

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 354**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2001** **E 07075011 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2011** **EP 1790344**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de neuropatía periférica inducida por una enfermedad y afecciones relacionadas**

30 Prioridad:

07.07.2000 US 216844 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2013

73 Titular/es:

SPECTRUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
157 TECHNOLOGY DRIVE
IRVINE, CA 92618, US

72 Inventor/es:

DIAMOND, JACK y
GLASKY, ALVIN J

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 420 354 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] Esta invención está dirigida al tratamiento de neuropatía periférica inducida por una patología.

- 5 **[0002]** Aunque han mejorado los métodos para el tratamiento de la diabetes y sus consecuencias, la neuropatía diabética es aún un problema extremadamente serio. La neuropatía diabética puede ser definida como una trastorno demostrable, bien clínicamente evidente o bien subclínicamente, que sucede en el escenario de la diabetes mellitus sin otras causas para la neuropatía periférica. El trastorno neuropático conlleva manifestaciones en las
- 10 partes somáticas y/o autonómicas del sistema nervioso periférico. La neuropatía diabética a menudo es asociada con deterioro de los nervios justo bajo la piel conduciendo a uno o más de los siguientes estados: adormecimiento y hormigueo de dedos, manos, dedos de los pies, y pies; debilidad en manos y pies; o dolor y/o sensación de quemazón en manos y pies. El deterioro de nervios como resultado de neuropatía periférica puede también llevar a problemas
- 15 con el tubo digestivo, corazón y órganos sexuales, causando indigestión, diarrea o descomposición, mareo, infecciones de vejiga, e impotencia.

[0003] La neuropatía dietética es un ejemplo de una neuropatía periférica inducida por una patología, la cuál tiene otras causas. Similares neuropatías pueden suceder en afecciones tales como acromegalia, hipotiroidismo, SIDA, lepra, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso

20 sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, periarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis craneal, y sarcoidosis, entre otras afecciones.

[0004] Más del 15% de los 13 millones de pacientes diabéticos en los Estados Unidos sufren alteraciones sintomáticas del sistema nervioso. Puede desarrollarse neuropatía clínica significativa dentro de los 10 primeros años después del diagnóstico de diabetes y el riesgo de

25 desarrollar neuropatías aumenta cuanto más tiempo ha tenido diabetes una persona. Sin embargo en la mayoría de los casos (del 30-40%) no existen síntomas, hasta el 60% de los pacientes con diabetes tiene algún tipo de neuropatía. La neuropatía diabética resulta ser más común en fumadores, personas por encima de los 40, y aquellos que han tenido problemas para controlar sus niveles de glucosa en la sangre.

30 **[0005]** En la actualidad no existen medicamentos en el mercado para el tratamiento de neuropatía diabética. Hay algunos medicamentos en prueba o en espera de prueba, incluyendo alond (zopolrestat; Pfizer), zenarestat (Fujisawa), pregabalin (Wamer-Lambert), timcodar dimesilato (Vertex), la memantina antagonista de NMDA (Merz), neurulin (Cortec), y un producto de IGF-II (Aurogen).

35 **[0006]** Están siendo intentados o siendo considerados otros enfoques, incluyendo inhibidores de reaductasa aldosa, que se piensa que inhiben el flujo incrementado a través de la ruta de poliol causado por glucosa alta en la sangre, imitando el efecto de control glucémico mejorado, factor de crecimiento nervioso, ácido alfa-lipoico, ácido linolénico gamma como suplemento

alimenticio, hormonas de factor de crecimiento tipo insulina, inmunoglobulina, myoinositol, o aminoguanidina.

[0007] WO 96/03125 revela medicamentos y métodos destinados al control de actividad neurológica y celular y que puede ser usados para afectar a una variedad de funciones y actividades neurológicas y celulares. AIT-082 se revela como una guanilil ciclasa dependiente de monóxido de carbono modulante de derivado de purina.

[0008] Rathbone et al (Drug Development Research, 45, pages 356-372, 1998) describe la fisiología y farmacología de AIT-082 en el sistema nervioso.

[0009] Sin embargo, hay una necesidad sustancial de un tratamiento mejorado para neuropatía diabética, particularmente un tratamiento que pueda realmente retrasar o invertir la degeneración de los nervios involucrados sin inducir hiperalgesia.

[0010] Por tanto, existe una necesidad de métodos mejorados para tratar la neuropatía diabética así como otras neuropatías periféricas inducidas por una patología. Existe una particular necesidad de métodos que puedan estimular el crecimiento o regeneración nerviosa en particular sin inducir hiperalgesia.

[0011] La invención se refiere al uso como se define en la reivindicación 1 y al compuesto de propósito limitado según la reivindicación 12.

[0012] Realizaciones adicionales se establecen en las reivindicaciones 2 a 11 y 13 a 14.

RESUMEN

[0013] Preferentemente, el compuesto es capaz de pasar la barrera hematoencefálica.

[0014] Normalmente, la administración del compuesto provoca la brotación del nervio periférico en la piel del paciente a quien es administrado el derivado de purina. La brotación del nervio periférico puede ser brotación nociceptiva del nervio. Normalmente, la brotación nociceptiva del nervio es inducida sin ocurrencia de hiperalgesia. Adicionalmente, usos según la presente invención pueden prevenir disfunciones nerviosas sensoriales grandes y pequeñas en diabetes.

[0015] La neuropatía periférica inducida por una patología puede ser neuropatía diabética o puede ser una neuropatía asociada con las siguientes afecciones: acromelagia, hipotiroidismo, SIDA, lepra, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, periarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis craneal, o sarcoidosis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] La siguiente invención llegará a ser mejor entendida con referencia a la especificación, reivindicaciones adjuntas y dibujos que se acompañan, donde:

La Figura 1 (a) es un boceto de mapas de campos nerviosos recién aisladas de mDCN-T13, con las áreas individuales identificadas de calor, pinchamiento y presión;

La figura 1 (b) es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre la brotación de fibras nerviosas nociceptivas;

La figura 2(a) es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre la brotación de fibras

nerviosas termo-nociceptivas;

La figura 2(b) es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre la brotación de fibras nerviosas mecano-nociceptivas;

La figura 3 es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 al invertir la inhibición de brotación
5 mediante el anticuerpo anti-NGF;

La figura 4 es un gráfico mostrando que AIT-082 no causa hiperalgesia al medirse por el umbral de temperatura para contracción de pie de una sonda térmica, umbral de temperatura para evocar el reflejo CTM en la piel dorsal; y la latencia de la contracción de pie a partir de un baño caliente a 49 °C;

10 La figura 5 es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre la velocidad de conducción en el nervio sensorial en ratas diabéticas y de control;

La figura 6 es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre latencia de respuesta térmica en ratas diabéticas y de control;

La figura 7 es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre contracción de pies inducida por
15 formol en ratas diabéticas; y

La figura 8 es un gráfico mostrando el efecto de AIT-082 sobre contracción de pies inducida por formol en ratas diabéticas, mostrando el efecto en fases 1, Q, y 2a.

