



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 001**

51 Int. Cl.:
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04380155 .4**
96 Fecha de presentación : **20.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1618880**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Uso de compuestos derivados de la 2,3-dehidronaringenina para el tratamiento de procesos inflamatorios y composición farmacéutica que contiene dichos derivados.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2011

73 Titular/es: **FURFURAL ESPAÑOL, S.A.**
c/ Mayor, 237
30820 Alcantarilla, Murcia, ES

72 Inventor/es: **Lozano Teruel, José Antonio;**
Alcaraz Banos, Miguel;
Vicente Ortega, Vicente;
Benavente-García García, Obdulio;
Yáñez Gascón, Josefa;
Lorente Salinas, Juan;
Castillo Sánchez, Julián;
Solano Muñoz, Francisco y
García Borrón, José Carlos

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

**USO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE LA 2,3-DEHIDRONARINGENINA
PARA EL TRATAMIENTO DE PROCESOS INFLAMATORIOS Y
COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE CONTIENE DICHOS DERIVADOS**

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba dentro del campo de fármacos para el tratamiento de procesos inflamatorios; concretamente, se refiere al uso de derivados de la 2,3-dehidronaringenina (apigenina), de fórmula (I), para el tratamiento o profilaxis de procesos inflamatorios y enfermedades crónicas derivadas de procesos inflamatorios, así como a una composición farmacéutica que los contiene, junto con excipientes.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Uno de los mayores problemas de salud en la sociedad actual está relacionado con los procesos inflamatorios y enfermedades derivadas de los mismos, debido a las molestias y el dolor que provocan en el paciente. Un ejemplo clásico de este tipo de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios es la artritis reumatoide (de ahora en adelante, AR). El tratamiento de la artritis reumatoide con medicamentos incluye dos grandes grupos de fármacos: uno de ellos engloba a los que sirven para aliviar el dolor y la inflamación a corto plazo. Son útiles para bajar la inflamación y sobrellevar el dolor del "día a día", pero no sirven para modificar la evolución de la enfermedad a largo plazo. En este grupo se encuentran los llamados antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los corticoides.

Los AINE son inhibidores de las ciclooxigenasas. Las reacciones adversas más frecuentes de los AINE, las gastrointestinales, se relacionan con su naturaleza ácida y con la inhibición de las prostaglandinas. Puede expresarse por diversas lesiones, que oscilan desde la gastritis a la úlcera, preferentemente gástrica. Éstas pueden ser asintomáticas o bien manifestarse con sangrado microscópico o hemorragia digestiva franca. Son factores de riesgo para presentar estas complicaciones la edad avanzada y la historia previa de epigastralgiyas o de úlcera péptica. Es aconsejable la toma de un protector gástrico en estos pacientes y es necesario vigilar la aparición de

molestias digestivas inusuales o cambios en la deposición sugestivos de sangrado digestivo.

Los AINE pueden llegar a producir una disminución del aclaramiento de creatinina, al afectar la función vasodilatadora de las prostaglandinas. Esto es particularmente importante en pacientes de edad avanzada y en aquellos con función renal previamente dañada. Los pacientes pueden llegar a desarrollar nefropatía intersticial aguda, necrosis papilar y, raramente, síndrome nefrótico. Menos frecuentes son los efectos secundarios cutáneos, hepáticos, hematológicos o neurológicos. La elección de un AINE concreto es empírica, y debe basarse en la farmacocinética de cada preparado, incluyendo su vida media y su toxicidad, así como el grado de dolor o inflamación del proceso articular. Se debe tener en cuenta la posible interacción con otros fármacos que pueda estar tomando el paciente. Es aconsejable la utilización de un preparado concreto durante dos semanas a dosis adecuadas, antes de considerarlo ineficaz y cambiar a otro diferente. El empleo de dos AINE diferentes no añade eficacia al tratamiento y supone un mayor riesgo de efectos secundarios.

Desde la introducción de la cortisona para el tratamiento de la AR hace casi 50 años, los glucocorticoides se han empleado ampliamente con dicho fin. Tras el entusiasmo inicial por sus efectos beneficiosos, aquel decreció por la alta frecuencia de importantes efectos secundarios y la falta de evidencia de que la enfermedad remitiera con su uso. Restringido su empleo por estos motivos durante años, actualmente se emplean con más frecuencia dada su clara acción antiinflamatoria y la evidencia, según estudios recientes, que sugiere que su uso a dosis bajas disminuye la aparición de erosiones. Su utilización en la AR debe reservarse para aquellos pacientes en los que los beneficios a corto plazo sean mayores que los riesgos de su empleo a largo plazo, y siempre como parte de un tratamiento programado. Los glucocorticoides están siendo actualmente cuestionados debido a que parecen estar relacionados con un aumento en la incidencia de enfermedades cardíacas en pacientes tratados con estos medicamentos.

