



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 588**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 31/66** (2006.01)  
**A61K 31/42** (2006.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02746091 .4**  
96 Fecha de presentación : **16.07.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1415667**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Regulación de la secreción del jugo pancreático que comprende un agente de regulación del receptor del LPA.**

30 Prioridad: **17.07.2001 JP 2001-216133**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

73 Titular/es: **ONO PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**  
**1-5, Doshomachi 2-chome**  
**Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP**

72 Inventor/es: **Nakade, Shinji y**  
**Saga, Hiroshi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 312 588 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

Regulación de la secreción del jugo pancreático que comprende un agente de regulación del receptor de LPA.

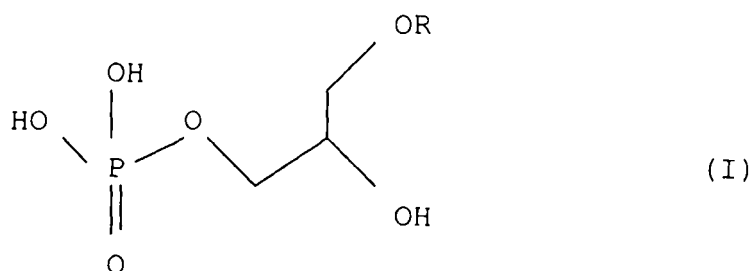
5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica para la regulación de la secreción del jugo pancreático que comprende un modulador de receptor de ácido lisofosfatídico (abreviado en adelante LPA). En particular, se refiere al uso de una composición farmacéutica para la inhibición de la secreción del jugo pancreático que comprende un agonista de receptor de LPA, y al uso de una composición farmacéutica para la aceleración de la secreción del jugo pancreático que comprende un antagonista de receptor de LPA, así como al uso de una composición farmacéutica que los comprende como ingrediente activo. Más en particular, se refiere al uso de una composición farmacéutica para la inhibición de la secreción del jugo pancreático que comprende un agonista de EDG-2, una composición farmacéutica para la aceleración de la secreción del jugo pancreático que comprende un antagonista de EDG-2, y al uso de una composición farmacéutica que los comprende como ingrediente activo.

**Antecedentes**

Se sabe que a través de la actividad de fosfolipasa desde las membranas celulares se producen diversos mediadores de lípidos, como eicosanoide y factor activador de plaquetas (PAF).

El ácido lisofosfatídico, un mediador de lípidos, representado por la fórmula (I):



(en la que R es acilo, alquenoilo o alquilo) es un lípido que se produce desde las membranas celulares o en la sangre, que actúa como mediador en el sistema de transducción de señal y suministra varias señales a las células. El LPA que existe de manera natural es L- $\alpha$ -LPA.

Recientemente, se ha descrito la existencia de tres subtipos de receptor de LPA y se ha ido probando gradualmente que sus actividades fisiológicas son a través del receptor de LPA. Los tres subtipos de receptor LPA se denominan EDG (gen de diferenciación endotelial) -2, 4 y 7 (LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> y LPA<sub>3</sub>), respectivamente y forman parte de la familia de receptor de EDG así como EDG-1, 3, 5, 6 y 8 (S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> y S1P<sub>5</sub>) que son receptores de esfingosina-1-fosfato. EDG-2 se denomina VZG-1, también (*Mol. Pharmacol.*, 2000 diciembre; 58(6):1188-96). El receptor de LPA al que se une LPA suministra señales a las células a través del receptor acoplado a proteína G. Como proteínas G capaces de unirse a receptores de LPA, se conocen Gs, Gi, Gq, G<sub>12/13</sub> y similares, y la diversidad está muy relacionada con el mecanismo de acción de LPA. Por otra parte los EDG-2, 4- y 7 que están ampliamente distribuidos en los organismos son diferentes en cuanto a la localización dependiendo de sus subtipos, y su papel en los receptores se considera, en correspondencia, diverso en los tejidos. No obstante, el subtipo de receptor localizado en los diversos tejidos aún no ha sido especificado.

Los efectos de LPA conocidos incluyen aceleración del crecimiento de fibroblastos *in vitro*, contracción del músculo liso (*J. Pharm. Pharmacol.* 43, 774 (1991), *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 514 (1982)), modulación de liberación de citoquina desde inmunocitos y similares. Por otra parte, en cuanto al efecto farmacológico causado por LPA *in vivo*, se han conocido el aumento de la presión arterial en ratas y la constricción de las vías respiratorias en cobayas.

Por otra parte, se ha sabido del efecto de LPA en el páncreas, según el cual LPA acelera la síntesis de ADN en las células beta de los islotes de Langerhan (*BBRC*, 218, 132 (1996)) y que LPA actúa sobre las líneas celulares de carcinoma ductal aumentando el nivel de la concentración de calcio intracelular (*J. Cell Phys.*, 186, 53 (2201)). Asimismo, se ha sabido que los subtipos de receptores de LPA, EDG-2 y EDG-7, están presentes en el páncreas (*Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 231, 619 (1997); *J. Biol. Chem.* 274, 39 2776 (1999)).

No existe ningún informe, sin embargo, en cuanto a la actividad *in vitro* e *in vivo* de LPA en el sistema acinal y en la secreción de jugos pancreáticos.

Hasta la fecha, no existe ningún informe sobre un producto natural que inhiba la secreción de jugos pancreáticos, salvo ciertas sustancias, es decir, transmisores nerviosos simpáticos del sistema nervioso autónomo como adrenalina, y hormonas como somatostatina, aunque sí se conocen péptidos fisiológicamente activos como colecistoquinina y

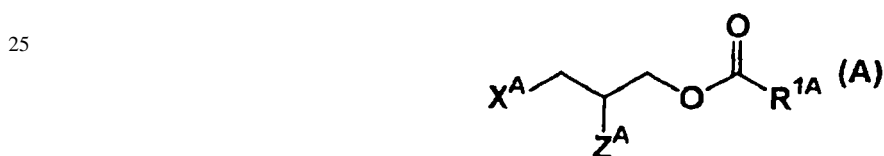
secretina como sustancias que aceleran la secreción de los jugos pancreáticos. Por consiguiente, se trata de un hallazgo inesperado que LPA, que no ha sido clasificado como neurotransmisor ni como hormona, tenga un efecto de inhibición de la secreción de jugos pancreáticos.

5 En general, se ha conocido que el jugo pancreático anormalmente secretado podría causar una característica patológica de pancreatitis aguda o crónica (Illustrative Digestive Organ Diseases, serie 14, Pancreatitis and Pancreatic Cancer, 90, publicado por Medical View Co.). Se ha considerado que amilasa y las enzimas proteolíticas contenidas en el jugo pancreático podrían actuar de forma excesiva destruyendo los propios tejidos. Los tratamientos terapéuticos  
10 existentes conocidos para la pancreatitis incluyen mesilato de camostat cuyo efecto consiste en inhibir las enzimas proteolíticas que incluyen principalmente tripsina (*Gendai Iryo*, 16, 844 (1984)) y loxiglumida que inhibe la secreción del jugo pancreático que depende de colescistoquinina (*Kan Tan Sui*, 37(5), 703-728 (1998)).

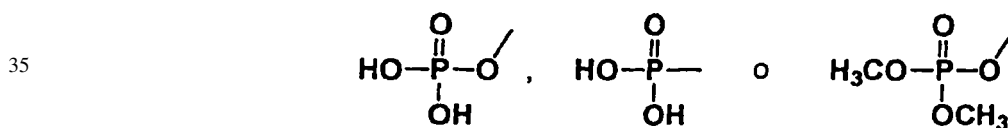
Por otra parte, entre las enzimas contenidas en el jugo pancreático, la lipasa pancreática es una importante enzima lipolítica. En los últimos años, se ha elucidado que un inhibidor de lipasa pancreática podría inhibir la absorción de  
15 grasas y lípidos desde órganos digestivos, estando relacionado el efecto con la anti-obesidad y teniendo como resultado el lanzamiento de un agente anti-grasa, orlistat, que inhibe la lipasa pancreática (*Expert Opinion Pharmacother*, 1(4), 841-847, mayo 2000). Por consiguiente, se espera que una disminución del nivel de lipasa pancreática en el jugo pancreático tenga un efecto de contrarrestar la obesidad.

20 Por otra parte, como ligandos para los receptores de LPA o EDG-2, se conocen los siguientes compuestos:

(1) En US 6.380.177 se describen compuestos representados por la fórmula (A) y agonistas de EDG-2:

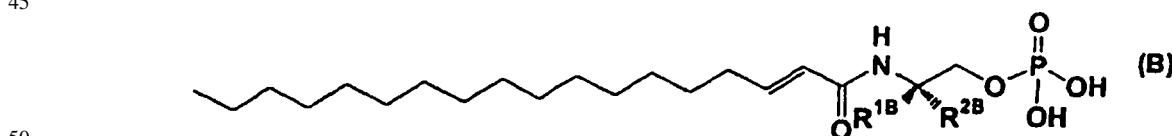


en la que  $X^A$  representa un grupo hidroxilo,



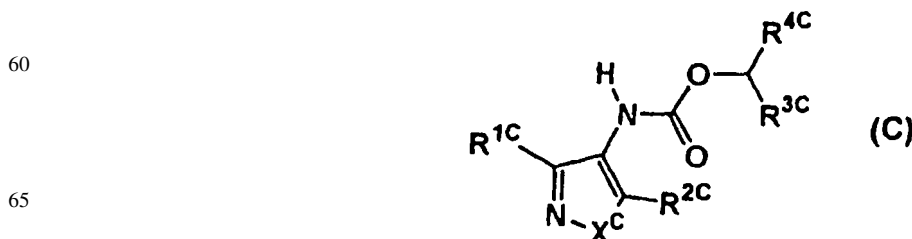
40  $Z^A$  representa hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo o  $OR^{2A}$ ;  $R^{2A}$  representa un grupo alquilo insaturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; y  $R^{1A}$  representa un alquilo saturado o insaturado que tiene de 15 a 17 átomos de carbono.

(2) *Molecular Pharmacology*, 60(6), 1173-1180 (2001) describe compuestos de fórmula (B) que son agonistas o  
45 antagonistas para  $LPA_1$  (EDG-2) y  $LPA_3$  (EDG-7):



en la que uno entre  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  representa hidrógeno, metilhidroxi, carbometilo, metilnamino, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno.

55 (3) En WO 01/60819 se describe que los compuestos de fórmula (C) o sus sales tienen un efecto inhibitor para los receptores de LPA en un experimento en el que se utilizan células que sobre-expresan EDG-2 y actúan en EDG-2:



en la que

R<sup>1C</sup> representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi, ariloxi, alquiltio o ariltio que puede tener un sustituyente(s), o halógeno;

R<sup>2C</sup> representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi o ariloxi que puede tener un sustituyente(s) o halógeno;

R<sup>3C</sup> representa un átomo de hidrógeno, alquilo inferior o alquilo halogenado;

R<sup>4C</sup> representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en (a) fenilo, arilo o un grupo heterocíclico que puede tener un sustituyente(s); (b) alquilo sustituido o sin sustituir; y (c) alquenilo sustituido o sin sustituir;

X<sup>C</sup> representa oxígeno o azufre, y

en la que R<sup>3C</sup> y R<sup>4C</sup> tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar una estructura cíclica de 5- a 10- eslabones, y en la que R<sup>3C</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>4C</sup> es un grupo distinto a metilo.

### Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han estudiado las actividades fisiológicas de moduladores de receptor de LPA de varias maneras con el fin de elucidar el papel de los receptores de LPA y han concluido de manera inesperada que actúan en el páncreas y que tienen relación con la secreción de jugo pancreático. Asimismo, han llegado a la conclusión de que EDG-2, entre los subtipos de receptores de LPA, está particularmente implicado. Los autores de la presente invención valoraron por primera vez en sus experimentos, si bien no se esperaban en absoluto los resultados por la técnica anterior.

Así pues, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica para la regulación de la secreción de jugo pancreático en los siguientes puntos (1) a (21), así como a un método para la detección selectiva de moduladores de receptores de LPA (no reivindicado).

1. Uso de un modulador de receptor de ácido lisofosfatídico (LPA) para la preparación de una composición farmacéutica para la regulación de la secreción de jugos pancreáticos.

2. El uso según el punto 1 antes mencionado, en el que el modulador de receptor de LPA es un agonista de receptor de LPA.

3. El uso según los puntos 1 y 2 antes mencionados, en el que la composición farmacéutica tiene la actividad de inhibir la secreción del jugo pancreático.

4. El uso de un agonista de receptor de LPA para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades pancreáticas u obesidad.

5. El uso según el punto 4 antes mencionado, siendo la enfermedad pancreática disfunción exocrina congénita, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, litiasis pancreática, colelitiasis, tumor pancreático, quiste pancreático o enfermedades pancreáticas acompañadas de anormalidad en el sistema nervioso autónomo.

6. El uso según el punto 2 antes mencionado, siendo el agonista de receptor de LPA ácido 1-linoleoil-lisofosfatídico o ácido 1-oleoil-lisofosfatídico.

7. El uso según el punto 1 antes mencionado, siendo el modulador de receptor de LPA un antagonista de receptor de LPA.

8. El uso según los puntos 1 a 7 antes mencionados, teniendo la composición farmacéutica la actividad de acelerar la secreción de jugos pancreáticos.

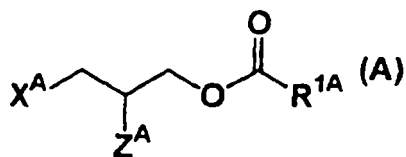
9. Uso de un antagonista de receptor de LPA para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades de órganos digestivos.

10. El uso según el punto 9 antes mencionado, siendo la enfermedad de un órgano digestivo indigestión, estreñimiento, diarrea, cibofobia o síndrome de malabsorción.

11. El uso según el punto 2 antes mencionado, siendo el receptor de LPA, EDG-2.

12. El uso según el punto 11 antes mencionado, siendo el agonista de EDG-2 un compuesto representado por la fórmula (A):

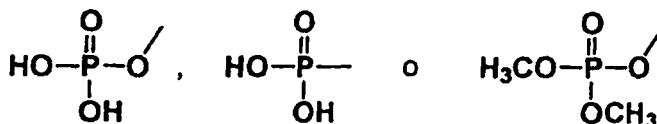
5



10

en la que  $X^A$  representa un grupo hidroxilo,

15



20

$Z^A$  representa hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo o  $OR^{2A}$ ;

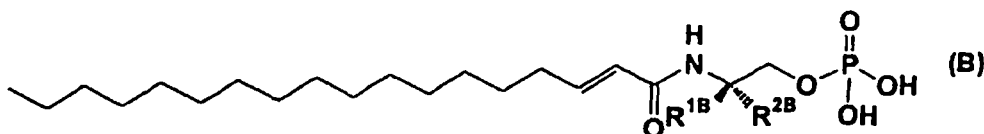
$R^{2A}$  representa un grupo alquilo insaturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; y

25

$R^{1A}$  representa un alquilo saturado o insaturado que tiene de 15 a 17 átomos de carbono.

13. El uso según el punto 11 antes mencionado, en el que el agonista de EDG-2 es un compuesto representado por la fórmula (B):

30



35

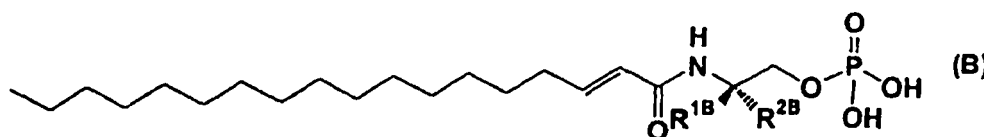
en la que uno entre  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  representa hidrógeno, metilendioxi, carbometilo, metilendioxi, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno.

40

14. El uso según el punto 7 antes mencionado en el que el receptor LPA es EDG-2.

15. El uso según el punto 14 antes mencionado, en el que el antagonista de EDG-2 es un compuesto representado por la fórmula (B):

45



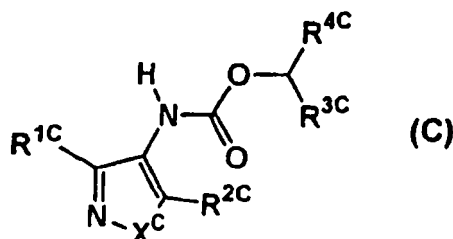
50

en la que todos los símbolos tienen los mismos significados que se han descrito en el punto 13 antes mencionado.

55

16. El uso según el punto 14 antes mencionado, en el que el antagonista de EDG-2 es un compuesto representado por la fórmula (C):

60



65

## ES 2 312 588 T3

en la que

$R^{1C}$  representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi, ariloxi, alquiltio o ariltio que puede tener un sustituyente(s), o halógeno;

$R^{2C}$  representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi o ariloxi que puede tener un sustituyente(s) o halógeno;

$R^{3C}$  representa un átomo de hidrógeno, alquilo inferior o alquilo halogenado;

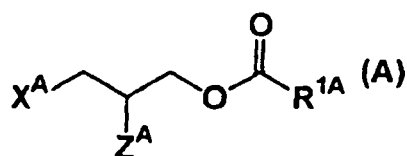
$R^{4C}$  representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en (a) fenilo, arilo o un grupo heterocíclico que puede tener un sustituyente(s); (b) alquilo sustituido o sin sustituir; y (c) alqueno sustituido o sin sustituir;

$X^C$  representa oxígeno o azufre, y

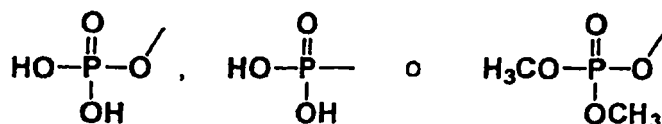
en la que  $R^{3C}$  y  $R^{4C}$  tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar una estructura cíclica de 5- a 10- eslabones, y en la que  $R^{3C}$  es un átomo de hidrógeno,  $R^{4C}$  es un grupo distinto a metilo.

17. El uso según el punto 16 antes mencionado, en el que el antagonista de EDG-2 es 3-({4-[4({1-(2-clorofenil)etoxi}carbonil}amino)-3-metil-5-isoxazolil]encil}ulfanil)propanoato de metilo.

18. Uso de un agonista de receptor de LPA según el punto 4 antes mencionado seleccionado del grupo que consiste en ácido 1-linoleoil-lisofosfatídico, ácido 1-oleoil-lisofosfatídico, un compuesto representado por la fórmula(A):



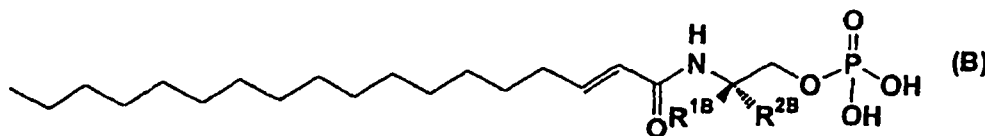
en la que  $X^A$  representa un grupo hidroxilo,



$Z^A$  representa hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo o  $OR^{2A}$ ;

$R^{2A}$  representa un grupo alquilo insaturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; y

$R^{1A}$  representa un alquilo saturado o insaturado que tiene de 15 a 17 átomos de carbono y un compuesto representado por la fórmula (B):



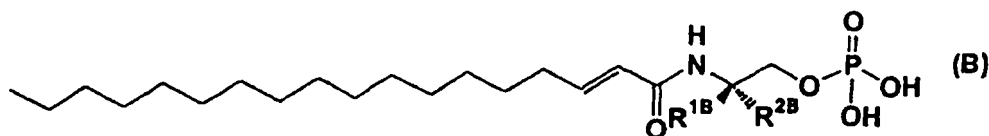
en la que uno entre  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  representa hidrógeno, metilhidroxi, carbometilo, metilamino, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno,

para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades pancreáticas u obesidad.

19. El uso según el punto 18 antes mencionado, siendo la enfermedad pancreática disfunción exocrina congénita, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, litiasis pancreática, colelitiasis, tumor pancreático, quiste pancreático o enfermedades pancreáticas acompañadas de anomalía en el sistema nervioso autónomo.

20. Uso de un antagonista de receptor de LPA según el punto 9 antes mencionado seleccionado del grupo que consiste en un compuesto representado por la fórmula (B):

5



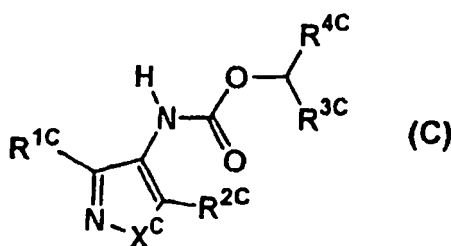
10

en la que uno entre  $R^{1B}$  y  $R^{2B}$  representa hidrógeno, metilhidroxi, carbometilo, metilnamino, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno, y

15

un compuesto representado por la fórmula (C):

20



25

30 en la que

$R^{1C}$  representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi, ariloxi, alquiltio o ariltio que puede tener un sustituyente(s), o halógeno;

35

$R^{2C}$  representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi o ariloxi que puede tener un sustituyente(s) o halógeno;

$R^{3C}$  representa un hidrógeno, alquilo inferior o alquilo halogenado;

40

$R^{4C}$  representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en (a) fenilo, arilo o un grupo heterocíclico que puede tener un sustituyente(s); (b) alquilo sustituido o sin sustituir; y (c) alqueno sustituido o sin sustituir;

$X^C$  representa oxígeno o azufre, y

45

en la que  $R^{3C}$  y  $R^{4C}$  tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar una estructura cíclica de 5- a 10- eslabones, y en la que  $R^{3C}$  es un átomo de hidrógeno,  $R^{4C}$  es un grupo distinto a metilo,

para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención para enfermedades de un órgano digestivo.