DESCRIPCIÓN

[0017] Hemos descubierto que el derivado de purina bifuncional N-4-carboxifenilo-3-(6-oxohidropurina-9-ilo) propanamida (también conocido como AIT-082 y leteprinima potásica),
20 que elude la barrera hematoencefálica, puede actuar para inducir brotación del nervio periférico en la piel de ratas adultas. Como se detalla abajo en el Ejemplo, esta actividad puede ser atribuible a regulación al alza de niveles de factor de crecimiento del nervio cutáneo (NGF) inducida por este derivado de purina bifuncional, aunque los Solicitantes no tienen la intención
25 de ligarse a esta teoría. Además, esta actividad sucedía sin la inducción de hiperalgesia. Este propiedad de actuar para inducir brotación del nervio periférico, por tanto, debería ser también poseída por otros derivados de purina y análogos, como antes discutido. Usos según la presente invención pueden prevenir grandes y pequeñas disfunciones nerviosas sensoriales en la diabetes.

30 [0018] La brotación del nervio periférico puede ser brotación nociceptiva del nervio. La brotación nociceptiva del nervio puede suceder sin la inducción de hiperalgesia.

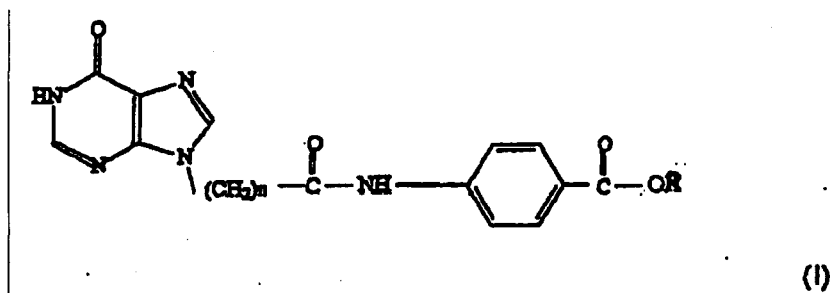
[0019] Normalmente, un compuesto útil en la presente invención es capaz de eludir la barrera hematoencefálica.

[0020] Más específicamente, como se detalla abajo en el Ejemplo, AIT-082 administrado
35 sistemáticamente imita estrechamente los efectos tanto de niveles incrementados de NGF endógenos como de NGF exógenos. El compuesto induce brotación vigorosa colateral, y la brotación que indujo se bloqueó por tratamiento anti-NGF sistémico. El crecimiento de tal tejido nervioso es evocado y mantenido completamente por los niveles incrementados de NGF en

piel adyacente sin nervio. Sin embargo, AIT-082 recuerda más los efectos de NGF endógeno aumentado que de NGF exógeno, porque no induce hiperalgesia.

[0021] El compuesto que tiene la actividad contra la neuropatía periférica inducida por una patología es compuesto de fórmula (I)

5

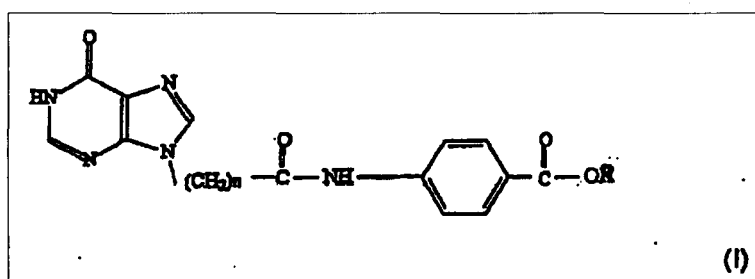


en donde n es un entero de 1 to 6 y R es hidrógeno o alquilo C₁ a C₆, o su sal. Normalmente, el compuesto es un compuesto de fórmula (I) donde n es un entero de 1 to 6 y R es hidrógeno o bajo alquilo. Normalmente, R es hidrógeno, y el compuesto es ácido benzoico N-4-[[3-(6-oxo-1,6-dihidropurina-9-il)-1-oxopropil] amino], designado AIT-082. Alternativamente, R es etilo y el compuesto es éster etílico de ácido benzoico N-4-[[3-(6-oxo-1,6-dihidropurina-9-il)-1-oxopropil] amino].

10

[0022] Cuando la fracción de purina es hipoxantina, un derivado preferido de purina es un compuesto de fórmula (I)

15



en el que n es un entero de 1 to 6, o de una sal de fórmula (I), en la que n es un entero de 1 to 6. Normalmente, el derivado de purina es es un compuesto de fórmula (I) en el que n es un entero de 1 to 6. Preferiblemente, n es 2 y el compuesto es propanamida N-4-carboxifenil-3-(6-oxohidropurina-8-il), también conocido como AIT-082. La actividad de este compuesto se describe adicionalmente en el Ejemplo.

