



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 377 785**

21 Número de solicitud: 201031341

51 Int. Cl.:
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **08.09.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.04.2012

71 Solicitante/s:
Universidad Miguel Hernández de Elche
Avda. de la Universidad, s/n
03202 Elche, Alicante, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

72 Inventor/es: **Belmonte Martínez, Carlos;**
Gallar Martínez, Juana;
Ferrer Montiel, Antonio;
Fernández Carvajal, Asia y
Viana de la Iglesia, Félix

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco.**

57 Resumen:
Composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco.
La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento del ojo seco y, más concretamente, con composiciones que comprenden un ligando agonista del receptor TRPM8.

ES 2 377 785 A1

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco.

5 Campo técnico de la invención

La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento del ojo seco y, más concretamente, con composiciones que comprenden un ligando agonista del receptor TRPM8.

10 Antecedentes de la invención

El grado de humedad de la superficie ocular y de las mucosas externas se mantiene estable gracias a la producción continua de fluido acuoso por glándulas exocrinas. La interrupción de este proceso determina el desarrollo síndromes de sequedad ocular, bucal y vaginal, que son altamente prevalentes, especialmente en ancianos (Moss, S. E., *et al.* 2008. *Optom. Vis. Sci.* 85:668-674; Barker, K. E. & Savage, N. W. 2005. *Aust. Dent. J.* 50:220-223; Leiblum, S. R., *et al.* 2009. *J. Sex Med* 6:2425-2433). En el ojo, el flujo lagrimal producido en ausencia de factores emocionales o de estímulos irritantes exógenos (secreción lagrimal "basal") está ajustado a las condiciones ambientales y a la frecuencia de parpadeo (Dartt, D. A. 2009. *Prog. Retin. Eye Res.* 28:155-177). La lagrimación también aumenta de manera significativa tras la irritación de la superficie ocular (Acosta, M. C. *et al.* 2004. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 45:2333-2336). Los estímulos irritantes son detectados por las terminaciones nerviosas mecano-nociceptoras y polimodales del trigémino, que son sensibles a fuerzas de intensidad lesiva, al calor nocivo y a irritantes químicos, evocando dolor (Belmonte, C., *et al.* 2004. *Exp. Eye Res.* 78:513-525) y lagrimación refleja. Sin embargo, no se conocen las estructuras neurales responsables de la detección del grado de sequedad ocular implicadas en la regulación de la tasa de lagrimación basal.

Respecto al síndrome de sequedad ocular o xeroftalmía, ésta es una enfermedad de los ojos caracterizada por la sequedad persistente de la conjuntiva y opacidad de la córnea.

Existen múltiples causas que pueden producir la xeroftalmía, siendo más frecuente en personas con edad. Entre las enfermedades que producen xeroftalmía encontramos: deficiencia de vitamina A, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, quemaduras químicas o térmicas y fármacos como atenolol, clorfeniramina, hidroclorotiazida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacina, oxibutinina, tolterodina.

Los tratamientos utilizados para tratar la xeroftalmía incluyen corticoides que pueden ser eficaces en fases iniciales de la enfermedad, suplementos de vitamina A y la pilocarpina que es un fármaco que aumenta la producción lacrimal. Entre los preparados que mejoran la sequedad (lágrimas artificiales) se utilizan las soluciones de hipromelosa y los geles de carbómero que se aplican sobre la conjuntiva. Sin embargo, estos tratamientos tienen claras limitaciones respecto a su eficacia y toxicidad. Por lo tanto existe la necesidad de proporcionar nuevos tratamientos mejorados para el tratamiento de la xeroftalmía la sequedad vaginal y el síndrome de boca seca.

Sumario de la invención

En un primer aspecto la invención se relaciona con el uso de un agonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende al menos un agonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente, y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras de la invención

Figura 1. *Características de la respuesta de las terminaciones nerviosas sensibles al frío de la córnea del ratón.*
 a. Actividad de impulsos nerviosos (NTI) en respuesta a pulsos de enfriamiento y calentamiento, y al mentol. Los trazados, de arriba abajo, representan: Frecuencia media de disparo (Mean freq., en Hz), frecuencia instantánea (Inst. Freq., en Hz), registro directo de la actividad eléctrica (Imp. ampl., en μV), temperatura de la solución de perfusión (Temp., en $^{\circ}\text{C}$). b. Frecuencia promedio de disparo (Mean freq., en impulsos/s) de 55 terminaciones corneales sensibles al frío en respuesta a una rampa de enfriamiento. Los datos son la media \pm el error estándar, c. Distribución de los umbrales de frío (representado como el cambio desde la temperatura basal, $-\Delta\text{T}$, en $^{\circ}\text{C}$) de 55 terminales termosensibles. d. Cambio de la frecuencia de disparo con la temperatura, determinado en las mismas 55 terminales sensibles al frío. Para cada terminal se ha representado el cambio de frecuencia (Mean freq., en impulsos/s) entre la temperatura umbral y aquella a la que se alcanza la frecuencia pico. La línea gruesa representa el valor medio de las 55 pendientes individuales, e. Actividad eléctrica de una terminación nerviosa sensible al frío en respuesta al enfriamiento escalonado. Los trazados muestras la frecuencia media de disparo (Mean freq., Hz), la frecuencia instantánea (Inst. Freq., Hz), el número de impulsos por ráfaga de potenciales de acción (Impulses/Bursa) y la temperatura de la solución

de perfusión (Temp., °C). f. Frecuencia media de disparo (Mean frequency, en impulsos/s) de 10 terminales termosensibles durante el enfriamiento escalonado. Se observó un aumento significativo de la frecuencia media de disparo tanto durante la fase dinámica (30 s iniciales de cada escalón de temperatura) como durante la fase estática (últimos 30 s del escalón) del estímulo, siendo en ambos casos proporcional a la disminución de la temperatura (Respuesta dinámica: Coeficiente de correlación de Pearson = -0.98, $p=0.002$; Respuesta estática: Coeficiente de correlación de Pearson = -0.96, $p=0.014$).

Figura 2. *Inmunohistoquímica de las fibras nerviosas corneales del ratón TRPM8-EYFP*. a, b, y c son ejemplos de filetes nerviosos entrando en la córnea periférica para formar el plexo estromal. En a, todas las fibras nerviosas sensoriales del filete nervioso se han teñido con un anticuerpo contra la beta-tubulina clase III específica de neuronas (Tuj-1), mientras que en b sólo se han teñido aquellas fibras del filete nervioso que reaccionaron frente al anticuerpo contra la proteína verde fluorescente (GFP). c muestra una doble tinción de inmunofluorescencia de los nervios estromales, con anticuerpos contra Tuj-1 (panel superior) y contra GFP (panel intermedio), así como la imagen superpuesta (panel inferior), mostrando la reducida proporción de fibras sensibles al frío de entre la población general de fibras sensoriales corneales, d, e y f muestran la arquitectura característica de las fibras nerviosas que discurren bajo la capa basal del epitelio corneal (plexo subbasal), donde aparecen como fibras arrosariadas rectas y más o menos paralelas (fibras en pincel) que trascurren desde la córnea periférica hacia el centro durante largas distancias. En d, aparecen teñidas todas las fibras del plexo subbasal (positivas para Tuj-1), mientras que en e, sólo se han teñido las positivas para GFP. En f se muestra una doble tinción contra Tuj-1 (gris) y GFP (blanco) para ilustrar la escasez de axones presumiblemente positivos para TRPM8. g y h muestran a mayor aumento las áreas enmarcadas en d y e, respectivamente, mostrando en más detalle la morfología de las fibras arrosariadas subbasales, así como sus ramificaciones que ascienden perpendicularmente desde las capas basales del epitelio corneal hacia las más superficiales, presentando ocasionalmente terminaciones nerviosas en la capa subbasal. Para mostrar el aspecto de las terminaciones nerviosas intraepiteliales, en i (todas las terminaciones nerviosas epiteliales, Tuj-1 positivas) y j (supuestas terminales nerviosas sensibles al frío, positivas para GFP) se muestran las mismas zonas de g y h, pero enfocando en un plano más superficial. La diferente morfología y el bajo grado de ramificación de las terminales presumiblemente positivas para TRPM8 se muestran también en k, utilizando microscopía vertical de fluorescencia. En l se muestra un barrido de focos compilados en una sola imagen para ilustrar la trayectoria de los axones en su recorrido desde el estroma hasta la superficie corneal, donde finalmente originan racimos de terminaciones relativamente agrupadas (cuadrado enmarcado, que corresponde a la zona mostrada en k). En la zona superior derecha de la figura se muestra un dibujo para mostrar esquemáticamente la localización de los nervios sensoriales en las distintas zonas de la córnea, y su correspondencia con los diferentes paneles que conforman la figura. A-C corresponde al tercio anterior del estroma, donde se ubican los troncos nerviosos estromales, D-H representan las fibras del plexo subbasal, e I-K, las terminaciones nerviosas entre las capas más superficiales del epitelio corneal. Las escalas representan 70 μm (a-c), 150 μm (d, e) o 40 μm (f-l).

Figura 3. *Respuesta a rampas de frío de las terminaciones nerviosas termosensibles corneales registradas en ratones TRPM8(-/-), TRPM8(+/-) y TRPA1(-/-), y en ratones silvestres*. a. Frecuencia media de disparo (en impulsos/s, panel superior) durante una rampa de enfriamiento (panel inferior) registrada en 143 terminaciones nerviosas de ratones TRPM8(-/-) (línea delgada), 11 terminales de TRPM8(+/-) (línea discontinua) y 12 terminales de ratones silvestres de las mismas carnadas (línea continua), prefundidos con solución control (izquierda) y en presencia de mentol 50 μM (derecha), b. Frecuencia media de disparo de 11 terminaciones termosensibles registradas en córneas de ratones TRPA1(-/-) (línea delgada) y en 13 terminaciones de córneas de ratones silvestres de las mismas carnadas (línea gruesa), durante una rampa de enfriamiento (panel inferior). Los datos son media \pm error estándar.

Figura 4. *Variación de la tasa de secreción lagrimal con la temperatura corneal*. a. Tasa basal de lagrimación, expresada como la longitud media de hilo de rojo fenol humedecido durante 2 minutos, medido en los ojos de ratones anestesiados expuestos a una temperatura ambiente de 24.8 \pm 0.9°C y 42.5 \pm 0.4°C, con una humedad ambiental del 63.7 \pm 0.4% y del 38.2 \pm 1.4%, respectivamente, que modificaron la temperatura corneal hasta los valores indicados en la figura. Las columnas llenas y las sombreadas representan, respectivamente, la tasa de lagrimación en los animales expuestos a una temperatura ambiente neutra (24.8°C) o caliente (42.5°C). El número de medidas de las sucesivas columnas es 35, 11, 23, 9 y 6 observaciones. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, test de Mann-Whitney). b. Aumento de la tasa de lagrimación medido en animales silvestres (columnas negras) y TRPM8(-/-) (columnas grises), en respuesta a la aplicación durante 30 s de un papel de filtro empapado en capsaicina 1 μM (n=12 y 15) ó alil-isotiocianato 500 μM (AITC; n=10 y 6). La primera columna muestra la respuesta a la aplicación del vehículo (DMSO al 0.5% en salino) en animales silvestres (n=6). Las medidas de la secreción lagrimal se realizaron 1 minutos después de retirar el papel con la droga. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores basales de lagrimación, empleando el test de Wilcoxon (* $p<0.05$, *** $p<0.001$). c. Tasa media de lagrimación, expresada como la longitud de hilo de rojo fenol humedecido durante 15 s, medida en los ojos de voluntarios de ambos sexos a temperaturas ambientes de 18°C, 25°C y 43°C, que produjeron una temperatura corneal de 32.4 \pm 0.4°C, 34.2 \pm 0.1°C y 36.0 \pm 0.2°C, respectivamente (** $p<0.01$, ANOVA para medidas repetidas).

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto que, de forma sorprendente, el receptor TRPM8 está implicado en el control de la lagrimación y que su activación usando agonistas del mismo resulta en un aumento de la lagrimación. En concreto, los inventores de la presente invención han descrito que temorreceptores de frío

ES 2 377 785 A1

que inervan la cornea en los mamíferos mantienen una actividad tónica de disparo a la temperatura corneal normal, y son exquisitamente sensibles a pequeñas variaciones térmicas de la superficie ocular, como las resultantes de la evaporación de la película lagrimal precorneal que se da en los intervalos entre parpadeos o durante la exposición a ambientes secos. Esta marcada sensibilidad al frío es consecuencia de la elevada expresión de canales TRPM8, que de manera crucial determinan una actividad espontánea basal y el aumento de la frecuencia de disparo en respuesta al enfriamiento. Así mismo, los inventores han observado que la eliminación con técnicas genéticas de los canales TRPM8 reduce a la mitad la secreción lagrimal en ratones. Su silenciamiento parcial por calentamiento de la cornea también reduce la secreción lagrimal en humanos.

