la sustancia también se menciona, pero los resultados no son significativos desde el punto de vista estadístico. Por lo tanto, tal uso de la acetil L-carnitina difiere del uso propuesto en la presente invención, ya que en la anterior no se identifica ningún efecto analgésico de dicha sustancia.

La actividad de la acetil L-carnitina sobre el dolor en pacientes con neuropatías periféricas se describe en Int J. Clin. Pharm. Res. XV(1): 9-15 de 1995 con resultados estadísticamente significativos.

Este estudio también difiere de la presente invención, ya que concierne al dolor neuropático y la aproximación terapéutica intervencionista, más que presintomática (bloqueo de la entrada de dolor) o preventiva (antes del comienzo del dolor) según se describe en la presente invención.

En Exp. Gerontol. 29(5): 569-574; 1994 el uso de la acetil L-carnitina en ratas sometidas a estrés por agua fría para estudiar los mecanismos mediados por eje hipotálamo-pituitaria-corteza adrenal en la analgesia inducida por dicho estrés.

Comparando ratas jóvenes y viejas, este trabajo divulga la capacidad de la acetil L-carnitina para mantener una respuesta eficiente al estrés en las ratas viejas a través de un mecanismo unido a la ralentización de la pérdida de los receptores de glucocorticoides localizados en el hipocampo dependiente de la edad, favoreciendo así el envejecimiento positivo de las estructuras celulares en términos de mantenimiento y función.

Los trabajos mencionados anteriormente describen la actividad antiálgica de la acetil L-carnitina y su capacidad de ralentizar el proceso de envejecimiento, pero ni describen ni sugieren el uso de la acetil L-carnitina como un compuesto analgésico, particularmente como un analgésico presintomático.

Drogas para el tratamiento preventivo del dolor son ya conocidas.

La indometacina es activa en la prevención o reducción del dolor posquirúrgico en pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas. Los efectos secundarios de este compuesto son: ulceraciones individuales o múltiples el tracto gastrointestinal superior y dolor de cabeza frontal (Goodman y Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, editores: McGraw-Hill, 1997).

La clonidina y la ketamina, que son compuestos utilizados como analgésicos presintomáticos, producen efectos adversos, tales como sedación, anestesia e inmovilidad (Goodman y Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, editores: McGraw-Hill, 1997).

ES 2 290 292 T3

En el campo médico, hay una gran necesidad de medicamentos dotados de actividad analgésica, que puedan ser útiles en el tratamiento preventivo del dolor y no presenten las desventajas de los medicamentos mencionados anteriormente.

Se ha encontrado ahora que la acetil L-carnitina posee actividad analgésica y se puede utilizar como un agente útil para la terapia preventiva del dolor posquirúrgico.

En particular, el compuesto según la presente invención se usa como un medicamento analgésico presintomático para la terapia del dolor posquirúrgico.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la acetil L-carnitina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para la terapia preventiva del dolor posquirúrgico.

Mediante sal farmacéuticamente aceptable de la acetil L-carnitina se quiere decir cualquier sal de la misma con un ácido que no da lugar a efectos tóxicos adversos. Estos ácidos son bien conocidos para los farmacólogos y expertos en farmacia.

Ejemplos no limitantes de estas sales son: cloruro, bromuro, orotato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, mucato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato ácido, glucosa fosfato, tartrato, tartrato ácido, tartrato de magnesio, 2-aminoetanosulfonato, 2-aminoetanosulfonato de magnesio, tartrato de colina y tricloroacetato.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

El perfil antinociceptivo de la acetil L-carnitina se evaluó en ratones llevando a cabo dos ensayos tradicionales de analgesia, tales como el ensayo de la placa caliente (estímulo termal) y el ensayo de la constricción abdominal (estímulo químico), y algunos modelos experimentales de hiperalgesia inducida mediante:

- administración intraperitoneal (IP) de una solución de ácido acético al 0.3% y al 0.6%;
- síndrome de abstinencia de morfina;
- administración de ácido kaínico (20 mg/kg, IP);
- administración de N-metil-D-aspartato (1.64 μ g/ratón intratecal);

El primer experimento fue el ensayo de la placa caliente.

Se utilizaron ratones macho Swiss Webster que pesaban entre 22 y 30 g.

El ensayo se llevó a cabo según O'Callaghan y Holtzman en J. Pharmacol. Exp. Ther. 197: 533-537, 1976.

Según este ensayo, se debe colocar un contenedor de acero inoxidable al baño maría a una temperatura de 52.5°C.

El ratón se retiró de la placa caliente inmediatamente después del primer signo de estímulo doloroso. El tiempo máximo de latencia registrado en la placa caliente fue de 45 segundos.

Los valores de analgesia se determinaron a intervalos de 15 minutos.

Los datos de la Tabla 1(A) muestran que la administración subcutánea (SC) aguda de acetil L-carnitina a una dosis de 100 mg/kg no ejerció ningún efecto protector.

ES 2 290 292 T3

TABLA 1(A)

Tratamiento agudo SC

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica (SF)	13.6±1.6 (20)	14.7±1.5 (20)	13.1±1.8 (20)	14.5±1.6 (20)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg	13.9±0.7 (30)	17.3±1.7 (30)	16.8±1.2 (30)	15.2±1.7 (30)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

Los datos de la Tabla 1(B) referidos a los animales tratados con acetil L-carnitina a una dosis de 100 mg/kg, dos veces al día (BID), SC durante 7 días muestran un efecto nociceptivo estadísticamente significativo.

TABLA 1(B)

Tratamiento subcrónico de 7 días (SC)

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	16.4±1.6 (20)	17.5±1.5 (20)	15.3±1.9 (20)	14.9±2.1 (20)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	21.8±1.1 [^] (41)	22.1±1.8 [^] (41)	22.5±1.9 [^] (41)	22.2±1.7 [^] (41)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

[^]p<0.05 comparado con el grupo tratado con SF.

Cuando la acetil L-carnitina se administró durante 14 días, no afectó a la intensidad del efecto antinociceptivo, que fue el mismo que después de 7 días, pero el ensayo no tuvo éxito en ser estadísticamente significativo, porque el estrés causado por las administraciones repetidas (dos inyecciones/día durante 14 días) hicieron aumentar el umbral de tolerancia de las ratas control en algunos segundos, Tabla 1(C).