50

21. El uso según el punto 20 antes mencionado, siendo la enfermedad de un órgano digestivo indigestión, estreñimiento, diarrea, cibofobia o síndrome de malabsorción.

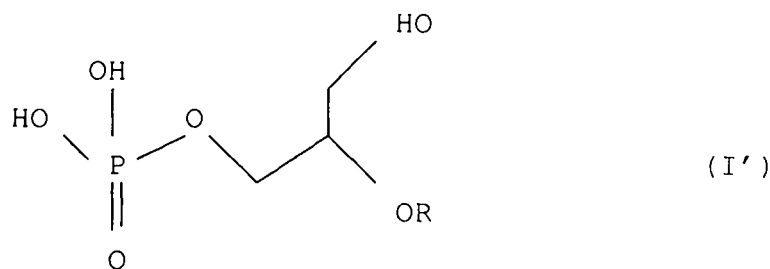
### 55 Descripción detallada

En la presente invención, LPA significa ácido lisofosfatídico representado por la fórmula (I) y es un nombre genérico de compuestos en los que uno o dos grupos hidroxilo de glicerol en el ácido glicerofosfórico está sustituido por ácido graso.

60

En la presente memoria descriptiva, la fórmula estructural de LPA está representada por la siguiente fórmula (I), y LPA incluye también compuestos en los que el grupo R está unido a otro grupo hidroxilo de glicerol, es decir, los compuestos representados por la siguiente fórmula (I')

65

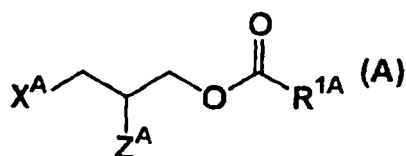


en la que R tiene el mismo significado que se ha descrito antes.

15 En la presente invención, el modulador de receptor de LPA se refiere a un agonista de receptor de LPA o un antagonista de receptor de LPA.

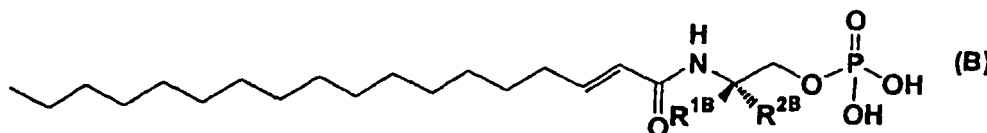
20 El agonista de receptor de LPA incluye todos los compuestos naturales y no naturales que actúan sobre los receptores de LPA o que activan los receptores de LPA. Los agonistas son preferiblemente compuestos de bajo peso molecular que tienen un peso molecular de 100 a 700, más preferiblemente, derivados de LPA, más preferiblemente 18:3-LPA (el compuesto de fórmula (I) en el que R es 1-linoleoilo) y en particular 18:3-LPA. Adicionalmente, se utilizan preferiblemente los siguientes compuestos.

(1) Compuesto de fórmula (A):



en la que todos los símbolos tienen los mismos significados que se han descrito anteriormente.

35 (2) Compuestos de fórmula (B):



45 en la que todos los símbolos tienen los mismos significados que se han descrito antes.

Entre los LPAs representados por la fórmula (I), es preferible un L- $\alpha$ -LPA de origen natural.

50 Dado que los agonistas de receptor de LPA tienen el efecto de inhibir la secreción del jugos pancreáticos, son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por una secreción de jugos pancreáticos excesiva, es decir, enfermedades pancreáticas (disfunción exocrina congénita, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, litiasis pancreática, colelitiasis, tumor pancreático, quiste pancreático) y obesidad asociada con lipasa pancreática.

Entre los agonistas de receptor de LPA, se prefieren en particular los agonistas de EDG-2.

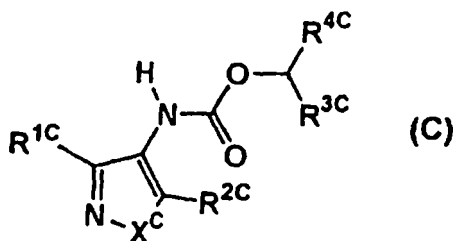
55 Como agonistas de EDG-2, se prefieren los compuestos de fórmula (A) y de fórmula (B). En cuanto a los agonistas de EDG-2, los compuestos que se encuentren en el futuro, según se espera, deberán incluirse naturalmente de forma adicional a los compuestos conocidos hasta ahora.

60 Entre los compuestos representados por la fórmula (A), se prefieren los descritos en US 6.380.177, que incluyen específicamente LXR100023, LXR100008, LXR100016, LXR100024, LXR100001, LXR1000013, Y LXR100030.

65 Entre los compuestos representados por la fórmula (B), se prefieren los descritos en *Mol. Pharmacol.*, 60(6), 1173-1180 (2001). Son compuestos particularmente preferibles NAEPA, VPC31143, VPC31144, VPC31139, VPC31180, VPC12178, VPC12048, VPC12086, VPC12101, VPC12109, VPC12115, VPC12098, VPC40105, VPC12084, VPC12255 y VPC12204.

Por otra parte, como antagonista de receptor de LPA, se permite cualquiera que inactive el receptor de LPA.

Específicamente, se emplean preferiblemente los compuestos de fórmula (B) y de fórmula (C) antes mencionados:



en los que todos los símbolos tienen los mismos significados que se han descrito antes.

15 Dado que los antagonistas de receptor de LPA tienen el efecto de promover la secreción de jugos pancreáticos, son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por una secreción de los jugos pancreáticos insuficiente, es decir, indigestión, estreñimiento, diarrea y cibofobia.

20 Los antagonistas de EDG-2 no aceleran la secreción de jugos pancreáticos en animales normales (ejemplo 6, figura 5). Por lo tanto, se espera que tengan un buen efecto en la disminución de la secreción de los jugos pancreáticos cuando la función digestiva o de absorción se haya obstruido durante un largo período debido a cirugía de los órganos digestivos, trastornos hepato-biliares, enfermedades pancreáticas o enfermedad de Crohn, con el resultado de diarrea, heces sueltas, absorción insuficiente de diversos nutrientes y malnutrición (es decir, síndrome de malabsorción).

25 En cuanto a los antagonistas de EDG-2, son preferibles los compuestos representados por las fórmulas (B) y (C).

Entre los compuestos representados por la fórmula (B), se prefieren los descritos de manera específica en *Molecular Pharmacology*, 60(6), 1173-1180 (2001). El compuesto particularmente preferible es VPC12249.

30 Entre los compuestos representados por la fórmula (C), se prefieren los descritos en los ejemplos de WO 01/60819. Se prefiere en particular 3-((4-[4-([1-(2-clorofenil)etoxi]carbonil)amino]-3-metil-5-isoxazolil]bencil)sulfanil)propanoato de metilo.

35 Los autores de la presente invención han confirmado que 18:3-LPA tiene un fuerte efecto en el páncreas *in vivo*. En particular, se ha observado que la administración de LPA inhibe la secreción de jugo pancreático (ejemplo 1), reduce el volumen de amilasa y lipasa secretadas (ejemplo 2 y ejemplo 3) y modera el aumento de la secreción de jugo pancreático inducida por la estimulación con colecistoquinina (CCK) (ejemplo 4). Se conoce CCK como un factor que empeora la pancreatitis o que da tensión al organismo vivo. Dado que LPA inhibe una señal de CCK, se considera que el efecto de LPA debería reducir el estado patológico de la pancreatitis causado por CCK y aliviar de la tensión.

40 En este sentido, no se ha podido confirmar ningún efecto de LPA en LPC que tiene la misma cadena de carbonos. Esto hace pensar en que el efecto de LPA está mediado por el receptor de LPA.

45 Por otra parte, se ha sabido que los subtipos de receptores de LPA incluyen 3 clases de EDGs (gen de diferenciación endotelial), 2, 4 y 7; por lo tanto, los compuestos que actúan de manera particular sobre ellos se consideran efectivos para enfermedades pancreáticas.

50 Asimismo, en un experimento en el que se utilizó el agonista de EDG-2 (ejemplo 6), se confirmó un efecto inhibitorio en la secreción de jugo pancreático. Por otra parte, en un experimento en el que se utilizó antagonista de EDG-2 (ejemplo 7), se confirmó que el antagonista había recuperado la secreción de jugos pancreáticos desde la inhibición causada por 18:3-LPA y que indujo la secreción al mismo nivel en un grupo de control sin tratar. Por consiguiente, esto sugiere que el efecto está mediado por EDG-2.

55 Por lo tanto, cabe esperar que el antagonista de receptor de LPA, en particular un antagonista de EDG-2, funcione para promover la secreción de jugo pancreático. Por otra parte, cabe esperar que al agonista de receptor de LPA, en particular el agonista de EDG-2, inhiba la secreción de jugo pancreático.

60 El efecto inhibitorio de LPA en la secreción de jugos pancreáticos en el páncreas observado en la presente invención sugiere que el propio LPA, así como el agonista y antagonista de receptor de LPA son útiles como agentes terapéuticos en enfermedades causadas por secreción de jugos pancreáticos anormal.

65 El método para determinar el efecto en la secreción de jugos pancreáticos descrito en la presente invención es útil como método de detección selectiva *in vivo* para moduladores de receptor de LPA, en particular moduladores de EDG-2 en mamíferos como ratas.

*Toxicidad*

El compuesto utilizado en la presente invención tiene una baja toxicidad de manera que su uso como sustancia farmacéutica se puede considerar como suficientemente seguro.

5

**Aplicación industrial***Aplicación a sustancias farmacéuticas*

Los moduladores de receptor de LPA utilizados en la presente invención, es decir agonistas y antagonistas de receptor de LPA, se unen a los receptores de LPA para presentar el efecto de activación o inactivación. Por lo tanto, se consideran útiles para prevenir y/o tratar enfermedades causadas por una secreción de jugos pancreáticos anormal. Así pues, los agonistas de receptor de LPA que inhiben la secreción de jugos pancreáticos, se consideran como útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades pancreáticas y obesidad. Los antagonistas de receptor de LPA que promueven la secreción de jugos pancreáticos se consideran como útiles en el tratamiento y/o prevención de indigestión, estreñimiento, diarrea y cibofobia.

15

Los moduladores de receptor de LPA utilizados en la presente invención se administran normalmente sistémicamente o por vía tópica, y por vía oral o parenteral para el propósito mencionado.

20

En la presente invención, los moduladores de receptor de LPA pueden administrarse en combinación con otros fármacos para el propósito de 1) complementar y/o potenciar el efecto de prevención y/o tratamiento, 2) mejorar la dinámica y la absorción del compuesto y reducir la dosis, y/o 3) aliviar el efecto secundario del compuesto.

Los moduladores de receptor de LPA pueden administrarse en combinación con otros fármacos como una composición en un producto de fármaco que comprende estos componentes o se puede administrar por separado. Cuando se administran independientemente, pueden administrarse simultáneamente con un tiempo de retardo. La administración con un tiempo de retardo incluye el método de administración de moduladores de receptor de LPA antes de otros fármacos y viceversa; se pueden administrar en la misma ruta o no.