20

[0023] Conforme a la presente invención, y como se usa aquí, los siguientes términos, cuando aparecen solos o como parte de una fracción incluyendo otros átomos o grupos, son definidos con los siguientes significados, a menos que sea expuesto explícitamente de otro modo. Además, todos los grupos aquí descritos pueden ser opcionalmente sustituidos a menos que tal sustitución sea excluida. El término "alquilo," como se usa aquí en todos los casos, hace referencia a grupos alifáticos saturados incluyendo cadena lineal, cadena ramificada, y grupos cíclicos, todos que pueden ser sustituidos de manera opcional. Grupos de alquilo preferidos

25

contienen de 1 a 10 átomos de carbono. Grupos adecuados de alquilo incluyen metilo, etilo, y similares, y pueden ser sustituidos de modo opcional. El término "alquenil," como se usa aquí en todos los casos, se refiere a grupos insaturados que contienen al menos un enlace doble carbono - carbono e incluye cadena lineal, cadena ramificada, y grupos cíclicos, todos los cuales pueden ser sustituidos de modo opcional. Grupos alquenil preferidos tienen de 2 a 10 átomos de carbono. El término "alcoxi" se refiere al éter -O-alquilo, donde alquilo es definido como antes. El término "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen al menos un anillo teniendo un sistema conjugado de electrones π e incluye arilo y biarilo carbocíclico, ambos de los cuales pueden ser opcionalmente sustituidos. Grupos arilo preferidos tienen de 6 a 10 átomos de carbono. El término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo. Grupos adecuado aralquilo incluyen bencilo y similares; esos grupos pueden ser opcionalmente sustituidos. El término "aralquenilo" se refiere a un grupo de alquenilo sustituido con un grupo arilo. El término "heteroarilo" se refiere a radicales insaturados cíclicos conteniendo de 5-14 elementos conteniendo uno, dos, tres, o cuatro heteroátomos O, N, o S y teniendo 6, 10, o 14 π -electrones deslocalizados en uno o más anillos, por ejemplo, piridina, oxazol, indol, tiazol, isoxazol, pirazol, pirrol, cada uno de los cuales puede ser sustituido de modo opcional como se trata arriba. El término "sulfonilo" se refiere al grupo -S(O₂)-. El término "alcanoilo" se refiere al grupo -C(O)R_g, donde R_g es alquilo. El término "aroilo" se refiere al grupo -C(O)R_g, donde R_g es arilo. Radicales compuestos similares comprendiendo un grupo de carbonilo y otros grupos se definen por analogía. El término "aminocarbonilo" se refiere a -NHC(O)-. El término "oxicarbanilo" se refiere al grupo -OC(O)-. El término "heteroaralquenilo" se refiere a un grupo de alquilo sustituido con un grupo heteroarilo. De igual modo, el término "heteroaralquenilo" se refiera a un grupo de alquenilo sustituido con un grupo heteroarilo. Como se usa aquí, el término "inferior", en referencia a un alquilo o la parte de alquilo de otro grupo incluyendo alquilo, es definida como un grupo conteniendo de uno a seis átomos de carbono. El término "sustituido opcionalmente" se refiere a uno o mas sustituyentes que pueden ser alquilo inferior, aril, amino, hidroxil, alcoxi inferior, ariloxi, alquiloamino inferior, arilamino, alquilotio inferior, ariltio, o oxo, en algunos casos, otros grupos pueden ser incluidos, tal como ciano, acetoxi, o halo. El término "halo" se refiere generalmente a flúor, cloro, bromo, o yodo; más normalmente, "halo" se refiere a cloro.

[0024] Preferentemente, un compuesto útil en métodos según la presente invención tiene un log P desde cerca de 1 a alrededor 4 para optimizar la disponibilidad biológica y la penetración CNS del compuesto.

[0025] Como se detalla abajo en el Ejemplo, se cree que los compuestos usados según la presente invención ejercen su actividad a través de la regulación al alza de síntesis de factor neurotrófico. La regulación al alza de la síntesis del factor neurotrófico puede comprender uno o más de esos factores neurotróficos: NGF, NT-3, BDNF, y NT-4/5.

[0026] Estudios a modo de ejemplo y tratamientos fueron realizados como se trata abajo

usando varias dosis y rutas de administración de compuestos seleccionados a modo de ejemplo representativos de composiciones que son efectivas con la presente invención. Por supuesto, aquellos entendidos en la materia reconocerán que la presente invención no esta específicamente limitada a las composiciones particulares, dosis o rutas de administración detalladas abajo.

[0027] Dependiendo de las particulares necesidades del sujeto individual involucrado, las composiciones usadas en la presente invención pueden ser administradas en varias dosis para proporcionar concentraciones efectivas de tratamiento basadas en las enseñanzas de la presente invención. Lo que constituye una cantidad efectiva de la composición seleccionada variará dependiendo de factores tales que incluyan la actividad del compuesto seleccionado, las características fisiológicas del sujeto, la extensión y naturaleza de la enfermedad o estado del sujeto y el método de administración. Concentraciones de tratamiento a modo de ejemplo que han probado efectividad en modificar índices de actividad neuronal desde menos de 1 μ M a concentraciones de 500 mM o más. Generalmente, las dosis iniciales serán modificadas para determinar la dosis optima para el tratamiento de un sujeto mamifero en particular. Las composiciones pueden ser administradas usando un número de diferentes vias incluyendo inyeccion oral, tópica, transdérmica, intraperitoneal o inyección intravenosa directamente en la corriente sanguínea. Por supuesto, cantidades efectivas de los compuestos pueden ser administrados también por inyección dentro del fluido cerebroespinal o infusión directamente dentro del cerebro, en caso de desearse.

[0028] La presente invención puede ser puesta en práctica usando compuestos administrados a un sujeto mamifero bien solas o en combinación como una formulación farmacéutica. Además, los compuestos pueden ser combinados con excipientes permitidos farmacéuticamente y materiales portadores tales como disolventes sólidos inertes, soluciones acuosas o disolventes orgánicos no tóxicos. Si se desea, estas formulas farmacéuticas pueden también contener conservantes y agentes estabilizantes y similares, asi como cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, asi como agentes tampón de pH y similares que mejoran la efectividad del ingrediente activo. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser elegido de aquellos generalmente conocidos en la materia, incluyendo, pero no limitado a, albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, dextrosa, aluminio, lecitina, sustancias tampón tales como fosfato, glicina, acido sorbico, sorbato de potasio, propilenglicol, polietilenglicol, y sales o electrolitos tales como sulfato de protamino, cloruro sódico, o cloruro potásico. Otros portadores pueden ser usados.

[0029] Las composiciones liquidas pueden también contener fases liquidas bien en adición a o con la exclusión de agua. Ejemplos de tales fases liquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como etil oleato, y emulsiones aceite-agua.

[0030] Las composiciones pueden ser hechas en formaciones de aerosol (es decir, pueden ser

“nebulizadas”) para ser administradas por medio de inhalación. Formulaciones de aerosol pueden ser colocadas dentro de propulsores aceptables presurizados, tales como diclorometano, propano, o nitrógeno. Otros propulsores adecuados son conocidos en la técnica.

