



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 122**

51 Int. Cl.:
A61K 31/231 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00916646 .3**
86 Fecha de presentación : **24.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1196161**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

54 Título: **Ácido linoleico conjugado para el tratamiento de inflamación y dolor mediado por ciclooxygenasa-2.**

30 Prioridad: **20.07.1999 US 357268**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street
Post Office Box 7365
Madison, Wisconsin 53707-7365, US

72 Inventor/es: **Cook, Mark, E.;**
Whigham, Leah, D. y
Pariza, Michael, W.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 269 122 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

Ácido linoleico conjugado para el tratamiento de inflamación y dolor mediado por ciclooxigenasa-2.

5 **Antecedentes de la invención**

Las reacciones inflamatorias y el dolor asociado con ellas pueden ser inducidos por las prostaglandinas. La inflamación puede reducirse inhibiendo la biosíntesis de prostaglandinas. La mayor parte de los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (NSAIDs), incluyendo la aspirina, inhiben la síntesis de prostaglandinas inhibiendo la ciclooxigenasa, una enzima regulada clave en la síntesis de los eicosanoides de 20 átomos de carbono, incluyendo la prostaglandina E2 (PGE₂), a partir del ácido araquidónico. Sin embargo, no se recomienda la inhibición completa de la síntesis de prostaglandinas ya que las prostaglandinas beneficiosamente también mantienen la mucosa gástrica. Cuando no hay prostaglandinas, puede desarrollarse una propensión a las úlceras y problemas digestivos similares. Esto es particularmente problemático en la gente que sufre de condiciones tales como la artritis, el tratamiento de la cual requiere generalmente el uso a largo plazo de agentes antiinflamatorios en cantidades relativamente grandes.

Las enzimas de ciclooxigenasa han sido revisadas por Williams, C.S. y R. N. DuBois, "Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms?" *Am. J. Physiol.* 270 (Gastrointest. Liver Physiol. 33): G393-G400 (1996). Resumiendo, la ciclooxigenasa existe al menos como dos isoformas diferentes de enzimas, denominadas Cox-1 y Cox-2. La Cox-1 está implicada en la síntesis de prostaglandinas de mantenimiento que funcionan para mantener la mucosa gástrica. Por el contrario, la Cox-2 cataliza la síntesis de prostaglandinas que causan la inflamación y el dolor, pero no parece catalizar las prostaglandinas de mantenimiento. Tanto la Cox-1 como la Cox-2 están implicadas en la producción de precursores para varios prostanoides incluyendo la PGE₂.

La Cox-1 nativa se expresa en concentraciones relativamente estables en muchos tejidos, mientras que la expresión de la Cox-2 puede ser inducida por una variedad de agentes químicos, incluyendo, pero no limitados a, los liposacáridos, los ésteres de forbol, la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral, la gonadotropina humana coriónica, y el factor de activación de plaquetas. Como resultado de esta diferencia, puede caracterizarse la contribución relativa de cada forma isomorfa a la concentración total de PGE₂ comparando las concentraciones basales de PGE₂ con las concentraciones después de la inducción.

Puesto que los fármacos que hay actualmente que se unen tanto a la Cox-1 como a la Cox-2 pueden causar efectos secundarios gástricos indeseables significativos, se ha dirigido considerable atención al desarrollo de medicamentos para el alivio del dolor que inhiben específicamente la actividad enzimática de la Cox-2 sin afectar la actividad enzimática de la Cox-1. Recientemente la agencia de alimentación y medicamentos de los Estados Unidos aprobó una medicación de este tipo, el Celebrex, sólo para el tratamiento del dolor de artritis, mientras que se espera a los estudios adicionales. Los resultados preliminares sugieren que el Celebrex proporciona alivio del dolor y reduce la inflamación sin causar problemas de estómago. Desgraciadamente, el Celebrex es caro.

Según esto, hay actualmente gran interés en desarrollar fármacos y terapias que reduzcan la inflamación y proporcionen alivio del dolor sin causar los problemas de estómago asociados.