25

La combinación mencionada tiene efecto sea cual sea el efecto de los moduladores de receptor de LPA de tratamiento y/o prevención de la enfermedad complementándolo y/o potenciándolo.

30

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto de agonista de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento para enfermedades pancreáticas (pancreatitis) se pueden mencionar por ejemplo, inhibidores de proteasa, inhibidores de secreción de ácido gástrico, agentes antiespasmódicos (inhibidores COMT, agentes anti-serotonina, etc.), fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agentes analgésicos de actuación central, fármacos sedantes, fármacos digestivos, antácidos, bloqueadores H<sub>2</sub>, antidepresivos, agentes anestésicos de la mucosa gástrica, moduladores de la función del tracto digestivo (antagonistas CCK-A), antagonistas de receptor de benzodiazepina mitocondrial, etc.

35

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto de prevención y/o tratamiento de agonista de receptor de LPA para obesidad, se pueden mencionar por ejemplo agonistas beta3, inhibidores de lipasa pancreática etc.

Como agonistas beta3, se pueden mencionar SER-58611A, AJ-9677, KUL-7211, SB-418790, GW 427353, N-5984, SR-59062A, etc.

45

Como inhibidores de lipasa pancreática se puede mencionar orlistat, etc.

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto de antagonista de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento para indigestión y/o síndrome de indigestión, se pueden mencionar por ejemplo, antácidos, bloqueadores H<sub>2</sub>, moduladores de la función del tracto digestivo, aceleradores de la función del tracto digestivo, fármacos contra la ansiedad, tranquilizantes, fármacos digestivos, inhibidores de bomba de protones, agentes antimuscarínicos, fármacos anticolinérgicos, fortificadores del factor defensivo, antagonistas de dopamina, aceleradores digestivos, fármacos para controlar la función intestinal, antagonistas de receptor de benzodiazepina mitocondriales, etc.

50

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto del antagonista de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento para estreñimiento, se pueden mencionar por ejemplo evacuantes.

Como evacuantes, se pueden mencionar laxantes para el intestino delgado (aceite de ricino, aceite de oliva), laxantes osmóticos (salinos) (sulfato de magnesio, sulfato sódico, hidrogen fosfato sódico, sal de Karlsbad artificial), catárticos de masa (metil celulosa, carmelosa sódica, agar), laxantes desemulsionantes (parafina líquida), laxantes infiltrativos (sulfosuccinato sódico de dioctilo), laxantes para el intestino grueso (bisacodil, fenofalin, picosulfato sódico, senosida), etc.

55

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto del antagonista de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento para diarrea, se pueden mencionar por ejemplo fármacos contra la diarrea, etc.

## ES 2 312 588 T3

Como fármacos contra la diarrea, se pueden mencionar astringentes (tanato de albúmina, subnitrito de bismuto, subgalato de bismuto), fármacos anticolinérgicos (bromuro de propantelina, extracto de escopolia, escopolamina), compuestos opioidérgicos (morfina, hidrocloreto de loperamida), agentes de absorción (carbón medicinal, silicato de aluminio), etc.

5

Como otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto de antagonista de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento para cibofobia, se pueden mencionar por ejemplo SSRI (inhibidor de la recaptación de serotonina selectivo), SNRI (inhibidor de la recaptación de serotonina y norepinefrina selectivos), etc.

10

Como SSRI, se pueden mencionar hidrocloreto de fluoxetina, maleato de fluvoxamina, etc.

15

Como otros SSRI, se pueden mencionar hidrocloreto de minapina, hidrocloreto de sibutramina, hidrocloreto de tramadol, hidrocloreto de venlafaxina, hidrocloreto de paroxetina, hidrocloreto de milnacipran, hidrobromuro de citalipram, hidrocloreto de nefazolon, hidrocloreto de celtralina, esitalopram, hidrocloreto de duloxetina, hidrocloreto de tramadol, etc.

Como SNRI, se puede mencionar venlafaxina, etc.

20

La relación de peso del modulador de receptor de LPA y otros fármacos no está limitada. Se pueden administrar otros fármacos como una combinación de cualquiera de los dos o más fármacos.

25

En otros fármacos para complementar y/o potenciar el efecto del modulador de receptor de LPA de prevención y/o tratamiento, se incluyen también no solamente los fármacos que existen actualmente, sino también los que se puedan encontrar en el futuro basándose en los mecanismos mencionados.

El modulador de receptor de LPA con otros fármacos se utilizan para los propósitos que se han descrito anteriormente, y se administran normalmente sistémica o tópicamente por vía oral o parenteral.

30

Las dosis que se administren serán determinadas dependiendo por ejemplo de la edad, el peso corporal, los síntomas, el efecto terapéutico deseado, la ruta de administración y la duración del tratamiento. En el adulto humano, las dosis por persona están comprendidas por lo general entre 1 mg y 1000 mg, por administración oral, hasta varias veces al día, o de 0,1 mg a 100 mg, por administración parenteral (preferiblemente por administración intravenosa), hasta varias veces al día, o administración continua desde 1 a 24 horas por día desde la vena.

35

Tal como se ha mencionado anteriormente, las dosis que se utilicen dependerán de varias condiciones. Por lo tanto, existen casos en los que se puedan utilizar dosis que sean más bajas o más altas que los intervalos antes identificados.

40

El modulador de receptor de LPA o el modulador de receptor de LPA y otros fármacos se pueden administrar en la composición por ejemplo presentadas como composiciones sólidas, composiciones líquidas y otras composiciones, cada una de ellas para administración oral, o inyecciones, linimentos o supositorios, cada una de ellas para administración parenteral.

45

Las composiciones sólidas para administración oral incluyen tabletas de comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y granulados. Las cápsulas incluyen cápsulas duras y cápsulas blandas.

50

En dichas composiciones sólidas, se pueden utilizar una o más sustancia(s) activas, como tales o como sustancias farmacéuticas según las leyes de la técnica, en combinación con un agente de dilución (lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, almidón, etc.), un aglutinante (hidroxipropil celulosa, polivinil pirrolidona, aluminometasilicato de magnesio, etc.), disgregantes (glicolato de celulosa y calcio, etc.), lubricantes (estearato de magnesio, etc.), agentes estabilizantes y solubilizantes (ácido glutámico, ácido aspártico, etc.; etc. Y se pueden recubrir con agentes de recubrimiento (sacarosa, gelatina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, ftalato, etc.) o con dos o más capas, si es necesario. Asimismo, se incluyen cápsulas hechas de una sustancia que puede ser absorbida por el cuerpo, como por ejemplo gelatina.

55

Las composiciones líquidas para administración oral incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, siropes y elixires farmacéuticamente aceptables. En dichas composiciones líquidas, se pueden disolver, suspender o emulsionar una o más de las sustancia(s) activas, en los diluyentes inertes que se utilizan generalmente (agua purificada, etanol o mezclas de ellos, etc). Las composiciones pueden comprender además del diluyente inerte humectantes, agentes de suspensión, agente emulsionante, agentes edulcorantes, agentes para dar sabor, agentes aromatizantes, conservantes y agentes de tampón.

60

En la administración parenteral, la formulación de uso externo incluye por ejemplo pomadas, geles, cremas, cataplasmas, apósitos, linimentos, agentes atomizados, inhaladores, pulverizadores, gotas oculares y gotas nasales, etc. Incluyen uno o más de los compuestos activos y se preparan a través de un método conocido o el método habitual.

La pomada se prepara a través de un método conocido o del método habitual. Por ejemplo, se prepara por levigación o fusión de uno o más de los compuesto(s) activo(s) y un sustrato. El sustrato de la pomada se selecciona a partir de los conocidos o los habituales. Por ejemplo, se pueden utilizar ácido graso superior o éster de ácido graso superior (ácido

## ES 2 312 588 T3

adípico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, éster de ácido adípico, éster de ácido mirístico, éster de ácido palmítico, éster de ácido esteárico, éster de ácido oleico, etc.), cera (cera de abeja amarilla, Spermaceti, cersina, etc.), agente tensioactivo (éster de ácido fosfórico de éter de polioxietileno alquilo, etc.), alcohol superior (cetanol, alcohol estereol, alcohol cetosteárico, etc.), aceite de silicona (dimetil polisiloxano, etc.), hidrocarburo (petrolato hidrófilo, petrolato blanco, lanolina purificada, parafina líquida, etc.), glicol (etilen glicol, dietilen glicol, propilen glicol, polietilen glicol, macrogol, etc.), aceite vegetal (aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de trementina, etc.), aceite animal (aceite de visón, aceite de yema de huevo, esqualeno, etc.), agua, acelerador de la absorción, inhibidor hidratante reafirmante, etc. como una sola sustancia seleccionada entre ellas o una mezcla que consiste en dos o más clases seleccionadas entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un humectante, un agente conservante, un estabilizante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

Se prepara el gel a través de un método conocido o un método habitual. Por ejemplo, se prepara por fusión de uno o más de los compuesto(s) activo(s) y el sustrato. El sustrato de gel se selecciona entre los conocidos o los habituales. Por ejemplo, se puede utilizar alcohol inferior (etanol, alcohol isopropílico, etc.); agente gelificante (carboxi metil celulosa, hidroxil etil celulosa, hidroxil propil celulosa, etil celulosa, etc.), agente neutralizante (trietanolamina, diisopropanolamina, etc.), agente tensioactivo (monoestearato, polietilen glicol, etc.), goma, agua, acelerador de la absorción, inhibidor hidratante reafirmante, etc., como una sustancia única seleccionada entre ellos o una mezcla que consiste en dos o más clases que se selecciona entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un agente conservante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

La crema se prepara a través de un método conocido o el método habitual. Por ejemplo, se prepara por fusión o emulsificación de uno o más de los compuesto(s) activo(s) y el sustrato. El sustrato de la crema se selecciona entre los conocidos o los habituales. Por ejemplo, se puede utilizar un éster de ácido graso superior, alcohol inferior, hidrocarburo, polialcohol (propilen glicol, 1,3-butilen glicol, etc.), alcohol superior (2-hexildecanol, cetanol, etc.), agente emulsionante (éter alquílico de polioxietileno, éster de ácido graso, etc.), agua, acelerador de la absorción, inhibidor hidratante reafirmante, etc. como una sustancia única seleccionada entre ellos o una mezcla que consiste en dos o más clases que se seleccionan entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un agente conservante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

La cataplasma se prepara a través de los métodos conocidos o los métodos habituales. Por ejemplo, se prepara por fusión de uno o más de los compuesto(s) activo(s) y un sustrato, y después se coloca la sustancia amasada sobre un medio de soporte. El sustrato para la cataplasma se selecciona entre los conocidos o los habituales. Por ejemplo, se puede utilizar un agente espesante (ácido poliacrílico, polivinil pirrolidona, goma arábica, almidón, gelatina, metil celulosa, etc.), un humectante (urea, glicerina, propilen glicol, etc.), agente de volumen (caolín, óxido de zinc, talco, calcio, magnesio, etc.), agua, agente solubilizante, agentes espesante, inhibidor hidratante y reafirmante, etc. como una sustancia en solitario seleccionada entre ellos o una mezcla que consiste en dos o más clases que se seleccionan entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un agente conservante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

El apósito se prepara a través de métodos conocidos o métodos habituales. Por ejemplo, se prepara por fusión de uno o más de los compuesto(s) activo(s) y un sustrato, y se coloca después sobre un medio de soporte. El sustrato para el apósito se selecciona entre los conocidos o los habituales. Por ejemplo, se puede utilizar un sustrato de polímero, grasa, ácido graso superior, espesante, inhibidor hidratante reafirmante, etc. como una sustancia en solitario seleccionada entre ellos o como una mezcla que consiste en dos o más clases que se seleccionan entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un agente conservante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

El linimento se prepara a través de un método conocido o el método habitual. Por ejemplo, se pueden disolver, suspender o emulsionar uno o más de los compuesto(s) activo(s) en agua, alcohol (etanol, polietilen glicol, etc.), ácido graso superior, glicerina, jabón, agente emulsionante, agente de suspensión, etc. como una sustancia en solitario seleccionada entre ellos o como una mezcla que consiste en dos o más unidades que se selecciona entre ellos. Asimismo, puede estar contenido un agente conservante, un agente antioxidante, materiales de fragancia, etc.