Otro gran grupo de antiinflamatorios lo integran medicamentos que no sirven para tratar el dolor en un momento determinado, sino que actúan haciendo que la actividad de la enfermedad a largo plazo sea menor, son fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, inductores de remisión, de acción lenta, inmunosupresores y citotóxicos. El uso de estos fármacos es empírico y aunque todos

han mostrado su eficacia en el tratamiento de la AR, estudios a largo plazo muestran resultados desalentadores en cuanto a su relación beneficio/toxicidad. Tardan en hacer efecto semanas e incluso meses. No existe un criterio unánime acerca de qué régimen de tratamiento emplear ni de qué fármaco o combinación de fármacos elegir. No llegan a ser eficaces en el 100% de los enfermos, por lo que es habitual que el médico tenga que prescribir varios de forma secuencial hasta encontrar aquel que sea más eficaz y mejor tolerado. En este grupo entran el metotrexato, las sales de oro, la cloroquina, la sulfasalacina, la D-penicilamina, la azatioprina, la ciclosporina...etc. En general, requieren control por parte del reumatólogo y una estrecha colaboración del paciente. A la hora de prescribir un fármaco de este tipo se debe tener en cuenta, además del grado de actividad de la enfermedad, los posibles resultados que esperamos obtener y los potenciales efectos tóxicos del mismo.

Existe, por lo tanto, la necesidad de encontrar compuestos con una buena actividad antiinflamatoria, y que a la vez tengan efectos secundarios escasos o nulos debido a su citotoxicidad, permitiendo así tratamientos a largo plazo.

El uso de sustancias polifenólicas de origen natural ha resultado combinar una baja toxicidad con unas interesantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de ser moderados inhibidores de ciclooxigenasas.

En concreto, los glucósidos de 2,3-DHNA (apigenina) presentes en numerosas plantas (y en particular en la manzanilla) han mostrado ser importantes agentes antiinflamatorios de origen natural. La efectividad de la manzanilla en el alivio de los síntomas de gastritis, úlceras gástricas y otros procesos inflamatorios en mucosas es debido a las propiedades antiinflamatorias que le confieren los glucósidos de 2,3-DHNA que contiene (Merfort et al.,1994).

Algunos estudios recientes han mostrado que 2,3-DHNA podría ser eficaz en el tratamiento de procesos inflamatorios en la piel inducidos por radicales libres (tales como radiación UV, X o γ , o agentes químicos). Aplicaciones intradérmicas de liposomal 2,3-dehidronaringenina-7-glucósido inhiben la inflamación cutánea de forma dosis-dependiente provocada por xanthin-oxidasa y cumeno hidropéroxido. Estos resultados están de acuerdo con las propiedades como captadores in-vitro de radicales peróxido y del anion superóxido de 2,3-DHNA y que indican que sus propiedades antioxidantes contribuyen a su efecto antiinflamatorio en sistemas modelo (Fuchts y

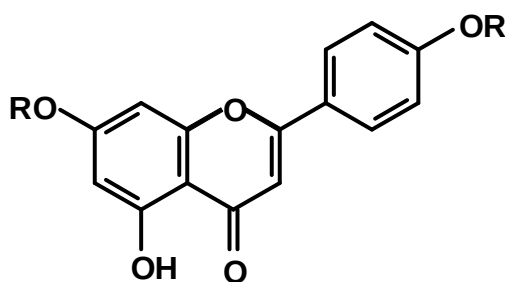
Milbradt, 1993). Estudios realizados sobre la penetración en la piel de 2,3-DHNA, luteolina y 2,3-dehidronaringenina-7-glucósido han concluido que estos flavonoides no solo son absorbidos en la superficie de la piel, sino que penetran en las capas profundas de la piel. Esto es muy importante para su aplicación en forma tópica como agente
5 antiflogístico (Mefort et al., 1994).

Aunque existen algunas publicaciones que describen el uso de 2,3-DHNA (apigenina) en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de ciertas enfermedades como el cáncer de colon (Walle y Halushka, 2001), la diabetes (Ziegler, 2000), coleostasis hepática (Gebhardt, 2001) o como ansiolítico (Cassels et al., 1999),
10 no existe ninguna publicación en que se haya descrito la efectividad del uso de 2,3-DHNA para el tratamiento de enfermedades crónicas de carácter inflamatorio.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora un grupo de compuestos que resuelve el problema
15 de la carencia de compuestos con escasa o nula citotoxicidad, con una buena actividad antiinflamatoria en procesos inflamatorios y/o enfermedades crónicas generadas por los mismos, que permite además una administración prolongada al paciente. Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de compuestos de fórmula (I)

20



(I)

donde los restos R es un catión de un metal alcalino en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades crónicas derivadas de
25 procesos inflamatorios.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, en el compuesto de fórmula (I) R es un catión potásico.