El ácido linoleico conjugado reduce las concentraciones de PGE₂ en el hígado y el suero de las ratas alimentadas con una dieta que contiene un 1% de CLA (Sugano *et al. Nutritional Biochem.* 8:38-43, 1997). Liu *et al.* (Cancer Lett. 127:15-22, 1996) sugirieron que el CLA inhibe la síntesis de PGE₂ por la ciclooxigenasa compitiendo con el sustrato de la enzima, el ácido araquidónico. No se aclaró si los ácidos linoleicos conjugados inhiben tanto la Cox-1 como la Cox-2.

El documento de patente de Estados Unidos US 5.585.400 describe un método para el tratamiento de la hipersensibilidad tipo I o hipersensibilidad mediada por la IgE en un animal por administración de CLA.

Truitt *et al.* Biochimica et Biophysica Acta (1999) 1438, páginas 239-248 se refieren al efecto de los isómeros de CLA en la agregación de las plaquetas humanas y el metabolismo del ácido araquidónico. Se mostró que la mezcla de los isómeros de CLA inhibe la formación del producto proagregante del tromboxano A₂ catalizado por la ciclooxigenasa (TXA₂).

Whigham *et al.*, Faseb Journal, Vol. 13, N° 4 parte 1 (1999), página A 587 describe la influencia del CLA en la liberación de PGE₂ y LTB₄.

Whigham *et al.*, Faseb Journal, Vol. 13, No. 5, Supplement S, (20 de Marzo de 1998), página 4749 describe la reducción por CLA de la liberación de la prostaglandina E2 inducida por un antígeno.

65 **Breve compendio de la invención**

La presente invención se refiere al uso del ácido linoleico conjugado en la preparación de un medicamento que inhibe selectivamente a la Cox-2 que tenga actividad para reducir la inflamación mediada por la Cox-2 o el dolor mediado por la Cox-2 en un animal sin causar irritación gástrica. La reducción selectiva de la actividad de la Cox-2

ES 2 269 122 T3

puede medirse comparando las concentraciones de PGE₂ antes y después de inducir la expresión de la Cox-2, como se describe aquí.

5 Es un objeto de la presente invención reducir selectivamente la actividad de la enzima Cox-2 sin reducir sustancialmente la actividad de la Cox-1.

Es una ventaja de la presente invención que el ácido linoleico conjugado se considera generalmente seguro y no tóxico cuando se administra a los animales y seres humanos.

10 Es otra ventaja de la presente invención que el ácido linoleico conjugado puede obtenerse y usarse sin receta.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

15 La Fig. 1 muestra la magnitud y la liberación en el curso del tiempo de la prostaglandina E2 (PGE₂) de la tráquea superfundida de cobayas sensibilizados alimentados con una dieta control (diamantes) o una dieta que contiene 0,25% de CLA (cuadrados) antes (periodo 0 de toma de muestra) y después (periodos 1-8) del enfrentamiento con el antígeno.

20 Las Fig. 2A-2C muestran la liberación de PGE₂ del tejido del pulmón (A), vejiga (B), y tráquea (C) de cobayas sensibilizados con o sin (basal) enfrentamiento con el antígeno.

Descripción detallada de la invención

25 Los inventores han reconocido, y descrito aquí, que los ácidos linoleicos conjugados (CLA) inhiben selectivamente la actividad enzimática de la Cox-2 sin reducir significativamente la actividad enzimática de la Cox-1 en los animales administrados con una cantidad de CLA eficaz para inhibir la actividad enzimática de la Cox-2. Esta observación no se ha descrito anteriormente, y permite intervenciones terapéuticas ventajosas que satisfacen un objeto manifestado de la presente invención. La observación es importante ya que las funciones de mantenimiento de la Cox-1 se realizan sin efectos secundarios, mientras que puede controlarse la síntesis de las prostaglandinas inflamatorias.