ES 2 290 292 T3

TABLA 1(C)

Tratamiento subcrónico de 14 días (SC)

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	18.7±1.7 (7)	19.1±2.2 (7)	17.9±2.4 (7)	18.0±2.0 (7)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	22.4±1.4 (27)	22.1±2.7 (27)	22.5±2.1 (27)	23.4±2.9 (27)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

La acción antinociceptiva de la acetil L-carnitina persistió incluso 7 días después de la última de una serie de inyecciones durante 14 días a una dosis de 100 mg/kg BID, SC, Tabla 1(D).

TABLA 1(D)

7 días después del tratamiento de 14 días

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	14.0±1.2 (7)	15.1±2.0 (7)	13.8±2.5 (7)	13.0±2.1 (7)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	19.2±1.6 [^] (12)	21.1±1.9 [^] (12)	18.5±1.8 (12)	19.0±2.3 (12)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

[^]p<0.05 comparado con el grupo tratado con SF.

En este caso, el umbral de dolor de las ratas control volvió a los valores iniciales y, por lo tanto el aumento en la latencia de la lamedura se encontró que era de nuevo estadísticamente significativo.

En el mismo ensayo, la acetil L-carnitina no afectó al umbral de dolor después de 1-8 horas de una administración individual de 100 mg/kg SC, Tabla 2.

ES 2 290 292 T3

TABLA 2

Tratamiento SC

Placa caliente							
Latencia de lamedura (seg)							
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento					
		1h	2h	3h	4h	6h	8h
Solución fisiológica	14.1 ±1.0 (8)	14.9 ±1.7 (8)	13.7 ±1.9 (8)	13.8 ±1.4 (8)	14.0 ±1.6 (8)	13.3 ±1.5 (8)	14.6 ±2.1 (8)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg	14.5 ±0.9 (12)	15.8 ±2.2 (12)	14.7 ±1.5 (12)	15.6 ±1.9 (12)	14.1 ±2.0 (12)	15.2 ±1.9 (12)	14.9 ±1.6 (12)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

La acetil L-carnitina, a una dosis de 30 mg/kg, SC, no tuvo efecto analgésico en ratones durante el ensayo de la placa caliente, tanto después administración aguda (Tabla 3(A)), como de administración de 30 mg/kg BID SC durante 7 días (Tabla 3(B)).

TABLA 3(A)

Tratamiento agudo SC

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	13.4±1.1 (10)	14.3±1.3 (10)	14.1±1.7 (10)	15.1±1.9 (10)
Acetil L-carnitina 30 mg/kg	14.2±0.9 (15)	15.8±1.8 (15)	16.5±2.0 (15)	15.0±2.1 (15)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

TABLA 3(B)

Tratamiento subcrónico de 7 días (SC)

Placa caliente				
Latencia de lamedura (seg)				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	17.1±1.2 (10)	17.5±1.9 (10)	16.6±1.8 (10)	15.9±2.1 (10)
Acetil L-carnitina 30 mg/kg BID	15.8±1.3 (16)	16.3±2.1 (16)	17.3±1.9 (16)	15.2±1.5 (16)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

ES 2 290 292 T3

Ejemplo 2

El segundo experimento fue el ensayo de constricción abdominal.

Se utilizaron ratones machos Swiss Webster con un peso de entre 22 g y 30 g.

El ensayo de constricción abdominal se llevó a cabo según Koster *et al.* en Fed. Proc. 18: 412, 1959.

Según este ensayo, se debe dar una inyección IP de una solución de ácido acético al 0.6% 5 minutos antes de empezar la observación, que duró 10 minutos.

En algunos experimentos, el porcentaje de ácido acético se redujo a la mitad (0.3%).

Cuando se llevó a cabo el ensayo de constricción abdominal utilizando una solución de ácido acético al 0.6%, se necesitaron 14 días de tratamiento antes de que la acetil L-carnitina ejerciera un efecto antinociceptivo (100 mg/kg BID, SC o IP), mientras que tanto la administración aguda (SC o IP), como la repetida durante 7 días, siempre a la misma dosis, no tuvieron ningún efecto (Figura 1).

Por lo tanto, fue necesaria una administración de 14 días para obtener analgesia en este ensayo particular que implica un dolor abdominal intenso.

Cuando las contracciones abdominales se indujeron mediante ácido acético al 0.3%, la significancia estadística de la acetil L-carnitina (100 mg/kg BID, IP o SC) se alcanzó después de un tratamiento de 7 días (Figura 2).

De modo similar a lo observado en el ensayo de la placa caliente, la acetil L-carnitina a una dosis de 30 mg/kg IP (o SC) no tuvo ningún efecto incluso después de un tratamiento de 18 días en presencia de ácido acético al 0.6% (Figura 3). A diferencia de lo que ocurría en el ensayo de la placa caliente, la significancia estadística se obtuvo después de 14 días en presencia de una concentración pequeña de ácido acético (Figura 4).

Tanto en el ensayo de la placa caliente (Tabla 4(A)) como en el ensayo de constricción abdominal (0.3% y 0.6%) (Tabla 4(B) y (C)), no se observó aumento en el umbral de dolor en aquellos ratones que recibieron soluciones de acetil L-carnitina (3 mg/ml) disuelta en una botella durante 7 y 14 días.

TABLA 4(A)

Tratamiento subcrónico de 7-14 días

Placa caliente			
Latencia de lamedura (seg)			
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	
		7 días	14 días
Solución fisiológica	14.4±1.0 (15)	16.6±1.9 (15)	17.2±2.2 (15)
Acetil L-carnitina 3 mg/ml en el agua de beber	13.8±0.8 (15)	17.8±2.3 (15)	18.8±2.5 (15)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

ES 2 290 292 T3

TABLA 4(B)

Número de constricciones (ácido acético al 0.6%)		
Tratamiento subcrónico		
	7 días	14 días
Solución fisiológica	33.1±3.6 (10)	25.8±4.8 (10)
Acetil L-carnitina 3 mg/ml en el agua de beber	31.5±4.0 (6)	28.3±5.1 (6)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

TABLA 4(C)

Número de constricciones (ácido acético al 0.3%)		
Tratamiento subcrónico		
	7 días	14 días
Solución fisiológica	14.5±2.6 (10)	12.7±3.4 (10)
Acetil L-carnitina 3 mg/ml en el agua de beber	12.7±3.5 (6)	11.9±2.2 (6)

Los valores son medias ± error estándar

El número de animales se da entre paréntesis.

