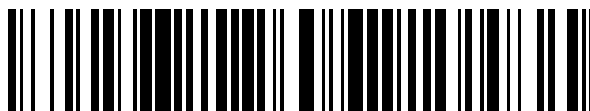


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 878**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/498** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04755981 .0**  
96 Fecha de presentación: **22.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1638569**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Uso de brimonidina para prevenir y reducir la severidad de afecciones asociadas al estrés**

30 Prioridad:  
**25.06.2003 US 607439**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.03.2012**

73 Titular/es:  
**ALLERGAN, INC.**  
**2525 DUPONT DRIVE**  
**IRVINE, CALIFORNIA 92612, US**

72 Inventor/es:  
**GIL, Daniel, W.;**  
**WHITCUP, Scott, M.;**  
**BRIN, Mitchell, F. y**  
**DONELLO, John, E.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 376 878 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

Uso de brimonidina para prevenir y reducir la severidad de afecciones asociadas al estrés

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

- 5 La invención se refiere, en general, al sistema nervioso simpático y varias afecciones asociadas con el estrés y, en particular, al agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico, brimonidina.

#### Información de antecedentes

10 Las afecciones que se asocian con, o se exacerban, el estrés pueden ser mediadas, al menos en parte, por el sistema nervioso simpático. Tales afecciones asociadas con estrés incluyen sin limitación, enfermedad gastrointestinal; síndrome intestinal irritable; dispepsia; taquicardia; ataque de pánico; resistencia a la insulina; diabetes tipo II; afecciones dermatológicas; trastornos de contractura muscular tales como cefalea tipo tensional; hipersensibilidad sensorial asociada con migraña tal como náuseas, fotofobia y fonofobia; y trastornos del comportamiento asociados con el estrés tales como comer en exceso y dependencia de drogas.

15 Desafortunadamente, los tratamientos para tales afecciones asociadas con estrés generalmente han sido ineficaces o no satisfactorios, por ejemplo, debido a efectos secundarios no deseados tales como sedación. En consecuencia, se necesitan nuevos procedimientos para prevenir o reducir la severidad de las afecciones asociadas con estrés. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

20 C. V. Dills, et al. (BIOSIS, 4 de noviembre de 2000 - 9 de noviembre de 2000) desvelan alodinia táctil inducida por NMDA y sulprostona en ratones tipo salvaje, ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C y desvelan el tratamiento de estos ratones con memantina y agonistas  $\alpha$ -2 (por ejemplo, clonidina).

#### Sumario de la invención

Una realización de la presente invención es brimonidina o una sal, tautómero, solvato, amida o N-óxido farmacéuticamente aceptable de la misma para usar en la prevención o reducción de la severidad de hipersensibilidad sensorial asociada con una migraña por la administración sistémica del compuesto.

- 25 La brimonidina o el derivado de esta se puede administrar por alguna de una variedad de procedimientos que incluyen, pero sin limitación, vía oral, tópica, intravenosa o por medio de un parche.

#### Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 muestra la hipersensibilidad táctil observada con varios modelos químicos distintos. Cada grupo experimental incluyó 5-6 ratones tipo salvaje. La hipersensibilidad táctil se evaluó como se describe a continuación; las puntuaciones de sensibilización determinadas cada 5 minutos durante el período de medición de 35 minutos se sumaron y se calcularon como la media  $\pm$  SEM. Cada grupo se comparó con un control de vehículo por medio de una prueba t de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ). (a) La inyección espinal del agonista  $\alpha$ -1, fenilefrina, induce hipersensibilidad táctil de una manera dependiente de la dosis. La fenilefrina (círculo lleno) se inyectó por vía intratecal a varias dosis. El antagonista  $\alpha$ -1, 5-MU (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.; cuadrado lleno) se administró 15 minutos antes de la administración intratecal de 30 ng de fenilefrina. (b) La fenilefrina sistémica induce hipersensibilidad táctil de una manera dependiente de la dosis. La fenilefrina (círculo lleno) se inyectó por vía intraperitoneal a varias dosis. El antagonista  $\alpha$ -1, 5-MU (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.; cuadrado lleno) se administró 15 minutos antes de la administración de 30 ng/kg de fenilefrina. (c) La sulprostona espinal, un agonista selectivo de  $\text{EP}_1/\text{EP}_3$  induce hipersensibilidad táctil química de una manera que responde a la dosis. Dosis crecientes de sulprostona (círculo lleno) se inyectaron por vía intratecal. Un antagonista  $\text{EP}_1$  (100 ng i.t.; cuadrado lleno) se inyectó 15 minutos antes de la administración de 200 ng de sulprostona. (d) La administración espinal de NMDA induce hipersensibilidad táctil de una manera que responde a la dosis. NMDA (círculo lleno) se inyectó por vía intratecal a varias dosis. El antagonista de NMDA, memantina (1  $\mu\text{g}$  i.t.; cuadrado lleno), se inyectó 15 minutos antes de la administración de 100 ng de NMDA.

45 La Figura 2 muestra que el aumento del tono simpático de ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C aumenta la inducción de hipersensibilidad táctil por la activación del receptor  $\alpha$ -1. A los ratones tipo salvaje (círculo lleno), deficientes en  $\alpha$ -2A (cuadrado lleno), y deficientes en  $\alpha$ -2C (triángulo lleno) se les inyectó por vía intraperitoneal con dosis crecientes de fenilefrina y se analizaron para determinar la hipersensibilidad táctil. Los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A se pretrataron con 50 mg/kg i.p. de guanetidina para producir una simpatectomía química temporaria 24-30 horas antes de una inyección i.p. con fenilefrina (cuadrado abierto). Cada grupo de ratones consistió en 5-6 animales. La puntuación de sensibilización promedio y SEM se calcularon y compararon con un grupo control de vehículo mediante una prueba t de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ).

50 La Figura 3 muestra que el sistema nervioso simpático mejora la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona. A los ratones tipo salvaje (círculo lleno), deficientes en  $\alpha$ -2A (cuadrado lleno), y  $\alpha$ -2C (triángulo lleno) se les inyectó en forma intratecal con dosis crecientes de sulprostona y se analizó para determinar la hipersensibilidad táctil. Los

ratones deficientes en  $\alpha$ -2A se pretrataron con guanetidina (50 mg/kg i.p.) para producir una simpatectomía química temporaria 24 horas antes de una inyección intratecal de sulprostona (cuadrado abierto). Cada grupo de ratones consistió en 5-6 animales. La puntuación de sensibilización promedio y SEM se calcularon y compararon con un grupo control de vehículo mediante una prueba t de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ).

5 La Figura 4 muestra que los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 no exhiben hipersensibilidad táctil inducida por NMDA alterada. A los ratones tipo salvaje (círculo lleno), deficientes en  $\alpha$ -2A (cuadrado lleno), y  $\alpha$ -2C (triángulo lleno) se les inyectó en forma intratecal con dosis crecientes de NMDA. Cada grupo de 5-6 ratones fue calificado para hipersensibilidad táctil. Se calcularon la respuesta promedio y SEM y se compararon con un grupo de control de vehículo por medio de una prueba t de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ).

10 La Figura 5 muestra que los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos difieren en el alivio de hipersensibilidad sensorial potenciada simpáticamente. Se calificó la respuesta de 5-6 ratones por grupo; se calcularon la respuesta promedio y la SEM como se describió anteriormente. Cada grupo tratado con fármaco se comparó con un grupo de control de vehículo por medio de una prueba t de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ). (a) La brimonidina y clonidina espinal alivian la hipersensibilidad táctil inducida por NMDA en los ratones tipo salvaje. Se inyectó a los ratones en forma intratecal con vehículo DMSO o se co-inyectó en forma intratecal con 100 ng de NMDA y solución salina, 0,4  $\mu$ g de brimonidina (UK14304) o 1  $\mu$ g de clonidina. (b) La brimonidina y clonidina espinal alivian la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona en ratones tipo salvaje. Se inyectó a los ratones en forma intratecal con vehículo DMSO o se co-inyectó en forma intratecal con 200 ng de sulprostona y solución salina, 0,4  $\mu$ g de brimonidina (UK14304) o 0,4  $\mu$ g de clonidina. (c) La brimonidina y clonidina espinal alivian la hipersensibilidad táctil inducida por NMDA en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C, pero no en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A. Se inyectó a los ratones en forma intratecal con vehículo DMSO o se coinyectó en forma intratecal 100 ng de NMDA y solución salina, 0,4  $\mu$ g de brimonidina (UK14304) o 1  $\mu$ g de clonidina. (d) La brimonidina y clonidina espinal difieren en su capacidad de aliviar la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C. Se inyectó a los ratones vehículo DMSO o se coinyectó en forma intratecal 200 ng (deficientes en  $\alpha$ -2C) o 30 ng (deficientes en  $\alpha$ -2A) sulprostona y solución salina, 0,4  $\mu$ g de brimonidina (UK14304) o 0,4  $\mu$ g de clonidina. La analgesia del agonista  $\alpha$ -2 está ausente en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A; la analgesia clonidina también se pierde en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C.

La Figura 6 muestra que la brimonidina, pero no la clonidina o tizanidina alivia la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona en ausencia de sedación. Los efectos anti-hipersensitivos y sedantes que responden a la dosis de tres agonistas  $\alpha$ -2 (tizanidina, triángulo; clonidina, cuadrado; y brimonidina, círculo) se compararon en modelos de hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona y actividad locomotora, respectivamente. Se calcularon la puntuación de sensibilidad total promedio y el error estándar de la media y se indicaron como una línea entera (eje izquierdo). La actividad locomotora relativa a los animales tratados con vehículo se expresó como un porcentaje, y el por ciento de sedación se calculó como 100% menos el por ciento de actividad locomotora y se indicó como una línea discontinua (eje derecho).

35 La Figura 7 muestra selectividad variable del agonista  $\alpha$ -2 versus  $\alpha$ -1 en los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos clonidina y brimonidina. Las concentraciones crecientes de fenilefrina (cuadrado lleno), clonidina (rombo lleno), tizanidina (círculo lleno), dexmedetomidina (triángulo lleno) y brimonidina (triángulo invertido lleno) se analizaron para determinar actividad del agonista  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 por medio de ensayos funcionales basados en células in vitro. (a, b) Actividad de agonistas  $\alpha$ -1A y  $\alpha$ -1B de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos. El aumento de calcio intercelular en las células HEK que expresan en forma estable el receptor  $\alpha$ -1A bovino (a) o el receptor  $\alpha$ -1B de hámster (b) después de la adición de varias concentraciones de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos se determinó por la medición del cambio en la fluorescencia de un colorante sensible al calcio. Los agonistas se analizaron 6-15 veces por triplicado, y se calculó la fluorescencia media y SEM en cada concentración. Se muestran resultados de un experimento típico. (c, d) Actividad de agonista  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos. Inhibición de acumulación de AMPc inducido por forskolina en células PC12 que expresan en forma estable el receptor  $\alpha$ -2A humano (c) o el receptor  $\alpha$ -2C humano (d) después de la adición de varias concentraciones de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos. Los agonistas se analizaron 3-5 veces por triplicado, y el % de inhibición promedio y SEM se calcularon en cada concentración. Se muestran los resultados de un experimento típico. (e) La coadministración de prazosina con clonidina restaura la analgesia mediada por clonidina en ratones deficientes en  $\alpha$ -2C. A los ratones tipo salvaje (barras abiertas) y deficientes en  $\alpha$ -2C (barras rayadas) se les inyectó vehículo, prazosina (100 ng/kg i.p.), sulprostona (200 ng i.t.), clonidina (400 ng i.t.) o varias combinaciones, tal como se indica. Se calificó la hipersensibilidad táctil de 5-6 ratones por grupo, y se calculó la respuesta promedio y SEM. Cada grupo tratado con fármaco se comparó con un grupo de control de vehículo por medio de una prueba de dos colas no pareada (\*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$ ).