[0031] Formulas adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intravenosa, intramuscular, intradérmica, y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas. Estas pueden contener antioxidantes, buffers, conservantes, agentes bacterioestáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del particular receptor. De manera alternativa, estas formulaciones pueden ser suspensiones estériles no acuosas que pueden incluir agentes en suspensión, agentes espesantes, solubilizantes, estabilizadores, y conservantes. Las composiciones adecuadas para usar en métodos según la presente invención pueden ser administradas, por ejemplo, por infusión intravenosa, oralmente, tópicamente, intraperitonealmente, intravesiculamente, o intratecalmente. Formulaciones de compuestos adecuadas para el uso en métodos según la presente invención pueden ser presentadas en recipientes sellados unidos o multidosis, en formas físicas tales como ampollas o viales.

[0032] La neuropatía periférica inducida por enfermedad a ser tratada puede ser neuropatía diabética o puede ser neuropatía periférica que surge como resultado de otro estado, tal como, pero no limitada a, acromegalia, hipotiroidismo, SIDA, lepra, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, periarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis craneal, y sarcoidosis.

[0033] Aunque los solicitantes no tienen intención de ser limitados por esta teoría, los efectos beneficiosos de los derivados bifuncionales de purina tales como AIT-082 pueden depender de mecanismos tróficos generalizados y sensibles a NGF y no meramente de la inducción de brotación. Estos efectos tróficos puede impulsar la capacidad de las neuronas sensibles a NGF para responder a unos factores de regeneración aun desconocidos distintos al propio NGF. Por ejemplo, es probable que la expresión de CGRP y sustancia P aumente con el tratamiento con AIT-082 u otros derivados bifuncionales de purina. Los usos según la presente invención pueden también evitar grandes y pequeños disfunciones sensoriales de nervios en la diabetes.

[0034] La invención es ilustrada por los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos son presentados como ilustración únicamente y no con la intención de limitar la invención.

EJEMPLO 1

La Administración de Derivados Bifuncionales de Purina N-4-Carboxifenilo-3-(6-Oxohidropurina-9-ilo) Propanamida Induce Brotación Nociceptiva de Nervio

[0035] El propósito de este estudio era evaluar los efectos de AIT-082 en el sistema nervioso periférico (PNS), centrándose en la bien caracterizada brotación colateral dependiente del factor (NGF) de crecimiento de nervio de nervios nociceptivos dentro de piel denervada y dentro de la piel parcialmente denervada (Nixon et al., 1984; Doucette and Diamond 1987). La

inducción y el mantenimiento de esta brotación son provocados por NGF endógeno (Diamond et al., 1992), el cual incrementa en piel sin nervio ambos a causa de una expresión de NGF mRNA incrementado (Mearow et al., 1993), y porque NGF ya no es aceptado dentro de extremos eliminados de nervio (Korsching and Thoenen, 1985). NGF inyectado sistémicamente induce brotación en piel normal, mejora un brotación en curso en piel denervada adyacente, y puede restaurar una brotación reducida por tratamiento concomitante anti-NGF (Diamond et al., 1992; Pertens et al., 1999). La utilidad clínica del NGF exógeno es limitada severamente porque causa hiperalgesia (Lewin et al., 1993, 1994). AIT-082 puede regular al alza la expresión de factores neurotróficos, incluyendo NGF. Por ello, elegimos examinar el alcance en el que las inyecciones AIT-082 imitarían al NGF exógeno, y si así fuera, descubrir si sus efectos se debían a una acción directa sobre las neuronas, o por medio de una regulación al alza inducida por AIT-082 de NGF endógeno. Dado que AIT-082 podría tener aplicaciones terapéuticas y que el NGF exógeno causa hiperalgesia también examinamos si su administración sistémica induce hiperalgesia.

MÉTODOS

[0036] Todos los procedimientos animales usados en estos estudios fueron aprobados por el Institucional Animal Research Ethics Board, y son conformes con las directrices NIH. En experimentos terminales los animales fueron sacrificados mientras estaban anestesiados con pentobarbitona sódica, 45 mg/kg (inyectada intraperitonealmente, o i.p.), que fue usada para todos los procedimientos operativos y durante sesiones electrofisiológicas de grabación. Los mapeados de campo nociceptivo se hicieron usando 35 mg/kg de pentobarbitona, que permite que el reflejo CTM (ver abajo) sea provocado mientras se mantiene el estado anestésico.

[0037] "Aislamiento" de campos sensoriales: Este procedimiento, el paso inicial en el estudio de brotación colateral, fue hecho como se describe en Diamond et al. (1992). Su propósito era aislar el territorio de inervación cutánea, o campo, de un nervio seleccionado dentro de un vasto entorno de piel circundante sin nervio. El nervio usado fue la rama media del nervio dorsal cutáneo izquierdo (DCN), a nivel segmental T13 (mDCN-T13). El aislamiento de su campo fue logrado eliminando quirúrgicamente en el lado izquierdo los 4 DCNs inmediatamente rostrales y caudales a DCN-T13 (respectivamente T9 -T12 y L1-L4), la rama lateral de DCN-T13, y los 4 nervios cutáneos laterales que suministran la piel de flanco adyacente al territorio DCN-T13.

[0038] Cartografía de campos sensoriales: Como se describe en Nixon et al. (1984) y Doucette and Diamond (1987), las fronteras de campos mecánico-nociceptivo y term-nociceptivo aislados, servidos respectivamente por las fibras mDCNT13 Aδ y C, fueron determinadas aplicando sistemáticamente a lo largo de la piel pellizcos forceps (para nocicepción mecánica) y aplicaciones breves de una sonda térmica de 60°C (para nocicepción térmica); la presencia de extremos nociceptivos es indicada durante estos procedimientos cuando los estímulos provocan la respuesta "reflejo CTM", una contracción del músculo

subyacente *cutaneus trunci*, que causa un tirón de piel característico y fácilmente reconocido (Theriault and Diamond, 1988). Los campos de bajo umbral ("toque") fueron medidos electrofisiológicamente como se ha descrito por Jackson and Diamond (1984). El DCN-T13 fue colocado a lo largo de electrodos bipolares de platino que se cargan a un preamplificador y de ahí a un osciloscopio y un amplificador de audio. Cepillar piel sin nervio con una cerda fina genera impulsos en los axones grandes A β mielinados, produciendo respuestas audibles que desaparecen abruptamente cuando la cerda cruza dentro del territorio sin nervio. Las áreas de los territorios cutáneos de las tres modalidades sensoriales estudiadas ("pellizco", "calor" and "toque") fueron medidas usando el sistema de análisis de imagen MCID (Imaging Research, Inc., St. Catharines, Ontario, Canada).