30 Según esto, un aspecto de la presente invención es el uso de un ácido linoleico conjugado (CLA) en la preparación de un medicamento para inhibir selectivamente la actividad de la ciclooxigenasa 2 en un animal, donde el medicamento comprende una cantidad de CLA eficaz para reducir selectivamente la actividad de la ciclooxigenasa 2, sin afectar substancialmente la actividad de la ciclooxigenasa 1 (Cox-1). El porcentaje absoluto de reducción de la actividad de la Cox-2 es menos crítico que los efectos causados *in vivo* por la actividad reducida de la Cox-2. Lo que es importante es
35 que el CLA inhibe la actividad de la Cox-2 hasta un grado suficiente para reducir la inflamación, sin causar problemas de estómago.

40 El efecto se estudia muy fácilmente en un sistema de modelo *ex vivo*, aunque con la selección cuidadosa de un sistema de modelo apropiado, esto es el cobaya, se puede predecir razonablemente el éxito en los mamíferos, incluyendo los seres humanos y animales domésticos tales como animales de granja y animales de compañía. En el sistema del modelo, la actividad de la Cox-2 preferiblemente se reduce al menos alrededor del 10% en el tejido de animales alimentados con una dieta que contiene CLA. Más preferiblemente, la actividad de la Cox-2 se reduce al 20% o incluso al 50% o más. Al mismo tiempo, la actividad de la Cox-1 se reduce de forma insignificante.

45 El efecto de CLA en la actividad de la ciclooxigenasa puede también expresarse como la relación de porcentaje de la reducción Cox-2:Cox-1. Preferiblemente, se maximiza la relación de porcentaje de manera que se proporcione alivio eficaz del dolor e inflamación reducida, sin interferir con las funciones de mantenimiento de la Cox-1. Preferiblemente, esta relación es al menos alrededor de 2:1. Más preferiblemente, esta relación es al menos alrededor de 20:1, o incluso alrededor de 50:1.

50 En esta solicitud "ácido linoleico conjugado" o "CLA" significa un ácido graso insaturado que tiene 18 átomos de carbono y dos enlaces dobles conjugados, el ácido graso se selecciona del grupo que consiste en 18:2(9c, 11t), 18:2(9t, 11c), 18:2(10c, 12t) y 18:2(10t, 12c), y también incluye ésteres bioactivos y sales de los mismos, y mezclas de los mismos. El CLA puede administrarse en cualquier forma conveniente. Preferiblemente, se administra el ácido linoleico conjugado oralmente en una cápsula, comprimido o forma masticable que comprende el ácido linoleico conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la ingestión. Se visualiza que el CLA puede administrarse oralmente en liberación controlada. Alternativamente, puede formularse el CLA para administración intravenosa, intramuscular, transdérmica o transmucosal. Puesto que el CLA es generalmente considerado seguro, la cantidad precisa de CLA administrado no se considera crítica, siempre que sea suficiente para conseguir el objetivo manifestado de la invención.
60 Por ejemplo, si se administra a un animal, una cantidad adecuada de CLA en la dieta está en el intervalo de 0,1% a 5% en peso, preferiblemente 0,2% a 0,5% en peso en la dieta. Si se administra por otra ruta, el CLA puede ser eficazmente administrado a una dosis en el intervalo de 1 mg/kg a 1000 mg/kg de peso corporal del animal o mayor. Esto corresponde a 0,1 g/día a 40 g/día en una persona que pese 45 kg.

65 En los siguientes ejemplos no limitativos, se midió la actividad de Cox-1 y Cox-2 indirectamente monitorizando las concentraciones de PGE₂ liberadas del tejido cortado de animales sensibilizados alimentados con dietas con CLA o sin CLA, en presencia o ausencia de un enfrentamiento antigénico inductor. Los ejemplos demuestran que la presente invención es eficaz en la reducción de la producción de PGE₂ dirigida por la Cox-2 en cobayas, un sistema de modelo

ES 2 269 122 T3

preferido para evaluar respuestas inmunes e inflamatorias en los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Puesto que la estructura química de los sustratos de Cox-2 es la misma en todas las especies animales, es razonable predecir con estos ensayos que la presente invención conseguirá la inhibición selectiva de la Cox-2 en cualquier animal que tenga la isoforma de la Cox-2, incluyendo los seres humanos.