### Descripción detallada de la invención

55 Los receptores adrenérgicos median las respuestas fisiológicas a las catecolaminas, norepinefrina y epinefrina, y son miembros de la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G que tienen siete dominios de transmembrana. Estos receptores, que se dividen farmacológicamente en tipos de receptores  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\beta$ -adrenérgicos, están involucrados en diversas funciones fisiológicas que incluyen funciones de los sistemas cardiovascular y nervioso central. Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos median la mayoría de las funciones excitatorias: los receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos generalmente median las respuestas en el órgano efector, mientras que los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos se ubican en forma postsináptica así como presináptica, donde regulan la liberación de

neurotransmisores. Los agonistas de receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos en la actualidad se usan clínicamente en el tratamiento de hipertensión, glaucoma, espasticidad y trastornos por déficit de atención, en la supresión de la abstinencia a opiáceos, y como auxiliares para anestesia general.

5 Los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos actualmente se clasifican en tres subtipos basados en su caracterización farmacológica y molecular:  $\alpha$ -2A/D ( $\alpha$ -2A en seres humanos y  $\alpha$ -2D en rata);  $\alpha$ -2B; y  $\alpha$ -2C (Bylund et al., *Pharmacol. Rev.* 46:121-136 (1994); y Hein y Kobilka, *Neuropharmacol.* 34:357-366 (1995)). Los subtipos  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2B pueden regular la contracción arterial en algunos lechos vasculares, y los subtipos  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C median la inhibición por retroalimentación de la liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas simpáticas. El subtipo  $\alpha$ -2A también media muchos de los efectos centrales de los agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Calzada y Artiñano, *Pharmacol. Res.* 44: 195-208 (2001); Hein et al., *Ann. NY Acad. Science* 881:265-271 (1999); y Ruffolo (Ed.),  $\alpha$ -Adrenoreceptors: Molecular Biology, Biochemistry and Pharmacology S. Karger Publisher's Inc. Farmington, CT (1991)).

15 Estudios previos han demostrado que la norepinefrina tiene mayor afinidad por el receptor  $\alpha$ -2C ( $K_i = 650$  nM) que el receptor  $\alpha$ -2A ( $K_i = 5800$  nM; Link et al., *Mol. Pharm.* 42:16-27 (1992)). En consecuencia, la acción autoinhibitoria sobre la liberación de norepinefrina está mediada a través del receptor  $\alpha$ -2C a concentraciones bajas de norepinefrina, y a través del receptor  $\alpha$ -2A a concentraciones altas de norepinefrina (Altman et al., *Mol. Pharm.* 56:154-161 (1999)). Como resultado, la inhibición por retroalimentación de la liberación de norepinefrina basal está mediada por el receptor  $\alpha$ -2C, mientras que el receptor  $\alpha$ -2A media la inhibición por retroalimentación de la liberación en condiciones de estimulación de alta frecuencia (Hein et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 881:265-271 (1999)). Como se desvela en la presente en el Ejemplo II, los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C, que tienen una disminución de la inhibición presináptica del flujo de salida simpático en condiciones basales (o estimulación de baja frecuencia), son más sensibles al aumento de la actividad del receptor  $\alpha$ -1 mediante el tratamiento con fenilefrina (ver Figura 2). Además, como se muestra en la presente en la Figura 3, los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A son más sensibles a la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona, mientras que en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C, la sensibilidad a sulprostona es la misma que la de los ratones tipo salvaje. Estos resultados demuestran que el tratamiento con sulprostona produce estimulación nerviosa simpática de alta frecuencia, que se evidencia por el hecho de que solo los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A, que carecen de la inhibición presináptica del flujo de salida simpático de alta frecuencia, exhiben una disminución del umbral para la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona.

30 Como se desvela adicionalmente en la presente en el Ejemplo III, la brimonidina fue analgésica en ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2C con hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona. En contraste, la clonidina fue analgésica en ratones tipo salvaje pero no en deficientes en  $\alpha$ -2C (comparar las Figuras 5b y d). Como se esperaba, ni clonidina ni brimonidina fueron analgésicas en ratones deficientes en  $\alpha$ -2A, que carecen del receptor adrenérgico  $\alpha$ -2A espinal que media la actividad analgésica. En consecuencia, en ratones deficientes en  $\alpha$ -2C tratados con sulprostona, que sirve como modelo para afecciones potenciadas simpáticamente, los pan-agonistas brimonidina y clonidina tienen actividades sorprendentemente diferentes. Los resultados adicionales desvelados en la presente demuestran que, en ratones tipo salvaje, brimonidina, pero no otros pan-agonistas tales como tizanidina o clonidina, presenta actividad analgésica sin sedación concomitante (ver Figura 6). Además, brimonidina fue altamente selectiva (más de 1000 veces) para los receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos en comparación con los receptores  $\alpha$ -1 en ensayos funcionales en comparación con otros pan-agonistas tales como clonidina y tizanidina, que exhibieron selectividad menor que 10 veces (ver Figura 7 y Tabla 2). Estos resultados demuestran la actividad funcional diferencial de los pan-agonistas brimonidina y clonidina e indican que la selectividad funcional  $\alpha$ -2 versus  $\alpha$ -1 puede ser ventajosa en el tratamiento de afecciones potenciadas simpáticamente tales como afecciones asociadas con estrés sin sedación concomitante.

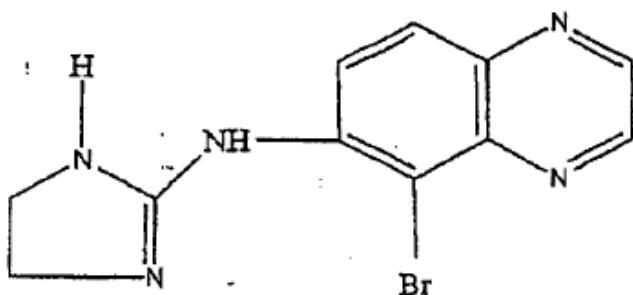
45 Las migrañas son cefaleas que afectan a más del 10% de la población y se pueden asociar con un componente vascular. En una realización, brimonidina o el derivado de esta se usa para prevenir o reducir la severidad de hipersensibilidad ocular asociada con la migraña, por ejemplo, fotofobia. La brimonidina y sus derivados son útiles para prevenir o reducir la severidad de la hipersensibilidad sensorial asociada con una cualquiera de una variedad de formas de migraña que incluyen, pero sin limitación, migraña sin aura ("MO"), migraña con aura ("MA"), y trastorno migrañoso. La hipersensibilidad sensorial a prevenir o reducir en severidad se puede asociar con, por ejemplo, migraña abdominal, migraña confusional aguda, migraña basilar (arteria basilar), migraña hemipléjica o familiar, migraña fulgurante, migraña ocular (oftálmica), migraña oftalmopléjica o migraña retiniana. Además, la hipersensibilidad sensorial asociada con una migraña equivalente, en que existe un aura de migraña sin cefalea, se puede prevenir o reducir en severidad. Las auras de migraña son anomalías visuales, motoras, psíquicas, parestésicas u otras anomalías neurológicas que acompañan una migraña. Ver Elrington, J. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72 Supple. II:ii10-ii15 (2002); Anderson, supra, 1994; Bennett y Plum, supra, 1996.

55 La hipersensibilidad sensorial asociada con una migraña incluye, pero sin limitación, náuseas; vómitos; diarrea; fotofobia (intolerancia a la luz); y fonofobia (intolerancia al ruido). Tal hipersensibilidad sensorial también incluye anomalías visuales tales como luces brillantes y centelleantes (centelleo o escotoma de fortificación) o una anomalía visual monocular (retiniana) y/o pérdida hemianóptica de la visión; parestesia (sensación al tacto anormal) tal como parestesia unilateral; afasia (pérdida del habla o comprensión); hemiparesia (debilidad muscular o parálisis incompleta en un lado del cuerpo); defecto hemisensorial; o vértigo, ataxia (pérdida de coordinación muscular) o diplopía. Uno de estos u otros tipos de hipersensibilidad sensorial que ocurren antes, durante o después

de la cefalea migrañosa, o que ocurren en ausencia de cefalea como parte de una migraña equivalente, se pueden prevenir o reducir en severidad.

Una afección asociada con el estrés se puede prevenir o reducir en severidad sin sedación concomitante. La sedación, como se usa en la presente, es un término que significa una reducción de la actividad motora. La frase "sin sedación concomitante", como se usa en la presente, significa que relativamente poca reducción de la actividad motora acompaña la reducción de la severidad de uno o más síntomas de una afección asociada con el estrés a una o más dosis de fármaco. Un fármaco generalmente actúa "sin sedación concomitante" si, después de la administración periférica, la dosis requerida para producir un 20% de reducción de la actividad motora es al menos 3 veces mayor que la dosis requerida para producir una reducción significativa de uno o más síntomas de la afección asociada con el estrés. Como se muestra en la Figura 6, la brimonidina pero no tizanidina o clonidina se pudieron administrar en dosis que producen una reducción de la puntuación de sensibilización (línea entera, eje izquierdo) con menos de 20% de aumento de la sedación (línea interrumpida, eje derecho). A modo de ejemplos no limitantes, la dosis requerida para producir una reducción de 20% de la actividad motora puede ser al menos 4 veces mayor que, 5 veces mayor que, 6 veces mayor que, 7 veces mayor que, 8 veces mayor que, 9 veces mayor que, 10 veces mayor que, 25 veces mayor que, 50 veces mayor que, 100 veces mayor que, 200 veces mayor que, 500 veces mayor que, 1000 veces mayor que, 2000 veces mayor que, o 5000 veces mayor que la dosis requerida para producir una reducción en uno o más síntomas de una afección asociada con el estrés. Los procedimientos para determinar el grado de reducción de la severidad de los síntomas de una afección asociada con el estrés y el grado de sedación son bien conocidos en la técnica.

El término "brimonidina" como se usa en la presente, significa un compuesto que tiene la fórmula



o una sal, tautómero, solvato, N-óxido o amida farmacéuticamente aceptable de la misma. Tal derivado farmacéuticamente aceptable puede tener sustancialmente actividad de D-tartrato de 5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)quinoxalina (1:1) en reducir la hipersensibilidad táctil sin sedación concomitante en ratones tratados con sulprostona. El término brimonidina abarca, sin limitación, Alphagan™ y UK14304. Brimonidina está disponible en el comercio, como Alphagan™ (Allergan). Brimonidina y sus sales y amidas farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por procedimientos de rutina tales como los que se describen a continuación en el Ejemplo I. Ver, también, la Patente de EE.UU.S. Núm. 6.323.204.