El agente atomizado, el inhalador y el pulverizador pueden comprender además del diluyente utilizado generalmente un estabilizante como bisulfito sódico y un tampón de isotonicación como cloruro sódico, citrato sódico o ácido cítrico. El proceso de preparación de los pulverizadores se describe en detalle por ejemplo en la patente EE.UU. N° 2.868.691 y 3.095.355.

Las inyecciones para administración parenteral incluyen formas acuosas, suspensiones, emulsiones y formas sólidas que se disuelven o se suspenden en disolvente(s) para inyección inmediatamente antes de su uso. En las inyecciones, se pueden disolver, suspender o emulsionar en el disolvente(s) uno o más de los compuesto(s) activo(s). Los disolventes pueden incluir agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, aceite vegetal, propilen glicol, polietilen glicol, alcohol como etanol o una mezcla de ellos. Asimismo, estas inyecciones pueden comprender algunos aditivos, como agentes estabilizantes, adyuvantes de solución (como ácido glutámico, ácido aspártico o POLYSORBATE80 (marca registrada), etc.), agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes suavizantes, agentes de tamponado, conservantes. Se pueden esterilizar en una etapa final, o se pueden preparar y compensar con arreglo a los métodos de esterilización. Se pueden fabricar también en una forma sólida esterilizada, como por ejemplo, productos liofilizados, que se pueden disolver en agua esterilizada o algún otro diluyente(s) esterilizado para inyección inmediatamente antes de su uso.

## ES 2 312 588 T3

Entre las formas de dosis para las gotas oculares para administración parenteral se incluyen soluciones oftálmicas, suspensiones oftálmicas, emulsiones oftálmicas, soluciones oftálmicas disueltas antes de su uso y pomadas oculares.

5 Dichas gotas oculares se preparan a través de métodos conocidos. Por ejemplo, se pueden disolver, suspender o emulsionar uno o más de los compuesto(s) activo(s) en un disolvente(s). Como disolventes para gotas oculares, se pueden mencionar por ejemplo agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, otros disolventes acuosos, disolventes no acuosos para inyección (por ejemplo, aceite vegetal, etc.) y una combinación de ellos. Si es necesario, las gotas oculares pueden comprender uno o más aditivos como por ejemplo un agente isotonzante (como cloruro sódico o glicerina concentrada), un agente de tamponado (como fosfato sódico o acetato sódico), un agente tensioactivo (como "Polysorbate 80" (marca comercial), estearato de polioxilo 40 o aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno), un estabilizante (como citrato sódico o edetato sódico) y un antiséptico (como cloruro de benzalconio o ácido p-aminobenzoico). Se pueden esterilizar en una etapa final, o se pueden preparar y compensar con arreglo a los métodos de esterilización. Se pueden fabricar también en una forma sólida esterilizada, como por ejemplo productos liofilizados, que se pueden disolver en agua esterilizada o algún otro diluyente(s) esterilizado(s) inmediatamente antes de su uso.

15 La dosis de inhaladores para administración parenteral incluye un aerosol, polvos para inhalación o líquidos para inhalación. Los líquidos para inhalación se pueden disolver o suspender en agua o en otro disolvente apropiado, según sea necesario.

20 Dichos inhaladores se preparan a través de un método conocido. Por ejemplo, se prepara un líquido para inhalación mediante el uso de aditivos apropiados seleccionados entre un antiséptico (como cloruro de benzalconio o ácido p-aminobenzoico), un agente colorante, un agente de tamponado (como fosfato sódico o acetato sódico), un agente isotonzante (como cloruro sódico o glicerina concentrada), un agente espesante (como polímero de carboxivinilo) o un acelerador de la absorción, etc., si es necesario.

25 Se prepara un polvo para inhalación utilizando los aditivos apropiados seleccionados entre un agente lubricante (como ácido estearílico o la sal del mismo), un agente aglutinante (como almidón, dextrina) un agente diluyente (como lactosa, celulosa), un agente colorante, un antiséptico (como cloruro de benzalconio o un ácido p-aminobenzoico), un acelerador de la absorción, etc., si es necesario.

30 En el caso de la administración de un líquido para inhalación, se utiliza normalmente un pulverizador (atomizador, nebulizante) y en el caso de la administración del polvo para inhalación, para agentes en polvo se utiliza normalmente un aparato de administración por inhalación.

35 Las demás composiciones para administración parenteral incluyen supositorios para administración intrarectal y pesarios para administración vaginal que comprenden uno o más de las sustancia(s) activa(s) y se pueden preparar a través de métodos conocidos por sí mismos.

### Breve descripción de los gráficos

40 La figura 1 es un gráfico en el que se muestra un efecto de inhibición de LPA sobre la secreción de los jugos pancreáticos en ratas.

45 La figura 2 es un gráfico en el que se muestra el efecto inhibidor de LPA en la secreción de amilasa en ratas.

La figura 3 es un gráfico en el que se muestra el efecto inhibidor de LPA en la secreción de lipasa en ratas.

50 La figura 4 es un gráfico en el que se muestra el efecto inhibidor de LPA en la secreción de jugos pancreáticos inducida por colecistoquinina en ratas.

La figura 5 es un gráfico en el que se muestra un efecto de recuperación de 3-({4-4-({1-(2-clorofenil)etoxi} carbonil} amino)-3-metil-5-isoxazolil}bencil} sulfanil)propanoato de metilo contra la inhibición inducida por 18:3-LPA de secreción de jugos pancreáticos en ratas.

### 55 Mejor modo de realización de la invención

A continuación, se describirá la presente invención mediante un ejemplo de referencia y un ejemplo.

Ejemplo de referencia 1

60 *Preparación de 1-linoleoil (18:3) LPA*

Se hizo reaccionar enzimáticamente una composición que contenía 1-linoleoil (18:3)-LPC (lisofosfatidil colina) (SRL-B641) 3 mg/mL, fosfolipasa D (Sigma P-8023) 60 U/mL, Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, y fluoruro sódico 5 mM, durante toda la noche, con agitación vigorosa a 37°C. Se extrajo con disolvente mixto de cloroformo y metanol (una vez con la proporción de cloroformo: metanol = 2:1 y, a continuación, dos veces con la proporción de cloroformo: metanol = 17:3), y se ajustó el pH a 2,5 a través de la adición de metanol y ácido clorhídrico 1N, en correspondencia, en la capa superior. Se extrajo dos veces con un disolvente mixto de cloroformo : metanol = 17:3, y se recogió la capa

## ES 2 312 588 T3

de cloroformo y se concentró. Se neutralizó el residuo con cloroformo: metanol: agua de amoníaco al 3% (6:5:1) y se concentró para dar 1-linoleoil o (18:3)-LPA.

5 Por otra parte, siguiendo el mismo procedimiento, se puede preparar ácido lisofosfatídico (LPA), si se desea, utilizando la lisofosfatodil colina correspondiente (LPC).

### Ejemplo 1

#### *Determinación de la cantidad de jugo pancreático secretado en ratas*

10

Se anestesiaron ratas macho (8 a 9 semanas de vida) en ayuno desde la mañana del día anterior con una aplicación subcutánea de uretano (1,2 g/5 ml/kg) y se insertaron tubos de polietileno en la arteria carotis communis y en la vena femoral. Se abrió el abdomen a lo largo de la línea mediana y se ligó el píloro gástrico. A continuación, se insertó un tubo de polietileno en el conducto biliar en la porción del portal hepático, a través del cual se insertó la punta del tubo en el poro abierto en el duodeno con el fin de retornar la bilis al duodeno. Se cortó para abrirlo el origen del tubo hepatopancreático desde el duodeno en el que se insertó de la misma manera que el conducto biliar y se dejó fuera del cuerpo. Se recogió el jugo pancreático puro desde el tubo.

15

Se administró continuamente el fármaco a través de la vena femoral con solución salina. Por otra parte, se realizó la infusión de solución salina que contenía 18:3-LPA, 18:3 LPC o 0,5% de albúmina de suero bovino (Sigma, A-0281) como control (vehículo) (1 ml/h) a través de la vena cervical, y se recogió el jugo pancreático durante 1 hora. Se confirmó el efecto de inhibición dependiente de la dosis de LPA en la secreción de jugo pancreático en ratas. Se llevó a cabo el ensayo con arreglo al protocolo que se muestra en la tabla 1.

20

TABLA 1

25

infusión i.v.: 1 ml/h			Pre-administración (1 hora)		Administración (1 hora)	
Gp	(n)	Adm. Fármaco principal	Vena cervical	vena femoral	vena cervical	vena femoral
A	4	Vehículo	salina	salina	vehículo	salina
B	4	18:3-LPA (1 mg/kg/h)	salina	salina	LPA	salina
C	5	18:3-LPA (3 mg/kg/h)	salina	salina	LPA	salina
D	4	18:3-LPA (10 mg/kg/h)	salina	salina	LPA	salina
E	5	18:3 LPC (10 mg/kg/h)	salina	salina	LPA	salina

30

35

40

45

Se midió el volumen de jugo pancreático recogido. A este respecto, se administró por infusión solución salina a través de la vena cervical y la vena femoral 1 hora antes de la administración del fármaco, período durante el cual se midió la cantidad de jugo pancreático secretada con el fin de valorar que no existía una diferencia considerable entre animales individuales en el valor previo y la secreción de jugo pancreático en los animales individuales.