Se midieron las concentraciones de PGE₂ en tejidos cortados de cobayas administrados (o no administrados) con CLA y sensibilizados a un antígeno usando superfusión traqueal o baños de tejidos que contenían el tejido del pulmón, la vejiga o el tejido traqueal. Si se desea monitorizar la respuesta de la Cox-2 al CLA puede medirse alternativamente la cantidad de proteína de la Cox-2 o el mRNA de la Cox-2 formado en los tejidos adecuados.

En ausencia de un enfrentamiento antigénico inductor, el tejido de animales administrados con CLA muestra sólo ligeras disminuciones en la producción de PGE₂, en relación con los animales alimentados con una dieta de control sin CLA. Por el contrario, en los tejidos sometidos a un enfrentamiento antigénico inductor, se observó una reducción mucho más grande de la PGE₂ en el tejido de los animales alimentados con CLA en la dieta que en los tejidos de los animales alimentados con dietas sin CLA. Estos resultados sugieren que el CLA inhibe específicamente la actividad inducible de la enzima Cox-2 en un grado mucho mayor que inhibe la actividad de la Cox-1 nativa.

La invención se entenderá mejor considerando los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Superfusión

Dietas y sensibilización

Se completaron tres experimentos usando condiciones idénticas en cada uno de los tres experimentos, a no ser que se indique lo contrario. Se mantuvieron cobayas Hartley hembras (Harlan, Madison, WI) que pesaban 200-350 g en una habitación con temperatura y humedad controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se dividió a los cobayas de forma aleatoria en dos grupos de dieta (n=6 cobayas/tratamiento en los experimentos 1 y 3, n=3 cobayas/tratamiento en el experimento 2). Uno de los dos grupos recibió una dieta control que comprendía una dieta estándar de cobaya (Harlan-Teclad) suplementada con 0,25% de aceite de maíz (experimento 1) o 0,25% de ácido linoleico (Nu-Check prep; experimentos 2 y 3). El segundo grupo de animales en cada experimento recibió una dieta estándar de cobayas (Harlan-Teclad) suplementada con 0,25% de ácido linoleico conjugado (CLA) sintetizado a partir del ácido linoleico por métodos descritos previamente (Chin *et al.*, J. Food Comp. and Anal. 5:185-197 (1992)).

Se les dio a los cobayas acceso libre a las dietas experimentales durante al menos 1 semana antes y durante la sensibilización activa al antígeno de la ovoalbúmina del huevo de pollo (OVA, Sigma). Se sensibilizaron los cobayas con una inyección inicial intraperitoneal (IP) de 50 µg de ova en PBS con hidróxido de aluminio seguido dos semanas más tarde con una inyección subcutánea (en el lomo) de 200 µg de OVA en PBS emulsionado con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund. Los animales se sacrificaron 4 días después de la segunda inyección de OVA por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico.

Superfusión de la tráquea

Las tráqueas de los cobayas sensibilizados se sacaron inmediatamente después de que se mataron los animales y se transfirieron a placas petri que contenían solución fisiológica salina tamponada con bicarbonato (PSS)(ClNa 118 mM, PO₄H₂Na 1,0 mM, ClK 4,7 mM, Cl₂Ca 2,5 mM, Cl₂Mg 0,5 mM, glucosa 11 mM, y CO₃NaH 25 mM). El exceso de tejido fue eliminado de las tráqueas, con cuidado para evitar la distensión o dañado de las tráqueas. Cada tráquea se cortó longitudinalmente en ángulo de 45° como una espiral (Constantine, 1965) y se suspendió el tejido en una cámara con aire, rodeada de una funda con agua mantenida a 37°C. Las tráqueas se superfundieron a una velocidad de 2,2 ml/min con PSS (37°C, gaseado con 95% de O₂ y 5% de CO₂) mientras se mantenía una tensión de 5 g durante un periodo de estabilización de 90 minutos. Los cambios en las tensiones se midieron con transductores de fuerza eléctrica FT03 y se representaron gráficamente con un polígrafo de Grass. Después de la estabilización, las tráqueas se enfrentaron mediante una superfusión continuada de PSS que contenía 0,01 mg/ml de OVA. Los superfundidos se recogieron continuamente en intervalos de 90 segundos comenzando 90 segundos antes del enfrentamiento con el antígeno (designado periodo de recolección 0) y se guardaron a 4°C. Se determinaron los cambios máximos de las tensiones de la tráquea para cada periodo de recolección de 90 segundos. Los superfundidos se analizaron para determinar el contenido de histamina y PGE₂. A continuación del enfrentamiento con el antígeno, las tráqueas fueron perfundidas continuamente con PSS que contenía 10⁻⁵ de carbacol (cloruro de carbamilcolina Sigma) para producir la respuesta contráctil máxima. A continuación de las contracciones por carbacol, las tráqueas se pesaron, se cortaron con tijeras y se homogeneizaron en ácido perclórico 0,4 N, y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos para extraer la histamina residual.