Por tanto, TRPM8 es un candidato molecular para la detección de la humedad en las fibras nerviosas termorreceptoras de frío que inervan la superficie ocular expuesta en animales terrestres. Los datos mostrados en esta solicitud (véase ejemplo 1) indican que en las terminales corneales termosensibles, el TRPM8 es crítico para el desarrollo tanto de la actividad espontánea como de la evocada por el frío que resulta en la producción de lágrimas. De esta forma, la estimulación de TRPM8 aumenta la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío por medio de la activación de TRPM8.

Por tanto, la presente invención se relaciona con el tratamiento de la xerofltalmía, la sequedad vaginal y el síndrome de boca ardiente mediante el empleo de distintos agentes terapéuticos. Así mismo, los resultados obtenidos por los autores de la presente invención abren la puerta para el tratamiento de la lagrimación excesiva (epifora) mediante el empleo de distintos agentes que inhiben el receptor TRPM8.

Usos terapéuticos de los agonistas de TRPM8

Así, la presente invención se relaciona con el uso de un agonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos para producir un medicamento para el tratamiento o la prevención de la xerofltalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

El receptor TRPM8 o “Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8”, también conocido como el receptor de frío y mentol 1 (cold and menthol receptor 1 o CMR1), es una proteína que en humanos está codificada por el gen TRPM8. (Clapham DE, *et al.* 2005. *Pharmacological Reviews* 57 (4): 427-50).

TRPM8 es un canal iónico que tras ser activado permite la entrada de iones de sodio (Na⁺) y calcio (Ca²⁺) a la célula de manera que se genere una depolarización de la misma que lleva a la generación de un cambio en el potencial de membrana.

La proteína TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales y es activada por temperaturas frías (por debajo de aproximadamente 26°C), por agentes químicos como el mentol y por voltaje. TRPM8 también se expresa en la próstata, los pulmones, la vejiga sin que su función en estos órganos sea conocida.

El gen humano de TRPM8 está localizado en el cromosoma 2 en la región 2p37.1; y codifica por una proteína de 1104 aminoácidos (NP_076985.4, SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de nucleótidos NM_024080.4 (SEQ IS NO: 2). El gen TRPM8 presenta seis segmentos trans-membrana estando los términos C y N terminal en el lado citoplasmático. Cuatro subunidades tetramerizan para formar canales activos.

El término “TRPM8” tal y como se usa en esa descripción no se refiere únicamente al gen y a la proteína humanos sino también a los ortólogos de otras especies, como por ejemplo, perro (XP_543296.2), ratón (NP_599013.1), rata (NP_599198.2), etc.

El término “tratar” o “tratamiento” designa tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o frenar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como la sequedad en los ojos, la vagina o en la boca. Para el fin de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, alivio de síntomas, reducción de la extensión de la enfermedad, estado patológico estabilizado (concretamente no empeorado), retardo o freno de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como no detectable. Aquellos sujetos que necesitan de tratamiento incluyen aquellos sujetos que sufren ya la afección o trastorno, así como aquellos con tendencia a sufrir la afección o trastorno o aquellos en los que ha de prevenirse la afección o trastorno.

Como “método de tratamiento” se entiende la administración a un individuo en necesidad de dicho tratamiento, de una composición farmacéutica que comprende un agonista de TRPM8 según la invención.

Por “xerofltalmía o síndrome de ojos secos” se entiende en la presente invención a la enfermedad caracterizada por la sequedad persistente de la conjuntiva y opacidad de la córnea. Existen múltiples causas que pueden producir la xerofltalmía, siendo más frecuente en personas con edad. Entre las causas y enfermedades que producen xerofltalmía encontramos: deficiencia de vitamina A, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, quemaduras químicas o térmicas, fármacos como atenolol, clorfeniramina, hidroclorotiazida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacina, oxibutinina, tolterodina.

Así, en una realización particular, la xeroftalmía está asociada a deficiencia de vitamina A, al síndrome de Sjögren, a la artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, a quemaduras químicas o térmicas o a fármacos como atenolol, clorfeniramina, hidroclorotiazida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacina, oxibutinina, tolterodina.

5 Por “sequedad vaginal” se entiende a la disminución en la cantidad de fluidos producidos en la vagina. Esta sequedad puede provocar malestar, como picores, irritación y sensación de quemazón en la zona genital, además de dolor en las relaciones sexuales. Esta falta de lubricación puede estar motivada por causas orgánicas o por causas psíquicas. Entre las causas orgánicas, la más habitual es la insuficiente cantidad de estrógenos por ejemplo durante la menopausia. Otras causas que provocan sequedad vaginal son la vaginitis, que es la inflamación de los tejidos vaginales o la diabetes. En el caso de las mujeres con diabetes en las que la lubricación vaginal puede estar disminuida, particularmente en aquellas con un control deficiente de la glucosa sanguínea, esta pérdida de lubricación puede asociarse a dos complicaciones: la neuropatía, que puede disminuir la respuesta al estímulo sexual, y el daño a los vasos sanguíneos, que limita el flujo sanguíneo en la pared vaginal disminuyendo la cantidad de flujo lubricante.

15 Otro factor a considerar es el estrés, que provoca un aumento en la liberación de cortisol en la sangre, que a su vez produce un desequilibrio en las demás hormonas. También el tabaco interfiere en las funciones estrogénicas y por tanto puede disminuir la lubricación vaginal. Un efecto similar puede producirse por acción del alcohol y de la marihuana. Ciertos medicamentos hormonales, como las pastillas anticonceptivas o los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama, de ovario o de útero, pueden producir sequedad vaginal. Los antidepresivos tricíclicos, algunos antiulcerosos o ciertos antihipertensivos pueden tener como efecto secundario la disminución de la secreción vaginal. Otros medicamentos que también pueden ser causantes de este problema son los antihistamínicos.

25 Así, en una realización particular, la sequedad vaginal está asociada a insuficiente cantidad de estrógenos, a diabetes, al estrés o al consumo de alcohol, marihuana o fármacos como fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama, de ovario o de útero, pueden producir sequedad vaginal. Los antidepresivos tricíclicos, antiulcerosos, antihipertensivos o antihistamínicos.

30 Por “síndrome de boca ardiente” en la presente invención se entiende la enfermedad denominada estomatodinia. Esta enfermedad es debida a múltiples causas. El consumo inadecuados de ciertas verduras o carne que aportan hierro, ácido fólico o vitamina B12, pueden contribuir a anemias carenciales que contribuyan a este síndrome de boca ardiente. Así mismo, algunas enfermedades endocrinas, como el hipotiroidismo o la diabetes, o digestivas, como el reflujo gastroesofágico, también contribuyen.

35 Otro aspecto que influye en la aparición de esta enfermedad es el consumo crónico de ciertos fármacos tales como betabloqueantes, antihipertensivos y antidiabéticos.

En una realización particular preferida, la enfermedad es la xeroftalmía.

40 En la presente invención se entiende por “agonista del receptor TRPM8” a cualquier molécula que se une específicamente al receptor TRPM8 y que al unirse es capaz de causar un aumento de la actividad del canal TRPM8, es decir que aumente el flujo de sodio y calcio a través del canal causando una despolarización de la célula. Estos agonistas aumentan la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío. Existe una amplia variedad de ensayos disponibles para detectar la actividad de agonistas del receptor TRPM8, tales como los experimentos de electrofisiológicos de Patch-clamp de célula entera citados en los ejemplos de la presente invención (véase Ejemplo 1), los métodos de microscopía de calcio (Bodding *et al.*, 2007, Cell Calcium, 42, 618-628) y los métodos basados en la detección de fluorescencia en placa “fluorometric imaging plate reader assay” (Behrendt *et al.*, 2004. J. Pharmacol. 141, 737-745), entre otros.

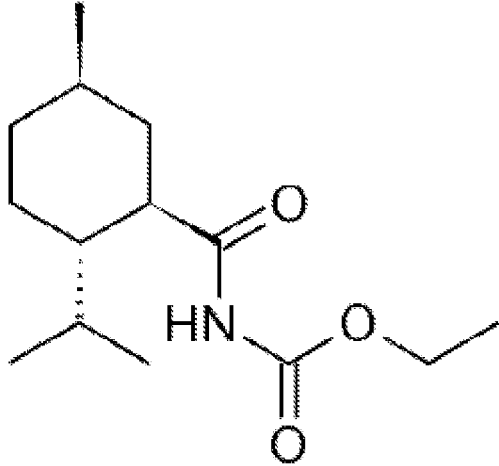
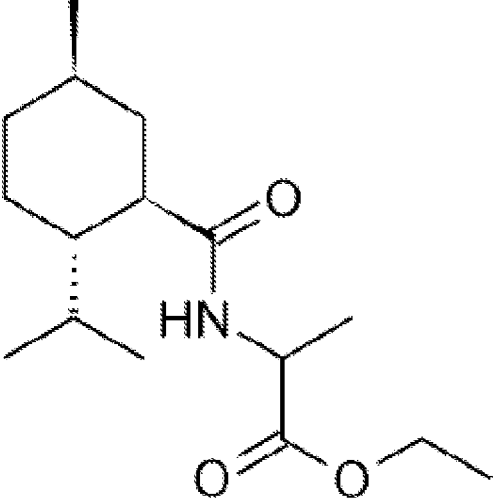
50 Ejemplos de agonistas del receptor TRPM8 adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, las moléculas descritas en la Tabla 1.

55

60

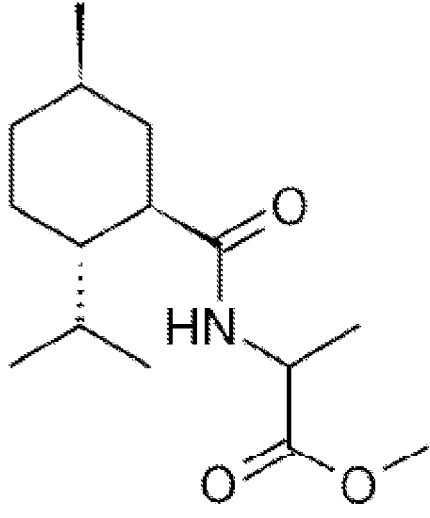
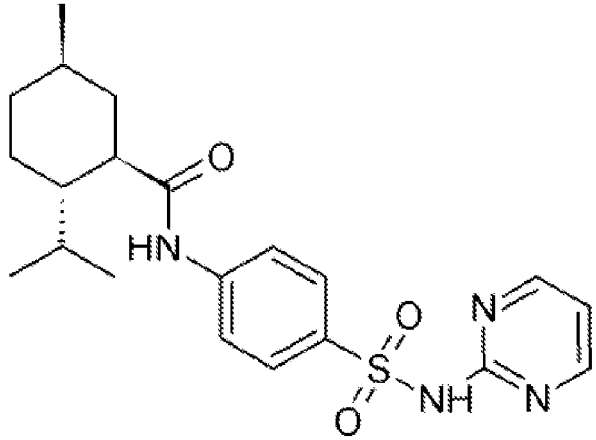
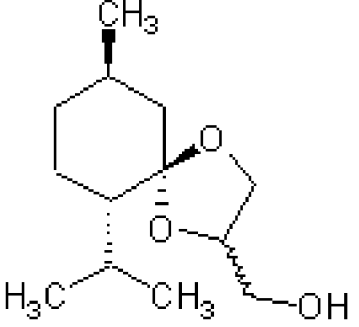
65

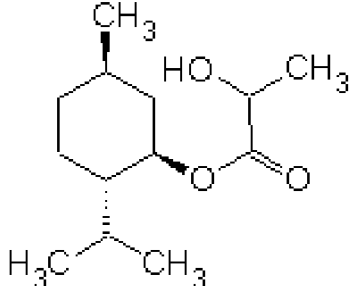
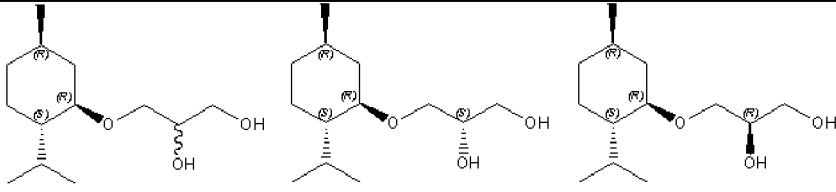
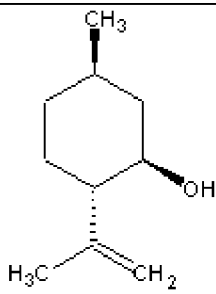
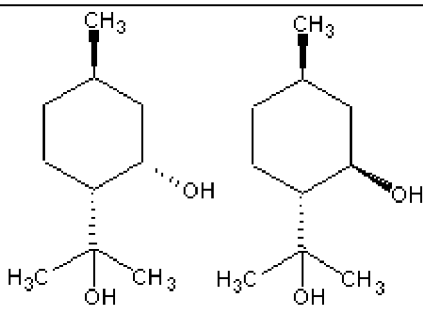
TABLA 1
Agonistas de TRPM8