50

La secreción de jugo pancreático en ratas disminuyó con 18:3-LPA, dependiendo el efecto de LPA diverso de la dosis, que alcanzó aproximadamente el máximo por infusión i.v. de 3 mg /kg/h y 1 ml/h (figura 1). Por otra parte, se examinó el efecto de otro fosfolípido LPC que tenía la misma cadena lateral de ácido graso y se observó que 18:3-LPC (10 mg/kg/h, 1 ml/h, infusión i.v.) no tenía ningún efecto de inhibición en la secreción del jugo pancreático, tal como se observó en LPA. Por consiguiente, se considera que LPA funciona inhibiendo la secreción del jugo pancreático a través de los receptores de LPA.

55

### Ejemplo 2

#### *Determinación de la cantidad de amilasa secretada*

60

Se diluyó el jugo pancreático recogido del ejemplo 1 con solución salina(-) tamponada con fosfato de Dulbeccos (PBS(-)) a un índice de dilución apropiado, y se determinó la actividad de amilasa con un reactivo de equipo Diacolor AMY Neorate (Ono Pharmaceutical). Se añadieron a 10  $\mu$ l de una solución patrón de amilasa (Worthington Biochemical, diluida a 100 U/L a 6.400 U/L con PBS(-)) o el jugo pancreático diluido recogido 50  $\mu$ l de un reactivo de enzima del equipo y se incubó la mezcla a 37°C durante 3 minutos. A continuación, tras la adición de 50  $\mu$ l de un reactivo de sustrato del equipo, se llevó un control de la variación (Vmax) de la densidad óptica (OD) a 400 nm, a 37°C durante 3 minutos (SPECTRAMAX 250). Se calculó la actividad de amilasa de una curva patrón de amilasa para evaluar el

65

## ES 2 312 588 T3

efecto de la sustancia en cuestión a través de la cantidad secretada de la enzima (U/h) obtenida según la actividad de la enzima (concentración) (U/L) multiplicado por la cantidad de jugo pancreático recogida (L/h). En la figura 2 se muestran los resultados.

5 Se redujo la cantidad de amilasa secretada por administración de LPA a 1,3 ó 10 mg/kg/h. Por otra parte, se examinó el efecto de LPC de fosfolípido que tenía la misma cadena lateral de ácido graso, lo que indicó que 18:3 LPC (10 mg/kg/h, 1 ml/h, infusión i.v.) no tuvo ningún efecto de inhibición en la secreción de amilasa en ratas tal como se observó en LPA. Por lo tanto, se considera que LPA actúa para inhibir la secreción de amilasa a través de los

10

### Ejemplo 3

#### *Determinación de la cantidad de lipasa secretada*

15 Se diluyó el jugo pancreático recogido en el ejemplo 1 con una solución salina a un índice de dilución apropiado y se midió la actividad de lipasa con un reactivo contenido en un equipo Liquitech Lipase Color (Roche Diagnostics). A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de una solución R-1 del equipo a 10  $\mu$ l de una solución patrón de lipasa (Worthington Biochemical; preparada para 1 U/L a 1.000 U/L con solución salina) o el jugo pancreático diluido recogido y se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 60  $\mu$ l de una solución R-2 de equipo y se llevó un control de la variación (Vmax) de la densidad óptica (OD) a 570 -700 nm a 37°C durante 3 minutos (SPECTRAMAX 250). Se calculó la actividad de lipasa del jugo pancreático a partir de una curva patrón de lipasa para evaluar el efecto de la sustancia en cuestión a través de la cantidad secretada de la enzima (U/h) obtenida según la actividad de la enzima (concentración) (U/L) multiplicado por la cantidad del jugo pancreático recogido (L/h). En la figura 3 se muestran los resultados.

25

LPA redujo de manera significativa la cantidad de lipasa secretada a 3 y 10 mg/kg/h. Por otra parte, se examinó el efecto de un fosfolípido LPC que tenía la misma cadena lateral de ácido graso, lo que indicó que 18:3-LPC (10 mg/kg/h, 1 ml/h, infusión iv.) no tuvo ningún efecto de inhibición en la secreción de lipasa en ratas tal como se observó en LPA. Por consiguiente, se considera que LPA actúa para inhibir la secreción de lipasa a través de receptores de LPA.

30

### Ejemplo 4

#### *Determinación de la cantidad de jugo pancreático de rata secretado por estimulación con colecitoquinina (CCK)*

35 Se recogió el jugo pancreático secretado en ratas de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1. Para valorar el efecto de LPA sobre la secreción excesiva de jugo pancreático mediante CCK, se llevó a cabo un experimento con arreglo al protocolo que se muestra en la tabla 2. Como CCK, se utilizó CCK-8 (Sigma N° C-2175).

TABLA 2

40

Infusión i.v.: 1 ml/h			Administración previa (1 hora)		Administración 1 (1 hora)		Administración 2 (1 hora)	
GP	(n)	Fármaco administrado principalmente	vena cervical	vena femoral	Vena cervical	Vena femoral	Vena cervical	Vena Femoral
A	5	Control sin estímulos	salina	salina	salina	salina	0,5% BSA/salina	salina
B	4	vehículo	salina	salina	salina	salina	CCK-8	salina
C	4	18:3-LPA (3 mg/kg/h)	salina	salina	salina	LPA	CCK-8	LPA
D	4	18:3 LPC (10 mg/kg/h)	salina	salina	salina	LPC	CCK-8	LPC

65

Se administró solución salina por infusión a través de la vena cervical y de la vena femoral, 1 hora antes de la administración del fármaco, durante lo cual se midió la cantidad de jugo pancreático secretado con el fin de valorar que no había una diferencia considerable entre los animales individuales en el valor previo y la secreción de jugo pancreático en los animales individuales. Al cabo de 1 hora de infusión de solución salina, se administraron por

## ES 2 312 588 T3

infusión, al grupo 18:3-LPA y al grupo 18:3-LPC, 3 mg/kg/h de 18:3-LPA y 10 mg/kg/h de 18:3 LPC, respectivamente, a través de la vena femoral. Al cabo de un lapso de tiempo de 1 hora, se administró por infusión intravenosa CCK-8 por estimulación a través de la vena cervical con el fin de examinar el efecto de LPA en la secreción excesiva de jugo pancreático. Se administró al grupo de control (vehículo) que no había sido estimulado por CCK-8, 0,5% de BSA en solución salina, a través de la vena cervical. Por otra parte, se administró por infusión solución salina al grupo de control LPA (vehículo) a través de la vena femoral. En los otros grupos, se administró CCK-8 a través de la vena cervical a una velocidad de 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  y 1 ml/h. En el grupo 18:3-LPA y el grupo 18:3-LPC, se administraron por infusión 3 mg/kg/h de 18:3-LPA y 10 mg/kg/h de 18:3 LPC, respectivamente a través de la vena femoral. En el grupo de control que no había sido estimulado con CCK-8 y en el grupo de control 18:3-LPA (vehículo), se administró solución salina a través de la vena femoral. Una hora después de la administración final (administración 2), se midió el volumen del jugo pancreático recogido. En la figura 4 se muestran los resultados.

La secreción del jugo pancreático en ratas aumentó considerablemente con CCK-8. 18:3-LPA (3 mg/kg/h) por infusión intravenosa redujo el aumento de la secreción de jugo pancreático a aproximadamente el nivel de control. A este respecto, se examinó el efecto de otra lisofosfatidilcolina de fosfolípido (LPC) que tenía la misma cadena lateral de ácido graso y se observó que 18:3-LPC (10 mg/kg/h, 1 ml/h, infusión intravenosa) no tenía ningún efecto inhibitorio en la secreción del jugo pancreático inducida por CCK-8 tal como se observó en 18:3-LPA. Por consiguiente, se considera que el efecto de LPA está mediado por receptores de LPA.

### 20 Ejemplo 5

#### *Evaluación de las actividades antagonista y agonista para EDG-2*

Se demostró el efecto de EDG-2 por ejemplo, a través del siguiente experimento

Utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban de forma excesiva gen EDG-2 humano, se evaluó la actividad de dicho antagonista de receptor. Se cultivaron células que expresaban EDG-2 utilizando medio F12 de Ham (GIBCO BRL) que contenía FBS 10% (suero bovino fetal), penicilina/estreptomicina, y blasticidina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Con el fin de incorporar Fura2-AM (Dojindo) en las células, se incubaron las células en una solución Fura2-AM 5  $\mu\text{M}$  [medio F12 de Ham que contenía FBS al 10%, tampón HEPES (20 mM, pH 7,4) y probenecid (2,5 mM Sigma, N° P-8761)] a 37°C durante 60 minutos, y después se lavó una vez con solución de Hank que contenía tampón HEPES (20 mM, pH 7,4) y probenecid (2,5 mM) y se sumergió en la solución de Hank. Posteriormente, se realizó la evaluación con arreglo al siguiente método (i) ó (ii).

#### 35 (i) *Evaluación de la actividad antagonista*

Se preparó una placa en un sistema de detección selectiva de fármaco fluorescente (Hamamatsu Photonics) y tras la medida durante 30 segundos sin estimulación, se añadió una solución del compuesto que se iba a analizar. Transcurrido un lapso de tiempo de 5 minutos, se añadió 18:3-LPA (concentración final: 100 nM), se midió la concentración de ión calcio intracelular antes y después de la adición cada 3 segundos (longitud de onda de excitación: 340 nm y 380 nm; longitud de onda fluorescente: 500 nm). Se disolvió el compuesto en DMSO y se añadió para que estuviera comprendido entre 1nM y 10  $\mu\text{M}$  de la concentración final. Se sintetizó 18:3-LPA (1-linoleoil LPA) desde 18:3-LPC (1-linoleoil lisofosfatidilcolina) (Sedary) utilizando fosfolipasa D. Se calculó la actividad antagonizante de EDG-2 como el índice de inhibición (%) según la ecuación que se indica a continuación, en la que el valor pico de LPA (concentración final: 100 nM) en un pocillo al que se añadió DMSO que no contenía compuesto 1 fue considerado como valor de control (A), y en las células tratadas con el compuesto, se obtuvo la diferencia (B) entre el valor antes de la adición del compuesto y el valor tras la adición y se comparó con el valor de control.

$$50 \quad \text{Índice de inhibición (\%)} = ((A-B)/A) \times 100$$

Se calculó el valor  $\text{IC}_{50}$  como la concentración del compuesto de la presente invención que presentó un 50% de inhibición.

Se empleó un compuesto tal como se describe en WO 01/60819, es decir, 3-({4-[4-({1-(2-clorofenil)etoxi}carbonyl)amino]-3-metil-5-isoxazolil]bencil}sulfanyl)propanoato de metilo (denominado compuesto 1) como compuesto de la invención, y se determinó la actividad de inhibición para EDG-2. La  $\text{IC}_{50}$  del compuesto 1 fue 1,5  $\mu\text{M}$ .