Los compuestos de fórmula (I) han demostrado una eficacia especial en el tratamiento de la artritis reumatoide. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la invención, ésta se refiere al uso de compuestos de fórmula (I) en la
5 preparación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide.

A continuación, la invención será detallada adicionalmente, por medio de una serie de ejemplos y dibujos, meramente a título ilustrativo.

La figura 1 representa una gráfica de la variación del volumen de inflamación de la pata del ratón con respecto al tiempo, provocada por inyección
10 intradérmica de carragenina.

La figura 2 representa una gráfica de la variación del volumen de inflamación de la pata del ratón con respecto al tiempo, provocada por la administración vía intraperitoneal del compuesto de fórmula (I).

La figura 3 representa una imagen microscópica de la región subplantar correspondiente a grado 0 (HE 125X).
15

La figura 4a representa una imagen microscópica de región subplantar correspondiente a fenómenos inflamatorios (grado 1) caracterizado por vasos dilatados y congestivos con extensas áreas de edema y pequeños cúmulos de infiltrado de Polimorfonucleares preferentemente perivasculares (HE 125X).
20

La figura 4b representa un detalle de los fenómenos edematosos e infiltrados perivasculares (HE 200X).

La figura 5a representa una imagen microscópica con extensas áreas de edema y numerosos infiltrados de leucocitos Polimorfonucleares dispuestos en forma preferentemente difusa (HE 500X).
25

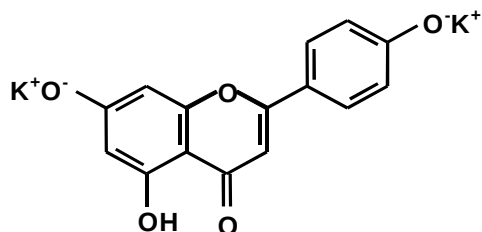
La figura 5b representa un detalle de las áreas de edema que ocupan toda la imagen, así como de los extensos infiltrados de Polimorfonucleares (HE 312'5X).

La figura 6a representa una imagen microscópica de la zona cutánea subplantar con marcados fenómenos edematosos y predominio de los infiltrados Polimorfonucleares dispuestos difusamente (HE 312'5X).
30

La figura 6b representa un detalle de extensos infiltrados de Polimorfonucleares que separan los haces musculares (HE 500X).

EJEMPLOS

Se ensayó la capacidad antiinflamatoria del producto de formula (I) donde R es un catión potasio:



5

en ratones albinos Swiss machos de 8 a 10 semanas de edad (38-44 g), procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar (temperatura de 22 ± 2 °C, humedad 60 ± 4 % y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas) con comida y bebida ad libitum. Los animales fueron anestesiados con éter en el momento de inducir la inflamación y durante las medidas del volumen de las patas.

Test del edema de pata en ratón inducido por carragenina

La inflamación fue provocada por inyección intradérmica de 0.05 ml de Lambda Carrageena (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 1% en suero salino en la almohadilla plantar de la pata derecha trasera. La medida del edema se realizó con un calibrador digital (Proinsa, Vitoria, España) midiendo para el cálculo del volumen los 3 diámetros mayores de la pata. Las medidas se realizaron por triplicado. El volumen de la pata se midió inmediatamente antes (0 horas) y a las 1, 5 y 24 horas después de provocar la inflamación. El compuesto de formula (I) fue disuelto en suero salino estéril y administrado intraperitonealmente (70 mg/kg) 1 h antes de provocar la inflamación. El grupo control no recibió tratamiento. Se utilizaron grupos de 10 animales.

El análisis de fiabilidad del método de medida utilizado (calibrador electrónico digital) ha puesto de manifiesto que las medidas realizadas por triplicado son significativamente fiables ($p < 0.005$).

Evolución de los volúmenes e inhibición de la inflamación

La inyección intradérmica de carragenina en la región subplantar de la pata en ratones provocó un aumento de su volumen a partir de la primera hora post-inoculación tanto en el grupo control como en el tratado, aunque sin mostrar diferencias significativas respecto a las 0 horas. El mayor aumento ocurrió a las 5 horas en ambos grupos, con diferencias significativas respecto a las 0 horas ($p < 0.005$) y 1 hora post-inoculación ($p < 0.025$). A las 24 horas el aumento del volumen fue menor, con diferencias significativas tanto en el grupo control como en el tratado, respecto a los valores a 0 horas ($p < 0.005$) y 1 hora post-inoculación ($p < 0.025$) (Figura 1).

El compuesto de fórmula (I) fue administrado vía intraperitoneal a dosis de 70 mg/kg una hora antes de la inyección intradérmica de carragenina en la región subplantar de la pata. Los incrementos en el volumen de la pata inoculada fueron menores en el grupo tratado que en el grupo control, existiendo diferencias significativas a la hora ($p < 0.025$), a las 5 horas ($p < 0.0005$) y a las 24 horas ($p < 0.0005$) (Figura 2).