En consecuencia, se entiende que la presente invención abarca el uso de sales y amidas farmacéuticamente aceptables derivadas de la fórmula que representa la brimonidina. Las sales de brimonidina farmacéuticamente aceptable adecuadas incluyen sin limitación, sales de adición de ácidos, que se pueden formar, por ejemplo, por la mezcla de una solución de brimonidina con una solución de un ácido apropiado tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen, aún sin limitación, fosfato ácido, acetato, bencensulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhirato, clorhidrato, yodhidrato, hidroxinaftorato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, N-metilglucamina de amonio, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, sacarato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, teoclato, sales de p-toluensulfonato, tosilato, trietioduro y valerato. En una realización, un procedimiento de la invención se practica con tartrato de brimonidina.

También se entiende que los tautómeros químicamente diferentes de brimonidina están abarcados dentro del término "brimonidina". Además, se puede usar un solvato de brimonidina (por ejemplo, con agua o un disolvente orgánico común). Los hidratos y otros solvatos de brimonidina también están abarcados dentro del término "brimonidina".

Se entiende que las composiciones farmacéuticas que contienen brimonidina pueden ser útiles en los procedimientos de la invención. Tal composición farmacéutica incluye brimonidina y opcionalmente incluye un excipiente tal como un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, que es un portador o diluyente que tiene

- efecto no perjudicial sustancialmente a largo plazo o permanente cuando se administra a un individuo. Un excipiente generalmente se mezcla a un compuesto activo o se permite para diluir o capturar el compuesto activo. Un portador puede ser un agente sólido, semisólido o líquido que actúa como un excipiente o vehículo para el compuesto activo. Los ejemplos de portadores sólidos incluyen sin limitación, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, poliaquilenglicoles, talco, celulosa glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las formulaciones de supositorios pueden incluir, por ejemplo, propilenglicol como un portador. Los ejemplos de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen sin limitación, agua, tal como agua desionizada destilada; solución salina; dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares. Se entiende que los ingredientes activos pueden ser solubles o se pueden administrar como una suspensión en el portador o diluyente deseado.
- Una composición farmacéutica opcionalmente también puede incluir uno o más agentes tales como, sin limitación, agentes emulsionantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes o saborizantes, agentes de ajuste de tonicidad, conservantes, tampones o antioxidantes. Los agentes de ajuste de tonicidad útiles en la composición farmacéutica incluyen pero sin limitación, sales tales como acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otros agentes de ajuste de tonicidad farmacéuticamente aceptables. Los conservantes útiles en las composiciones farmacéuticas incluyen sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, y nitrato fenilmercúrico. Varios tampones y medios para ajustar el pH se pueden usar para preparar una composición farmacéutica, que incluyen pero sin imitación, tampones de acetato, tampones de citrato, tampones de fosfato y tampones de borato. De modo similar, los antioxidantes útiles en la composición farmacéutica son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxiansol butilado e hidroxitolueno butilado. Se entiende de estas y otras sustancias conocidas en la técnica de farmacología se pueden incluir en una composición farmacéutica útil en los procedimientos de la invención. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences Mack Publishing Company, Easton, PA 16th Edición 1980. Además, una composición que contiene brimonidina se puede administrar en conjunto con una o más sustancias terapéuticas diferentes, en la misma o diferente composición farmacéutica y por la misma o diferentes vías de administración.
- Brimonidina o el derivado farmacéuticamente aceptable de esta se administra en una cantidad efectiva. Tal cantidad efectiva generalmente es la mínima dosis necesaria para obtener la prevención o reducción deseada de la severidad de uno o más síntomas de una afección asociada con el estrés, por ejemplo, esta considera generalmente necesaria para reducir el malestar causado por la afección asociada con el estrés en niveles tolerables.
- Tal dosis generalmente está en el intervalo de 0,1-1000 mg/día y puede estar por ejemplo, en el intervalo de 0,1-500 mg/día, 0,5-500 mg/día, 0,5-100 mg/día, 0,5-50 mg/día, 0,5-20 mg/día, 0,5-10 mg/día o 0,5-5 mg/día, con la cantidad real por administrar determinada por un médico que toma en cuenta las circunstancias relevantes que incluyen la severidad y tipo de afección asociada con el estrés, la edad y el peso del paciente, la condición física general del paciente y la formulación farmacéutica y vía de administración. Los supositorios y formulaciones de liberación extendida también pueden ser útiles en los procedimientos de la invención, que incluyen, por ejemplo, parches dérmicos, formulaciones para depósito sobre o debajo de la piel y formulaciones para la inyección intramuscular.
- Una composición farmacéutica se puede administrar a un individuo por una variedad de medios que dependen por ejemplo, del tipo de afección a ser tratada, la formulación farmacéutica, y los antecedentes, factores de riesgo y síntomas del individuo. A modo de ejemplos no limitantes, una composición farmacéutica se puede administrar por vía oral, por vía parenteral: por bomba subcutánea, por parche dérmico; por vía intravenosa, inyección intra-articular, subcutánea o intramuscular; por gotas, cremas, geles o ungüentos tópicos; como una formulación de liberación extendida implantada o inyectada; por minibomba subcutánea u otro dispositivo implantado; por bomba intratecal o inyección; o por inyección epidural. De acuerdo con el modo de administración, la brimonidina se puede incorporar en cualquier forma de dosis farmacéuticamente aceptable tal como, sin limitación, un comprimido, pastilla, cápsula, supositorio, polvo, líquido, suspensión, emulsión, aerosol o similares, y opcionalmente se puede envasar en una forma de dosis unitaria adecuadas para la administración única de dosis precisas, o formas de dosis de liberación sostenida para la administración controlada continua.
- Se puede emplear la administración periférica de brimonidina o el derivado de esta. Como se usa en la presente, el término "administración periférica" o "administrado periféricamente" significa introducir brimonidina o el derivado de esta farmacéuticamente aceptable en un individuo fuera del sistema nervioso central. La administración periférica abarca cualquier vía de administración diferente de la administración directa en la médula espinal o cerebro.
- La administración sistémica produce la administración de una composición farmacéutica esencialmente a lo largo de al menos el sistema periférico completo del individuo.
- Las vías de administración periférica útiles en los procedimientos de la invención abarcan, sin limitación, administración oral, administración tópica intravenosa u otra inyección, y minibombas implantadas u otros dispositivos o formulaciones de liberación extendida. Una composición farmacéutica útil en la invención se puede administrar periféricamente, por ejemplo, por vía oral en cualquier forma aceptable tal como en un comprimido, líquido, cápsula, polvo o similares; por inyección intravenosa, intraperitoneal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o parenteral; por difusión o electroforesis transdérmica; tópica en cualquier forma aceptable tal como en gotas, cremas, geles o ungüentos; y por minibombas u otra dispositivo o formulación de liberación extendida implantada.

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar pero no limitar la presente invención.

### Ejemplo I

#### PREPARACIÓN DE BRIMONIDINA

Este ejemplo describe la preparación de brimonidina (5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)quinoxalina).

##### 5 Preparación de bromhidrato de 6-amino-5-bromoquinoxalina

La 6-aminoquinoxalina (2,08 g, 14,4 mmol) se disolvió en 11,5 ml de ácido acético glacial. La solución se enfrió en agua mientras se añadió lentamente una solución de bromo (0,74 ml, 2,3 g, 14,4 mmol) en 1,5 ml de ácido acético glacial durante 15 minutos. Después de agitar durante 30 minutos adicionales, el sólido rojo anaranjado formado se filtró y lavó por completo con éter seco. El sólido se secó in vacuo toda la noche para producir 4,44 g de producto en bruto (un rendimiento del 100%). El compuesto, bromhidrato de 6-amino-5-bromoquinoxalina, no tuvo punto de fusión definido. Se observó un cambio de fase de polvo fino a cristales rojos a aproximadamente 220° C. La descomposición se observó a aproximadamente 245° C. El material se usó directamente para la preparación de 6-amino-5-bromoquinoxalina de la siguiente manera.

##### 6-amino-5-Bromoquinoxalina

15 La 6-amino-5-bromoquinoxalina en bruto anterior se disolvió en agua, y se añadió solución saturada de bisulfito de sodio de sodio hasta que la solución resultante analizada fue negativa con papel de almidón-yoduro. La solución posteriormente se alcalinizó con hidróxido de sodio 2N y se extrajo por completo con acetato de etilo. El extracto orgánico se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para dar la base libre. El producto en bruto se recrystalizó a partir de benceno en ebullición para dar cristales amarillos, p.f. 155-6° C. Por medio de varios procedimientos analíticos, se determinó que los cristales amarillos son 6-amino-5-bromoquinoxalina. El rendimiento fue del 82%.

##### 6-Bromo-6-isotiocianatoquinoxalina.

25 El producto de bromhidrato en bruto descrito anteriormente (4,27 g, 14,0 mmol) se disolvió en 60 ml de agua; se añadió tiosgeno (Aldrich, 1,28 ml, 16,8 mmol) en pequeñas porciones con agitación enérgica. Después de 2 horas, se descargó el color rojo de la solución. El sólido formado se filtró y lavó por completo con agua. Después de secar in vacuo a 25° C, se obtuvieron 3,38 g de cristales rojo ladrillo, p.f. 157-8° C, que representan un rendimiento del 90%. Una porción de este material también se purificó por cromatografía en columna para dar cristales blancos, p.f. 157-8° C. Por medio de varios procedimientos analíticos, se determinó que los cristales son 5-bromo-6-isotiocianatoquinoxalina.

##### 30 5-Bromo-6-(N-(2-aminoetil) tioureido) quinoxalina.

Una solución del isotiocianato (3,25 g, 12,2 mmol) en 145 ml de benceno se añadió a una solución de etilendiamina (Aldrich, 5,43 g, 90,0 mmol) en 18 ml de benceno a 25° C durante 2 horas. Después de agitar durante 30 minutos adicionales, se vertió el sobrenadante. El aceite que quedó se lavó por agitación con éter seco tres veces y se usó directamente para la etapa siguiente.

35 Una porción de este producto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>) para la caracterización. Se recuperó un sólido blanco que se descompuso a 175° C con desarrollo de gas (desprendimiento). Se determinó que este sólido blanco es 5-bromo-6-(N-2-(aminoetil)tioureido)quinoxalina.

##### 5-Bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)quinoxalina.

40 El producto en bruto anterior se disolvió en 100 ml de metanol seco y la solución marrón se sometió a reflujo durante 19 horas hasta que no se desarrolló más sulfuro de hidrógeno gaseoso. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a aproximadamente 50 ml. El sólido amarillo se filtró y se secó in vacuo; el sólido pesó 2,52 g (un rendimiento del 70%) y tuvo un punto de fusión de 242-4° C.