#### 60 (ii) *Determinación de la actividad agonista*

Se preparó una placa sobre el sistema de detección selectiva de fármaco fluorescente antes mencionado y tras la medida durante 30 segundos sin estimulación, se añadió una solución del compuesto que se iba a analizar. Se evaluó el compuesto que se iba a evaluar en DMSO y se añadió para que tuviera una concentración final de 0,1 nM a 10  $\mu\text{M}$ , es decir una concentración 1/1000 como una solución DMSO. A continuación, se midió la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (fluorescencia Fura2- $\text{Ca}^{2+}$ ) cada 3 segundos (longitud de onda de excitación 340 nm y 380 nm; longitud de onda fluorescente: 500 nm).

## ES 2 312 588 T3

En la medida de la actividad agonista, se utilizó el valor pico obtenido por estimulación con 18:3-LPA (1-linoleoil LPA) en un pocillo en el que se había añadido DMSO en lugar del compuesto que se iba a valorar como valor de control (A); se comparó este último con el aumento del valor (B) derivado de la relación fluorescente entre la fluorescencia antes de la adición del compuesto en cuestión y el valor después de la adición. De este modo, se calculó el aumento del índice de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a partir de:

$$\text{Aumento del índice (\%)} = (\text{B/A}) \times 100$$

Se calculó el valor  $\text{EC}_{50}$  a partir del aumento del índice en cada uno de los niveles de la concentración del compuesto.

### Ejemplo 6

*Efecto del receptor LPA o el agonista de EDG-2 en la secreción de jugos pancreáticos en ratas*

Se puede confirmar el efecto de agonista de EDG-2 en la secreción de jugo pancreático en ratas por ejemplo, con arreglo al siguiente método.

Utilizando un receptor LPA o un agonista de EDG-2, se examinó el efecto de LPA en la secreción del jugo pancreático. Se administró por infusión un agonista de receptor de LPA 18:3-LPA por vía intravenosa a una rata a través de la vena cervical y se midió la cantidad de jugo pancreático secretada. En un grupo al que se había administrado 18:3-LPA, se inhibió la secreción de jugo pancreático en las ratas.

De la misma manera, se confirmó que el compuesto que tenía la actividad agonista de EDG-2 inhibió la secreción de jugo pancreático.

### Ejemplo 7

*Efecto de receptor de LPA o antagonista de EDG-2 en la secreción de jugo pancreático en ratas*

Se puede confirmar el efecto del receptor de LPA o antagonista de EDG-2 en la secreción de jugo pancreático con arreglo al siguiente método.

Utilizando el compuesto 1 que tiene el efecto como antagonista de EDG-2, tal como se había confirmado en el ejemplo 5, se examinó el efecto de LPA en la secreción del jugo pancreático.

Se administraron por infusión a través de la vena femoral, en las ratas, (1) 18:3-LPA y (2) solución salina como control (vehículo) para 18:3-LPA, respectivamente, y se administraron por infusión a través de la vena cervical (3) el compuesto 1 y (4) solución de albúmina de suero bovino al 5%/DMSO al 10%/solución salina como control (vehículo) para el compuesto 1, respectivamente, a una velocidad de 0,5 ml/h durante 1 hora.

Por otra parte, se administró por infusión previamente solución salina a través de la vena femoral y la vena cervical (0,5 ml/h) y al cabo de 1 hora se recogió el jugo pancreático con el fin de valorar que no había diferencia en los volúmenes iniciales del jugo pancreático secretado en las ratas de cada grupo.

En la figura 5 se muestran los resultados. En el grupo al que se administró el compuesto 1 en solitario (10 mg/kg/h, infusión i.v.), no hubo diferencia en el volumen de secreción basal (en reposo) del jugo pancreático a partir del grupo de control (vehículo) (albúmina de suero bovino al 5%/ DMSO al 10%/solución salina) al cabo de una hora. En el grupo al que se administró 18:3-LPA (3 mg/kg/h, infusión i.v.), se observó la inhibición del volumen de secreción basal tal como se ha descrito antes. Para dicha inhibición, cuando se administró el compuesto 1 junto con 18:3-LPA, se recuperó de manera significativa la secreción de jugo pancreático desde la inhibición mediante 18:3-LPA. Esto hace pensar firmemente que la inhibición de la secreción del jugo pancreático a través de 18:3-LPA se consigue a través de EDG-2.

### Ejemplo de preparación 1

Se mezclaron los componentes que se indican a continuación según un método convencional, se troquelaron para dar 100 tabletas que contenían 50 mg de ingrediente activo cada una de ellas.

* 18:3-LPA (ácido 1-linoleoil lisofosfatídico)	5,0 g
* Carboximetil celulosa cálcica (disgregante)	0,2 g
* Estearato de magnesio (lubricante)	0,1 g
* Celulosa microcristalina	4,7 g

## ES 2 312 588 T3

### Ejemplo de preparación 2

Después de mezclar los componentes que se indican a continuación siguiendo un método convencional, se esterilizó la solución resultante a través de un método convencional y se cargaron porciones de 5 ml de la misma en ampollas respectivamente, y se liofilizaron a través de un método convencional para obtener 100 ampollas para inyección que contenían 20 mg de ingrediente activo cada una de ellas.

10	* 18:3-LPA	2,0 mg
	* Manitol	20 g
	* Agua destilada	1000 ml

### 15 Ejemplo de preparación 3

Se mezclaron los componentes que se indican a continuación siguiendo un método convencional, se troquelaron para dar 100 tabletas que contenían 50 mg del ingrediente activo cada una de ellas.

20	3-({4-[4({[1-(2-clorofenil)etoxi]carbonil}amino)-3-metil-5-	
	isoxazolil]bencil}sulfanil)propanoato de metilo	5,0 g
25	Carboximetil celulosa cálcica (disgregante)	0,2 g
	Estearato de magnesio (lubricante)	0,1 g
	Celulosa microcristalina	4,7 g

### 30 Ejemplo de preparación 4

Después de mezclar los componentes que se indican a continuación, a través del método convencional, se esterilizó la solución resultante a través de un método convencional y se cargaron porciones de 5 ml en ampollas respectivamente, y se liofilizaron según el método convencional para obtener 100 ampollas para inyección que contenían 20 mg de ingrediente activo cada una de ellas.

40	3-({4-[4({[1-(2-clorofenil)etoxi]carbonil}amino)-3-metil-5-	
	isoxazolil]bencil}sulfanil)propanoato de metilo	2,0 g
	Manitol	20 mg
45	Agua destilada	100 ml

50

55

60

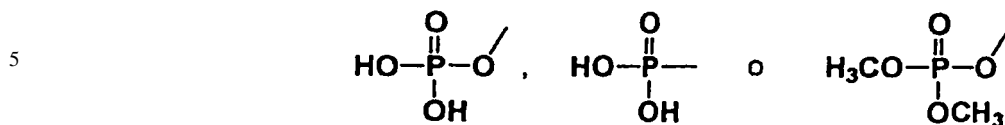
65





ES 2 312 588 T3

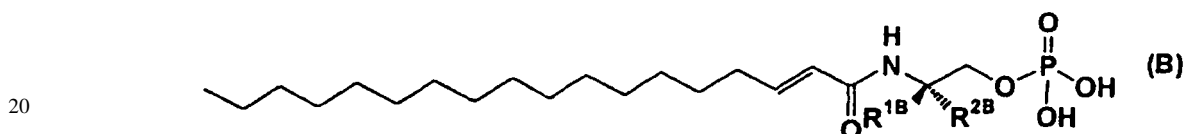
en la que X<sup>A</sup> representa un grupo hidroxilo,



10 Z<sup>A</sup> representa hidrógeno, bromo, cloro, flúor, yodo o OR<sup>2A</sup>;

R<sup>2A</sup> representa un grupo alquilo insaturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono; y

15 R<sup>1A</sup> representa un alquilo saturado o insaturado que tiene de 15 a 17 átomos de carbono y un compuesto representado por la fórmula (B):

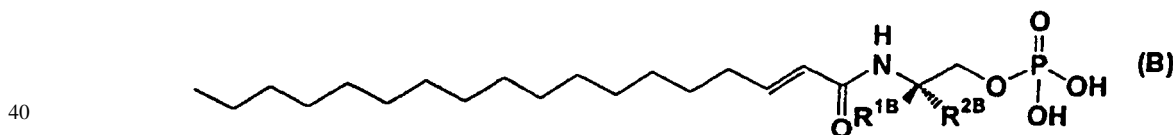


25 en la que uno entre R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> representa hidrógeno, metilendioxi, carbometilo, metilnamino, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno,

para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades pancreáticas u obesidad.

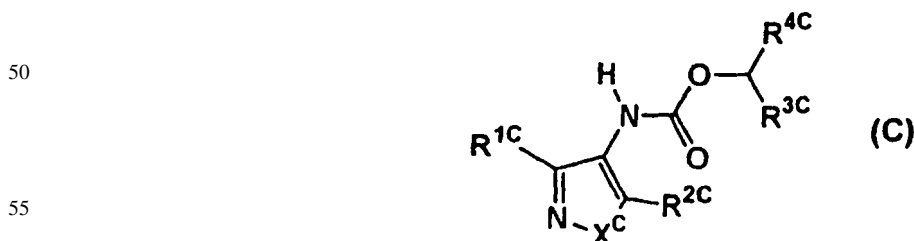
30 19. El uso según la reivindicación 18, siendo la enfermedad pancreática disfunción exocrina congénita, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, litiasis pancreática, colelitiasis, tumor pancreático, quiste pancreático o enfermedades pancreáticas acompañadas de anomalía en el sistema nervioso autónomo.

35 20. Uso de un antagonista de receptor de LPA según la reivindicación 9 seleccionado del grupo que consiste en un compuesto representado por la fórmula (B):



45 en la que uno entre R<sup>1B</sup> y R<sup>2B</sup> representa hidrógeno, metilendioxi, carbometilo, metilnamino, metilo, etilo, isopropilo, bencilo o bencil-4-oxibencilo y el otro es necesariamente hidrógeno, y

un compuesto representado por la fórmula (C):



en la que

60 R<sup>1C</sup> representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi, ariloxi, alquiltio o ariltio que puede tener un sustituyente(s), o halógeno;

65 R<sup>2C</sup> representa alquilo, arilo, un grupo heterocíclico, alquiloxi o ariloxi que puede tener un sustituyente(s) o halógeno;

R<sup>3C</sup> representa un átomo de hidrógeno, alquilo inferior o alquilo halogenado;

## ES 2 312 588 T3

$R^{4C}$  representa un grupo seleccionado del grupo que consiste en (a) fenilo, arilo o un grupo heterocíclico que puede tener un sustituyente(s); (b) alquilo sustituido o sin sustituir; y (c) alquenilo sustituido o sin sustituir;

$X^C$  representa oxígeno o azufre, y

5

en la que  $R^{3C}$  y  $R^{4C}$  tomados junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar una estructura cíclica de 5- a 10- eslabones, y en la que  $R^{3C}$  es un átomo de hidrógeno,  $R^{4C}$  es un grupo distinto a metilo,

10

para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención para enfermedades de un órgano digestivo.