Estudio y valoración microscópica

La zona de la almohadilla plantar inyectada fue extirpada a las 24 horas post-inoculación; fijadas en formol neutro tamponado al 10%, incluidas en parafina por el método habitual, seccionadas a 3 μm y teñidas con hematoxilina-eosina para su estudio óptico que fue realizado por dos observadores. Se determinó la presencia de edema y de polinucleares neutrófilos y monocitos, valorándose entre 0 (ausencia), 1 (leve), 2 (moderada) y 3 (intensa) (Figuras 3 a 6b).

Los resultados del estudio microscópico ponen de manifiesto la actividad antiinflamatoria del tratamiento con la 2,3-DHNA. A las 24 horas en el 60% de las muestras del grupo tratado no se observó la presencia de edema ni infiltrado inflamatorio (grado 0); mientras que el 26.65% mostró una inflamación leve (grado 1) y el 13.3% moderada (grado 2). En el grupo control (no tratado) el 53,3% de las muestras mostró una inflamación intensa (grado 3) y el 46,7% moderada (grado 2).

30 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza doble de medidas repetidas complementado con contraste de igualdad de medias dos dos mediante la t de Student.

Para el análisis de la fiabilidad del método de medida empleada se ha aplicado el coeficiente de correlación interclases.

Ensayo inmunoquímico: determinación de TNF α

- 5 Para los análisis inmunoquímicos se extrajo la sangre de los animales estudiados a las 24 hr del tratamiento, mediante punción cardiaca en tubos ependorff sin heparina. Se mantuvo 12 hr a 2-8 °C y se centrifugó a 2000 g. Se tomaron alicuotas del suero y se congelaron a -80 °C. La determinación de TNF α se realizó posteriormente utilizando un kit de enzima inmunoensayo comercial proporcionado por la casa R&D
- 10 Systems (n° catalogo MTA00).

- La técnica empleada está basada en la del enzima-inmunoensayo sandwich cuantitativo. Se utilizan microplacas cubiertas con un anticuerpo anti-TNF α policlonal, purificado por afinidad. El suero problema (además de cantidades conocidas de un patrón de TNF α para la recta de calibrado, proporcionado con el kit) se incuba en las
- 15 microplacas. El material no unido se elimina por lavado y el conjunto se vuelve a incubar con un nuevo policlonal TNF α -específico covalentemente unido a peroxidasa. La cantidad de peroxidasa unida se determina por reacción con un sistrato cromogénico y es proporcional a la cantidad de TNF α presente en la muestra de suero problema.

- Los valores obtenidos de TNF α para los animales control y tratados con
- 20 2,3-DHNA (Tabla 1), confirman los resultados mostrados por el ensayo de inflamación y por el estudio microscópico.

Tabla 1

	TNFα (pmoles/ml)
Grupo Control	143.07
Grupo tratado con 2,3-DHNA	54,89

Método de administración

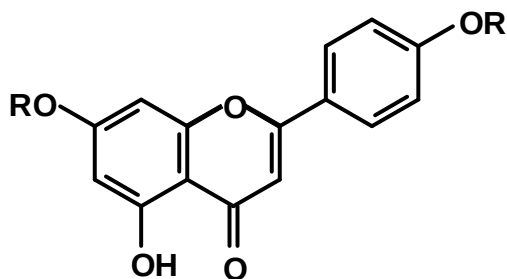
- 5 Para la administración intraperitoneal de la 2,3-DHNA en humanos se diseña una composición inyectable, para asegurar la presencia del compuesto en el torrente sanguíneo, compuesta de: suero salino esteril, fosfato monopotásico, hidróxido potásico, propilenglicol y alcohol bencílico de acuerdo a la descripción dada en el ejemplo 1.

10 **Ejemplo 1.****Tabla 2**

Composición inyectable	% en peso
2,3-DHNA	0.30 %
Suero salino esteril	88.55%
Fosfato potásico	0.10 %
Hydroxido potásico	0.05 %
Propilenglicol	10.00%
Alcohol benzílico	1.00 %

REIVINDICACIONES

1.- Uso de compuestos de fórmula



5

donde los restos R, es un catión de un metal alcalino, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades crónicas derivadas de procesos inflamatorios.

10

2.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho metal alcalino es un catión potásico.

3.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad crónica es la artritis reumatoide.