45 Debido a que el producto en bruto fue insoluble en la mayor parte de los disolventes orgánicos más comunes, se obtuvo una purificación inicial por el procedimiento de extracción de ácido-base. El producto en bruto (23 g) se disolvió en 100 ml de ácido clorhídrico 0,5 N. La solución amarilla turbia se filtró para dar una solución amarilla anaranjada clara que se extrajo dos veces con acetato de etilo (10 ml en cada extracción). La fase acuosa se enfrió a 0° C y se alcalinizó con hidróxido de sodio 6N, manteniendo la temperatura de la solución por debajo de 15° C en todo momento. El sólido amarillo que precipitó, se filtró y lavó por completo con agua hasta que los lavados fueron neutros al papel de pH. El sólido se secó toda la noche in vacuo para dar 1,97 g de sólido amarillo, p.f. 249-250° C.

50 La recuperación fue aproximadamente del 88%.

Se obtuvo purificación adicional por recrystalización. El producto parcialmente purificado del anterior se disolvió en N,N-dimetilformamida (aproximadamente 17 ml/g) a 100° C con agitación enérgica. La solución se filtró en caliente y se dejó enfriar toda la noche. Los cristales amarillo brillante se recolectaron por filtración, p.f. 252-253° C. La

recuperación fue del 65-77%. Por medio de procedimientos analíticos, se determinó que el sólido amarillo brillante es 5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)quinoxalina.

## Ejemplo II

### Modelos de ratón con diferentes mecanismos de sensibilización motora

- 5 Este ejemplo demuestra que el aumento de tono simpático de ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C mejora la inducción de hipersensibilidad táctil por la activación del receptor  $\alpha$ -1.

#### A. La hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona está dirigida por el sistema nervioso simpático mientras que la hipersensibilidad táctil inducida por fenilefrina es independiente de la entrada del sistema nervioso simpático

10 Para analizar la contribución del sistema nervioso simpático en la sensibilización motora, se desarrollaron modelos de ratón que tienen diferentes mecanismos de sensibilización motora. Se midió la hipersensibilidad táctil en ratones después de la inyección intratecal o intraperitoneal de un agente inductor por la calificación de la respuesta al toque ligero del flanco del ratón con un pincel. Para simular el aumento de tono simpático, se inyectó fenilefrina, un agonista del receptor  $\alpha$ -1 adrenérgico. Como se muestra en las Figuras 1a y 1b, la dosificación intratecal (i.t.) o intraperitoneal (i.p.) de fenilefrina causó hipersensibilidad táctil, con respuestas significativas observadas a partir de 15 las dosis de 3 ng i.t. y 3 ng/kg i.p. La inducción de hipersensibilidad táctil fue dependiente del receptor  $\alpha$ -1, evidenciada por la capacidad del antagonista del receptor  $\alpha$ -1 5-metil urapidilo (5-MU) de bloquear la respuesta hipersensible cuando se inyectó por vía intraperitoneal.

También se analizó la actividad de un agonista de prostaglandina selectivo del receptor EP<sub>1</sub>/EP<sub>3</sub> sintético, sulprostona. Como se muestra en la Figura 1c, las dosis crecientes de sulprostona intratecal indujeron 20 hipersensibilidad táctil dependiente de la dosis; dosis de 100 y 200 ng causaron una respuesta hipersensible significativa. La coadministración de un antagonista del receptor EP<sub>1</sub> bloqueó por completo la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona, lo que demuestra que la sulprostona media la hipersensibilidad táctil a través de la activación del receptor EP<sub>1</sub>.

25 En un tercer modelo de ratón, se indujo sensibilización química por la inyección de dosis crecientes intratecales de NMDA, que puede activar los canales de NMDA sobre las neuronas del asta dorsal postsináptica (Woolf et al., Science 288:1765-1769(2000)). La NMDA intratecal produjo una hipersensibilidad táctil dependiente de la dosis con un efecto máximo a una dosis de 100 ng. La hipersensibilidad se bloqueó con el antagonista de NMDA, memantina, como se muestra en la Figura 1d.

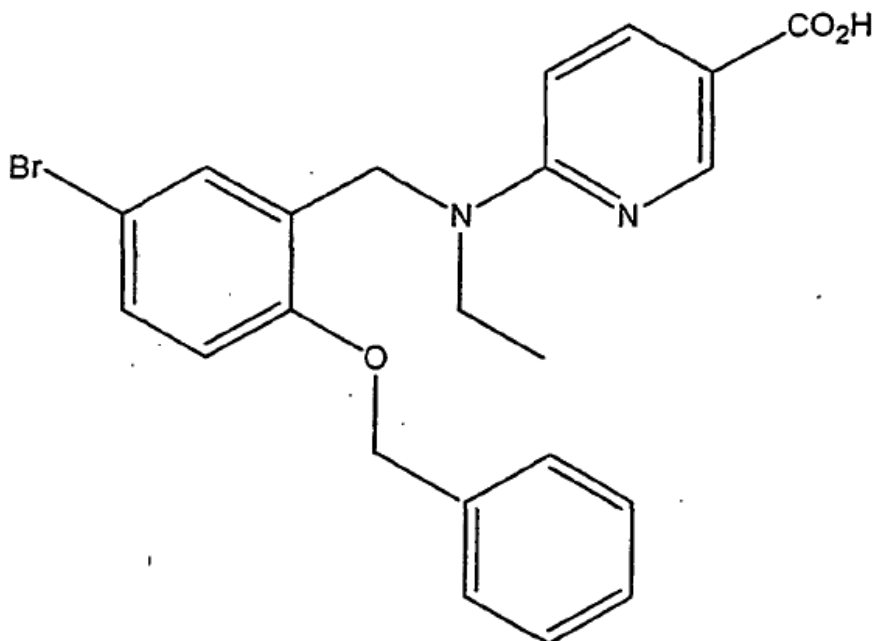
30 Para evaluar si los tres estímulos sensibilizan vías sensorias por mecanismos diferentes, se analizó un conjunto de agentes farmacológicos para determinar la capacidad de prevenir o mejorar la hipersensibilidad táctil. Como se muestra en la Tabla 1, cada antagonista del receptor (5-MU, el antagonista del receptor EP<sub>1</sub> o memantina) bloqueó solo la hipersensibilidad táctil resultante del correspondiente agonista del receptor (fenilefrina, sulprostona o NMDA, respectivamente). La gabapentina, que se usa clínicamente para aliviar el dolor neuropático por reducción de la sensibilización espinal, también se analizó para determinar la capacidad de bloquear la hipersensibilidad táctil. La 35 gabapentina inhibió la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona y NMDA, pero no por fenilefrina, lo que además demuestra diferencias entre las vías sensorias involucradas por estímulos diferentes.

Antagonistas del receptor y analgésicos usados clínicamente inhiben la hipersensibilidad mecánica inducida químicamente					
	Vehículo	5-MU	Antagonista de EP <sub>1</sub>	Memantina	Gabapentina
Fenilefrina (100 ng/kg I.P.)	14,3±0,7**	5,0±1,0	9,8±0,7**	11,0±0,7**	13,0 (± 0,6)**
Sulprostone (200 ng IT)	13,2 ± 0,8**	12,0±1,0**	4,0 ± 1,2	14,3±0,8**	3,2±0,5
NMDA (100 ng IT)	14,2 ± 1,0**	13,3±0,8**	11,4±1,53*	4,2±0,9	3,7±0,8
* indica p < 0,01					
** indica p < 0,001					

40 Los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 fueron provistos por el Dr. Brian Kobilka (Stanford University; Link et al., Mol. Farmacol. 48:48-55 (1995); Altman et al., Mol. Farmacol. 56:154-161 (1999)). Los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 tienen un fondo C57BL/6 y se criaron a partir de pares de cruce de ratones knockout homocigotas. Los ratones C57BL/6 tipo salvaje se combinaron por edad y sexo se usaron como controles.



La sulprostona (Cayman Chemical; Ann Arbor, Michigan) y NMDA (Sigma; St Louis, MO) se disolvieron en sulfóxido de metilo (DMSO). El antagonista del receptor EP1



5 sintetizado esencialmente como se describió en la Patente de EE.UU. Núm. 5.843.942, y gabapentina (Victor Medical; Irvine, CA) se disolvieron en 50% de DMSO, 50% de solución salina. La memantina (clorhidrato de 1-amino-3,5-dimetiladamantano), un análogo del bien conocido agente antiviral amantadina (clorhidrato de 1-adamantanamina), se sintetizó esencialmente como se describe en la Patente de EE.UU. Núm. 5.061.703 (ver, también, Schneider et al., Dtsch Med. Wochenschr. 109:987 (1984)). Se obtuvieron 5-metilurapidilo, brimonidina, fenilefrina, clonidina y guanetidina en Sigma y se disolvieron en solución salina. La prazosina (Sigma) y tizanidina (Biomol; Plymouth Meeting, PA) se disolvieron en agua destilada.

Se realizaron inyecciones de fármaco espinales de la siguiente manera. Los ratones (20-30 g) se inyectaron en forma intratecal como se describió en Hilden y Wilcox, Eur. J. Farmacol. 67:313-316 (1980). En resumen, se insertó una aguja de calibre 30 de ½ pulgada estéril fijada a una microjeringa entre las vértebras L5 y L6. El ratón se sostuvo firmemente por la cintura pelviana en una mano, mientras que la jeringa se sostuvo en la otra mano en un ángulo de aproximadamente 20° sobre la columna vertebral. La aguja se insertó en el tejido en un lado del proceso espinoso L6, en el surco entre los procesos espinosos y transversos. El ángulo de la aguja disminuyó a aproximadamente 10°, y la aguja avanzó lentamente en el espacio intervertebral hasta que sintió un chasquido y fue visible un movimiento serpentino de la cola. Los compuestos se inyectaron lentamente en el espacio subaracnoideo en un volumen de 5 µl. Cada compuesto se analizó en dosis múltiples. La dosis eficaz mínima se usó para todos los experimentos posteriores.

Se cuantificó la sensibilidad al toque ligero por la calificación de la respuesta de ratones al toque ligero en sus flancos con un pequeño pincel, lo que normalmente no es doloroso. Los ratones se calificaron sobre la siguiente escala una vez cada 5 minutos entre 15 y 50 minutos pos-inyección: se asignó una puntuación de "2" a los animales que muestran respuestas de escape agresivas junto con chirridos y mordidas en el cepillo, una puntuación de "1" se asignó a los animales que exhiben chirrido leve con intentos de escapar; y una puntuación de "0" se asignó si el animal no mostró respuesta al toque ligero del pincel. Las puntuaciones se sumaron para generar una puntuación acumulativa de 0 a 16 como las puntuaciones en Minami et al., Pain 57:217-223 (1994). Los cálculos estadísticos de significación para los estudios in vivo se realizaron por medio de una prueba t Student de dos colas.

30 Se realizaron simpatectomías con guanetidina esencialmente de la siguiente manera. Los animales se inyectaron por vía intraperitoneal con 50 mg/kg de guanetidina (Malmberg y Basbaum, Pain 76:215-222 (1998)) antes de evaluar la sensibilidad táctil inicial 24 horas después. Los animales que exhibieron sensibilidad táctil normal se analizaron para determinar la sensibilidad a la inducción química de hipersensibilidad táctil. Los ratones se recuperaron de la simpatectomía seis a ocho días después demostrado por un retorno a la receptividad de pre-simpatectomía.