Agonista	Número
<p data-bbox="95 344 124 367">5</p> <p data-bbox="95 479 124 501">10</p> <p data-bbox="95 613 124 636">15</p> <p data-bbox="95 748 124 770">20</p> <p data-bbox="95 882 124 904">25</p> <p data-bbox="95 1016 124 1039">30</p>  <p data-bbox="628 981 708 1014">WS-5</p> <p data-bbox="443 1037 893 1070">Etil 3-(p-mentane-3-carboxamido)</p>	<p data-bbox="1219 734 1235 757">1</p>
<p data-bbox="95 1160 124 1182">35</p> <p data-bbox="95 1294 124 1317">40</p> <p data-bbox="95 1429 124 1451">45</p> <p data-bbox="95 1563 124 1585">50</p> <p data-bbox="95 1697 124 1720">55</p>  <p data-bbox="612 1738 724 1771">CPS369</p>	<p data-bbox="1219 1435 1235 1458">2</p>

60

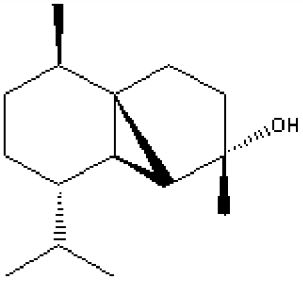
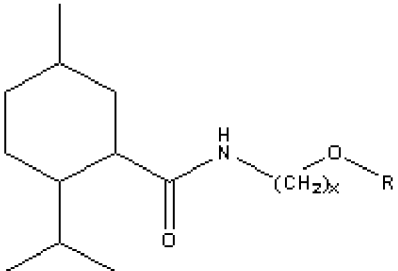
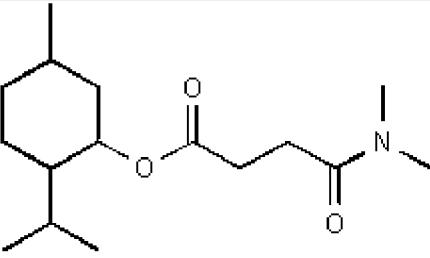
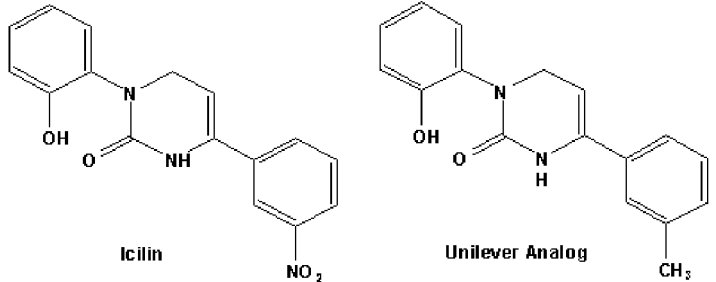
65

Agonista	Número
<p data-bbox="135 342 167 376">5</p> <p data-bbox="135 477 167 510">10</p> <p data-bbox="135 611 167 645">15</p> <p data-bbox="135 745 167 779">20</p> <p data-bbox="135 880 167 913">25</p>  <p data-bbox="651 857 762 891">CPS368</p>	<p data-bbox="1257 577 1289 611">3</p>
<p data-bbox="135 1014 167 1048">30</p> <p data-bbox="135 1149 167 1182">35</p> <p data-bbox="135 1283 167 1317">40</p> <p data-bbox="135 1417 167 1451">45</p>  <p data-bbox="651 1417 762 1451">CPS125</p>	<p data-bbox="1257 1171 1289 1205">4</p>
<p data-bbox="135 1552 167 1585">50</p> <p data-bbox="135 1686 167 1720">55</p> <p data-bbox="135 1821 167 1854">60</p>  <p data-bbox="523 1832 885 1865">Frescolat MGA - 2 Isomero</p>	<p data-bbox="1257 1653 1289 1686">5</p>

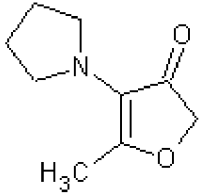
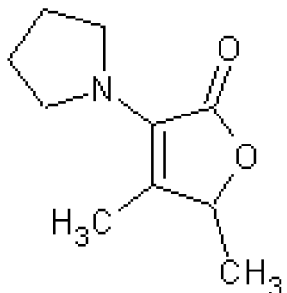
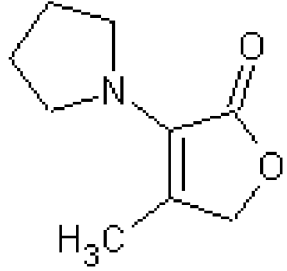
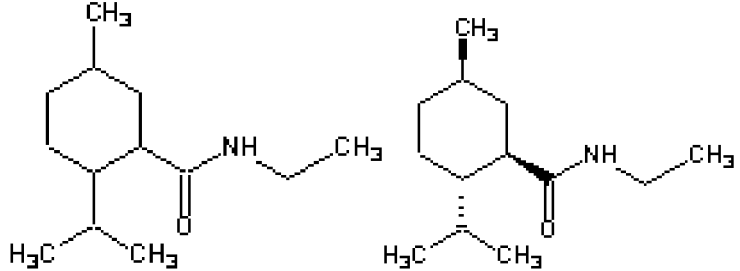
	Número
<p>5</p>  <p>10</p> <p>15</p> <p>Frescolat ML</p>	<p>6</p>
<p>20</p>  <p>25</p> <p>Coolant Agent 10 2S Isomer 2R Isomer</p>	<p>7</p>
<p>30</p>  <p>35</p> <p>40</p> <p>(-)-Isopulegol (Coolact P®)</p>	<p>8</p>
<p>45</p>  <p>50</p> <p>55</p> <p>(+)-cis & (-)-trans p-Mentane-3,8-diol Ratio ~ 62:38 (Coolact 38D®)</p>	<p>9</p>

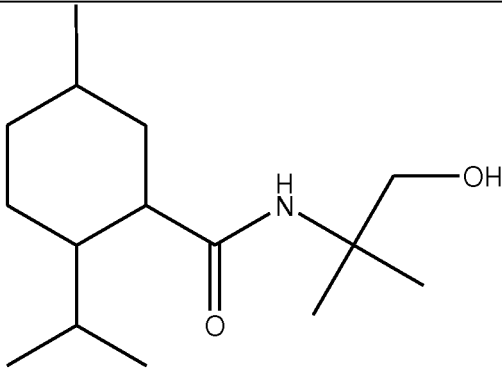
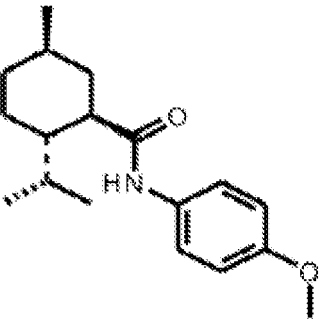
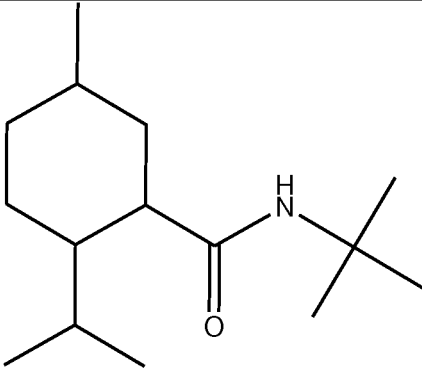
60

65

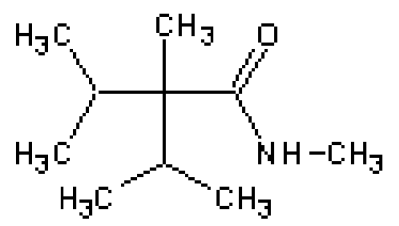
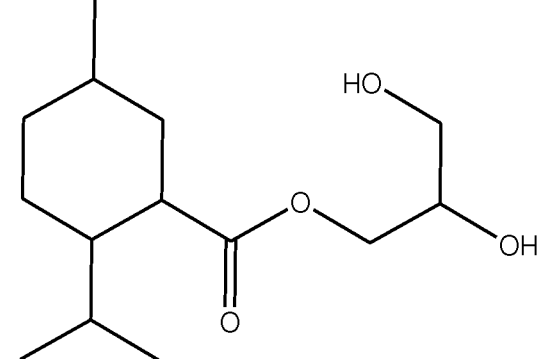
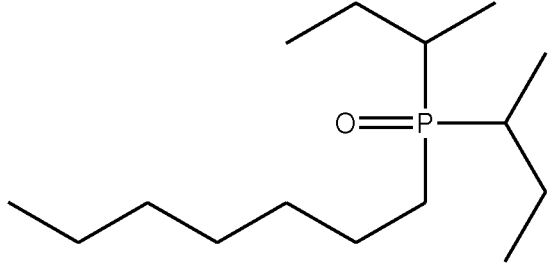
Agonista	Número
<p>5</p>  <p>10</p> <p>15</p> <p>(-)-Cubebol</p>	<p>10</p>
<p>20</p>  <p>25</p> <p>30</p> <p>“Hasegawa's Cooling Compound”</p>	<p>11</p>
<p>35</p>  <p>40</p> <p>45</p> <p>“IFF's New GRAS Cooling Material”</p>	<p>12</p>
<p>50</p>  <p>55</p> <p>Icilin</p> <p>NO₂</p> <p>Unilever Analog</p> <p>CH₃</p> <p>60</p> <p>Icilina</p> <p>AG-3-5, [1-[2-hidroxifenil]-4-[2-nitrofenil-]-1,2,3,6-tetrahidropirimidine-2-ona]</p> <p>65</p>	<p>13</p>

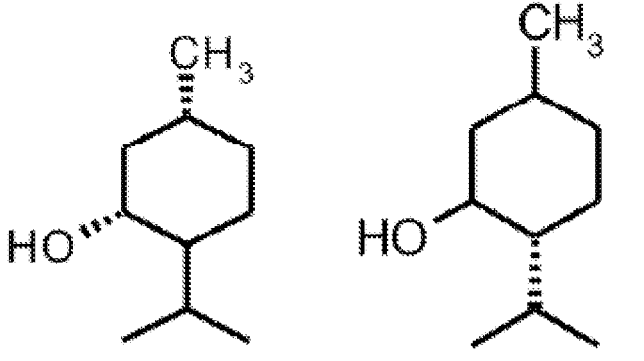
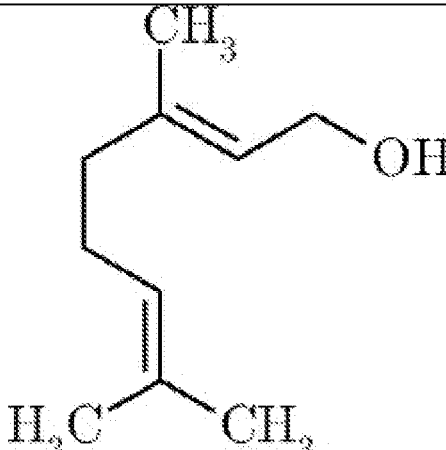
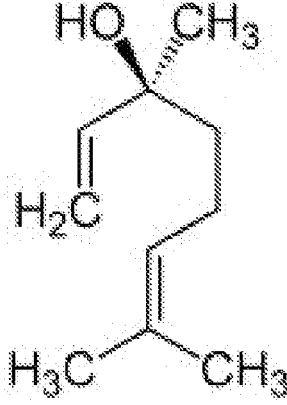
ES 2 377 785 A1

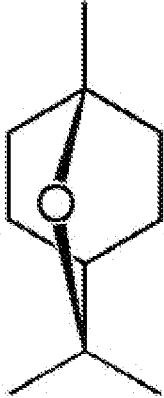
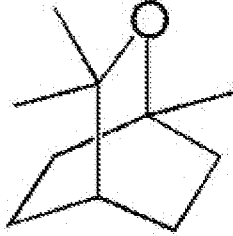
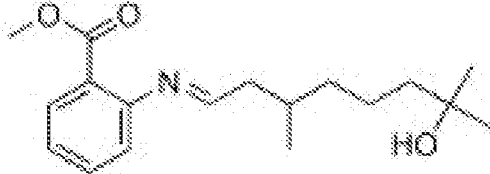
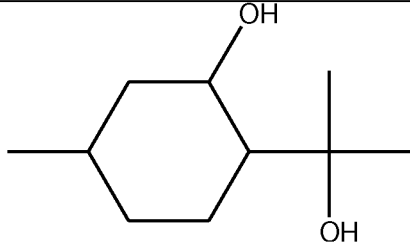
Agonista	Número
<p>5</p>  <p>10</p> <p>5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3-[2H]-furanona</p>	<p>14</p>
<p>15</p>  <p>20</p> <p>“Faintly mint-like”</p> <p>25</p> <p>4,5-dimetil-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona</p>	<p>15</p>
<p>35</p>  <p>40</p> <p>4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona</p>	<p>16</p>
<p>50</p>  <p>55</p> <p>WS-3</p> <p>1R,3R,4S-WS-3</p> <p>60</p> <p>N-etil-p-mentane-3-carboxamida</p>	<p>17</p>