En este caso, se debe considerar que la cantidad de solución bebida por los ratones tratados fue aproximadamente la mitad de la cantidad normal de agua bebida por ratones del mismo peso.

Ejemplo 3

La analgesia inducida por la acetil L-carnitina (100 mg/kg BID, SC durante 7 días) se determinó en presencia de algunos antagonistas de algunos sistemas de neurotransmisión implicados profundamente en la regulación del umbral de dolor, y en particular la naxolona (antagonista opioide), el CGP-35348 (antagonista de GABA_B) y la alpha-metil-p-tirosina (inhibidor de la síntesis de catecolaminas).

Estos compuestos no fueron capaces de antagonizar la analgesia inducida por la acetil L-carnitina (Tabla 5).

De acuerdo con los procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, las dosis utilizadas para cualquier antagonista fueron el mínimo requerido para prevenir la analgesia inducida por morfina (7 mg/kg SC) (1, 100 y 200 mg/kg IP), baclofeno (4 mg/kg SC) y anfetamina (1 mg/kg SC) (datos no presentados) respectivamente.

Según estos experimentos, fue posible excluir que los sistemas opioide, GABAérgico y catecolaminérgico/serotonérgico estuvieran implicados en la analgesia inducida por el compuesto en cuestión.

Por el contrario el tratamiento con compuestos que tienen acción anticolinérgica, tales como: atropina (antagonista muscarínico no selectivo), S-(-)-ET-126 (0.1 µg/ratón ICV) (antagonista selectivo de M₁), pirenzepina (0.1 µg/ratón ICV) (antagonista selectivo de M₁) y hemicolinio-3 (HC-3) (0.1 µg/ratón ICV) (reductor de acetilcolina mediante el bloqueo de la retoma de colina) se encontraron capaces de antagonizar el aumento del umbral de dolor inducido mediante la acetil L-carnitina (Tabla 5).

TABLA 5

Placa caliente					
Latencia de lamedura (seg)					
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Después del tratamiento	Después del tratamiento
Pre-trat.	Tratamiento		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica 10 mg/kg	Solución fisiológica (SF)	15.6±0.9	14.7±1.5	14.9±0.8	14.8±0.8
Solución fisiológica 10 mg/kg	Acetil L- carnitina	21.8±1.1*	22.6±1.3*	22.5±1.3*	22.9±1.6^
Naxolona 1 mg/kg	SF	14.0±0.7	13.3±1.3	13.1±1.1	14.2±1.3
Naxolona 1 mg/kg	Acetil L- carnitina	22.6±0.6*	22.3±1.9*	22.1±2.0*	20.6±1.2^
CGP 35348 100 mg/kg	SF	14.4±0.8	12.4±1.0	12.6±1.3	12.2±1.6
CGP 35348 100 mg/kg	Acetil L- carnitina	22.1±0.7*	21.1±1.2^	21.0±2.1^	20.3±1.9^
Alpha-M-p-T 200 mg/kg	SF	14.6±0.9	15.4±1.6	16.1±1.8	13.6±1.5
Alpha-M-p-T 200 mg/kg	Acetil L- carnitina	22.0±1.3*	22.5±2.0*	21.5±1.7*	21.6±1.5^
Atropina 5 mg/kg	SF	14.1±0.9	13.7±1.1	15.4±1.2	13.1±1.9
Atropina 5 mg/kg	Acetil L- carnitina	21.2±1.0^	11.4±1.7°	12.6±1.9°	12.8±1.3°
HC-3 1 µg ICV	SF	14.1±0.9	13.7±1.1	15.4±1.2	13.1±1.9
HC-3 1 µg ICV	Acetil L- carnitina	22.0±1.1^	14.6±1.3°	14.0±1.8°	15.5±1.9°
Pirenzepina 0.1 µg ICV	SF	13.6±0.8	13.9±1.5	14.5±1.8	15.5±1.5
Pirenzepina 0.1 µg ICV	Acetil L- carnitina	21.6±1.3^	16.5±1.8°	14.3±2.0°	17.1±1.6°
S-(-)-ET- 126 0.1 µg ICV	SF	15.0±1.0	15.3±1.8	16.2±1.9	16.1±2.1
S-(-)-ET- 126 0.1 µg ICV	Acetil L- carnitina	22.9±1.3^	15.8±2.2°	16.9±2.3°	15.8±1.8°

Acetil L-carnitina: 100 mg/kg BID, SC durante 7 días.

Los valores son medias ± error estándar de al menos 12 animales.

^ p<0.05; * p<0.01 comparado con el grupo tratado con SF.

° p<0.01 comparado con el grupo tratado con acetil L-carnitina.

La observación de que la analgesia inducida por la acetil L-carnitina está mediada por el receptor muscarínico del subtipo M₁ se confirma mediante la aplicación de la estrategia del antisentido.

Se encontró que la administración de oligonucleótidos contra el gen que codifica el receptor M₁ (aODN-anti M₁) a una dosis de 3 nanomoles por cada inyección intracerebroventricular (ICV) individual era capaz de prevenir la producción de la antinocicepción inducida por la administración repetida de acetil L-carnitina (100 mg/kg BID CS durante 7 días) (Tabla 6).

La idea de llevar a cabo esta serie de experimentos con aODN en presencia de acetil L-carnitina proviene de Ghelardini *et al.*, (*Br. J. Pharmacol.*, 128, 1633-1640, 2000), que demostraron que tanto la analgesia inducida por la fisostigmina, como la analgesia inducida por colinómiméticos directos son completamente prevenidas mediante un pretratamiento con aODN-anti-M₁ a una dosis de 3 nanomoles/cada inyección ICV individual.