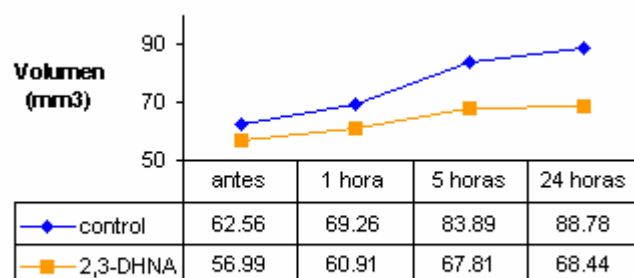


Figura 1

5

10

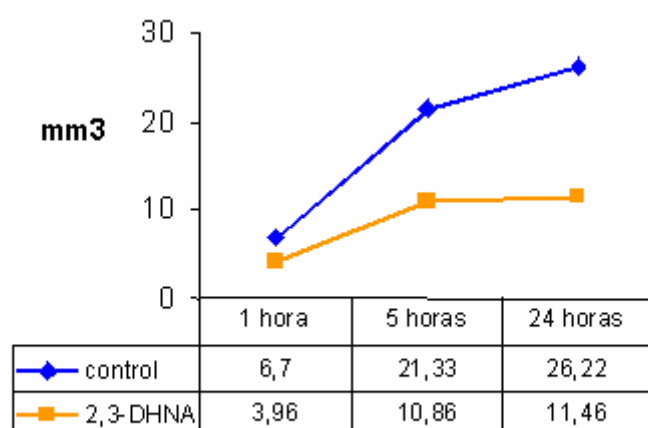


Figura 2