Agonista	Número
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p>  <p>WS-11</p> <p>acido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxilico (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-Amida</p>	18
<p>25</p> <p>30</p> <p>35</p> <p>40</p>  <p>WS-12</p> <p>acido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxilico (4-methoxiphenil)-amida</p>	19
<p>45</p> <p>50</p> <p>55</p> <p>60</p>  <p>WS-14</p> <p>acido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxilico tert-butilamida</p>	20

65

Agonista	Número
<p>5</p> <p>10</p>  <p>15</p> <p>WS-23</p> <p>2-isopropil-N-2,3-trimetilbutiramida</p> <p>20</p>	<p>21</p>
<p>25</p>  <p>30</p> <p>35</p> <p>WS-30</p> <p>acid 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxilico ester 2,3-dihidroxi-propilo</p> <p>40</p>	<p>22</p>
<p>45</p>  <p>50</p> <p>55</p> <p>WS-148</p> <p>1-(di-sec-butil-fosfinoil)-heptano</p> <p>60</p>	<p>23</p>

Agonista	Número
<p data-bbox="135 347 167 369">5</p>  <p data-bbox="399 716 606 761">- Menthol</p> <p data-bbox="782 716 1005 761">+ Menthol</p>	<p data-bbox="1244 582 1284 616">24</p>
<p data-bbox="135 884 167 907">25</p>  <p data-bbox="638 1422 766 1467">Geraniol</p>	<p data-bbox="1244 1164 1284 1198">25</p>
<p data-bbox="135 1556 167 1579">50</p>  <p data-bbox="1244 1691 1284 1724">26</p>	<p data-bbox="135 1825 167 1848">60</p>

Agonista	Número
Linallol	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p style="text-align: center;">Eucaliptol</p>	27
 <p style="text-align: center;">Hidroxil-citronellal</p>	28
 <p style="text-align: center;">PMD-38 p-mentane-3,8-diol</p>	39
Anticuerpos agonistas específicos para TRPM8	30
Variantes constitutivamente activas de TRPM8	31

ES 2 377 785 A1

TABLA 2
Resumen de agonistas de TRPM8

Compuesto	EC ₅₀ (μM)	Método
Icilina	0.2 ± 0.1 ^a	FL
	1.4 ^b	CI
	0.50 ^c	EP
	0.36 ± 0.03 ^d	EP
Mentol	10.4 ^b	CI
	83.6 ± 0.04 ^c	EP
	66.7 ± 3.3 ^d	EP
WS-12	0.193 ^b	CI
	0.680 ^b	EP
	0.039 ^c	EP
WS-3	3.7 ± 1.7 ^a	FL
WS-148	4.1 ^b	CI
WS-30	5.6 ^b	CI
WS-11	6.25 ^c	EP
WS-14	21.19 ^c	EP
WS-23	44 ± 7.3 ^a	FL
CPS-113	1.2 ^b	CI
CPS-369	3.6 ^b	CI
Frescolat ML	3.3 ± 1.5 ^a	FL
Frescolat MGA	4.8 ± 1.1 ^a	FL
Cooling Agent 10	6 ± 2.2 ^a	FL
PMD-38	31 ± 1.1 ^a	FL
Geraniol	5900 ± 1600 ^a	FL
Linalool	6700 ± 2000 ^a	FL
Eucalyptol	7700 ± 2000 ^a	FL
	3400 ± 400 ^d	EP
Hydroxyl-citronellal	19600 ± 2200 ^a	FL

Tabla 2: Potencia en la activación de canales TRPM8 de diferentes agonistas químicos medidos usando microscopia de calcio (CI), “fluorometric imaging plate reader assay” (FL) o electrofisiología patch-clamp (EP). Datos obtenidos de: a (Behrendt et al., 2004. J.Pharmacol. 141, 737-745.); b (Bodding et al., 2007 Cell Calcium, 42, 618-628); c (Beck et al., 2007 Cell Calcium, 41, 285-294.); d (McKemy et al., 2002. Nature, 416, 52-58.).

ES 2 377 785 A1

En una realización particular, el agonista usado en el primer uso de la invención es un agonista seleccionado de WS-5(Etil 3-(p-mentane-3-carboxamido), CPS369, CPS368, CPS125, Frescolat MGA-2 Isómero, Coolant Agent 10, (-)-Isopulegol (Coolact P®), (+)-cis & (-)-trans p-Mentane-3,8-diol Ratio ~ 62:38 (Coolact 38D®), (-)-Cubebol, “Hasegawa’s Cooling Compound”, “IFF’s New GRAS Cooling Material”, Icilina, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3-[2H]-furanona, 4,5-dimetil-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona, 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona, N-etil-p-mentane-3-carboxamida, WS-11 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-Amida), WS-12 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (4-methoxyphenil)-amida), WS-14 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico tert-butilamida), WS-23 (2-isopropil-N-2,3-trimetilbutiramida), WS-30 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico ester 2,3-dihidroxi-propilo), WS-148 (1-(di-sec-butil-fosfinoil)-heptano), Mentol, Geraniol, Linallol, Eucaliptol, Hidroxil-citronellal, PMD-38 (p-mentane-3,8-diol), Anticuerpos agonistas específicos para TRPM8 y variantes constitutivamente activas de TRPM8, o combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el agonista usado en el primer uso de la invención es un agonista distinto al mentol o a un derivado del mismo. Así, en una realización preferida el agonista de TRPM8 se selecciona de icilina, AG3-5, WS-23, WS-148, hidroxil-citronellal, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3[2H]-furanona; 4,5-metil-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona y 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona.

En una realización más preferida, el agonista usado en el primer uso de la invención es un agonista específico para TRPM8 seleccionado de los compuestos 1 a 4 de la tabla I (WS-5, CPS369, CPS368, CPS125), compuesto 19 (WS-12, Becka B. 2007, Cell Calcium 41(3):285-294) y anticuerpos agonistas de TRPM8.

En otra realización preferida, el agonista se selecciona de aquellos que poseen un EC_{50} menor de 7 (véase tabla II) tales como el Cooling Agent 10, Frescolat MGA, Frescolat ML, CPS-369, CPS-113, WS-23, WS-11, WS-30, WS-148, WS-3, WS-12 e Icilina.

Por “agonista específico” se entiende en la presente invención aquellos agonistas que activan TRPM8 sin activar a otros canales de la misma familia o que activen a TRPM8 con una eficacia de al menos 50, 100, 1000, 2000 veces más respecto a otro canal de la misma familia.

Los métodos que pueden ser usados para medir la especificidad de un agonista de TRPM8 son similares a los descritos anteriormente para medir la actividad agonista de un compuesto, tales como métodos electrofisiológicos, métodos de microscopia de calcio, etc.

Anticuerpos agonista del receptor TRPM8

Un agonista de TRPM8 para su uso en la presente invención puede ser un anticuerpo agonista de TRPM8, o un fragmento del mismo capaz de unirse específicamente al receptor TRPM8 y, más particularmente, al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir la activación del mismo. El anticuerpo agonista puede unirse de forma específica y activar el receptor TRPM8 humano o a un ortólogo del receptor TRPM8 homólogo.

Así, en una realización particular, el agonista del receptor TRPM8 es un anticuerpo agonista anti-receptor TRPM8 el cuál, puede ser de cualquier clase o subclase de inmunoglobulinas, tales como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En una realización particular, al menos uno de dichos anticuerpos agonistas anti-receptor TRPM8 es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.

En la presente invención, el término “anticuerpo” ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos ($F(ab')_2$, Fab), siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es capaz de unirse específicamente al receptor TRPM8 o al dominio extracelular de dicho receptor. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de a presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc.

En la presente invención, se entiende por “anticuerpo agonista del receptor TRPM8” todo aquel anticuerpo que es que es capaz de unirse específicamente al receptor TRPM8, o al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir la activación del canal de manera que se genere un aumento del flujo de sodio y calcio a través del canal. Métodos para adecuados para la detección de un anticuerpo agonista se basan en la capacidad de activar TRPM8 tal y como se describe en detalle anteriormente en el contexto de los usos terapéuticos de los agonistas de acuerdo a la invención.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, por ejemplo en Köhler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and Lane [“Using Antibodies. A Laboratory Manual” de E. Harlow y D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

ES 2 377 785 A1

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención con el receptor TRPM8). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (phage display) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (display) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

Así, en una realización particular de la composición de la invención, al menos, un anticuerpo agonista anti-receptor TRPM8 es un anticuerpo humanizado.

Ejemplos de anticuerpos agonistas específicos para el receptor TRPM8 se han descrito en Mahieu F *et al.* (2007. J Biol Chem 282(5):3325-36.) y en Obata K *et al.* (2005. J Clin Invest. 115(9):2393-2401).

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, dentro del término “anticuerpo” también se incluyen variantes con un patrón de glucosilación alterado, tal y como se ha descrito en WO2006088447 así como fragmentos de anticuerpos, obtenidos a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, glicosilados o no glicosilados, que pueden consistir (i) en zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), (ii) en la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), (iii) nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o (iv) cualquier modificación que se haga de los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que tengan capacidad de producir la activación del receptor TRPM8.

Los anticuerpos agonistas del receptor TRPM8 descritos en la presente invención pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o recombinante, de producción de anticuerpos, de extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos, o por cualquier otra técnica convencional para la obtención de proteínas y anticuerpos las cuales, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Cuando los agonistas del receptor TRPM8 son anticuerpos, para su producción pueden utilizarse, sin que esto suponga limitación alguna, entre otras: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o “display” (phage display, ribosome display, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

■ “Handbook of Therapeutic Antibodies”, de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);

■ “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);

■ “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);

■ “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

Más específicamente, para la producción y obtención de anticuerpos que se unen específicamente al receptor TRPM8 pueden utilizarse cualquiera de los métodos descritos en WO98/16249, WO2004/010947, US2004/0109847 y US2005/0013811, cuyo contenido se incluye en su integridad como referencia.

Variantes constitutivamente activas de TRPM8

Dentro de los agonistas de TRPM8 en la presente invención también se incluyen aquellas variantes constitutivamente activas del receptor TRPM8 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

5 Por “variantes constitutivamente activas del receptor TRPM8” se entienden aquellas secuencias peptídicas derivadas de la secuencia de TRPM8 que al ser expresada en una célula provocan que los canales mixtos TRPM8 formados por subunidades de TRPM8 nativo y de dicha variante constitutivamente activas resulten en canales que están continuamente activados. La definición de “variante funcionalmente equivalente de una variante constitutivamente activas del receptor TRPM8” se entiende en la presente invención a cualquier polipéptido cuya secuencia se pueda obtener mediante inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de las secuencias de la secuencia de variantes constitutivamente activas del receptor TRPM8 y que conserve al menos parcialmente la capacidad de formar canales activados constitutivamente. Para determinar si un canal es constitutivamente activo se pueden utilizar técnicas de electrofisiología como las mencionadas anteriormente. Preferiblemente, las variantes del ligando natural de 4-1BB tienen una identidad de secuencia con dicho ligando de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. La determinación del grado de identidad entre las variantes y el ligando natural se lleva a cabo usando métodos y algoritmos informáticos ampliamente conocidos para el experto en la materia. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de amino ácidos se determina usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S., *et al*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990).

El experto en la materia entiende que, mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la variante funcionalmente equivalente de una variante constitutivamente activas del receptor TRPM8 que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad.

Primera composición de la invención

30 Como entiende el experto en la materia, los agonistas de TRMP-8 pueden ser usados en combinación con otros fármacos útiles para el tratamiento de la xeroftalmía, la sequedad vaginal y el síndrome de boca ardiente. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende al menos un agonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente, y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los agonistas de TRPM8 adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención así como los vehículos farmacéuticamente aceptables han sido descritos con anterioridad.

40 Medicamentos útiles para el tratamiento de la xeroftalmía son, entre otros corticoides, vitamina A, pilocarpina, soluciones de hipromelosa, los geles de carbómero, la ciclosporina, las gotas lubricantes conteniendo glicerina, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, Carboximetilcelulosa, polietilenglicol, polivinilalcohol, ácido hialurónico, aceite de castor y aceite mineral.

45 Medicamentos útiles para el tratamiento de la sequedad vaginal son, entre otros, los lubricantes de base hídrica, vitamina E, estrógenos, isoflavonas agliconas, ácido hialurónico, moduladores selectivos del receptor de estrógenos como el raloxifeno, etc.

50 Medicamentos útiles para el tratamiento del síndrome de boca ardiente son, entre otros, capsaicina, nystatin (Mycostatin) o fluconazole (Diflucan), anticonvulsivos como gabapentin (Neurontin), sedantes en la familia de benzodiazepinas como clonazepam (Klonopin), antidepresivos, antiepilépticos y anticonvulsivantes como amitriptilina, carbamazepina, Mexiletina, Lamotrigina, Fenitoina, N-feniletilamitriptilina, Desipramina, Gabapentina, o nortriptilina (Pamelor, Aventyl).