ES 2 290 292 T3

En las mismas condiciones experimentales, el pretratamiento de los animales con el vehículo del aODN (DOTAP), así como con el oligonucleótido antisentido degenerado (dODN) (mezcla de 3×10^{14} oligonucleótidos cada uno diferente, presente en el sitio de acción a una concentración menor de 10^{-18} M) se encontró que no tenía efecto en la analgesia inducida por acetil L-carnitina (Tabla 6).

De los datos que se relacionan con el antagonismo ejercido por el hemicolinio-3, es posible deducir que la acetil L-carnitina no actúa como un antagonista muscarínico directo, pero que aumenta la funcionalidad del sistema colinérgico.

TABLA 6

Placa caliente					
Latencia de lamedura (seg)					
		Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Después del tratamiento	Después del tratamiento
Pre-trat. Inyección individual (ICV)	Tratamiento		15 min	30 min	45 min
AODN 3 nmol	Solución fisiológica	14.3±1.2	15.5±2.3	15.4±1.6	16.0±2.2
AODN 3 nmol	Acetil L-carnitina	13.5±0.8*	16.6±1.9*	15.8±1.8*	15.8±1.5*
dODN 3 nmol	Solución fisiológica	13.3±1.4	12.9±2.4	14.1±2.5	15.3±2.1
dODN 3 nmol	Acetil L-carnitina	23.6±1.1	22.6±2.3	21.9±1.5	22.3±1.7

Acetil L-carnitina: 100 mg/kg BID, SC, durante 7 días.

aODN se inyectó vía ICV en los días 1, 4 y 7;

La respuesta nociceptiva se registró 24 horas después de la última inyección de acetil L-carnitina

Los valores son medias ± error estándar de al menos 10 animales.

* $p < 0.01$ comparado con el grupo tratado con dODN + acetil L-carnitina.

Ejemplo 4

Los siguientes ensayos se llevaron a cabo para determinar los efectos que la acetil L-carnitina pudiera tener en el sistema nervioso: la prueba del cilindro giratorio, la prueba del tablero con agujeros y la prueba de inducción del sueño.

Se utilizaron ratones macho Swiss Webster que pesaban entre 22 g y 30 g.

La prueba del cilindro giratorio se llevó a cabo por medio de un aparato que consistía en una plataforma y un cilindro giratorio de 3 cm de diámetro (16-20 rpm) con una superficie no deslizante.

La integridad de la coordinación motora de los animales se determinó según la capacidad de los ratones de mantener su equilibrio en el cilindro giratorio.

A varios intervalos después del tratamiento, el parámetro considerado fue el número de caídas del animal en una observación de 30 segundos (Vaught *et al.*, *Neuropharmacol.*, 24: 211, 1985).

En la prueba del tablero con agujeros, los movimientos de la rata se registraron mediante dos sistemas diferentes de fotocélulas, que registraron tanto los movimientos en el tablero (motilidad espontánea) como cuantas veces el ratón pasó su cabeza por los agujeros de la superficie (actividad exploratoria).

Los ratones se colocaron en el tablero de uno en uno y se les dejó libres para explorar tanto la superficie como los agujeros durante 5 minutos.

En la prueba de inducción del sueño con pentobarbital, se midió la duración de la pérdida del reflejo de retorcerse en los ratones tratados con pentobarbital (60 mg/kg IP).

ES 2 290 292 T3

Se encontró que la coordinación motora de los ratones tratados con la acetil L-carnitina (100 mg/kg BID, SC o IP durante 7 y 14 días) no era diferente de la coordinación motora de los ratones control tratados con solución fisiológica. El número de caídas durante la observación de 30 segundos, de hecho, disminuyó progresivamente según se repetían las sesiones y esto prueba que los ratones tratados habían aprendido a mantener el equilibrio en el cilindro giratorio:

TABLA 7(A)

Tratamiento subcrónico de 7 días (IP)

CILINDRO GIRATORIO				
No. de caídas en 30 segundos				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	3.8±0.4 (5)	2.0±0.2 (5)	1.8±0.3 (5)	0.8±0.2 (5)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	3.6±0.5 (5)	2.2±0.4 (5)	1.5±0.3 (5)	1.1±0.3 (5)

Los valores son medias ± error estándar.

El número de animales se da entre paréntesis.

TABLA 7(B)

Tratamiento subcrónico de 14 días (IP)

CILINDRO GIRATORIO				
No. de caídas en 30 segundos				
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento		
		15 min	30 min	45 min
Solución fisiológica	4.2±0.4 (5)	3.1±0.4 (5)	2.2±0.2 (5)	1.6±0.3 (5)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	3.9±0.5 (5)	2.9±0.3 (5)	1.7±0.4 (5)	1.0±0.3 (5)

Los valores son medias ± error estándar.

El número de animales se da entre paréntesis.

La motilidad espontánea y la capacidad exploratoria de los ratones tratados, que se determinaron a través de la prueba del tablero de agujeros, no mostraron ninguna diferencia comparadas con el grupo control:

TABLA 8

Tratamiento subcrónico de 14 días (SC)

	ACTIVIDAD EXPLORATORIA	ACTIVIDAD LOCOMOTORA
	No. de movimientos	No. de exploraciones
Solución fisiológica	59.4±7.7 (7)	21.3±5.6 (7)
Acetil L-carnitina 100 mg/kg BID	52.3±6.5 (10)	24.0±5.1 (10)

El número de animales se da entre paréntesis.

ES 2 290 292 T3

De forma similar a lo que se observó en las dos pruebas anteriores, tampoco en el caso de la prueba de inducción de sueño con pentobarbital (60 mg/kg IP) (administrada 24 horas después del final de los tratamientos), la acetil L-carnitina (100 mg/kg BID SC durante 7 días) afectó ni a la duración del sueño ni a los tiempos de inducción, en contra de lo que sucedió con el piracetam (30 mg/kg IP):

TABLA 9

	SUEÑO	
	Tiempo de inducción (min)	Duración (min)
Solución fisiológica	3.3±1.8 (16)	24.2±6.0 (16)
Acetil L-carnitina	3.3±2.1 (10)	23.5±3.4 (10)
Piracetam 30 mg/kg IP	4.5±2.1 (10)	12.5±5.3* (10)

Acetil L-carnitina: 100 mg/kg BID, SC durante 7 días.

El número de animales se da entre paréntesis.