[0039] Medición de brotación colateral: La brotación colateral de fibras de pellizco y calor en el DCN-T13, y la regeneración axonal de estas y de los axones de toque (A β) que no se someten a brotación colateral en animales adultos (Jackson and Diamond, 1984; Yasargil et al., 1988) fueron medidas por recartografiados periódicos del campo. Estas re-cartografías revelaron la progresiva expansión de las áreas nociceptivas mDCN-T13d inicialmente aisladas dentro de la piel denervada circundante mientras se producía la brotación colateral (Nixon et al., 1984; Doucette and Diamond, 1987).

[0040] Detección de hiperalgesia: Las respuestas nociceptivas fueron estudiadas en animales ligeramente restringidos como descrito en Pertens et al. (1999), usando la latencia de contracción de pies de un baño de pies a 49°C, la temperatura del baño de pies a la cual la contracción se inició, y los umbrales de calor para evocar el reflejo "CTM" de piel trasera (ver arriba). La hiperalgesia es definida aquí como una disminución del umbral de un estímulo nociceptivo requerido para producir una respuesta refleja, y/o una reducción en la latencia de esa respuesta.

[0041] Administración de AIT-082: AIT-082 fue obtenido de NeoTherapeutics Inc., Irvine, California, USA. Una solución diferente de 50 mg/ml en 0.9% NaCl estéril fue preparada cada tres días. El protocolo de administración estándar era una inyección i.p. diaria de 50 mg/kg AIT-082. Un estudio de respuesta a dosis limitada (no ilustrado) confirmó que este tratamiento estaba bien por encima del umbral para inducir brotación nociceptiva, pero por debajo de niveles de saturación para esta respuesta.

[0042] Preparación de NGF y su antisuero: La preparación y purificación del factor de crecimiento de nervio (2.5S NGF or 7S NGF) de glándulas salivares de ratones machos y de antisuero anti-NGF (anti-NGF) de ovejas adultas, y la evaluación de potencia en pruebas funcionales, fueron realizadas como se describe en detalle en Diamond et al. (1992).

[0043] Administración de antisuero anti-NGF: Inyecciones subcutáneas fueron hechas en la región de la ingle groin (no en la región de piel posterior bajo estudio) El tratamiento anti-NGF de dosis "baja", o "adecuada", referida a lo último tenía un título biológico de 1:3300, y fue usado a 0.3 ml/250 gm; el anti-NGF "alto" o "supramáximo" tiene un título de 1:10000 y fue

usado a 0.5 ml/250 gm.

RESULTADOS

1. *AIT-082 induce brotación de nervio sensorial en piel normalmente innervada, pero únicamente de fibras sensibles a NGF.*

5 **[0044]** Aquí informamos de si AIT-082 induciría brotación morfológicamente demostrable, y expansiones asociadas de campo, dentro de piel normalmente innervada. Dos grupos de ratas sin operar fueron inyectadas diariamente con o bien AIT-082 (50 mg/kg) o solución salina durante 20 días. El territorio de innervación de mDCN-T13 fue entonces aislado en cada animal, como explicado en Métodos, para permitir la medición de las dos áreas nociceptivas de
10 innervación (el campo de calor y el campo de pellizco) por cartografía de comportamiento, y el campo de toque, subservido por las fibras A β insensibles a NGF (Diamond et al., 1987) por cartografía electrofisiológica. Los resultados son mostrados en la Figura 1a y 1b; los dos campos nociceptivos, pellizco y calor, se habían expandido significativamente en los animales recibiendo tratamiento AIT-082, pero los campos de toque no fueron afectados.

15 2. *AIT-082 mejora la brotación nociceptiva en piel adyacente denervada.*

[0045] Este experimento examinó si la inducción de brotación por AIT-082 descrita arriba era aditiva a una brotación colateral en curso dentro de piel adyacente sin nervio. Inmediatamente después del aislamiento estándar y cartografía del campo del mDCN-T13 seleccionado en dos grupos de ratas, un régimen diario de inyecciones de AIT-082 fue establecido en un grupo, con
20 el segundo grupo recibiendo solución salina. El cartografiado fue repetido cada 3 o 4 días a partir de entonces. Comenzando en unos 13 días tras el aislamiento, una expansión incrementada de los campos nociceptivos se vuelve evidente en el grupo de AIT-082 respecto a los crecimientos en el grupo de control (Figura 2). A causa de que los crecimientos de campo son representados aquí como un ratio (área de campo en el tiempo seleccionado respecto al
25 área de campo inicial), una comparación directa entre estos datos y los de la Figura 1 no es posible. Sin embargo, fue lograda una comparación usando los datos sin procesar que fueron a construir las Figuras 1 y 2; ello mostró que después de 20 días de tratamiento, la cantidad en la cual los crecimientos de campo en el grupo de brotación AIT-082 excedieron las expansiones en los controles era aproximadamente igual a la expansión de áreas de campo en animales sin
30 operar tras 20 días de tratamiento de AIT-082 (mostrado en la Figura 1).

3. *AIT-082 rescata una brotación bloqueada por un tratamiento anti-NGF simplemente adecuado, pero no uno bloqueado por tratamiento supramáximo.*

[0046] El objetivo aquí era descubrir cómo la brotación inducida por AIT-082 era afectada por un tratamiento anti-NGF conocido para inhibir brotación colateral espontánea (Diamond et al.,
35 1992). AIT-082 fue administrado diariamente a lo largo de todo el periodo de paradigma de brotación modelo, exactamente como en el experimento descrito en la Figura 2, pero en este ejemplo fue también administrado anti-NGF diariamente. En un grupo de animales la dosis de anti-NGF fue seleccionada para ser justo adecuada para bloquear la brotación colateral por sí

misma, mientras en un segundo grupo la dosis de anti-NGF era unas 5 veces esta dosis de "umbral" (ver Métodos). Los campos de pellizco y calor fueron medidos después de 22 días en todos los animales. Como se ve en la Figura 3, AIT-082 salvó totalmente la brotación que de otro modo habría sido bloqueada por el tratamiento anti-NGF de umbral ("bajo"), pero la brotación continuó estando ausente en los animales recibiendo el tratamiento anti-NGF "supra-umbral" ("alto").