55 Tal como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye aditivos, tales como conservantes, excipientes, cargas, agentes humectantes, aglutinantes, disgregantes, tampones que pueden estar presentes en las composiciones de la invención. Tales aditivos pueden ser, por ejemplo carbonatos de magnesio y calcio, carboximetilcelulosa, almidones, azúcares, gomas, estearato de magnesio o calcio, agentes colorantes o aromatizantes. Existe una amplia variedad de aditivos farmacéuticamente aceptables para las formas de dosificación farmacéuticas y la selección de aditivos apropiados es una materia de rutina para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

65 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una primera composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

En otro aspecto, la invención se refiere a una primera composición de la invención para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

ES 2 377 785 A1

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xerofthalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una primera composición de la invención.

5 La administración de la composición de la invención se puede efectuar por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial, y se puede administrar local o sistémicamente o directamente al sitio objetivo. Una revisión de las distintas vías de administración de principio activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faullí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

10 El régimen de dosificación lo determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, tamaño, sexo), la vía de administración utilizada, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular empleado y de las propiedades farmacocinéticas del individuo.

La composición de la invención puede contener una cantidad de agentes agonistas de TRPM8 que pueden variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces.

20 En la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" a la cantidad de un agonista del receptor TRPM8 suficiente para provocar un aumento en el lagrimeo, la secreción vaginal o la secreción salivar en el paciente.

25 Así, la composición de la invención puede contener una cantidad de agonista del receptor TRPM8 que oscila entre 0,1 y 2.000 mg, preferiblemente en el rango de 0,5 a 500 mg y, aún más preferiblemente, entre 1 y 200 mg. Dosis apropiadas de las composiciones pueden oscilar entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente, entre 0,5 y 20 mg/kg de peso corporal. La composición se puede administrar un número variable de veces al día, particularmente de 1 a 4 dosis al día.

30 Como el experto en la materia entiende, tanto el agonista de TRPM8 como el fármaco útil para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xerofthalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente puede estar presente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Excipientes o vehículos preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faullí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

45 Como entiende el experto en la materia, la composición de la invención que comprenden, al menos, un agonista del receptor TRPM8, estarán formuladas de acuerdo a la vía de administración que vaya a emplearse. Así, en una realización particular, la composición de la invención que comprende, al menos, un agonista del receptor TRPM8, estará formulada de forma adecuada para su administración por vía oftálmica.

50 En otra realización particular, la composición de la invención que comprende, al menos, un agonista del receptor TRPM8, estará formulada de forma adecuada para su administración por vía vaginal.

55 En otra realización particular, la composición de la invención que comprende, al menos, un agonista del receptor TRPM8, estará formulada de forma adecuada para su administración por vía bucal.

En una realización particular, el agonista usado en el primer uso de la invención es un agonista seleccionado de WS-5(Etil 3-(p-mentane-3-carboxamido), CPS369, CPS368, CPS125, Frescolat MGA-2 Isómero, Coolant Agent 10, (-)-Isopulegol (Coolact P®), (+)-cis & (-)-trans p-Mentane-3,8-diol Ratio ~ 62:38 (Coolact 38D®), (-)-Cubebol, "Hasegawa's Cooling Compound", "IFF's New GRAS Cooling Material", Icilina, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3-[2H]-furanona, 4,5-dimetil-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, N-etil-p-mentane-3-carboxamida, WS-11 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-Amida), WS-12 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (4-methoxyphenil)-amida), WS-14 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico tert-butilamida), WS-23 (2-isopropil-N-2,3-trimetilbutiramida), WS-30 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico ester 2,3-dihidroxi-propilo), WS-148 (1-(di-sec-butil-fosfinoil)-heptano), Mentol, Geraniol, Linallol, Eucaliptol, Hidroxil-citronellal, PMD-38 (p-mentane-3,8-diol), Anticuerpos agonistas específicos para TRPM8 y variantes constitutivamente activas de TRPM8, o combinaciones de los mismos.

ES 2 377 785 A1

En una realización preferida, el agonista usado en el primer uso de la invención no es mentol o un derivado del mismo. Así, en una realización preferida el agonista de TRPM8 se selecciona de icilina, AG3-5, WS-23, WS-148, hidroxil-citronellal, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3[2H]-furanona; 4,5-metil-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona y 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2-[5H]-furanona. En una realización más preferida, el agonista usado en el primer uso de la invención es un agonista específico para TRPM8 seleccionado de: compuestos 1 a 4 de la tabla I (WS-5, CPS369, CPS368, CPS125), compuesto 20 (WS-12, Becka B. 2007, Cell Calcium 41(3):285-294) anticuerpos agonista de TRPM8.

En otra realización preferida, el agonista se selecciona de aquellos que poseen un EC50 menor de 7 (véase tabla 2) tales como Cooling Agent 10, Frescolat MGA, Frescolat ML, CPS-369, CPS-113, WS-23, WS-11, WS-30, WS-148, WS-3, WS-12 e Icilina.

Como entiende el experto en la materia, en el caso de que el agonista de TRPM8 sea un anticuerpo o una variante constitutivamente activa de TRPM8, otra manera de poner en práctica la presente invención consiste en la administración de un vector que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican dichos agonistas del receptor TRPM8.

La secuencia de nucleótidos que codifica a dichos agonistas puede estar clonada precedidas por secuencias reguladoras de la expresión estando operativamente unidas a estas. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “operativamente unida” significa que las secuencias de nucleótidos están en el marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras.

Las secuencias reguladoras de utilidad para la presente invención pueden ser secuencia promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras (“enhancer”) y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea expresión constante de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. Numerosos otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear en la práctica de la invención. Si desea la expresión controlada de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se debe utilizar un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible está “silencioso”. Mediante “silencioso” se quiere decir que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico; en presencia de un inductor, sin embargo, se produce la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Con frecuencia, se puede controlar el nivel de expresión variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo variando la concentración del inductor de modo que un promotor inducible se estimula de forma más fuerte o más débil, se puede afectar la concentración del producto transcrito de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En el caso en el que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un gen, se puede controlar la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor de estrógeno o andrógeno, un promotor de metalotioneína, o un promotor que responde a ecdisona. Otros ejemplos numerosos son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la práctica de la invención. Además de los promotores constitutivos e inducibles (que suelen funcionar en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para alcanzar expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico específica en células o tejidos. Ejemplos bien conocidos de promotores específicos de tejido incluyen varios promotores específicos de músculo incluyendo: el promotor de la α -actina esquelética, el promotor de la actina cardiaca, promotor de la troponina C esquelética, promotor de la troponina C cardiaca de de contracción lenta, y el promotor/potenciador de la creatina quinasa. Existen numerosos promotores específicos de músculo que son bien conocidos en la técnica y que se pueden emplear en la práctica de la invención (para una revisión en promotores específicos de músculo ver Miller *et al.*, (1993) Bioessays 15: 191-196).

En una realización particular, anticuerpo agonista de TRMP8 es una inmunoglobulina del tipo IgG-2A.

En otra realización particular, anticuerpo agonista de TRMP8 es un anticuerpo humanizado.

Así mismo, se contempla la posibilidad es que el vector contenga un polinucleótido que codifique una variante constitutivamente activa del receptor TRPM8. De este modo, cuando el vector se exprese en el organismo receptor, producirá las correspondientes proteínas que ejercerán el efecto terapéutico anteriormente comentado para el tratamiento de las enfermedades como la xeroftalmía, la sequedad vaginal y el síndrome de boca ardiente.

En el ámbito de la presente invención, preferentemente el vector utilizado es un vector viral o no viral adecuado para su empleo en terapia génica; a modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, etc., o en caso de los no virales, los vectores pueden ser complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores, virales y no virales, que contienen la secuencia que codifica al agonista de TRPM8, pueden ser administrados directamente al cuerpo humano o animal por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, incluido el hombre, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto, dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a su viabilidad.

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo

5 Para definir funcionalmente la sensibilidad térmica y la capacidad de codificación de las terminales nerviosas termosensibles, se registró *in vitro* la actividad de impulsos nerviosos (NTI) en la cornea de ratones silvestres (Brock, J. A., *et al.*, 1998. *J. Physiol* 512:211-217). Las terminaciones nerviosas termorreceptoras se identificaron por su disparo espontáneo de impulsos nerviosos a 34°C cuya frecuencia aumentaba con el enfriamiento y se silenciaba al volver a calentar, así como por su respuesta a la aplicación de mentol (Figura 1A) (Schafer, K., *et al.*, 1986. *J. Gen. Physiol* 88:757-776). El 72% de las terminaciones sensibles al frío también respondieron a los pulsos de calor (respuesta paradójica) (Long, R. R. 1977. *J. Neurophysiol.* 40:489-502). (Figura 1A) y a la capsaicina 100 nM (el 65%).

15 La frecuencia espontánea de disparo de las terminaciones nerviosas sensibles al frío a la temperatura basal (34°C) fue de 4.0 ± 0.4 impulsos/s (n=55). Las terminales de frío dispararon espontáneamente, tantos potenciales único como, ocasionalmente, en ráfagas de dos o más potenciales de acción a intervalos regulares. Los pulsos de frío desde 34°C hasta 20°C evocaron una descarga de impulsos que aumentaba progresivamente con la reducción de la temperatura, alcanzando una frecuencia pico y disminuyendo la frecuencia de disparo o silenciándose más tarde, al alcanzar los valores de temperatura más bajos (Figuras 1A y 1B). El curso temporal de la frecuencia media de disparo y del decrecimiento de temperatura durante las rampas de enfriamiento, registrados en un total de 55 terminales sensibles al frío, se muestra en la Figura 1B. Los umbrales de temperatura necesarios para evocar un aumento de la frecuencia de disparo durante las rampas de enfriamiento fueron menores de 2°C (valor medio: -1.5 ± 0.2 °C, Figura 1C). Alrededor del 30% de las unidades termosensibles aumentaron significativamente su frecuencia de disparo con disminuciones de temperatura de 1°C o incluso menores. El valor medio de la frecuencia pico durante la rampa de enfriamiento fue de 37.6 ± 1.8 imp/s (n=55).

30 La sensibilidad térmica de los termorreceptores de frío corneales, expresada como el cambio en la frecuencia de disparo por cada grado centígrado de decremento de temperatura durante una rampa de enfriamiento continuo, varió entre las unidades registradas. La pendiente media fue 6.3 ± 1.0 impulsos/s/°C (n=55) (línea roja en la Figura 1D). También se evaluó la capacidad de las terminales termosensibles para codificar valores sostenidos de temperatura, realizando para ello escalones de temperatura de -2.5°C, entre 34°C y 24°C (Figura 1E). La disminución inicial de temperatura produjo un incremento transitorio de la frecuencia de disparo, que se adaptaba a continuación a un nuevo valor estable. Las terminales corneales sensibles al frío codificaron la temperatura estática en un amplio rango de temperatura. Las respuesta a las bajas temperaturas se caracterizaron por un aumento de la frecuencia de disparo; un marcado cambio en el patrón de disparo, que pasaba a ser en ráfagas en la mayoría de los casos (Figura 1E; Tabla 1), y una modificación transitoria de la forma de los potenciales registrados (Brock, J. A., *et al.*, 1998. *J. Physiol* 512:211-217). La figura 1F resume los cambios medios de frecuencia de disparo estáticos y dinámicos de 10 termorreceptores y muestra la notable sensibilidad de estos receptores sensoriales corneales a pequeños cambios de temperatura.