* $p < 0.01$ comparado con el grupo tratado con solución fisiológica

Ejemplo 5

Se evaluó la hiperalgesia inducida mediante el síndrome de abstinencia de morfina. Se utilizaron ratones macho Swiss Webster que pesaban entre 22 g y 30 g junto a ratas macho.

Para inducir la dependencia, la morfina se disolvió en la botella de los ratones; la dosis de morfina se aumentó cada 48 horas.

La solución de morfina se endulzó con sacarosa al 5% para ocultar el sabor amargo y se preparó según el siguiente programa: 1^{er} y 2^o día 0.1 mg/ml; 3^o y 4^o día 0.2 mg/ml; 5^o y 6^o día 0.3 mg/ml; 7^o al 14^o día 0.4 mg/ml.

El tratamiento de 7 días con acetil L-carnitina empezó a partir del día 7 del tratamiento con morfina.

La solución de morfina contenida en la botella se reemplazó con agua en la mañana del 15^o día. Cuatro horas después de que se hubiese reemplazado la solución, los ratones así tratados mostraron durante el ensayo de la placa caliente, una reducción significativa en el umbral de dolor que alcanzó su pico después de 6 horas (11.8±0.8 segundos de latencia de lamedura comparados con los 15.7±1.1 segundos registrados en el grupo control).

La coordinación motora y la actividad espontánea evaluadas a través de la prueba del cilindro giratorio y la prueba animex respectivamente (Activo 8 Sistema de actividad en campo abierto-Harvard Apparatus) no parecían ser diferentes entre los ratones con síndrome de abstinencia de morfina y los ratones tratados con la solución de sacarosa utilizada como vehículo.

Se encontró que la acetil L-carnitina fue capaz de revertir la hiperalgesia inducida por el síndrome de abstinencia de morfina después de un tratamiento repetido (100 mg/kg BID, IP o SC durante 7 días) (figura 5), pero no después de una administración individual (5 horas y 30 minutos desde el reemplazo de la morfina con agua) (figura 5bis).

Ejemplo 6

Se utilizaron ratones macho Swiss Webster que pesaban entre 22 g y 30 g para la hiperalgesia inducida por ácido kaínico y el ensayo se llevó a cabo conforme al método descrito por Giovengo *et al.* en Pain, 83: 347-358, 1999.

Según este ensayo, la hiperalgesia -determinada en los ratones a través del ensayo de la placa caliente- se induce mediante una solución de ácido kaínico (20 mg/kg, IP).

La reducción en el umbral de dolor, que alcanzó su pico 24 horas después de la inyección, persistió sin cambiar durante muchos días.

En este ensayo, se encontró que la administración repetida durante 7 días de acetil L-carnitina (que empezó 48 horas después de la administración de ácido kaínico) fue capaz de revertir la hiperalgesia (Figura 6), mientras que se encontró que una administración individual no tenía efecto anti-hiperalgésico (Figura 6bis).

ES 2 290 292 T3

Ejemplo 7

En el ensayo de hiperalgesia inducida por NMDA (N-Metil-D-Aspartato), se utilizaron ratones macho Swiss Webster que pesaban entre 22 g y 30 g.

El ensayo se llevó a cabo conforme a lo descrito en las ratas por Davies e Inturrisi en J. Pharmacol. Exp. Ther., 289: 1048-1053, 1999, pero se aplicó a los ratones.

Según este ensayo, la hiperalgesia, determinada a través del ensayo de la placa caliente, se induce mediante administración intratecal de una solución de NMDA (1.64 μ g/ratón; administrada alrededor de 15 después de la última administración de acetil L-carnitina).

La reducción del umbral de dolor, que alcanza su pico 15 minutos después de la inyección de NMDA, desaparece en los 30 minutos siguientes a la administración. La Figura 7 muestra el efecto antinociceptivo ejercido por la acetil L-carnitina (100 mg/kg, BID, SC o IP durante 7 días) en presencia de la reducción en el umbral de dolor inducida por NMDA.

En las mismas condiciones experimentales, se encontró que la dosis de 30 mg/kg BID, IP o SC durante 7 días no era activa (figura 7) de forma similar a lo que se puede observar en la figura 6.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de la acetil L-carnitina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para la terapia preventiva del dolor posquirúrgico.

10 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la sal de la acetil L-carnitina se selecciona del grupo que consiste en: cloruro, bromuro, orotato, aspartato ácido, citrato ácido, citrato de magnesio, fosfato ácido, fumarato y fumarato ácido, fumarato de magnesio, lactato, maleato y maleato ácido, mucato, oxalato ácido, pamoato, pamoato ácido, sulfato
15 ácido, glucosa fosfato, tartrato, tartrato ácido, tartrato de magnesio, 2-aminoetansulfonato, 2-aminoetansulfonato de magnesio, tartrato de colina y tricloroacetato.