Análisis del mediador

El contenido de PGE₂ de los superfundidos se determinó usando el protocolo de temperatura ambiente de un sistema de inmunoensayo de enzima (Amersham Life Science). La sensibilidad de este ensayo es 40 pg/ml. La reactividad cruzada con PGE₁, PGF_{2a}, 6-ceto-PGF_{1a}, y ácido araquidónico es 25%, 0,04%, <0,1% y <0,001%, respectivamente.

Resultados

La Fig 1 muestra la cantidad de PGE₂ liberada de las tráqueas de los animales alimentados con CLA y libres de CLA y después de la inducción de la actividad de la Cox-2. Antes de la inducción (periodo 0 de recolección), los animales alimentados con CLA y animales libres de CLA producen ambos bajos niveles de PGE₂, aunque los animales alimentados con CLA producen ligeramente menos PGE₂ que los animales libres de CLA, reflejando posiblemente una inhibición de la actividad endógena de bajo nivel de la Cox-2. Después de la inducción (periodos de recolección 1-8), los animales alimentados con CLA consistentemente producen menos PGE₂ que los animales libres de CLA, demostrando por tanto que un aumento en la síntesis de PGE₂ atribuible a la inducción de la Cox-2 puede sustancialmente reducirse mediante la administración de CLA que inhibe la actividad de la Cox-2.

Ejemplo 2

*Datos del baño de tejido**Dietas y sensibilización*

La dieta y los protocolos de sensibilización para dos experimentos del baño de tejidos fueron esencialmente como se describieron anteriormente para los experimentos de superfusión, con n=3 cobayas/tratamiento en el experimento 1 y n=6 cobayas/tratamiento en el experimento 2. Las dietas de control contenían 0,25% de aceite de cártamo, y se usó CLA-90 (Natural) para las dietas con CLA.

Experimentos del baño de tejidos

Después de la sensibilización y el sacrificio como se describió anteriormente, los pulmones, tráqueas y vejigas fueron cortados de los cobayas. Cada tejido se pesó, colocó en baños de PSS a 37°C, y se dejaron equilibrar en los baños durante una hora al menos. El antígeno OVA se añadió a los baños, y después de una hora se recogieron los baños para los análisis de liberación de PGE₂ y LTB₄. Las concentraciones basales de liberación se determinaron por medio del tampón del baño recogido antes del enfrentamiento con el antígeno.

Análisis del mediador

El contenido de PGE₂ y LTB₄ de las muestras del baño de tejidos se analizaron usando sistemas de inmunoensayo de enzima (Amersham Life Science). El ensayo de PGE₂ fue como se describió anteriormente. La sensibilidad del ensayo de LTB₄ es de 6 pg/ml, y la reactividad cruzada con 20-OH-LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTC₄, LTD₄, ácido 5-hidroxicicosatetraenoico (5-HETE), y 12-HETE son 2,0, 25,5, 0,011, 0,010, 0,008, y 0,034, respectivamente.