40 El mentol (50 μ M), un activador de las terminaciones sensoriales aferentes sensibles al frío bien conocido, (Schafer, K., *et al.*, 1986. *J. Gen. Physiol.* 88:757-776). aumentó la actividad espontánea en el 98% de las terminaciones estudiadas (Figura 1A) (desde 3.4 ± 0.3 imp/s a 18.4 ± 1.4 imp/s, n=44; $p < 0.001$, test de pares). El porcentaje de terminales que presentaban un patrón de disparo en ráfagas a 34°C fue casi diez veces más alto durante la perfusión con mentol (44%) que antes del tratamiento (5%). El mentol sensibilizó la respuesta de las terminales al enfriamiento: en presencia de mentol, las rampas de enfriamiento evocaron un mayor aumento de la frecuencia de disparo, alcanzándose la frecuencia pico a temperaturas más altas (control: 26.7 ± 0.5 °C; mentol: 28.6 ± 0.5 °C, n=44; $p < 0.001$, test de pares), y silenciándose asimismo a temperaturas más altas (control: 23.8 ± 0.4 °C; mentol: 25.2 ± 0.4 °C, n=44; $p < 0.05$, test de pares). El BCTC es un potente bloqueante reversible de los canales iónicos TRPM8 *in vitro* (Madrid, R. *et al.* 2006. *J Neurosci.* 26:12512-12525, Jordt, S. E. *et al.* 2004. *Nature* 427:260-265). Se estudió el efecto de una concentración saturante de BCTC (10 μ M) en las terminaciones sensoriales. La actividad espontánea y los incrementos de frecuencia de disparo evocados por el frío y por el mentol disminuyeron gradualmente y casi se silenciaron completamente tras la perfusión con BCTC durante 90 minutos. Estos efectos del BCTC se observaron también en ratones TRPA1 (-/-). El descenso de la actividad fue parcialmente reversible tras retirar el BCTC y no se observó en ausencia de la droga, lo que sugiere que la actividad de las terminales termosensibles depende fundamentalmente de canales TRPM8. A diferencia del efecto estimulante del mentol, el agonista específico TRPA1, alil-isotiocianato (AITC, 100 μ M) (Bardell, M. *et al.* 2004. *Neuron* 41:849-857) probado en 28 terminales de frío, no modificó la actividad espontánea ni la evocada por el enfriamiento en 24 de ellas. Sólo 4 unidades sensoriales mostraron un aumento significativo de la frecuencia de disparo durante la perfusión con AITC a temperatura basal (datos no mostrados), lo que sugiere la ausencia o la expresión reducida de canales TRPA1 en la mayoría de las terminales corneales sensibles al frío. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia, previamente sugerida, de un solapamiento de la expresión de canales TRPM8 y TRPA1 (Story, G. M. *et al.* 2003. *Cell* 112:819-829).

65 La IKD es una corriente de potasio activada por voltaje, tipo shaker, que actúa como freno de la excitabilidad en contra de la activación de las neuronas sensoriales inducida por decrementos de temperatura, contribuyendo a determinar el umbral térmico de los termorreceptores sensoriales (Madrid, R., *et al.* 2009. *J. Neurosci.* 29:3120-3131). Se empleó el bloqueante de la corriente IKD 4-amino-piridina (4-AP, 100 μ M) para explorar si esta corriente afectaba la sensibilidad térmica de las terminaciones nerviosas de frío corneales. En tres de las nueve unidades estudiadas, la

actividad espontánea aumentó significativamente tras la perfusión con 4-AP, pero no se encontraron cambios paralelos en el umbral de frío de estas terminales. Por el contrario, la frecuencia pico durante la respuesta al enfriamiento disminuyó un $39\pm 6\%$ en todas las terminales tratadas con 4-AP, respecto a los valores control ($p < 0.001$, $n=9$). Globalmente, estos datos sugieren que el umbral térmico de las terminaciones nerviosas de frío de la córnea del ratón no está determinado, al menos de manera significativa, por los canales de potasio tipo shaker Kv1, y que estas terminales pertenecen a neuronas termorreceptoras de frío de bajo umbral (Belmonte, C., *et al.* 2009. *Exp Brain Res.* 196:13-30).

A continuación, se analizó la presencia, morfología y densidad de fibras nerviosas que, presumiblemente, expresan el canal sensible al frío TRPM8 en la córnea de ratón, utilizando ratones modificados genéticamente para expresar la proteína verde fluorescente (EYFP) bajo el control de las secuencias reguladoras del TRMP8 (ratones TRPM8-EYFP) (Figura 2). Las fibras nerviosas presumiblemente positivas para TRPM8 se distribuían homogéneamente por toda la córnea. Los troncos nerviosos estromales se extendían por el tercio externo de la córnea (Figura 2A-C). Aproximadamente uno de cada nueve axones estromales resultó positivo para TRPM8 (Figura 2C). Una vez que las ramas del plexo nervioso estromal penetraban la lámina de Bowman, localizada entre el estroma y el epitelio corneal, se ramificaban en varias fibras nerviosas subbasales (fibras en cinta) que transcurrían paralelas unas a otras hacia el centro de la córnea, inmediatamente debajo de las células basales del epitelio (Figura 2D-H). Algunas fibras subbasales positivas para TRPM8 daban ya terminaciones nerviosas en el propio plexo subbasal (Figura 2H, punta de flecha). No obstante, la mayoría de ellas daban colaterales que ascendían hacia las capas más superficiales del epitelio corneal, acabando como racimos asimétricos (Figura 2I-K). A diferencia de las fibras nerviosas no fluorescentes, que presumiblemente eran fibras polimodales y mecano-nociceptoras, los axones positivos para TRPM8 se ramificaban escasamente en el epitelio, para acabar en las capas epiteliales más superficiales como un reducido número de terminales en pincel (Figura 2J-L). Tanto las fibras en cinta subbasales como las terminaciones nerviosas intraepiteliales mostraron, en todos los casos, una morfología arrosariada (Figura 2H-K). Utilizando tinción por inmunofluorescencia doble contra la proteína verde fluorescente (GFP) y contra los neurofilamentos, se determinó que las supuestas fibras termorreceptoras de frío representaban alrededor del 12% del número total de fibras subbasales y aproximadamente el 10% de las terminaciones nerviosas intraepiteliales superficiales (ver sección de Métodos; Figura 2C, F, K, L).

Se determinó a continuación la contribución de los canales TRPM8 a la sensibilidad al frío, explorando la descarga de impulsos nerviosos evocada por el enfriamiento en ratones mutantes TRPM8(-/-)-EGFP ki (Dhaka, A. *et al.* 2007. *Neuron* 54:371-378). Se intentó registrar la actividad eléctrica de las terminaciones termosensibles al frío en 12 córneas TRPM8(-/-). Sin embargo, en los centenares de intentos de registro, en los que la totalidad de la superficie corneal fue explorada repetidamente con la pipeta de registro, sólo se consiguió registrar actividad espontánea en 14 terminaciones nerviosas (Figura 3A, trazo punteado). En estos casos, la actividad espontánea registrada fue de baja frecuencia (0.6 ± 0.2 imp/s, $n=14$) y sólo en una de las terminales TRPM8(-/-) se obtuvo un aumento de la frecuencia de disparo durante la rampa de enfriamiento, con un umbral de temperatura de 28.4°C y una frecuencia pico durante la rampa de 3 imp/s obtenida a 24.7°C . El mentol es un potente activador de los canales TRPM8 (McKemy, D. D., *et al.* 2002. *Nature* 416:52-58). La perfusión con mentol $50\ \mu\text{M}$ no indujo ningún aumento de la frecuencia de disparo, ni a la temperatura basal de 34°C ni durante las rampas de enfriamiento ($n=6$) (Figura 3A, trazo puntuado). Este resultado es coherente con la existencia de una dependencia entre la actividad espontánea y a evocada por el frío, y la expresión del TRPM8 en en las terminales sensibles al frío. La capsaicina ($100\ \text{nM}$), probada en 6 de las unidades activas registradas en córneas TRPM8(-/-), evocó el disparo de unos pocos impulsos en dos terminales (5 y 8 impulsos, respectivamente), y una vigorosa descarga con una duración de más de 30 s en otra de ellas.

En contraste con la gran inhibición de la actividad espontánea y evocada por frío, observada en los ratones TRPM8(-/-), las terminaciones nerviosas corneales de los ratones TRPA1(-/-) (Kwan, K. Y. *et al.* 2006. *Neuron* 50:277-289) mostraron una frecuencia de disparo y una respuesta al frío similar a las de los ratones silvestres (Figura 3B). Estos resultados confirman que los canales TRPA1 no son determinantes moleculares críticos para la sensibilidad al enfriamiento de las terminaciones nerviosas corneales sensibles al frío. Los resultados son coherentes asimismo con resultados previos de nuestro grupo, obtenidos en neuronas sensoriales del trigémino en cultivo Madrid, R., *et al.* (J. Neurosci., 2009, 29:3120-3131). Para excluir la posibilidad de que las terminaciones nerviosas termosensibles estuvieran ausentes en las córneas de los ratones TRPM8(-/-), o presentaran una morfología alterada, éstas se tiñeron con anticuerpos anti-GFP, a fin de visualizar la morfología de las fibras nerviosas que expresaban los canales TRPM8 truncados (Dhaka, A., *et al.* 2008. *J. Neurosci.* 28:566-575. La distribución de las fibras teñidas en diferentes regiones de la circunferencia corneal fue variable de un animal TRPM8(-/-) a otro. No obstante, la morfología general de las fibras en cinta sub-basales y los racimos de terminaciones nerviosas intraepiteliales fue en todos los casos similar a las de las fibras de los ratones TRPM8-EYFP. Además, no se encontraron diferencias significativas en la densidad total de terminaciones nerviosas, lo que excluye la posibilidad de que la ausencia de actividad y de respuesta a frío observada en los experimentos de electrofisiología se debiera a que la pipeta de registro no alcanzaba las terminaciones.

Adicionalmente se exploró la actividad evocada por el frío en córneas de ratones TRPM8(+/-), en los que presumiblemente la respuesta al enfriamiento debería estar reducida debido a una menor expresión de canales TRPM8. En estos animales, el 30% de las terminales presentaban actividad espontánea pero carecían de respuesta al frío y al mentol, a diferencia de los animales silvestres, en los que era excepcional (7%) encontrar unidades sin sensibilidad al frío que presentaran actividad espontánea. Entre las terminaciones nerviosas activas, la actividad espontánea media a 34°C fue significativamente más baja que en los animales TRPM8(+/+) (2.2 ± 0.4 imp/s vs. 4.4 ± 0.9 imp/s; $n=11$; $p=0.025$, test de Mann-Whitney), mientras que el umbral de temperatura medido durante las rampas de frío esto es, la temperatura necesaria para evocar un aumento de la frecuencia de disparo, se estableció en temperaturas de valores más bajos ($30.6\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ vs. $32.7\pm 0.4^{\circ}\text{C}$; $p=0.004$, test de Mann-Whitney), y la frecuencia pico durante en enfriamiento

to fue asimismo significativamente más baja en las corneas de ratones TRMP8(+/-) que en las de ratones silvestres (19.4 ± 3.4 imp/s vs. 33.8 ± 3.5 imp/s; $p=0.008$, t de Student) (Figura 3A, trazo continuo). En los ratones TRMP8(+/-), el mentol ($50 \mu\text{M}$) aumentó la frecuencia de disparo a temperatura basal, el umbral de frío y la frecuencia pico, aunque significativamente menos que en los animales TRMP8(+/+) (Figura 3A, trazo continuo).

5

A continuación, se planteó que si la producción lagrimal está asociada a la actividad neural de las fibras termorreceptoras de frío, el flujo basal de lágrimas debe estar disminuido en los animales TRPM8(-/-), en los que la actividad espontánea está prácticamente ausente. La figura 4A muestra que ese es el caso. El volumen del fluido lagrimal, expresado como la longitud de hilo impregnado con rojo fenol que cambia de color al humedecerse con las lágrimas durante un período de 2 minutos, medido en los ratones TRPM8(-/-) en condiciones basales (1.5 ± 0.2 mm, $n=23$) fue significativamente más bajo que el medido en ratones silvestres (3.7 ± 0.4 mm, $n=35$; $p<0.001$). Por el contrario, la lagrimación basal de los ratones TRPA1(-/-) no fue significativamente diferente de la media en animales silvestres (Figura 4A, columnas negras). Por otra parte, la aplicación tópica de capsaicina ($1 \mu\text{M}$) y AITC ($500 \mu\text{M}$), dos agentes que activan los canales TRPV1 y TRPA1 en los nociceptores polimodales, aumentaron significativamente el flujo lagrimal tanto en ojos de ratones TRPM8(-/-) como silvestres, mientras que el vehículo de ambas drogas no tuvo ningún efecto significativo (Figura 4B).

10

15

A continuación se trató de confirmar si la relación entre la temperatura corneal y la tasa basal de lagrimación estaba también presente en el ser humano, para lo que se midió la tasa de lagrimación en 11 voluntarios jóvenes (28.9 ± 1.8 años) expuestos durante 10 minutos, en sesiones distintas, a temperaturas ambientes de 18°C , 25°C y 43°C con una humedad constante del 32%. La exposición a esas temperaturas llevó la temperatura de la superficie corneal a unos valores de $32.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$, $34.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y $36.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$, respectivamente. Los valores de temperatura medidos en la superficie corneal fueron significativamente diferentes entre sí ($p<0.001$, ANOVA para medidas repetidas). Por el contrario, sólo con la temperatura ambiente de 43°C se redujo significativamente la tasa de lagrimación (17.1 ± 1.4 mm, frente a 22.8 ± 1.2 mm a 25°C ó 23.2 ± 2.3 mm a 18°C ; $p=0.006$) (Figura 4C). Cuando los sujetos se expusieron a 43°C (temperatura corneal $36.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) con una humedad ambiental del 62.5%, la reducción de la tasa de lagrimación fue la misma (17.6 ± 2.4 mm) que en con la humedad del 32%. Estos experimentos se remedaron en ratones silvestres y TRPM8(-/-) anestesiados, ubicándolos en las mismas condiciones ambientales empleadas en los experimentos con humanos, esto es, exponiéndolos a temperaturas ambientales altas y neutras en condiciones de humedad ambiental constante. En los ratones silvestres, cuando la temperatura corneal subía hasta $36.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($n=11$), la lagrimación disminuía hasta 1.8 ± 0.4 mm (Figura 4A), mientras que en un ambiente con temperatura neutra, la temperatura corneal era de 27.2 ± 0.1 ($n=6$) y la tasa de lagrimación era de 4.6 ± 0.8 mm ($p=0.017$, test de Mann-Whitney). Por el contrario, en los ratones TRPM8(-/-) expuestos a condiciones similares, la tasa de flujo lagrimal no se modificaron significativamente al variar la temperatura de la superficie corneal (Figura 4A).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

ES 2 377 785 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un agonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad es la xeroftalmía.