B. El aumento de tono simpático de los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C aumenta su sensibilidad a la inducción de hipersensibilidad táctil por la activación del receptor  $\alpha$ -1

Para evaluar si el tono simpático puede influir en la susceptibilidad a la sensibilización sensorial, la sensibilidad de ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C a la inducción química de hipersensibilidad táctil se comparó con la sensibilidad de los ratones tipo salvaje. Los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C no exhibieron hipersensibilidad táctil inicial cuando se compararon con los controles tipo salvaje. En primer lugar, se comparó la concentración de fenilefrina que induce hipersensibilidad táctil en los ratones knockout y tipo salvaje. Como se muestra en la Figura 2, hubo un desplazamiento abrupto hacia la izquierda en la respuesta a la dosis de fenilefrina en ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C. Estos resultados demuestran que la capacidad de fenilefrina para causar hipersensibilidad táctil fue mejorada en ambas líneas de ratón deficiente en  $\alpha$ -2, con una mayor mejora en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C. En particular, en comparación con una dosis fuertemente inductora de hipersensibilidad táctil de 30 ng/kg de fenilefrina en la línea tipo salvaje, 0,1 y 0,3 ng/kg de fenilefrina produjeron máxima hipersensibilidad en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C y  $\alpha$ -2A, respectivamente. Como se evidenció adicionalmente en la Figura 2, la respuesta a la dosis bifásica gradual en los ratones tipo salvaje se tornó una respuesta a la dosis más pronunciada en ambas líneas de ratones deficientes.

La administración sistémica de guanetidina produce una simpatectomía funcional por reducción de noradrenalina de los terminales simpáticos. A fin de examinar si los cambios en las curvas de respuesta a la dosis de fenilefrina se debieron al aumento del tono simpático en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2, los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A se simpatectomizaron químicamente por tratamiento con guanetidina (50 mg/kg i.p.) y se analizaron para determinar la sensibilidad inducida por fenilefrina 24-30 horas después. En los ratones  $\alpha$ -2A tratados con guanetidina, el aumento de sensibilidad a fenilefrina fue parcialmente anulado de modo que la respuesta a la dosis fue similar a la respuesta a la dosis bifásica observada en los ratones tipo salvaje (ver la Figura 2). Estos resultados confirman que el aumento de tono simpático potencia la sensibilización sensorial en ratones deficientes en  $\alpha$ -2A.

C. El sistema nervioso simpático aumenta la hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona

La sulprostona se inyectó en forma intratecal en concentraciones crecientes en los ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2 a fin de determinar si los ratones knockout fueron más sensibles a la sensibilización de aferentes primarios. Como se muestra en la Figura 3, la respuesta a la dosis de sulprostona fue idéntica en los ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2C, pero se desplazó a la izquierda en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A. En particular, una dosis de 30 ng fue máximamente efectiva en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A en comparación con una dosis parcialmente inductora de hipersensibilidad de 100 ng y una dosis máxima de 200 ng en los ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2C. Una simpatectomía química con guanetidina (50 mg/kg i.p.) disminuyó la sensibilidad a sulprostona de los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A. Como se muestra en la Figura 3, la respuesta a la dosis de hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona se desplazó aproximadamente 10 veces a la derecha en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A tratados con guanetidina. Estos resultados demuestran que el sistema nervioso simpático aumenta la sensibilización a sulprostona.

D. El sistema nervioso simpático no contribuye a la hipersensibilidad táctil inducida por NMDA

Para evaluar si los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 son más sensibles a la sensibilización del asta dorsal por NMDA, los ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2 se inyectaron con concentraciones variadas de NMDA. Como se muestra en la Figura 4, los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C no son más sensibles al NMDA que los ratones tipo salvaje. Estos resultados indican que el sistema nervioso simpático no parece contribuir a la hipersensibilidad táctil inducida por NMDA.

En suma, estos resultados demuestran que los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 exhiben niveles elevados de actividad nerviosa simpática y también indican que estos ratones exhiben aumento de la sensibilización que es específica en el sitio y modo de estimulación.

**Ejemplo III**

Comparación de actividad de los agonistas  $\alpha$ -2 brimonidina y clonidina

Este ejemplo demuestra que los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, difieren en su capacidad de aliviar la hipersensibilidad sensorial que está aumentada por el sistema nervioso simpático.

A. Brimonidina, pero no clonidina, alivia la hipersensibilidad táctil aumentada simpáticamente

Los agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos administrados por vía espinal alivian el dolor neuropático a través de un receptor de  $\alpha$ -2A espinal. Para determinar si el aumento de actividad simpática en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2 altera la actividad analgésica de los agonistas  $\alpha$ -2, varios agonistas se analizaron para la determinar la actividad. Los agonistas  $\alpha$ -2 brimonidina y clonidina primero se analizaron en el modelo de NMDA en el que la sensibilización no está influida por el tono simpático basal de los ratones knockout. La coadministración intratecal de NMDA con clonidina o brimonidina produjo la inhibición completa de la hipersensibilidad táctil en los ratones tipo salvaje y deficientes en  $\alpha$ -2C (Figuras 5a y c, respectivamente). Como se esperaba, ni clonidina ni brimonidina inhibieron la hipersensibilidad táctil inducida por NMDA en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2A (Figura 5c), compatible con los

estudios previos que muestran que un subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha$ -2A espinal media las acciones analgésicas de los agonistas  $\alpha$ -2 adrenérgicos (Lakhlani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9950-9955 (1997); Stone et al., J. Neurosci. 17:17157-1765 (1997); Hunter et al., Br. J. Pharmacol. 122:1339-1344 (1997)). El mismo patrón de actividad analgésica de la brimonidina también se observó en el modelo de hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona, que es sensible al tono simpático (ver Figuras 5b y d). En contraste, los resultados obtenidos con clonidina fueron sorprendentemente diferentes: la clonidina fue analgésica en ratones tipo salvaje, pero no en ratones deficientes en  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C (comparar Figuras 5b y d). Estos resultados demuestran que los  $\alpha$ -2 pan-agonistas pueden tener actividad diferencial en las afecciones potenciadas simpáticamente, la brimonidina exhibe actividad mientras que la clonidina es inactiva.

10 *B. Brimonidina, pero no clonidina o tizanidina, alivia la hipersensibilidad inducida por sulprostona en ausencia de sedación*

La sedación limita la utilidad de muchos agentes farmacéuticos, que incluyen los agonistas  $\alpha$ -2. En consecuencia, los agonistas  $\alpha$ -2 se compararon para analizar si hubo una diferencia en la dosis que produjo alivio de la hipersensibilidad sensorial relativa a la dosis que produjo sedación.

15 En los tres agonistas  $\alpha$ -2 (tizanidina, clonidina y brimonidina), se compararon los efectos sedantes y la capacidad de bloquear la hipersensibilidad táctil a varias dosis en modelos de actividad locomotora e hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona, respectivamente. La hipersensibilidad táctil de 5-6 ratones por grupo se calificó cada cinco minutos entre 15 y 50 minutos después de la dosis intraperitoneal. Los animales tratados con el vehículo normalmente tenían una puntuación de aproximadamente 4. Además, se midió la actividad locomotora de 5-6  
20 ratones por grupo en un período de cinco minutos, 30 minutos después de la dosis intraperitoneal. La actividad locomotora relativa a animales tratados con vehículo se expresó como un porcentaje; el porcentaje de sedación se calculó como 100% menos el porcentaje de actividad locomotora. Como se muestra en la Figura 6, de los tres agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos analizados, solo brimonidina produjo un efecto analgésico que fue separable de la sedación. Estos resultados demostraron que la brimonidina es distinta de otros  $\alpha$ -2 pan-agonistas tales como  
25 clonidina y tizanidina en la capacidad de aliviar los trastornos potenciados simpáticamente tales como hipersensibilidad táctil inducida por sulprostona sin sedación concomitante.

*C. Selectividad funcional  $\alpha$ -2 versus  $\alpha$ -1 variable de pan-agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos*

Los perfiles farmacológicos del receptor  $\alpha$ -adrenérgico de brimonidina y clonidina se analizaron en ensayos que usan líneas celulares que expresan en forma estable los receptores de  $\alpha$ -2A,  $\alpha$ -2C,  $\alpha$ -1A y  $\alpha$ -1B.

30 Compatibles con los estudios previos, el orden de potencia para inhibir la acumulación de AMPc inducida por forskolina en células PC12 que expresan en forma estable un receptor  $\alpha$ -2A o  $\alpha$ -2C (Figuras 7a, b; Tabla 2) fue dexmedetomidina, que fue mayor que o igual a brimonidina, que fue mayor que clonidina, que fue mayor que tizanidina, que fue mayor que o igual a fenilefrina (Jasper et al., Biochem. Pharmacol. 55:1035-1043 (1998); Pihlavisto et al., Eur. J. Pharmacol. 385:247-253 (1999)). Brimonidina, clonidina y tizanidina fueron aproximadamente 10 veces  
35 más potentes en el receptor  $\alpha$ -2A que en el receptor  $\alpha$ -2C.

Los mismos compuestos se analizaron funcionalmente para determinar la capacidad de estimular aumentos mediados por  $\alpha$ -1 en el calcio intracelular en células HEK293 que expresan en forma estable el receptor  $\alpha$ -1A y  $\alpha$ -1B (Figuras 7c, d; Tabla 2). El orden de potencia en los receptores  $\alpha$ -1A y  $\alpha$ -1B fue fenilefrina, que fue mayor que clonidina, que fue mayor que tizanidina, que fue igual a dexmedetomidina, que fue mayor que brimonidina. Los  
40 agonistas  $\alpha$ -2, clonidina, tizanidina y dexmedetomidina, fueron agonistas parciales mientras que brimonidina exhibió actividad débil en el receptor  $\alpha$ -1A y ausencia de actividad en el receptor  $\alpha$ -1B. En consecuencia, si bien clonidina y tizanidina se han caracterizado previamente como agonistas " $\alpha$ -2 selectivos" en ensayos de unión, estos compuestos exhiben una selectividad menor que 10 veces entre la activación del receptor  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -1 en ensayos funcionales. En contraste, dexmedetomidina fue aproximadamente 300 veces selectiva en ensayos funcionales, y  
45 brimonidina, el compuesto más altamente selectivo en ensayos funcionales, exhibió una selectividad mayor que 1000 veces para los receptores  $\alpha$ -2 con respecto a los receptores  $\alpha$ -1 (ver Tabla 2). Estos resultados demostraron que la brimonidina es un agonista altamente selectivo  $\alpha$ -2 versus  $\alpha$ -1 y que la selectividad diferencial de  $\alpha$ -2/ $\alpha$ -1 de la brimonidina contrasta con la selectividad de otros pan-agonistas tales como clonidina.