4. AIT-082 no causa hiperalgesia.

[0047] Grupos de animales sin operar que habían recibido la administración de AIT-082 estándar que causó crecimientos de campo nociceptivo como las mostradas en la figura 1 fueron examinados en diversos momentos para la presencia de hiperalgesia. Como se ve en la figura 4, un número de pruebas reconocidas para hiperalgesia fallaron en proporcionar cualquier indicio para la ocurrencia de este fenómeno en momento alguno durante o después de un tratamiento por AIT-082 que inducía brotación.

DISCUSIÓN

AIT-082 promueve brotación nociceptiva por medio de una regulación al alza de NGF endógeno.

[0048] El presente estudio muestra primeramente que el AIT-082 administrado sistémicamente ocasiona una brotación colateral marcada de nervios nociceptivos en ratas adultas, a brotación normalmente llevada enteramente por de NGF derivado de piel (Diamond et al., 1992). Sin embargo, AIT-082 no evoca brotación de las fibras sensoriales A β no nociceptivas, las cuales son insensibles a NGF (Diamond et al., 1992). La administración de AIT-082 así provoca una hiper-inervación nociceptiva de la piel en animales sin operar, y mejora una brotación nociceptiva en curso conducida por NGF dentro de la piel sin nervio adyacente. El incremento absoluto que AIT-082 produjo en tal brotación en curso era aproximadamente igual a la cantidad brotación *de novo* (medida por la expansión de campo) que indujo en la piel normalmente inervada de animales sin operar. En todos estos aspectos, inyecciones de AIT-082 imitaron los efectos de inyecciones de NGF (Diamond et al., 1992).

[0049] El segundo mayor hallazgo es que la brotación inducida por AIT-082 no se logra por medio de una acción directa sobre las neuronas nociceptivas, sino que es secundaria a su acción de regular al alza los niveles de NGF *endógeno*. Un bloqueo de brotación espontánea dentro de piel denervada adyacente producido por un tratamiento de anti-NGF justo adecuado fue completamente revertido por administración de AIT-082, pero la propia brotación inducida por AIT-082 fue evitada cuando la dosis de anti-NGF fue incrementada aproximadamente 5 veces.

Implicaciones clínicas de los presentes hallazgos.

[0050] Existe prueba cada vez mayor que el soporte neurotrófico deficiente, incluyendo el provisto a los nervios cutáneos por NGF, contribuye a la patogénesis de las neuropatías periféricas más comunes, neuropatía diabética (Anand, 1996; Tomlinson et al., 1997), y ciertamente pruebas clínicas de NGF como un tratamiento para esta condición están aún en

progreso (Apfel, 1998). Un soporte indirecto para este enfoque terapéutico viene de nuestros hallazgos anteriores (Diamond et al., 1988; 1992) de que la privación crónica de NGF causa un estrechamiento de campos nociceptivos en la piel coherente con una neuropatía de "degeneración retrógrada". La administración de AIT-082, si fuera para inducir aumentos de NGF endógeno en la piel de individuos diabéticos, podría ayudar a proteger neuronas sensibles a NGF de la amenaza de neuropatía diabética, sin el riesgo de hiperalgesia, como se explicó arriba.

REFERENCIAS

[0051] Las siguientes referencias son citadas en el Ejemplo.

- 10 Anand, P, Terenghi, G, Warner, G, Kaoperlman, P, Williams-Chestnut, RE, and Sinicropi, DV (1996) The role of endogenous nerve growth factor in human diabétic neuropathy. *Nature Medicine* 2:703-707.
- Apfel, S.C., Kessler, J.S., Adomato, B.T., Litchy, W.J., Sanders, C., and Rask, C.S. (1998) Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabétic polyneuropathy. NGF Study Group. *Neurology* 51:695-702.
- 15 Diamond J, Holmes M and Visheau B (1988) NGF-regulated plasticity in the adult nervous system. *Soc Neurosci Abstr* 14:245.6
- Diamond J, Coughlin M, MacIntyre L, Holmes M and Visheau B (1987) Evidence that endógenous nerve growth factor is responsible for the collateral sprouting, but not regeneration, of nociceptivo axons in adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6596-6600.
- 20 Diamond J, Coughlin M and Holmes M (1992) Endógenous NGF and impulses regulate the collateral sprouting of sensory nerves in the skin of the adult rat. *J. Neurosci* 12:1454-1466.
- Doucette R, Diamond J (1987) The normal and precocious sprouting of heat nociceptors in the skin of adult rats. *J. Comp. Neurol* 261:592-603.
- 25 Jackson PC, Diamond J (1984) Temporal and spatial constraints on the collateral sprouting of low-threshold mechanosensory nerves in the skin of rats. *J. Comp. Neurol* 226:336-345.
- Korsching S, Theonen H (1985) Nerve growth factor supply for sensory neurons: site of origin and competition with the sympathetic nervous system. *Neurosci Lett* 54:201-205.
- Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM (1993) Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci* 13:2136-2148.
- 30 Lewin GR, Rueff A, Mendell LM (1994) Periferal and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 6:1903-1912.
- Mearow KM, Kril Y, and Diamond J (1993) Increased NGF mRNA expression in denervated rat skin. *Neuroreport* 4:351-354.
- 35 Nixon BJ, Doucette R, Jackson P and Diamond J (1984) Impulse activity evokes precocious sprouting of nociceptivo nerves into denervated skin. *Somatosensory Res* 2:97-126.
- Pertens E, Urschel-Gybers BA, Holmes M, Pal R, Foerster A, Kril Y and Diamond J (1999) Intrapinal and behavioural consequences of NGF-induced nociceptivo sprouting and NGF

induced hyperalgesia compared in adult rats. J Comp Neurol 410:73-89.

Theriault E, Diamond J (1988) Nociceptivo cutáneo stimuli evoke localized contractions in a skeletal muscle. J Neurophysiol 60:446-462.

Tomlinson DR, Femyhough P and Diemel LT (1997) Role of neurotrofinos in diabético neuropathy and treatment with nerve growth factors. Diabetes 46 Suppl 2:S43-S49.