10 3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho agonista aumenta la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío por medio de la activación de TRPM8.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el agonista de TRPM8 se selecciona de los agonistas descritos en la Tabla 1.

15 5. Uso según la reivindicación 4 en el que dicho agonistas de TRPM8 se selecciona del grupo formado por WS-5(Etil 3-(p-mentane-3-carboxamido), CPS369, CPS368, CPS125, Frescolat MGA-2 Isómero, Coolant Agent 10, (-)-Isopulegol (Coolact P[®]), (+)-cis & (-)-trans p-Mentane-3,8-diol Ratio ~ 62:38 (Coolact 38D[®]), (-)-Cubebol, “Hasegawa’s Cooling Compound”, “IFF’s New GRAS Cooling Material”, Icilina, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3-[2H]-furanona, 4,5-dimetil-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, N-etil-p-mentane-3-carboxamida, WS-11 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-Amida), WS-12 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (4-methoxyphenil)-amida), WS-14 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico tert-butilamida), WS-23 (2-isopropil-N-2,3-trimetilbutiramida), WS-30 (ácido 2-isopropil-5-methyl-ciclohexanecarboxílico ester 2,3-dihidroxi-propilo), WS-148 (1-(di-sec-butyl-fosfinoil)-heptano), Mentol, Geraniol, Linallol, Eucaliptol, Hidroxil-citronellal, PMD-38 (p-mentane-3,8-diol), Anticuerpos agonistas específicos para TRPM8 y variantes constitutivamente activas de TRPM8.

30 6. Composición que comprende al menos un agonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente, y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Composición según la reivindicación 6 en donde el agonista de TRPM8 se selecciona de los agonistas de TRPM8 mostrados en la Tabla 1.

35 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 en el que el agonista de TRPM8 se selecciona de los agonistas de TRPM8 específicos y/o de los agonistas de TRPM8, en donde dicho agonista es distinto al mentol o a un derivado del mismo.

40 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho agonista de TRPM8 se selecciona del grupo formado por WS-5(Etil 3-(p-mentane-3-carboxamido), CPS369, CPS368, CPS125, Frescolat MGA-2 Isómero, Coolant Agent 10, (-)-Isopulegol (Coolact P[®]), (+)-cis & (-)-trans p-Mentane-3,8-diol Ratio ~ 62:38 (Coolact 38D[®]), (-)-Cubebol, “Hasegawa’s Cooling Compound”, “IFF’s New GRAS Cooling Material”, Icilina, 5-metil-4-(1-pirrolidinil)-3-[2H]-furanona, 4,5-dimetil-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, 4-methyl-3-(1-pirrolidinil)-2[5H]-furanona, N-etil-p-mentane-3-carboxamida, WS-11 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (2-hidroxi-1,1-dimetil-etil)-Amida), WS-12 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico (4-methoxyphenil)-amida), WS-14 (ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanecarboxílico tert-butilamida), WS-23 (2-isopropil-N-2,3-trimetilbutiramida), WS-30 (ácido 2-isopropil-5-methyl-ciclohexanecarboxílico ester 2,3-dihidroxi-propilo), WS-148 (1-(di-sec-butyl-fosfinoil)-heptano), Mentol, Geraniol, Linallol, Eucaliptol, Hidroxil-citronellal, PMD-38 (p-mentane-3,8-diol), Anticuerpos agonistas específicos para TRPM8 y variantes constitutivamente activas de TRPM8.

50 10. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una o más de las enfermedades seleccionadas de xeroftalmía, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente.

55

60

65

Figura 1

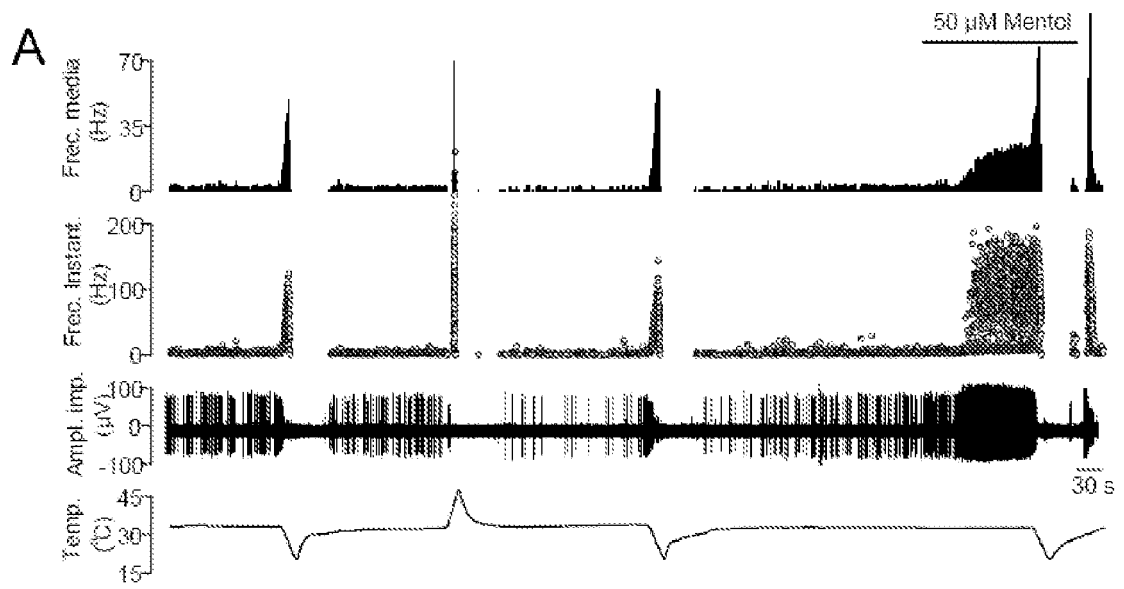


Figura 1 (cont.)

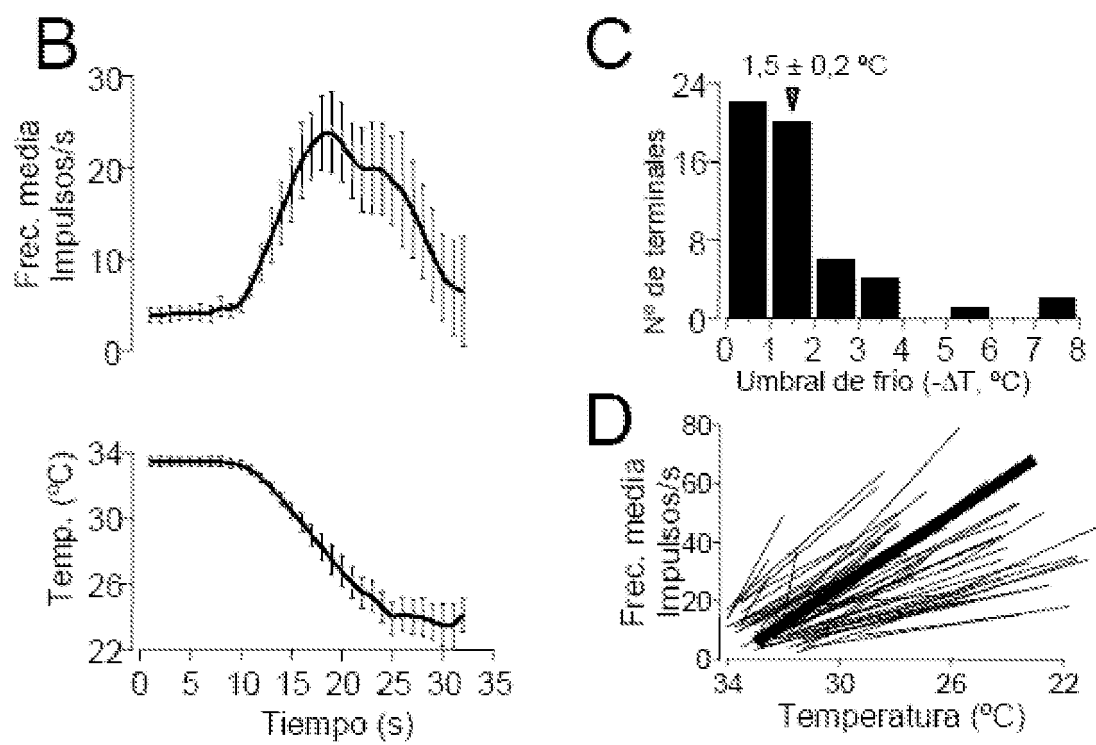


Figura 1 (cont.)

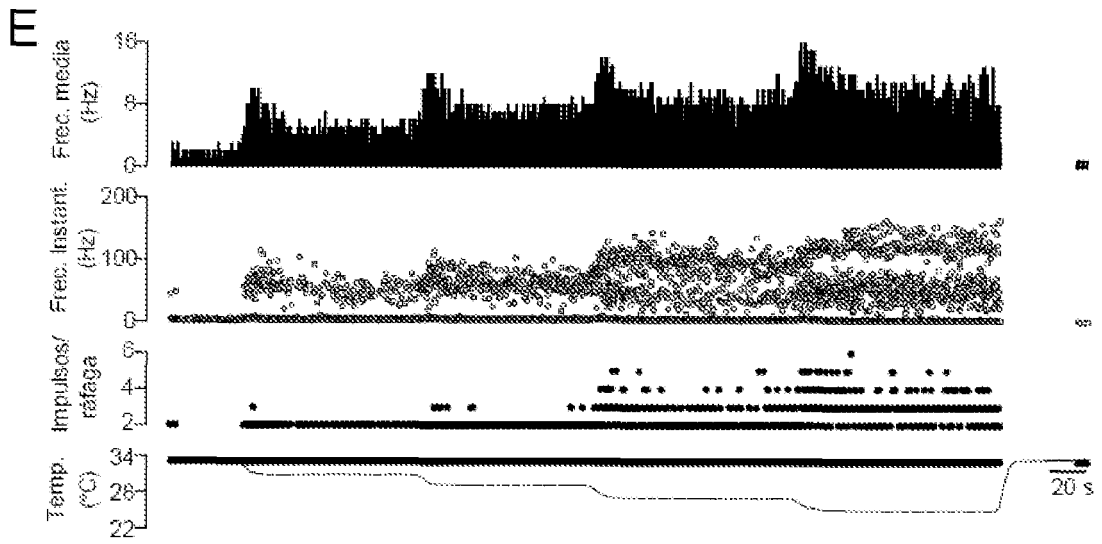


Figura 1 (cont.)