15

20

25

30

35

40

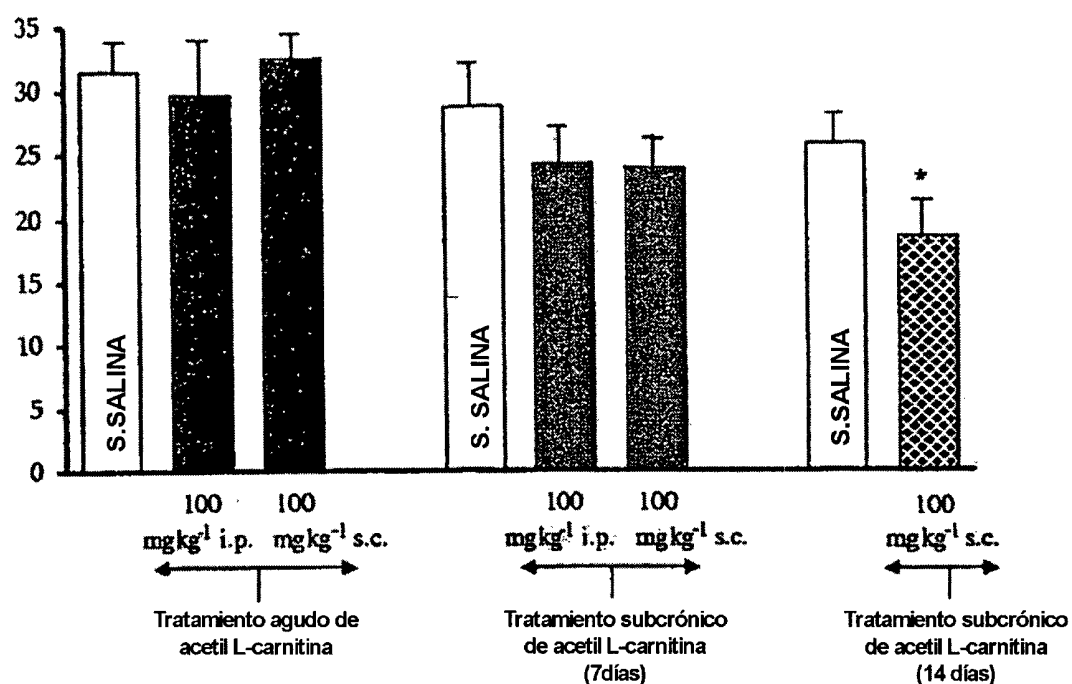
45

50

55

60

65

FIGURA 1**No. de constricciones abdominales**

Efecto de la acetil L-carnitina sobre la constricción abdominal inducida por una concentración de ácido acético del 0.6%.

La respuesta al estímulo de dolor se registró 30 minutos después de la administración aguda de acetil L-carnitina.

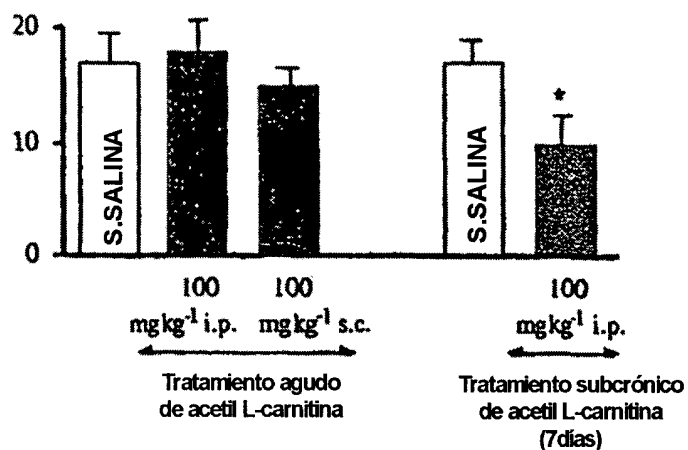
Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 100 mg/kg i.p. o s.c. dos veces al día durante 7 ó 14 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 12 animales

* $p < 0.05$

FIGURA 2

No. de constricciones abdominales



Efecto de la acetil L-carnitina sobre la constricción abdominal inducida por una concentración de ácido acético del 0.3%.

La respuesta al estímulo de dolor se registró 30 minutos después de la administración aguda de acetil L-carnitina.

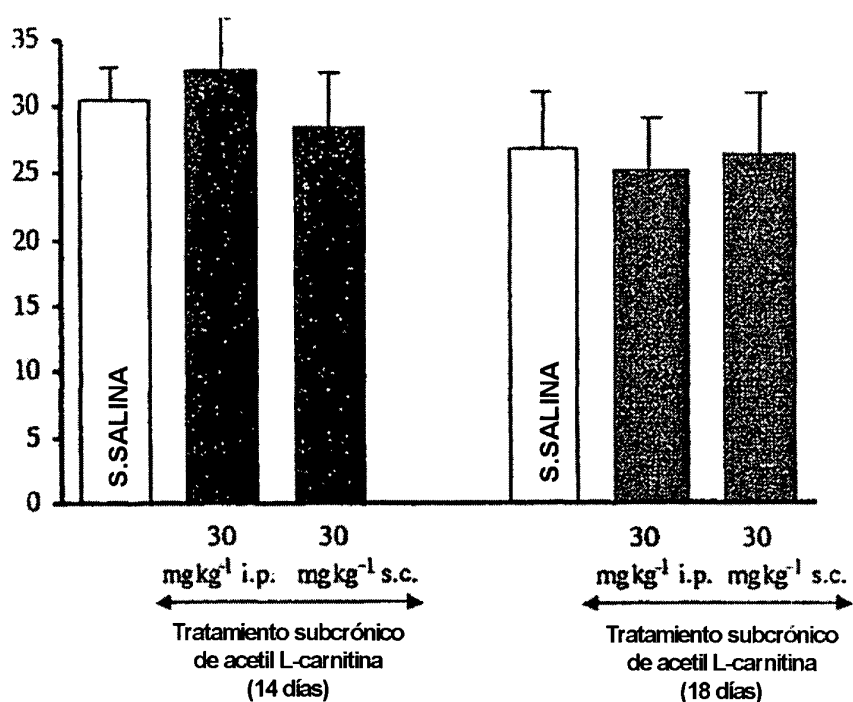
Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 100 mg/kg i.p. o s.c. dos veces al día durante 7 días.

Cada valor representa la media ± error estándar de 12 animales

* $p < 0.05$

FIGURA 3

No. de constricciones abdominales



Efecto de la acetil L-carnitina en el ensayo de constricción abdominal inducido por una concentración de ácido acético del 0.6%.

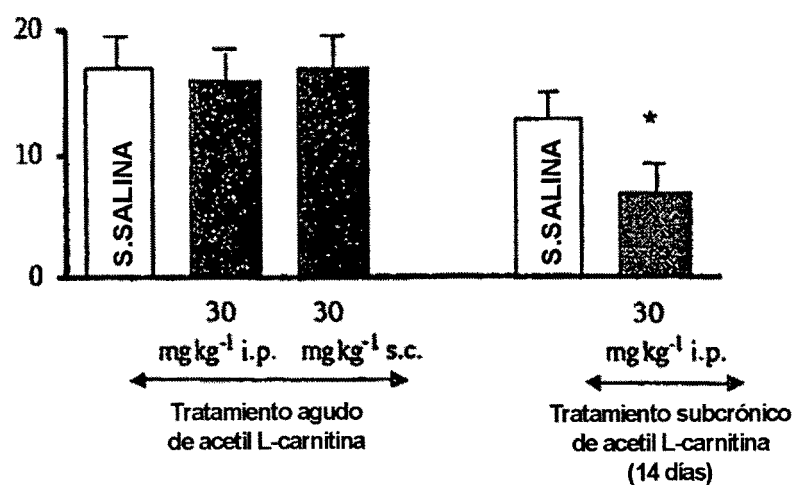
La respuesta al estímulo de dolor se registró 30 minutos después de la administración aguda de acetil L-carnitina y 24 horas después de la última administración durante el tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina.

Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 30 mg/kg i.p. o s.c. dos veces al día durante 14 ó 18 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 8-9 animales.

FIGURA 4

No. de constricciones abdominales



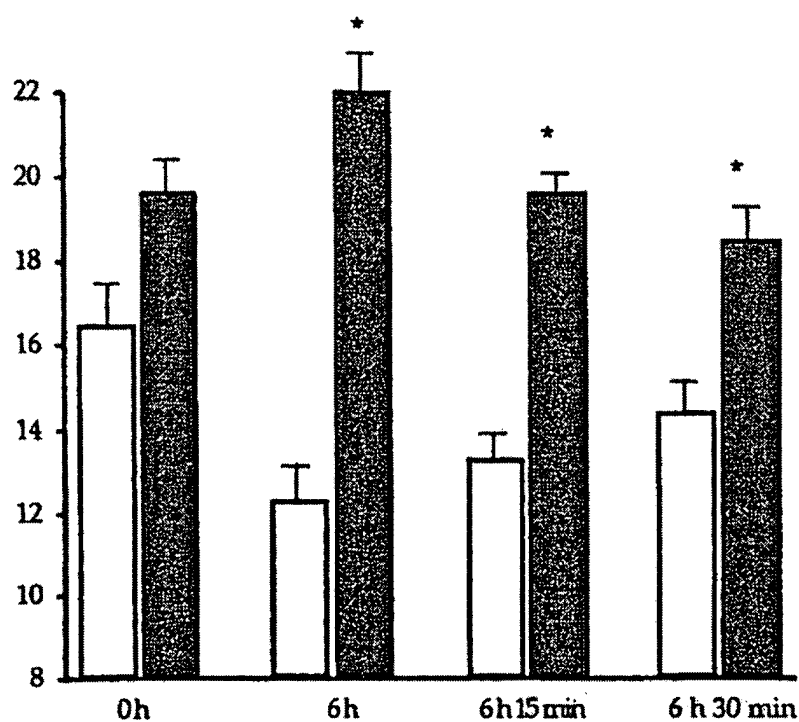
Efecto de la acetil L-carnitina sobre la constricción abdominal inducida por una concentración de ácido acético del 0.3%.

La respuesta al estímulo de dolor se registró 30 minutos después de la administración aguda de acetil L-carnitina.

Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 30 mg/kg i.p. o s.c. dos veces al día durante 14 días.

Cada valor representa la media ± error estándar de 12 animales

* $p < 0.05$

FIGURA 5**Tiempo de latencia de lamedura (seg)**

Tiempo de interrupción del tratamiento con morfina

□ S. Salina

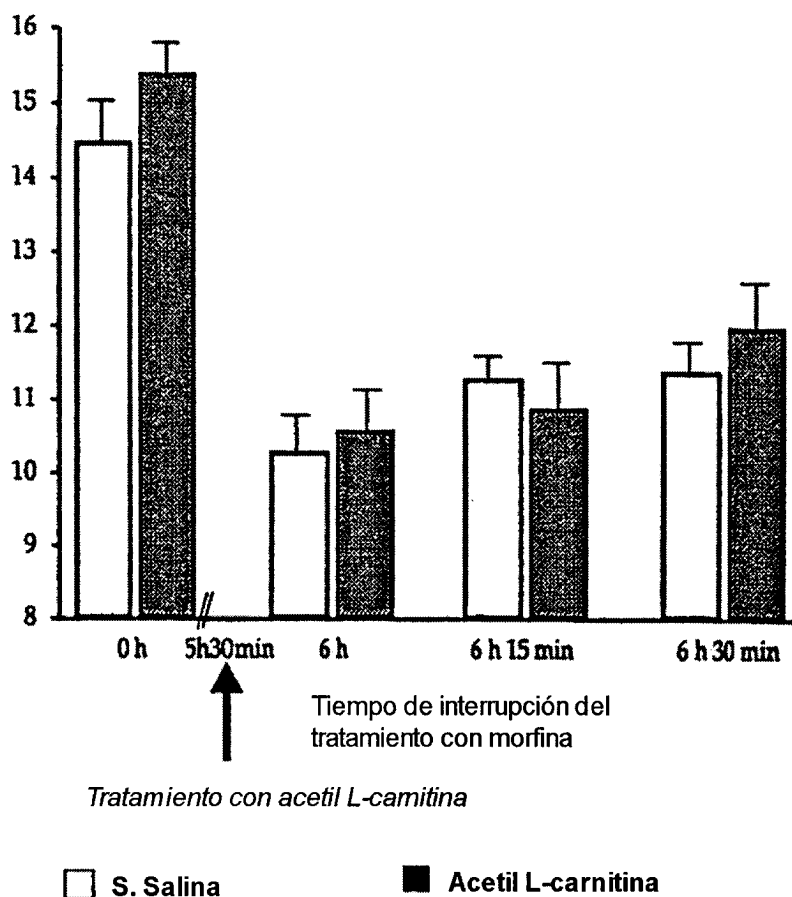
■ Acetil L-carnitina

Efecto de la acetil L-carnitina sobre la hiperalgesia inducida por crisis de abstinencia de morfina (ensayo de placa caliente)
 La solución de morfina contenida en la botella se sustituyó por agua la mañana del 15° día (0h).

Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 100 mg/kg i.p. dos veces al día durante 7 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 12 animales.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo tratado con solución salina.