La diferencia en la selectividad  $\alpha$ -2/ $\alpha$ -1 entre clonidina y brimonidina indica que la actividad agonista  $\alpha$ -1 de la clonidina puede aumentar el tono simpático elevado de los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C y enmascarar la actividad analgésica de la clonidina en el modelo de sulprostona. Estos resultados están avalados por la capacidad de co-administración del antagonista  $\alpha$ -1 prazosin con clonidina para restaurar la actividad analgésica de la clonidina en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C (Figura 7e). Prazosina no tuvo actividad analgésica por sí misma en los ratones tipo salvaje o deficientes en  $\alpha$ -2C.

55 En suma, estos resultados indican que la pérdida de actividad analgésica de la clonidina, pero no de brimonidina, en los ratones deficientes en  $\alpha$ -2C puede ser un resultado de la actividad de agonista  $\alpha$ -1 de clonidina y que la actividad agonista  $\alpha$ -1 de muchos "agonistas  $\alpha$ -2" puede limitar su capacidad de tratar trastornos asociados con el estrés y otros potenciados simpáticamente.

5 Las líneas estables que expresan un receptor adrenérgico se establecieron de la siguiente manera. Los ADNc del receptor  $\alpha$ -1A bovino,  $\alpha$ -1B de hámster,  $\alpha$ -2A humano y  $\alpha$ -2C humano se subclonaron por extremo romo en los sitios NheI-EcoRI en el vector retroviral pCL BABE Puro. Los constructos retrovirales se verificaron por secuenciación de ADN de cadena doble. Las partículas de tipo pseudoretroviral de título alto se produjeron por la co-transfección de HEK293GP, una línea celular HEK293 que expresa en forma estable Gag-Pol del virus de leucemia Maloney con el vector retroviral apropiado y pMD.G, un vector de expresión para la proteína de la envoltura del virus de estomatitis vesicular, VSV-G. Dieciséis horas después de la transfección, se cambió el medio (DMEM, 10% de FCS); posteriormente se recolectó el medio de título alto ( $\sim 1 \times 10^6$  ufp/ml) cuarenta y ocho horas después. El sobrenadante se filtró a través de un filtro a 0,4  $\mu$ M.

10 Los sobrenadantes del receptor  $\alpha$ -2A y  $\alpha$ -2C humano se añadieron, en cantidades variadas, a células PC12 sin tratamiento, que posteriormente se incubaron durante 48 horas. Las poblaciones de células transducidas se sembraron a una densidad menor y se cultivaron en medio que contiene 100  $\mu$ g/ml de puromicina. Las células no transducidas se destruyeron dentro de los tres días, y crecieron focos únicos dentro de los dos meses. Los focos se seleccionaron, expandieron y analizaron para determinar la densidad del receptor por unión del radioligando de brimonidina. La actividad del receptor  $\alpha$ -2 funcional fue confirmada por la inhibición de acumulación del cAMP inducida por forskolina.

15 Los sobrenadantes del receptor  $\alpha$ -1A bovino y  $\alpha$ -1B de hámster se añadieron en cantidades variadas a células HEK293 sin tratamiento, las que posteriormente se incubaron durante 48 horas. Las poblaciones de células transducidas se sembraron a una densidad menor y crecieron en medio que contiene 0,25  $\mu$ g/ml de puromicina. La muerte celular significativa fue evidente dentro de los tres días, con focos únicos que aparecieron dentro de las dos semanas. Después de que los focos se seleccionaron y expandieron, los subclones expandidos se analizaron funcionalmente para determinar la expresión del receptor  $\alpha$ -1 por la medición de la acumulación de  $Ca^{+2}$  intracelular inducida por fenilefrina. La densidad del receptor se midió en un ensayo de unión del radioligando de prazosina.

20 Las respuestas de  $Ca^{+2}$  intracelular se midieron de la siguiente manera en células HEK293 que expresan en forma estable el receptor adrenérgico  $\alpha$ -1A bovino o  $\alpha$ -1B de hámster. Se sembraron entre 40.000 a 50.000 células por pocillo en placas revestidas con poli-D-lisina de 96 pocillos en 0,2 ml de DMEM que contiene 10% de suero de carnero fetal inactivado por calor, 1% de antibiótico-antimicótico y 0,25  $\mu$ g/ml de puromicina un día antes de usar. Las células se lavaron dos veces con HBSS suplementado con 10 mM de HEPES, 2,0 mM de  $CaCl_2$  y 2,5 mM de probenidol, y posteriormente se incubaron a 37°C durante 60 minutos con 4  $\mu$ M de Fluo-4 (Molecular Probes; Eugene, Oregon). El colorante extracelular se lavó de las placas dos veces antes de colocar las placas en el lector de placas de visualización de imágenes fluorométrico (FLIPR; Molecular Devices; Sunnyvale, California): Los ligandos se diluyeron en HBSS y se alicuotaron en una microplaca de 96 pocillos. Los fármacos se analizaron en el intervalo de concentración de 0,64 nM a 10.000 nM. Los datos para las respuestas de  $Ca^{+2}$  se obtuvieron en unidades de fluorescencia arbitrarias.

Tabla 2

Selectividad funcional  $\alpha$ -2 versus  $\alpha$ -1 de agonistas  $\alpha$ -adrenérgico

Compuesto	$\alpha_{2A}$ humana		$\alpha_{2C}$ humana		$\alpha_{2A}$ bovina		$\alpha_{1B}$ hámster		$\alpha_{1A} / \alpha_{2A}$
	EC <sub>50</sub>	%E	EC <sub>50</sub>	%E	EC <sub>50</sub>	%E	EC <sub>50</sub>	%E	
Brimonidina	0,860±0,1	91	8±3	93	1132±281	15	943±247	12	1316
Dexmedetomidina	0,81±0,01	93	0,48±0,2	90	376±97	59	364±72	62	289
Clonidina	10±1	94	56±28	84	89±16	62	83±10	63	8,9
Tizanidina	86±35	93	123±137	85	264±37	63	322±31	61	3,1
Fenilefrina	306±19	94	340±131	87	9±1	110	10±1	110	0,03

El porcentaje de eficacia (%E) se determinó por la comparación del efecto máximo de cada agonista con el efecto máximo de un agonista total estándar (fenilefrina para receptores  $\alpha$ -1 y brimonidina para receptores  $\alpha$ -2). Los valores representan la media y SEM de 3-15 experimentos independientes. Las veces de selectividad de los agonistas para los receptores  $\alpha$ -2 con respecto a los receptores  $\alpha$ -1 se calculó a partir de la relación de sus EC<sub>50</sub> promedio para la activación de los receptores  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2.

35

La medición de cAMP intracelular se realizó de la siguiente manera. Las células PC12 que expresan en forma estable los receptores adrenérgicos  $\alpha$ -2A humano o  $\alpha$ -2C humano se sembraron en placas revestidas de poli-D-

## ES 2 376 878 T3

- lisina de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo en 100  $\mu$ l de DMEM suplementado con 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino fetal inactivado por calor, 1% de antibiótico-antimicótico y 100  $\mu$ g/ml de puromicina. Las células se cultivaron toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se dosificaron por la adición de un volumen igual de medio que contiene IBMX (a una concentración final de 1 mM), forskolina (a una concentración final de 10  $\mu$ M) y la dilución del fármaco apropiada (a una concentración final de entre 10<sup>-5</sup> M y 10<sup>-12</sup> M). Después de 10 minutos de incubación, se aspiró el medio y las células se lisaron con 200  $\mu$ l de tampón de lisis (Amersham Biosciences; Piscataway, New Jersey). Las placas se almacenaron a -20°C durante hasta 24 horas antes del ensayo. El AMPc cíclico intracelular se determinó por medio del sistema de inmunoensayo Biotrak cAMP (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector de placa a 450 nm.
- 5
- 10 Se generaron curvas de respuesta a la dosis para los ensayos in vitro por medio de KaleidaGraph (Synergy Software; Reading, PA) con ajustes de cuadrados mínimos para la ecuación, respuesta = respuesta máxima + ((respuesta mínima - respuesta máxima) / (1 + (concentración de ligando / EC<sub>50</sub>))). Se determinó el porcentaje de eficacia por la comparación del efecto máximo del compuesto con el efecto de un agonista total estándar, que fue fenilefrina para los receptores  $\alpha$ -1 y brimonidina para los receptores  $\alpha$ -2.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Brimonidina o una sal, tautómero, solvato, amida o N-óxido farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en la prevención o reducción de la severidad de hipersensibilidad sensorial asociada con una migraña por administración sistémica del compuesto.
- 5 2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el compuesto se administra por vía oral.
3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el compuesto se administra en forma tópica.
4. Un compuesto para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el compuesto se administra por medio de un parche.
- 10 5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.