Resultados

Las Figs. 2A-2C muestran la cantidad de PGE₂ liberada del pulmón (Fig. 2A), vejiga (Fig. 2B) y tráquea (Fig 2C) de los animales alimentados con CLA y libres de CLA antes y después de la inducción de la actividad de la Cox-2. Antes de la inducción (nivel basal), los animales alimentados con CLA y libres de CLA producen ambos niveles bajos de PGE₂, aunque los animales alimentados con CLA producen ligeramente menos PGE₂ que los animales libres de CLA, reflejando posiblemente una inhibición de la actividad endógena de bajo nivel de la Cox-2. Después de la inducción (nivel del enfrentamiento), los animales alimentados con CLA consistentemente producen menos PGE₂ que los animales libres de CLA, demostrando por tanto que un aumento en la síntesis de PGE₂ atribuible a la inducción de la Cox-2 puede reducirse sustancialmente por la administración de CLA que inhibe la actividad de la Cox-2.

ES 2 269 122 T3

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un ácido linoleico conjugado (CLA) en la preparación de un medicamento que inhibe selectivamente la actividad de la ciclooxigenasa 2 para reducir la inflamación mediada por la ciclooxigenasa 2 o el dolor mediado por la ciclooxigenasa 2 en un animal sin causar irritación gástrica.

2. El uso según la reivindicación 1, en donde el medicamento está formulado para la administración por vía oral, inyección intramuscular, inyección intravenosa, vía transdérmica o vía transmucosal.

10 3. El uso según la reivindicación 2, en donde el medicamento está formulado para la vía oral.

4. El uso según la reivindicación 1, en donde el animal es un ser humano.

15 5. El uso según la reivindicación 1, en donde el ácido linoleico conjugado se elige de un isómero 18:2 (9c, 11t), un isómero 18:2 (9t, 11c), un isómero 18:2 (10c, 12t), un isómero 18:2 (10t, 12c), un éster bioactivo de los mismos, una sal de los mismos y una mezcla de los mismos.

20 6. El uso según la reivindicación 1, en donde el CLA es para suministrarse en una dosis de 1 mg/kg a 1000 mg/kg de peso corporal del animal.

7. El uso según la reivindicación 1 para reducir la inflamación mediada por la ciclooxigenasa 2 en un animal sin causar irritación gástrica.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Lib liberación de PGE2 de la tráquea
3 experimentos de superfusión