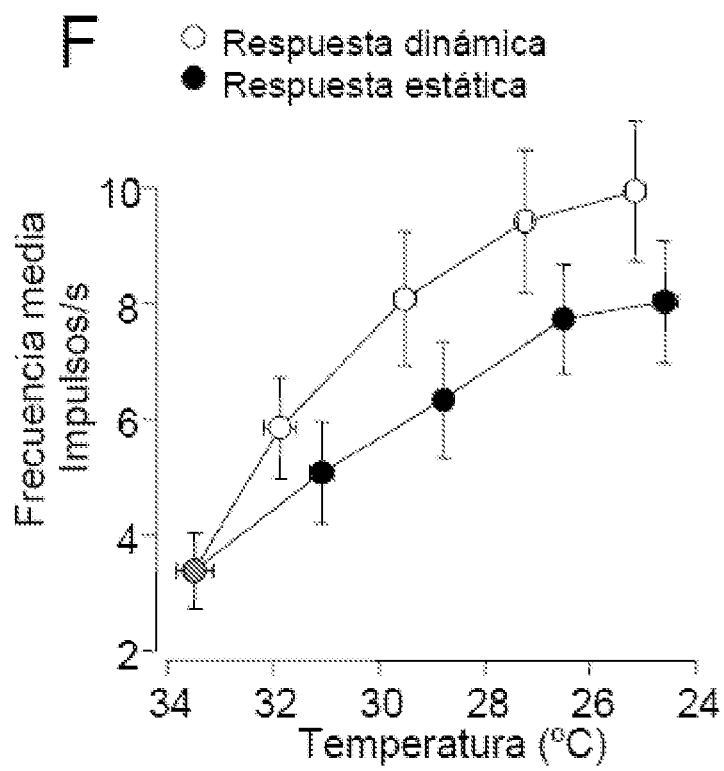


Figura 2

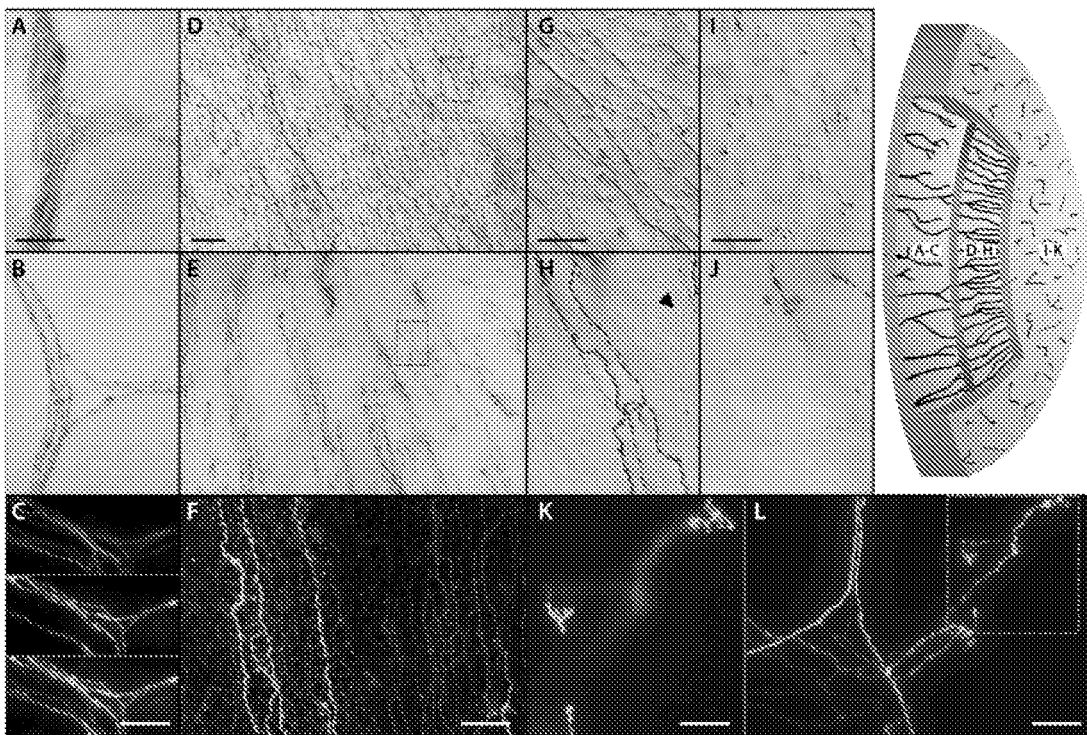


Figura 3

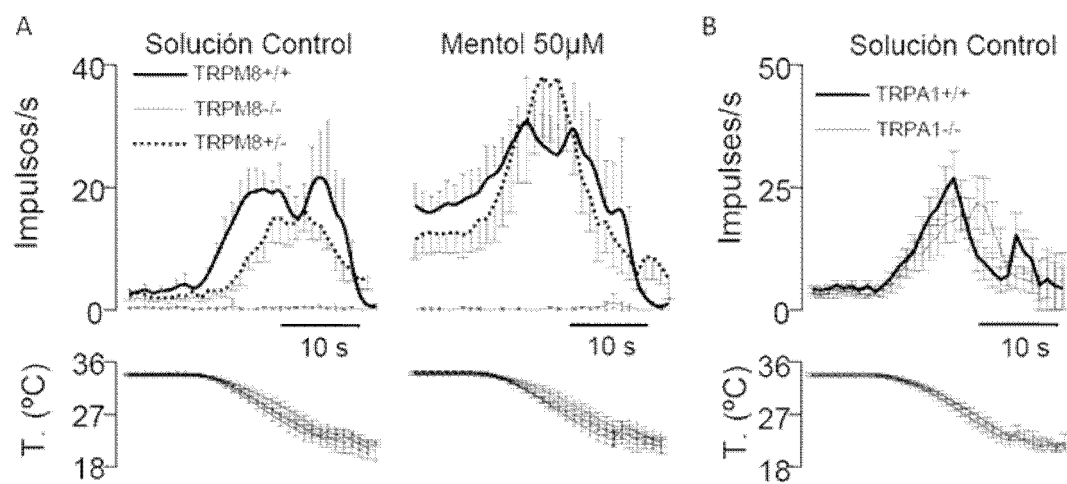


Figura 4A

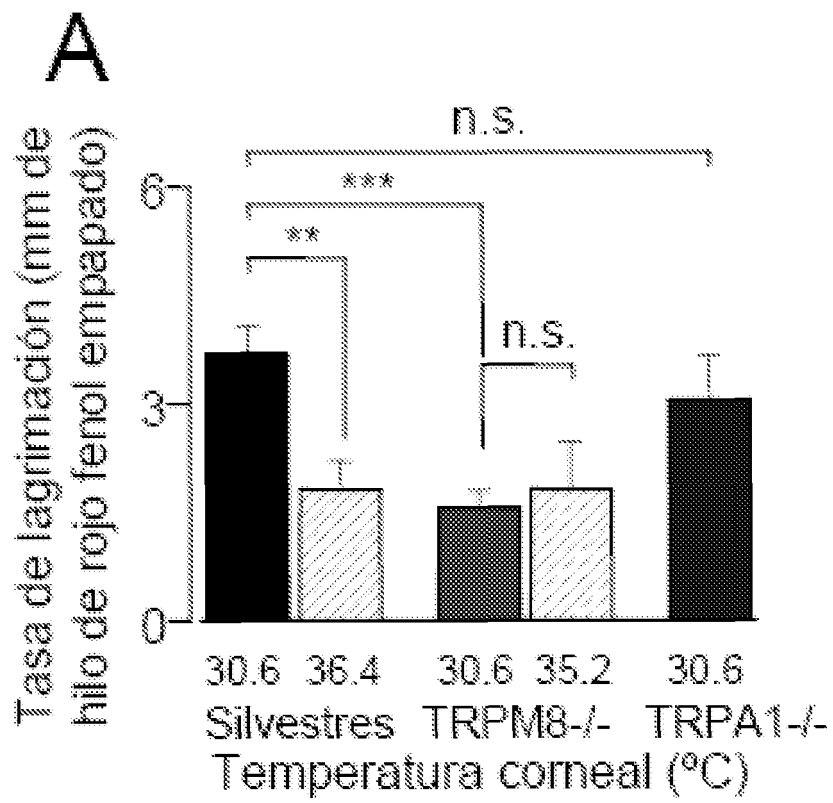


Figura 4B

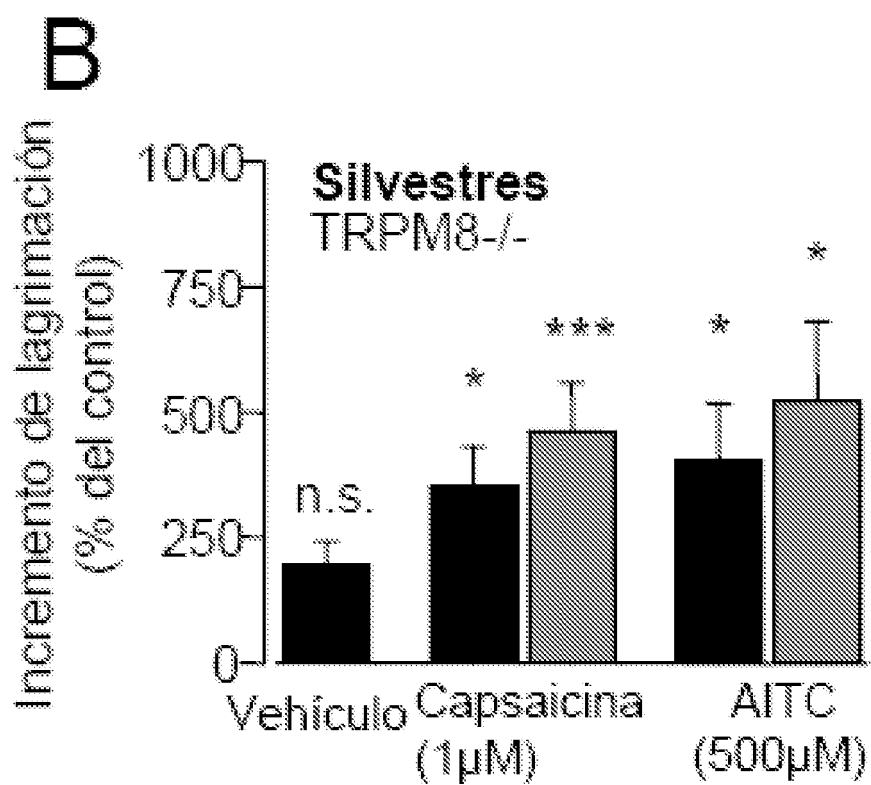
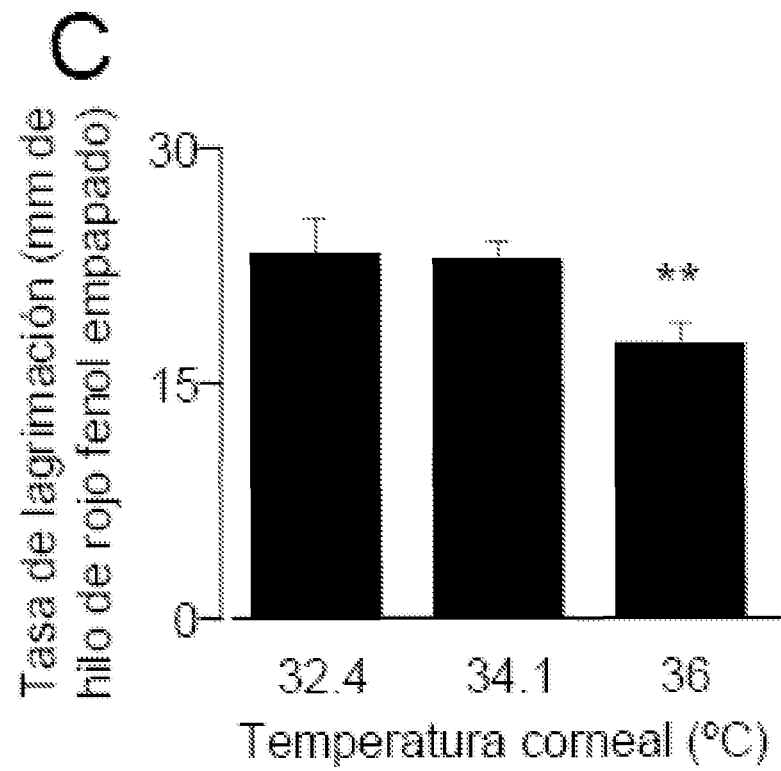


Figura 4C





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201031341

②² Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2010017609 A2 (NATURAL COSMETICOS, S. A) 18.02.2010, reivindicaciones.	1-10
A	WO 2007099503 A2 (GILLETTE COMPANY) 07.09.2007, reivindicaciones.	1-10
A	HAGHIGHI, A.B. et al.: "Therapeutic potentials of menthol in migraine headache: Possible mechanisms of action". Medical hypothesis, 2007, vol. 69, (2) página 455, todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
06.03.2012

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61P27/02 (2006.01)

A61P15/02 (2006.01)

A61K31/16 (2006.01)

A61K31/513 (2006.01)

A61K31/045 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2010017609 A2 (NATURAL COSMETICOS, S. A)	18.02.2010
D02	WO 2007099503 A2 (GILLETTE COMPANY)	07.09.2007
D03	HAGHIGHI, A.B. et al.: "Therapeutic potentials of menthol in migraine headache: Possible mechanisms of action". Medical hypothesis, 2007, vol. 69, (2) página 455, todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de un agonista de TRPM8 (transient receptor potential cation channel subfamily melastatin member 8) o de combinaciones de los mismos para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada de xeroftalmia, sequedad vaginal y síndrome de boca ardiente y a una composición que comprende al menos una agonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de una o más de las enfermedades citadas anteriormente.

Los documentos D1 y D2 se refieren a distintos usos de agonistas de TRPM8. El documento D1 se refiere a composiciones antitranspirantes que llevan agonistas de TRPM8 entre los que se citan mentol, eucaliptol, geraniol, eugenol, etc (ver reivindicaciones 1 y 2). El documento D2 reivindica un método para reducir el crecimiento del pelo utilizando composiciones que comprenden agonistas de TRPM8 entre los que se citan la icilina y terpenos como el mentol (ver reivindicaciones)

El documento D3 se refiere al uso terapéutico del mentol en la migraña por su efecto analgésico y antiinflamatorio.

Ninguno de los documentos citados se refiere al uso de los agonistas de TRPM8 en la xeroftalmia, sequedad vaginal y síndrome de la boca seca.

Por lo tanto, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-10 de la presente solicitud tiene novedad, actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.