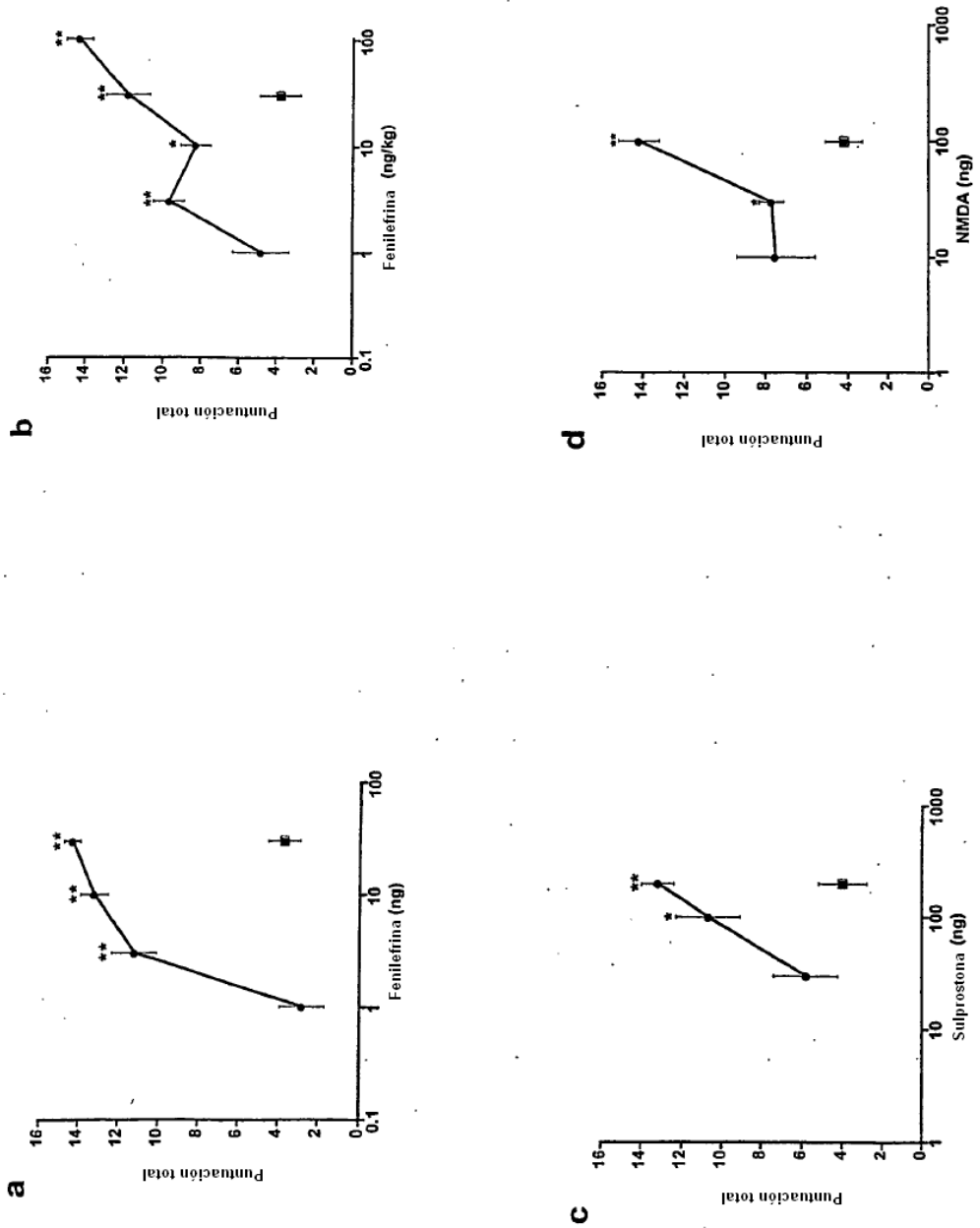


FIGURA 1

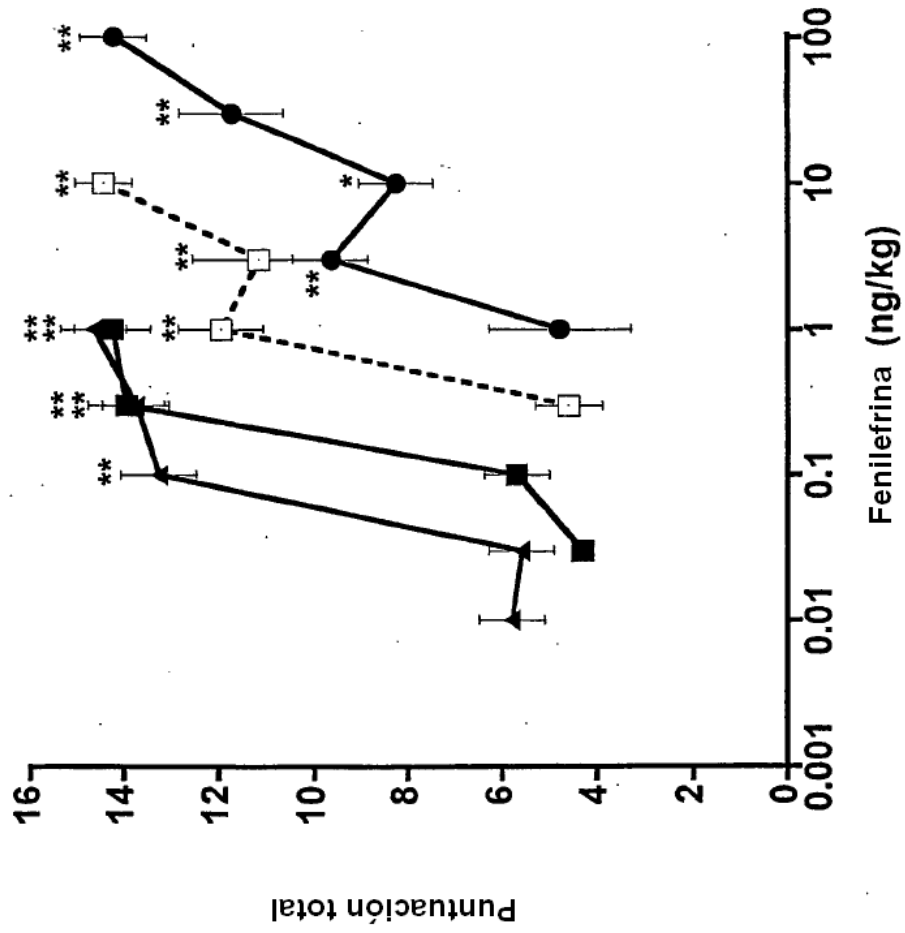


FIGURA 2



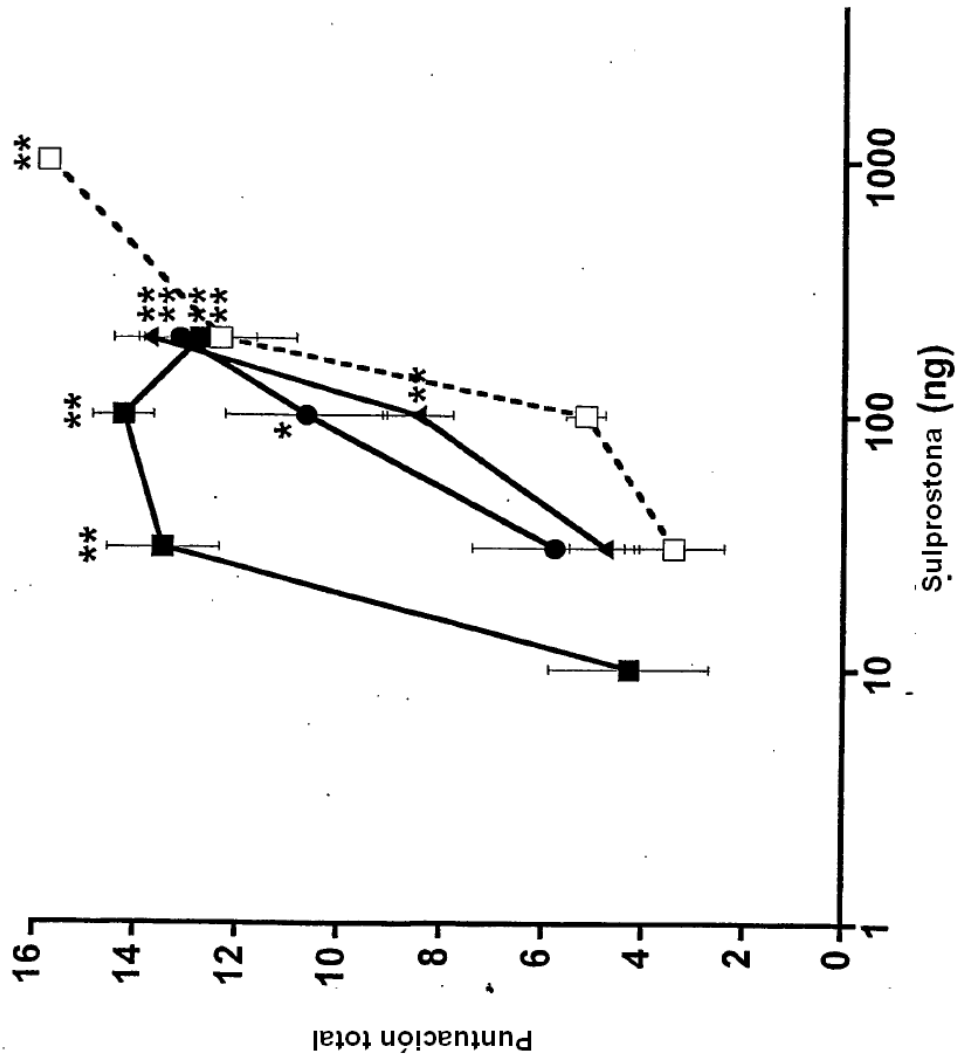


FIGURA 3

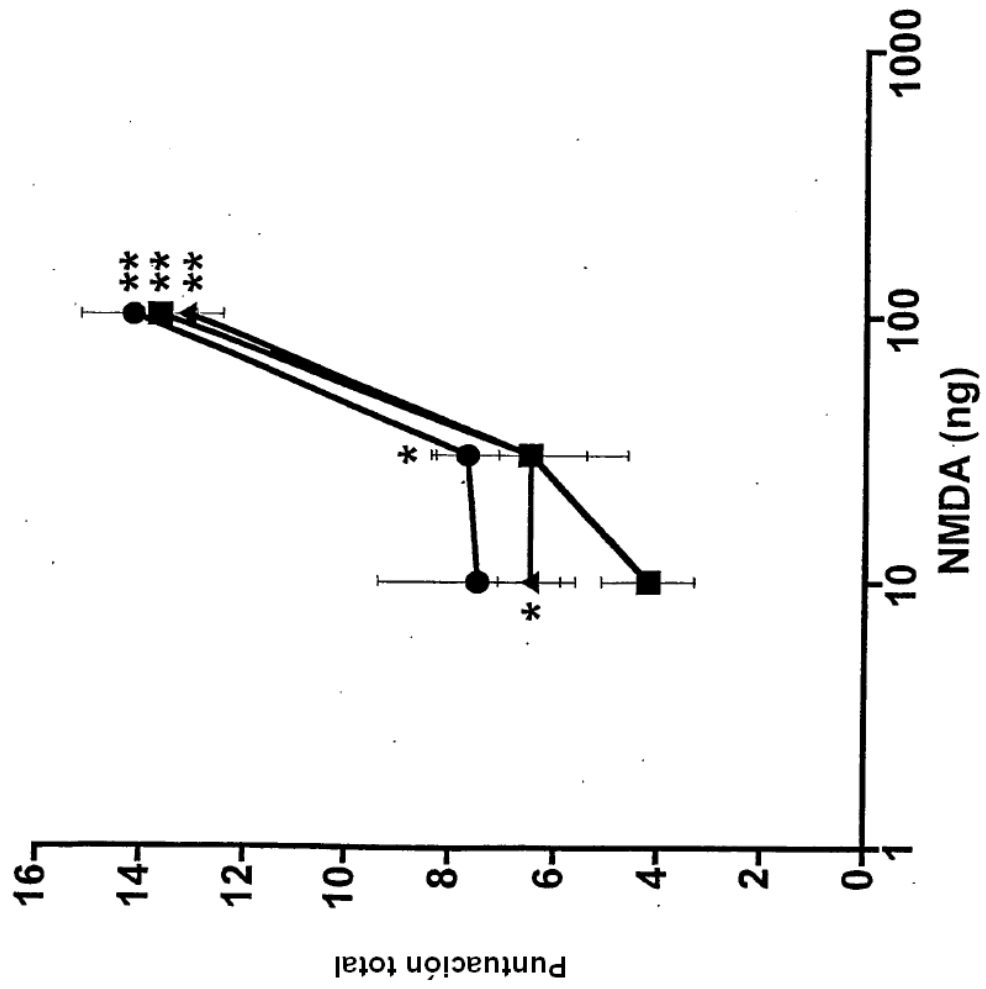