21. El uso según la reivindicación 20, siendo la enfermedad de un órgano digestivo indigestión, estreñimiento, diarrea, cibofobia o síndrome de malabsorción.

15

20

25

30

35

40

45

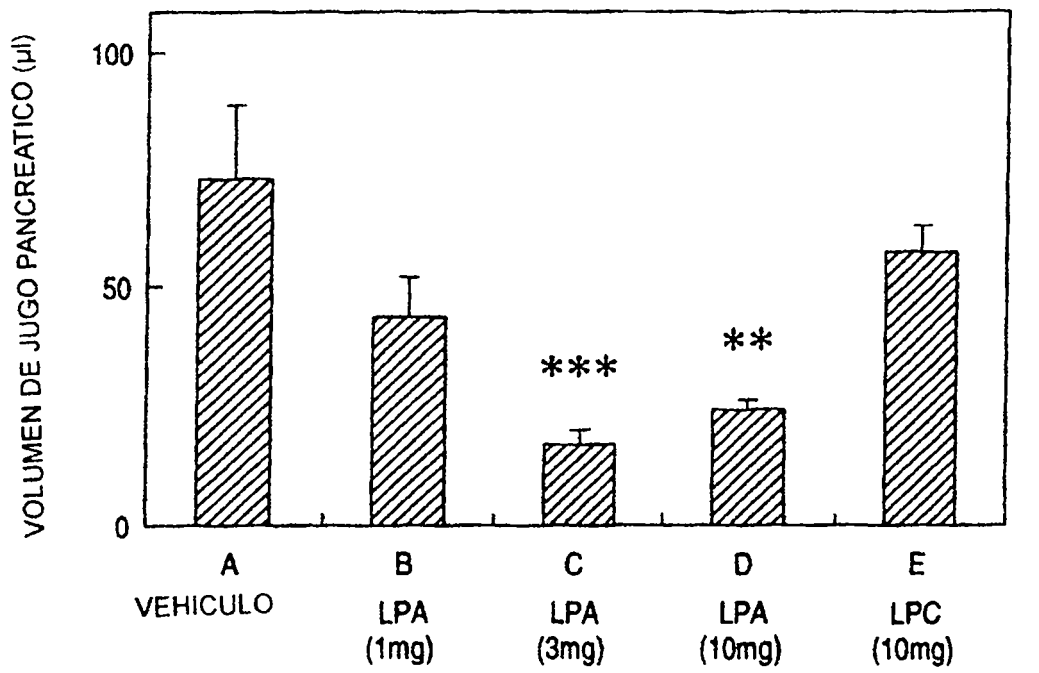
50

55

60

65

FIG. 1



MEDIA ± ERROR TIPICO \*\* : P > 0,01, \*\*\* : P < 0,001

FIG. 2

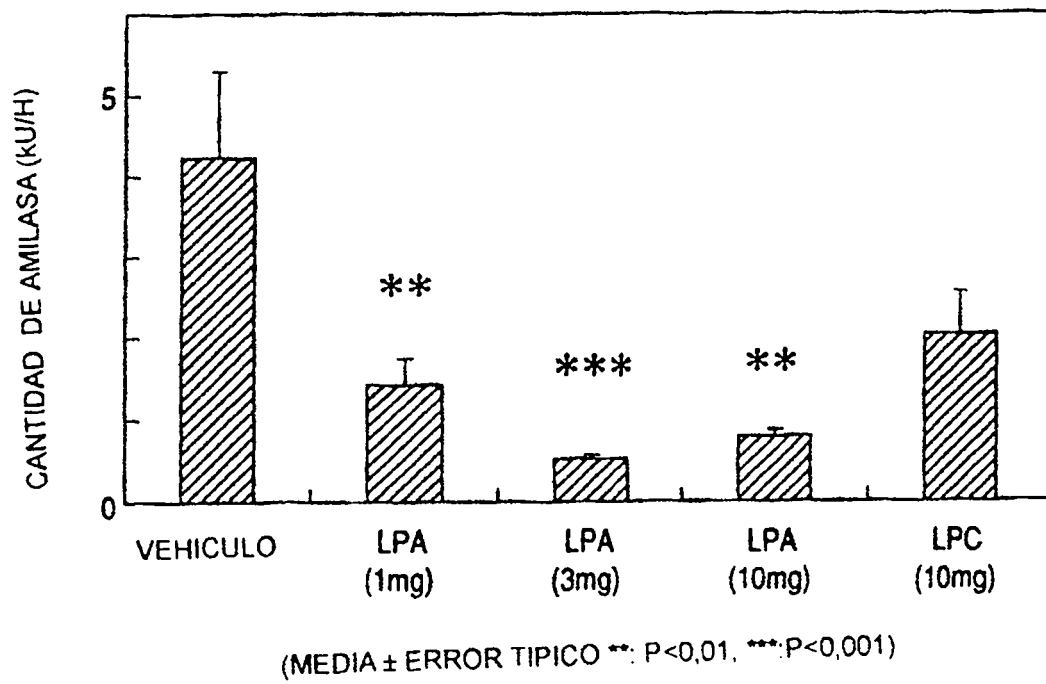
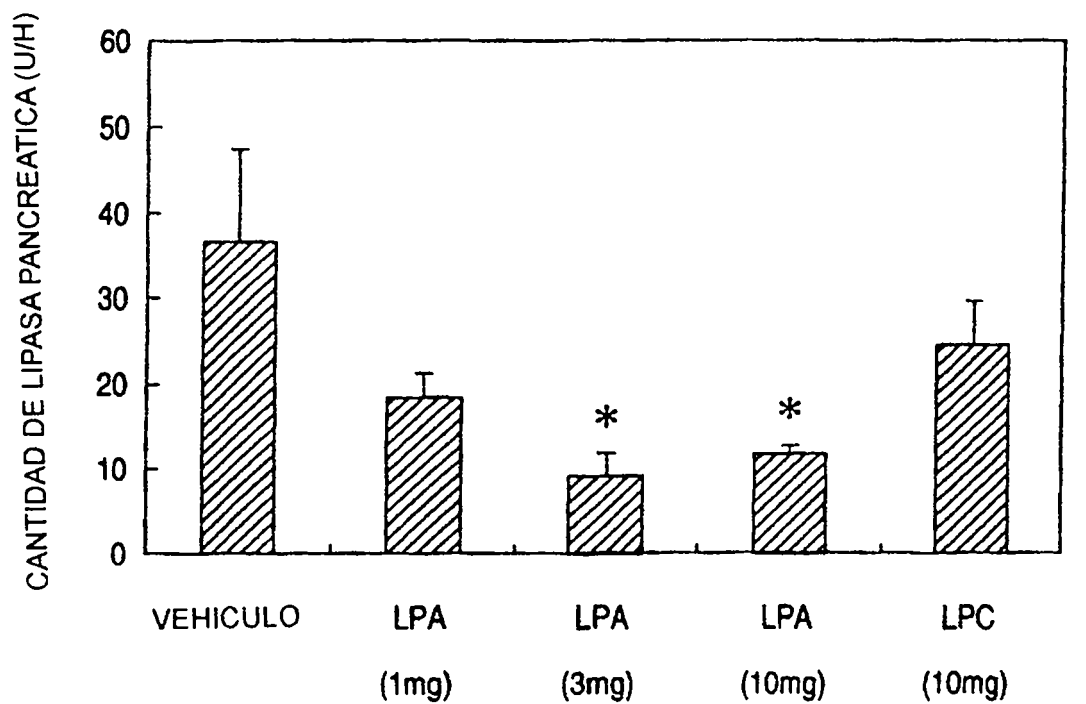
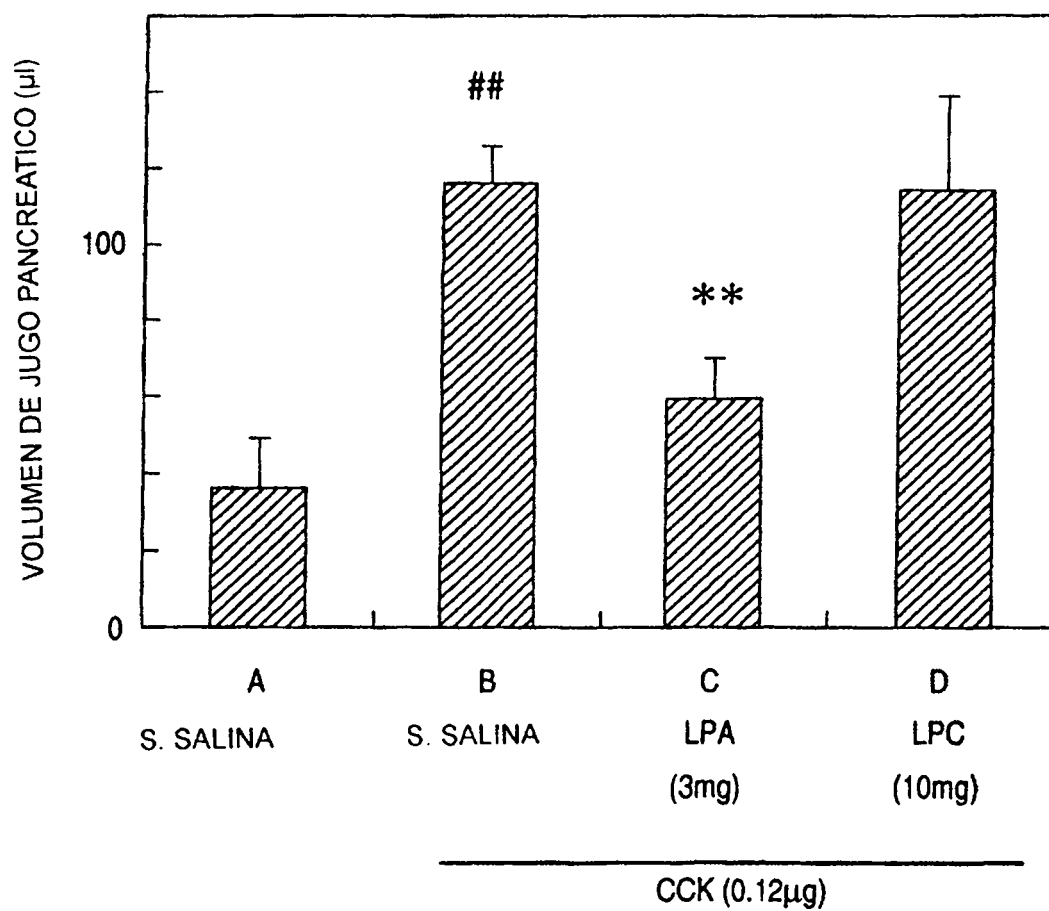


FIG. 3



(MEDIA±ERROR TIPICO \*:p <0,05)

FIG. 4



(MEDIA±ERROR TIPICO \*\*: $p < 0,01$  frente a S. SALINA CON CCK  
 ##: $P < 0,01$  frente a S. SALINA SIN CCK)

FIG. 5