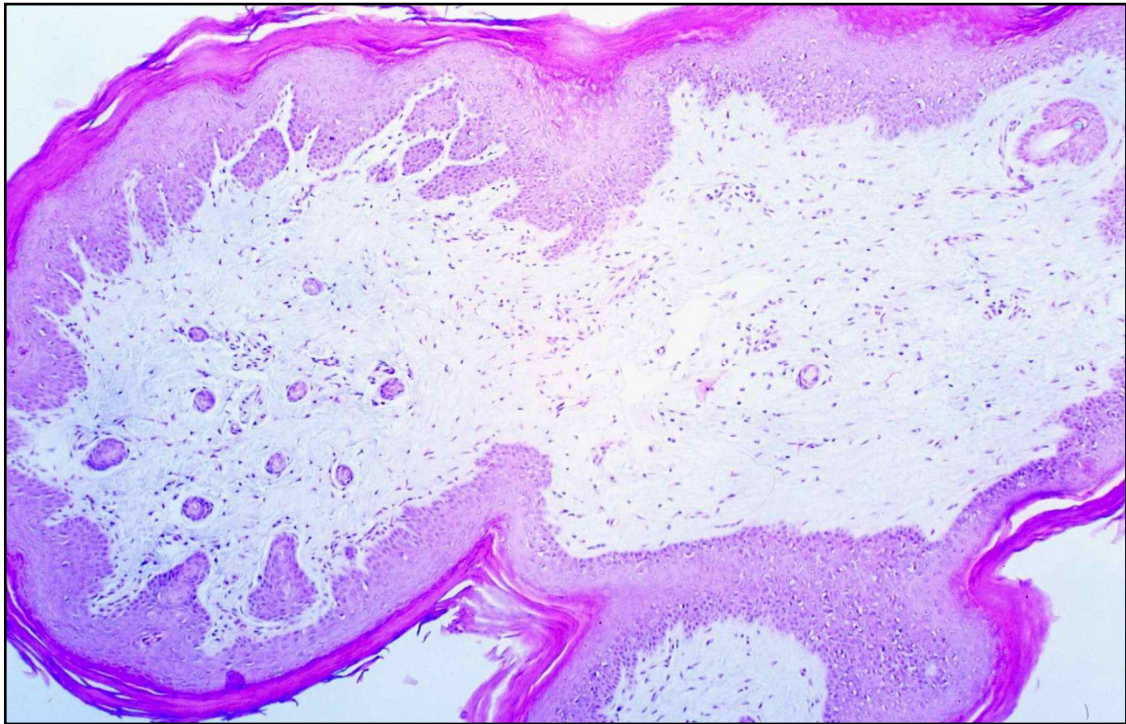


Figura 3

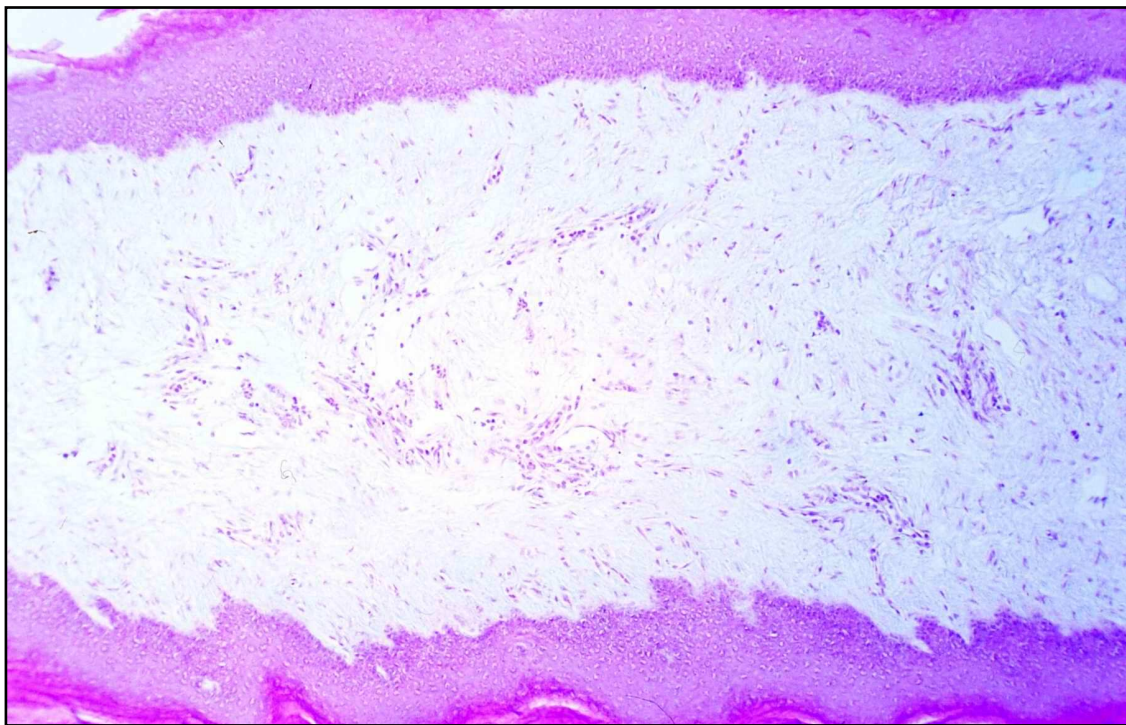


Figura 4a

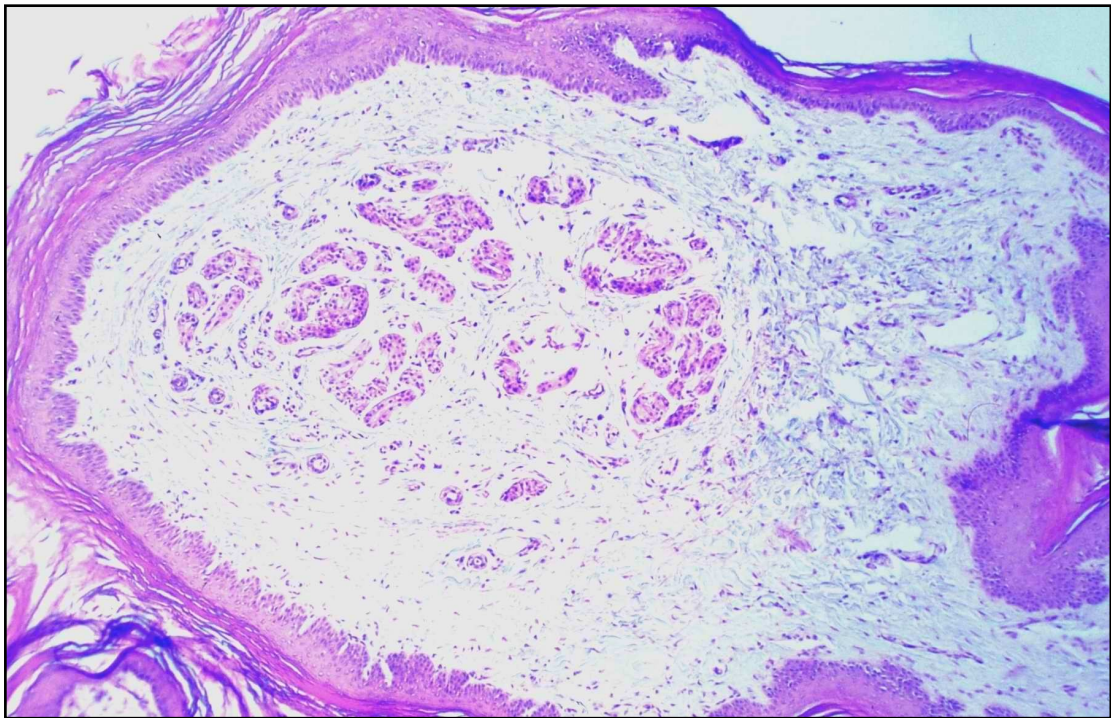