Yasargil GM, Macintyre L, Doucette R, Visheau B, Holmes M and Diamond J (1988) Axonal domains within shared touch domes in the rat: a comparison of their fate during conditions favoring collateral sprouting and following axonal regeneration. J Comp Neurol 270:301-312.

EJEMPLO 2

10 La administración del Derivado de Purina Bifuncional N-4-Carboxifenilo-3-(6-Oxohidropurina-9-ilo) Propanamida Evita Disfunción Nerviosa Sensorial a corto plazo

Ratas Diabéticas

[0052] el objetivo de este estudio era investigar el potencial terapeutico del análogo de purina AIT-082 para evitar transtornos nerviosos que se desarrollan en ratas diabéticas.

15 **Métodos**

[0053] Todos los procedimientos animales fueron aprobados por el comité local de asuntos animales y fueron realizados de acuerdo con las directrices de NIH sobre el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

[0054] Inducción de diabetes: Ratas Sprague-Dawley hembras adultas (250-275g) fueron puestas en ayuno durante la noche anterior a la inyección intraperitoneal de una solución elaborada recientemente de estreptozotocina en 0.9% de solución salina para entregar una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. Se restauró la alimentación y los animales fueron dejados durante 3 días antes de la determinación de niveles de glucosa en una muestra de sangre obtenida por medio de pinchazo en la cola. Los animales con niveles de glucosa >15 mmol/l fueron considerados diabéticos y usados en el estudio. El tratamiento con el AIT-082 comenzó en el día que fue confirmada la hiperglucemia. Los animales que no se mostraban como diabéticos en la primera prueba fueron redosificados con estreptozotocina y vueltos a ser probados 3 días después. Si se mostraban como diabéticos entonces era añadidos al estudio, si no eran omitidos.

[0055] Glucosa en sangre y plasma: Se midió la glucosa en sangre en muestras recién obtenidas usando un medidor de reflectancia operado por banda (Glucostix y Glucocheck). En la eutanasia, fue recogida sangre por pinchazo cardiaco y el plasma fue extraído y almacenado a -20 °C hasta que medición posterior de los niveles de glucosa por prueba espectrofotométrica usando el Trinder Kit (Sigma).

[0056] Velocidad de Conducción Nerviosa (NCV): Las ratas fueron anestasiadas con halotano (4% en O₂ para inducción, 2-3% para mantenimiento) y el nervio ciático expuesto por medio de una incisión en el flanco seguido por separación de musculatura subyacente por disección roma. Una sonda termistor fue colocada adyacente al nervio y la herida cerrada con

una grapa de piel y se colocó una segunda sonda, rectal. La temperatura nerviosa y rectal fue mantenida a 37°C por una lámpara de calor y compresa térmica conectada a un regulador de temperatura y las sondas termistor. El nervio fue estimulado (5v, pulso de onda cuadrada 0.05ms) por electrodos con aguja fina colocados en la entalla ciática y tendón de Aquiles y el

5 EMG evocado registrado de los músculos interoseos por medio de dos electrodos con aguja fina y visualizados en un osciloscopio de almacenado digital. La distancia entre los dos sitios de estimulación fue medida usando calibres de superficie y la NCV se calculó como la latencia entre las crestas de onda A α / β de la onda M (MNCV) o la onda H (SNCV) dividida por la distancia entre los dos lugares de estimulación. Las mediciones de NCV fueron hechas por

10 triplicado y la mediana usada para representar la NCV. Las sondas termistor fueron retiradas, la incisión de piel cerrada con pinzas de herida y cubiertas con Betadine y al animal se le retiró el halotano y se le controló hasta que recuperó la conciencia. Las ratas fueron entonces devueltas a sus jaulas con libre acceso a comida y agua.

[0057] Latencia de respuesta térmica: Se colocaron ratas en una camara de observación sobre la superficie (temperatura del suelo 30°C) de un Aparato Hargreaves modificado (UARD, San Diego CA) y se dejaron para aclimatarse durante 5 minutos. Para medición de latencia de respuesta termica, una fuente de calor (suministrando 4.5 amps para dar una latencia de retraimiento de pata de aproximadamente 10 segundos en ratas de control) era maniobrada bajo la pata trasera. La fuente de calor fue encendida manualmente y un cronómetro activado hasta

20 que se paraba automáticamente cuando la pata se movia (24 seg de tiempo de corte) El procedimiento fue repetido 4 veces en la misma pata en intervalos de 5 minutos y la mediana de valores de 2-4 usada para representar la latencia de respuesta térmica.

[0058] Prueba de formol: Las ratas fueron restringidas manualmente y se inyectó formol (50 μ l de solución 0.2%) subdérmicamente en el dorso de las patas traseras. Las ratas fueron

25 entonces colocadas en una cámara de observación y se contaron los comportamientos de contracción contados en bloques de un minuto cada 5 minutos durante 1 hora.

RESULTADOS

[0059] Fisiología general: las ratas diabéticas eran hiperglucémicas al final del estudio y AIT-082 no afectó a los niveles de glucosa de plasma en ratas de control o diabéticas. La diabetes

30 causó pérdida de peso corporal y esto no se alteró por el AIT-082.

[0060] SNCV (fibra sensorial grande): La diabetes redujo SNVC en las semanas 4 y 8. AIT-082 no tuvo efecto en ratas de control o sobre el déficit de SNCV a la semana 4. En la semana 8 hubo una mejora de SNCV dependiente de dosis en ratas diabéticas tratadas con AIT-082 (Figura 5).

[0061] Latencia de respuesta térmica (fibra sensorial pequeña): La diabetes produjo una hiperalgesia termica transitoria en la semana 4 que progresó a hipoalgesia en la semana 8. AIT-082 estuvo sin efecto en ratas de control. En ratas diabéticas, dosis de AIT-082 evitaron tanto hiperalgesia e hipoalgesia dependiendo de la dosis. La dosis alta (100 mg/kg) evitó

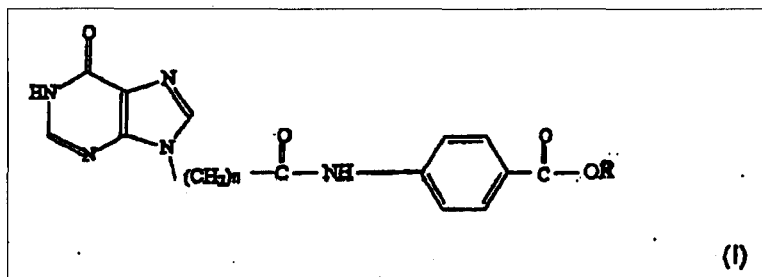
completamente tanto hiperalgesia en la semana 4 como hipoalgesia en la semana 8 (Figura 6).