FIGURA 4

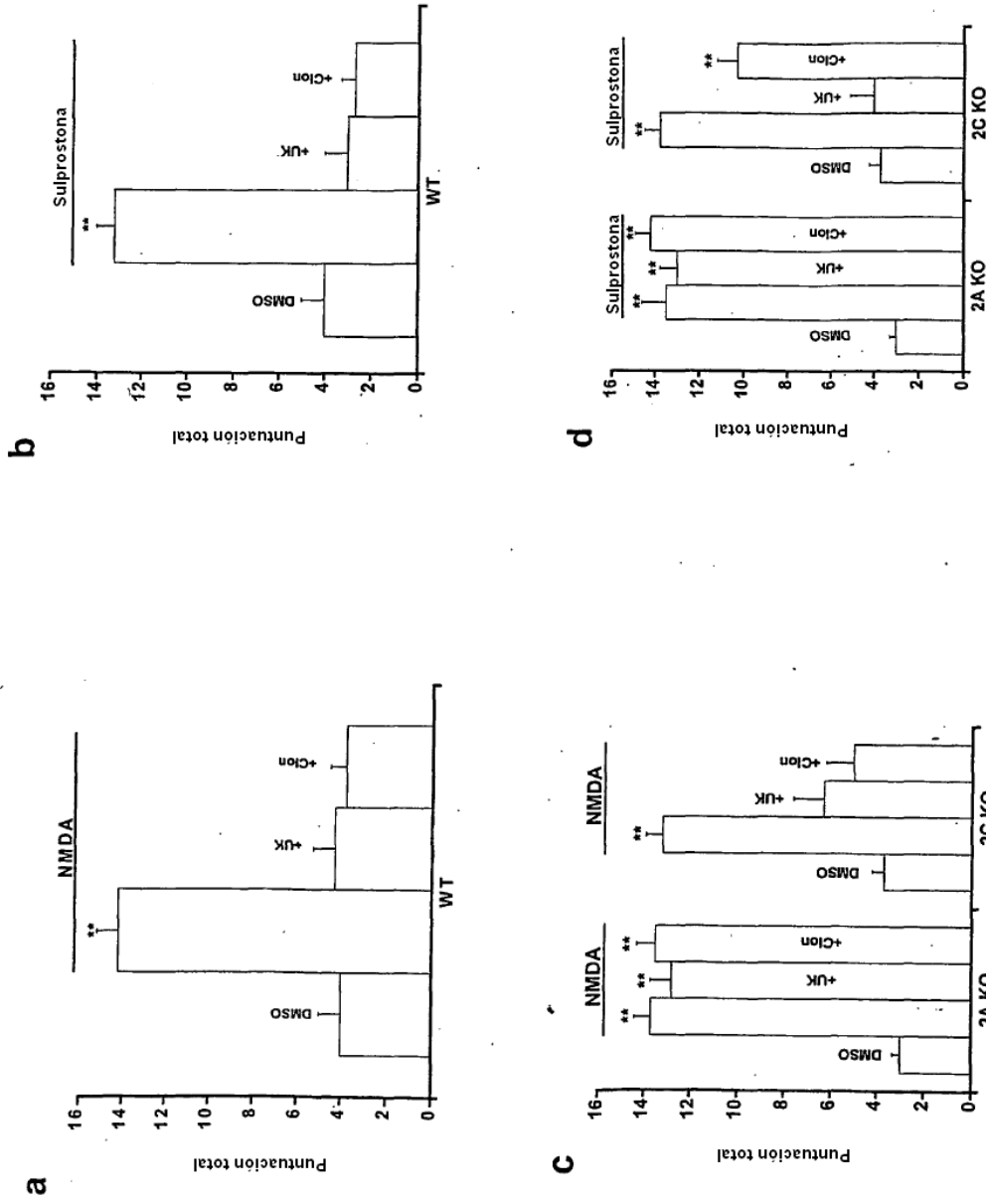


FIGURA 5

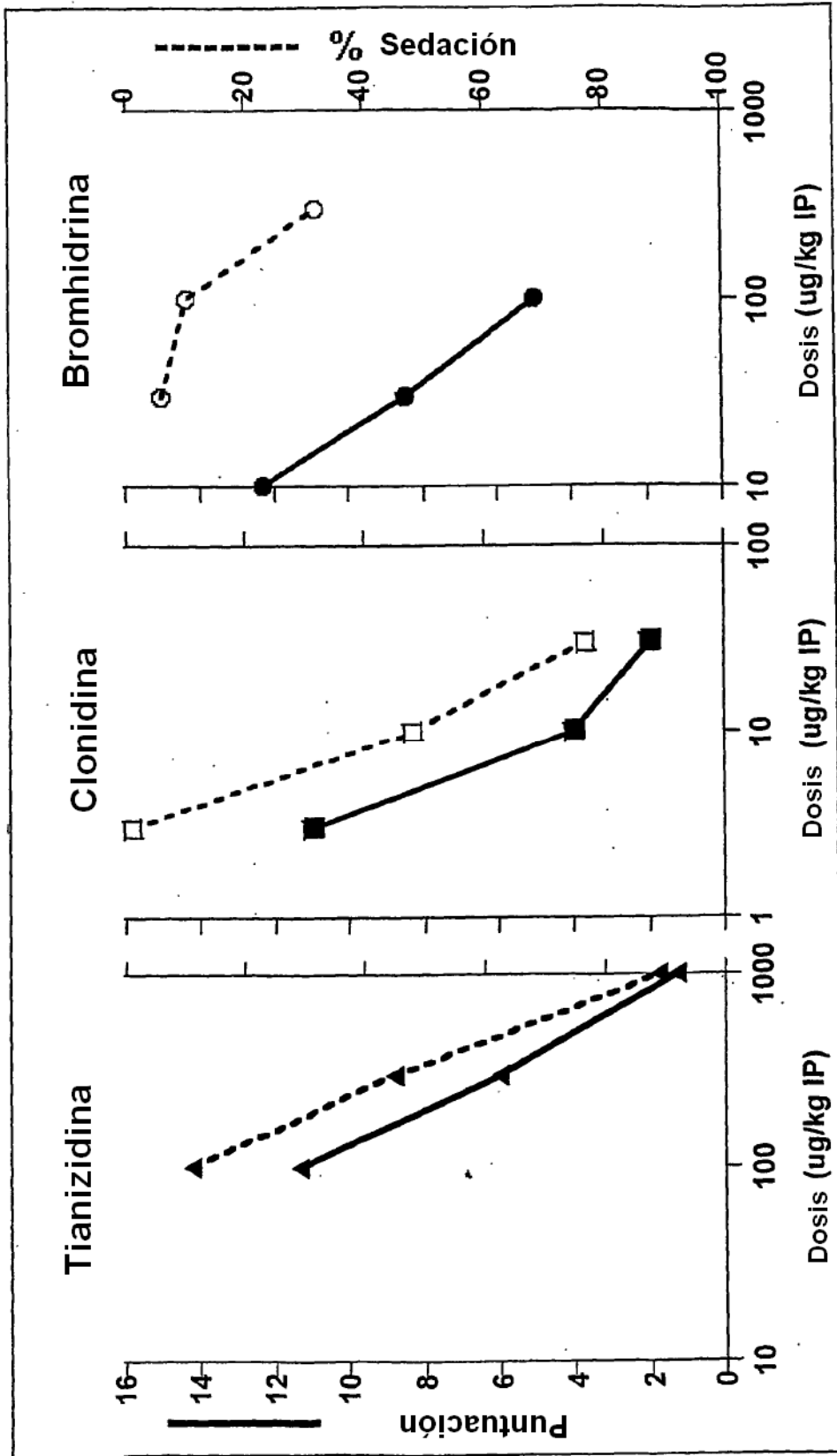


FIGURA 6

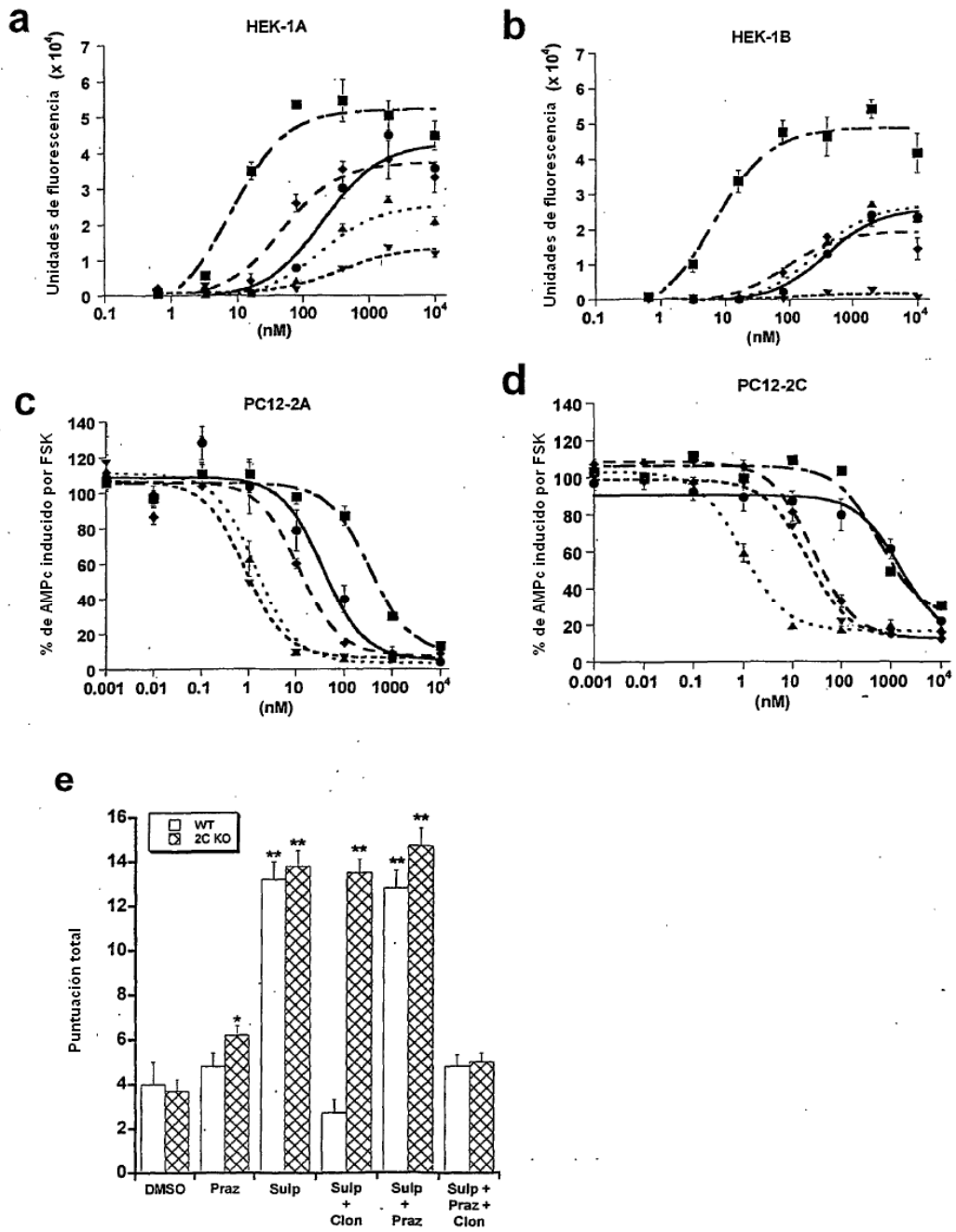


FIGURA 7