FIGURA 5bis**Tiempo de latencia de lamedura (seg)**

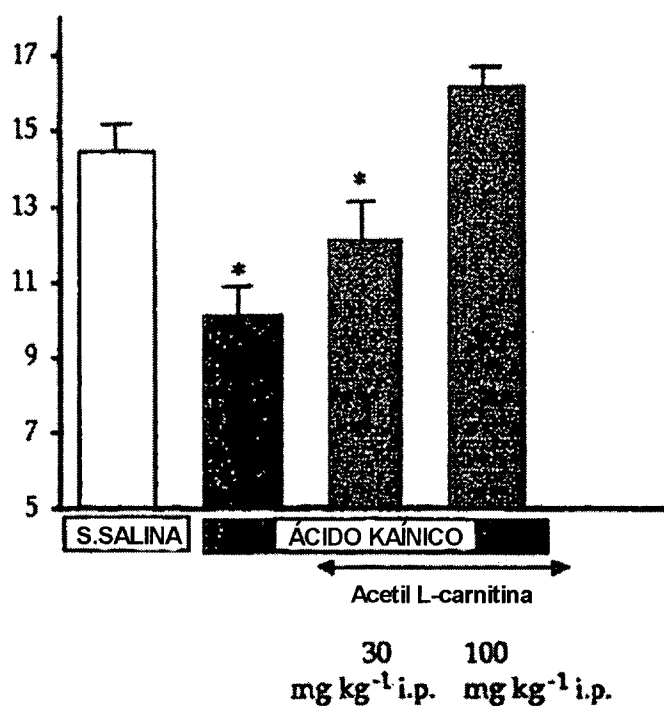
Efecto de la acetil L-carnitina sobre la hiperalgesia inducida por crisis de abstinencia de morfina (ensayo de placa caliente)
 La solución de morfina contenida en la botella se sustituyó por agua la mañana del 15° día (0h).

Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 100 mg/kg i.p. dos veces al día durante 7 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de al menos 10 animales.

FIGURA 6

Tiempo de latencia de lamedura (seg)



Efecto de la acetil L-carnitina sobre la hiperalgesia inducida por ácido kaínico (ensayo de la placa caliente).

El estímulo al dolor se registró 30 minutos después de la última administración de acetil L-carnitina.

El ácido kaínico se administró 48 horas antes del tratamiento con acetil L-carnitina.

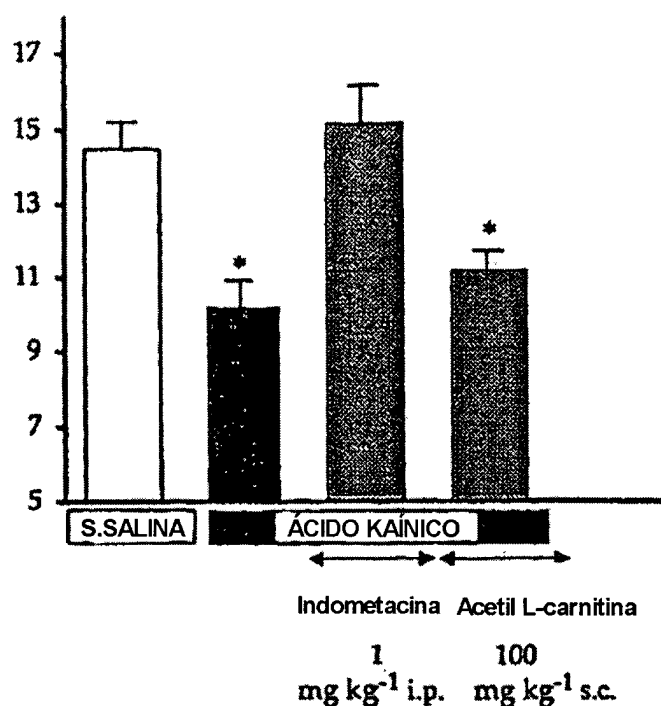
Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 30 ó 100 mg/kg i.p. dos veces al día durante 7 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 12 animales.

* $p < 0.01$ con respecto al grupo tratado con solución salina.

FIGURA 6bis

Tiempo de latencia de lamedura (seg)



Efecto de la acetil L-carnitina sobre la hiperalgesia inducida por crisis de abstinencia de morfina (ensayo de la placa caliente). Comparación con indometacina.

El estímulo al dolor se registró 30 minutos después de la última administración de acetil L-carnitina.

El ácido kaínico se administró 48 horas antes del tratamiento con acetil L-carnitina.

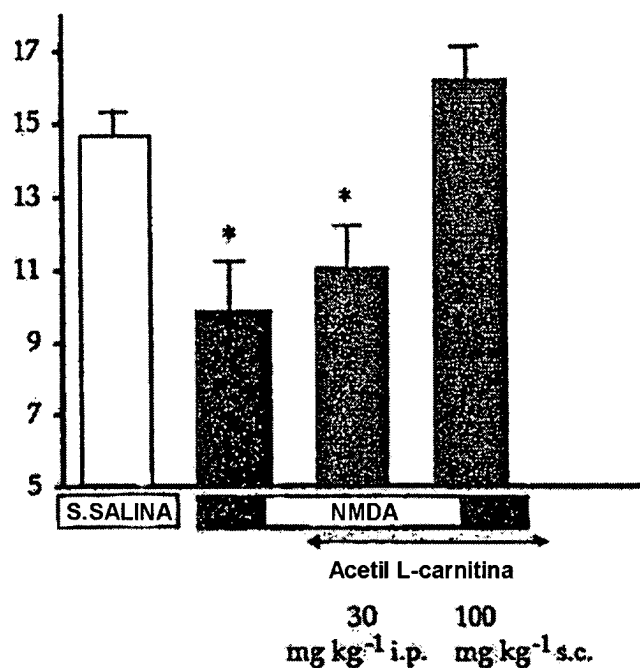
Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 100 mg/kg s.c.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 12 animales.

* $p < 0.05$ con respecto al grupo tratado con solución salina.

FIGURA 7

Tiempo de latencia de lamedura (seg)



Efecto de la acetil L-carnitina sobre la hiperalgesia inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) (ensayo de la placa caliente).

El estímulo al dolor se registró 30 minutos después de la última administración de acetil L-carnitina.

El NMDA se administró 15 horas antes del ensayo de la placa caliente.

Tratamiento subcrónico con acetil L-carnitina: 30 mg/kg i.p. o 100 mg/kg s.c. dos veces al día durante 7 días.

Cada valor representa la media \pm error estándar de 12 animales.

* $p < 0.01$ con respecto al grupo tratado con solución salina.