Figura 4b

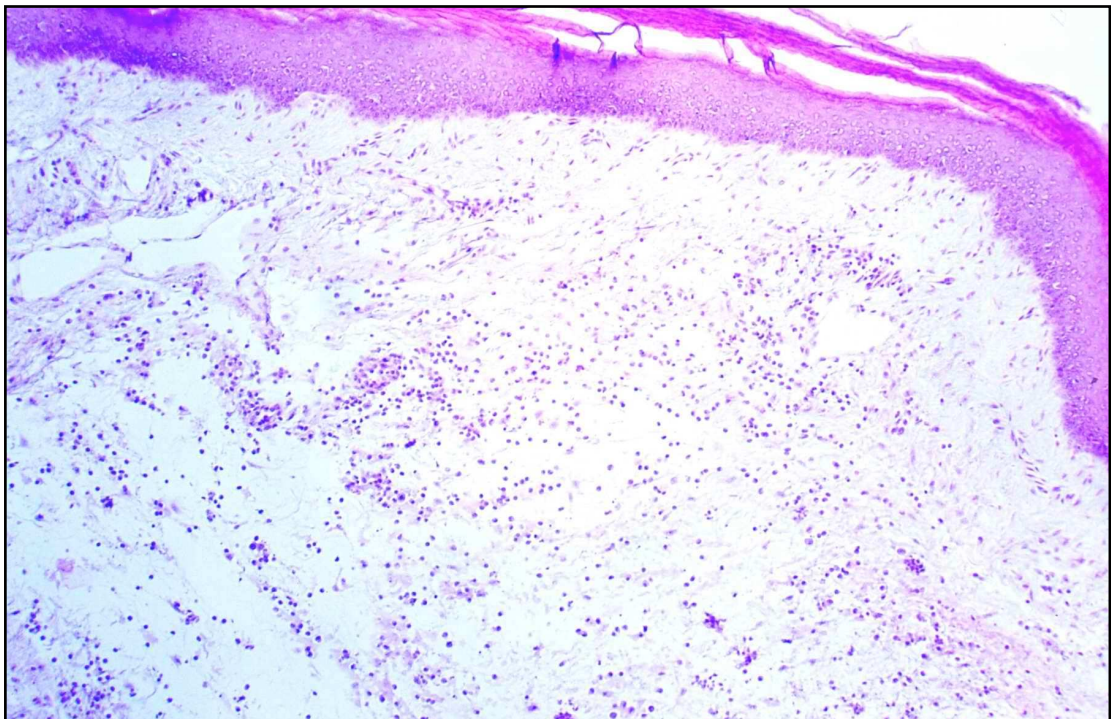


Figura 5a

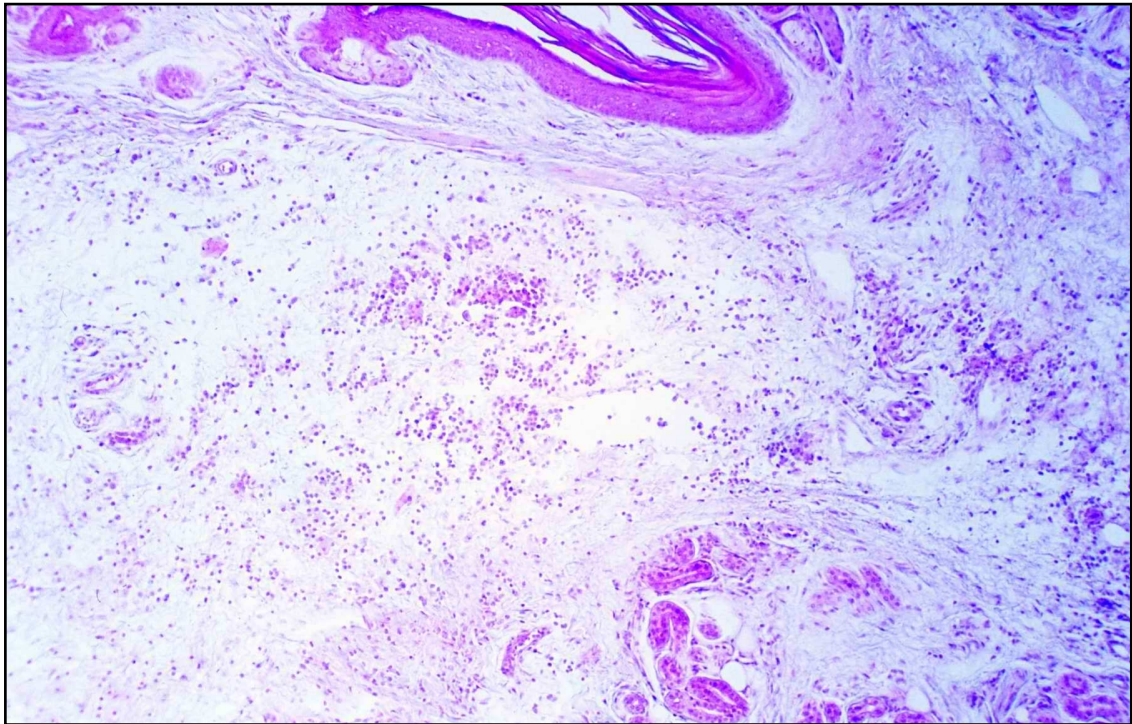