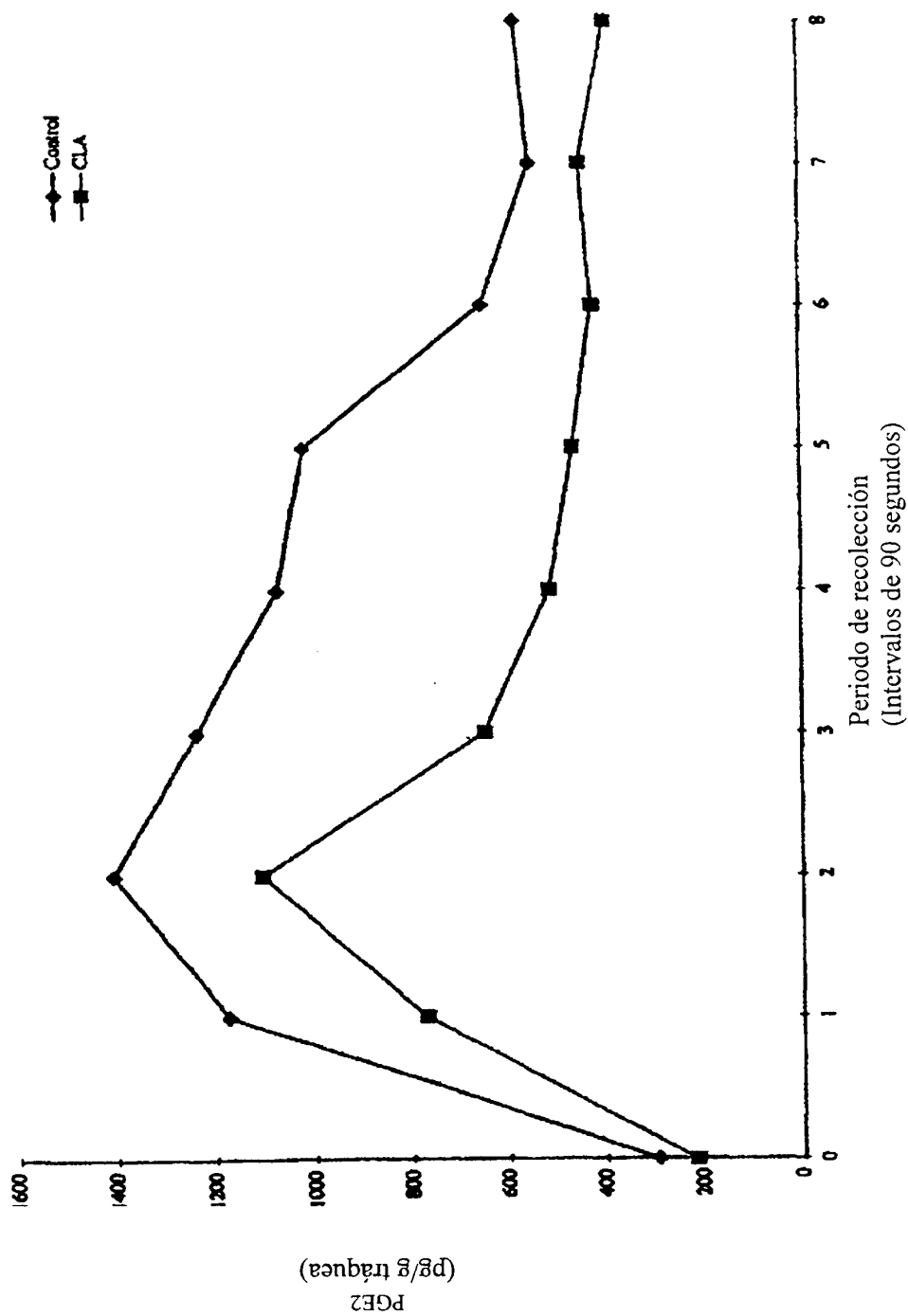


Fig. 1

FIG 2A

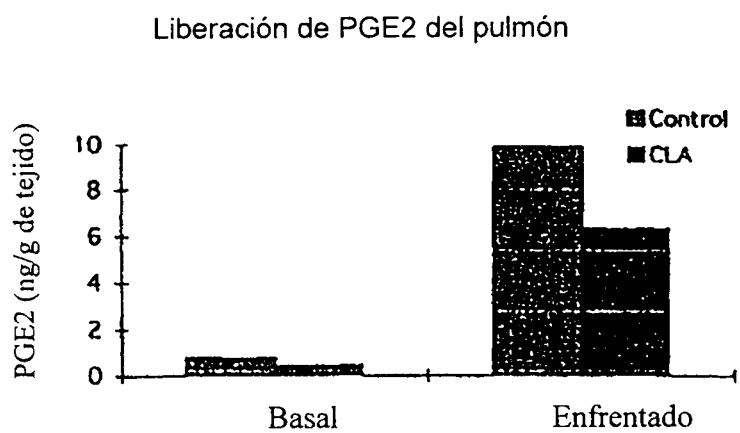


FIG 2B

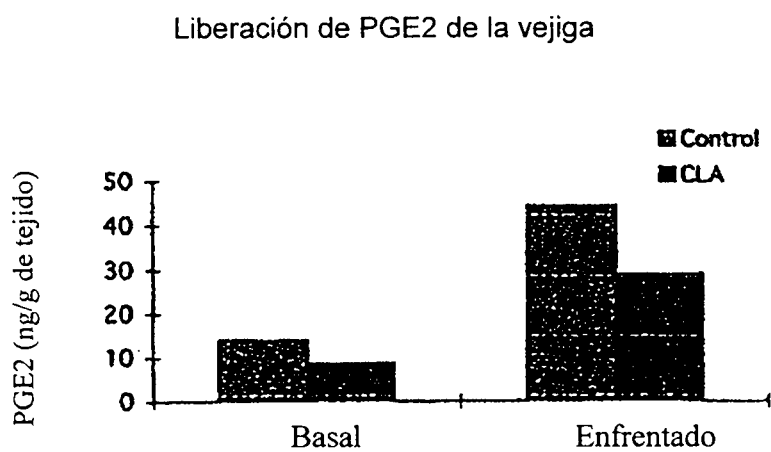


FIG 2C