Figura 5b

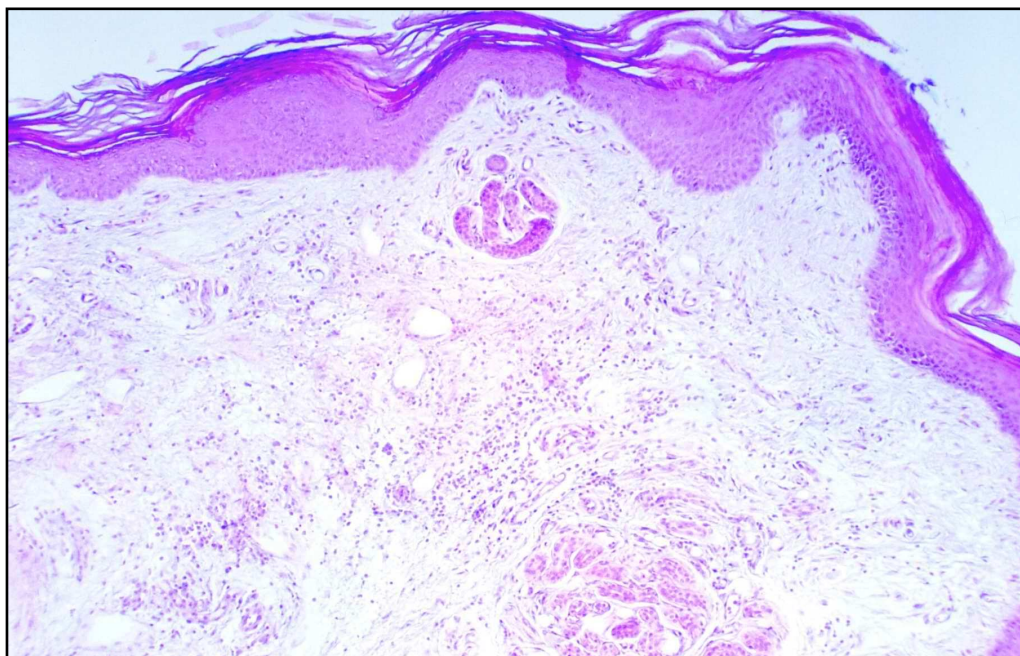


Figura 6a

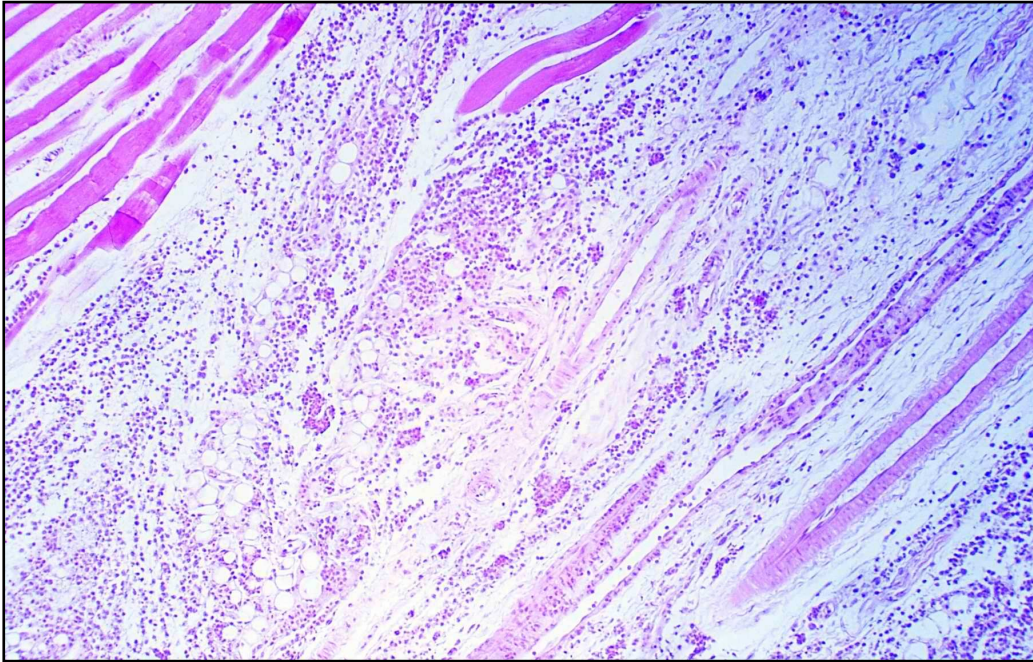


Figura 6b