[0062] Prueba de formol (neuronas sensoriales primarias con modulacion espinal): La diabetes produjo hiperalgesia marcada durante la prueba de formol (Figura 7). AIT-082 dependiente de dosis redujo la contracción de pies evocada por formol tanto en ratas de control como diabéticas. En ratas diabéticas la supresión de hiperalgesia fue notable en las fases 1, Q, y 2a (Figura 8). Estos datos sugieren una propiedad analgésica general de AIT-082 más que cualquier selectividad para hiperalgesia inducida por diabetes.

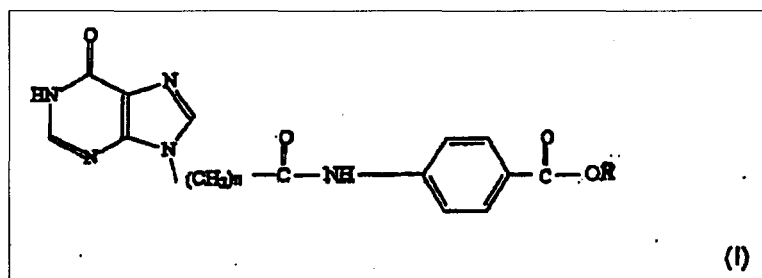
[0063] Conclusion: AIT-082 previno grandes y pequeñas disfunciones de nervios sensoriales en ratas diabéticas en periodos cortos.

VENTAJAS DE LA INVENCION

[0064] La presente invención proporciona nuevos usos para tratar pacientes con neuropatía periférica, incluyendo neuropatía diabética y otros tipos de neuropatía periférica, para inducir brotación nerviosa periférica, que incluye brotación nerviosa nociceptiva. Estos usos proporcionan regeneración nerviosa. Estos métodos pueden ser realizados, al menos en algunas alternativas, sin inducir hiperalgesia. Estos usos pueden combinarse con otros tratamientos para neuropatía periférica, incluyendo neuropatía diabética, tal como medidas paliativas para el alivio del dolor.

Reivindicaciones**1. Uso de un compuesto de fórmula (I)**

- 5 en el que n es un entero de 1 to 6 y R es hidrógeno o alquilo C₁ a C₆, o su sal, en la fabricación de un medicamento para tratar neuropatía periférica inducida por enfermedad.
2. El uso de la Reivindicación 1 donde el compuesto es un compuesto de fórmula (I) en el que n es un entero de 1 to 6 y R es hidrógeno o alquilo C₁ a C₆.
3. El uso de la Reivindicación 2 en donde R es hidrógeno.
- 10 4. El uso de la Reivindicación 3 en donde n es 2 y el compuesto es ácido benzoico N-4-[[3-(1,6-dihidro-6-oxo-purina-9-il)-1-oxopropil] amino].
5. El uso de la Reivindicación 2 en donde R es etilo.
6. El uso de la Reivindicación 5 en donde n es 2 y el compuesto es éster etílico de ácido benzoico N-4-[[3-(1,6-dihidro-6-oxo-purina-9-il)-1-oxopropil] amino].
- 15 7. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto es para inducir brotación nerviosa periférica en la piel del paciente.
8. El uso de la Reivindicación 7 en donde la brotación nerviosa periférica es brotación nerviosa nociceptiva.
9. El uso de la Reivindicación 8 en donde la brotación nerviosa nociceptiva es inducida sin la
- 20 ocurrencia de hiperalgnesia.
10. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en donde la neuropatía periférica inducida por enfermedad es neuropatía diabética.
11. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en donde la neuropatía periférica inducida por enfermedad es causada por una afección seleccionada de un grupo que consta de
- 25 acromegalia, hipotiroidismo, SIDA, lepra, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, periarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis craneal, and sarcoidosis.
12. Un compuesto de fórmula (I)



en el que n es un entero de 1 to 6 y R es hidrógeno o alquilo C_1 a C_6 , o su sal, en la fabricación de un medicamento para tratar neuropatía periférica inducida por enfermedad.

13. El compuesto para uso según la Reivindicación 12 en el que el compuesto es ácido benzoico N-4-[[3-(1,6-dihidro-6-oxo-purina-9-il)-1-oxopropil] amino].

14. El compuesto para uso según la Reivindicación 12 en el que el compuesto es éster etílico de ácido benzoico N-4-[[3-(1,6-dihidro-6-oxo-purina-9-il)-1-oxopropil] amino].

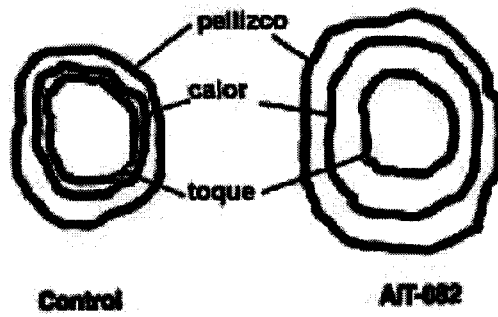


FIG. 1A

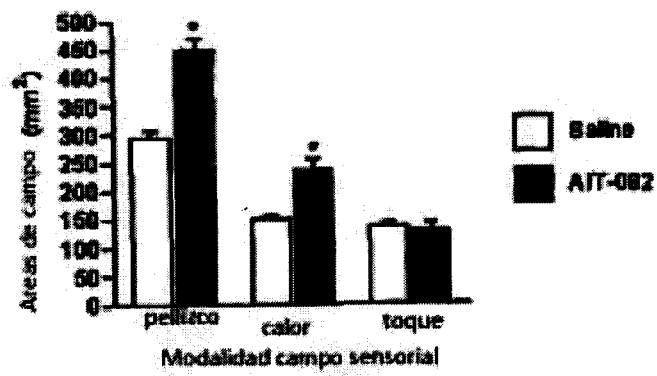


FIG. 1B

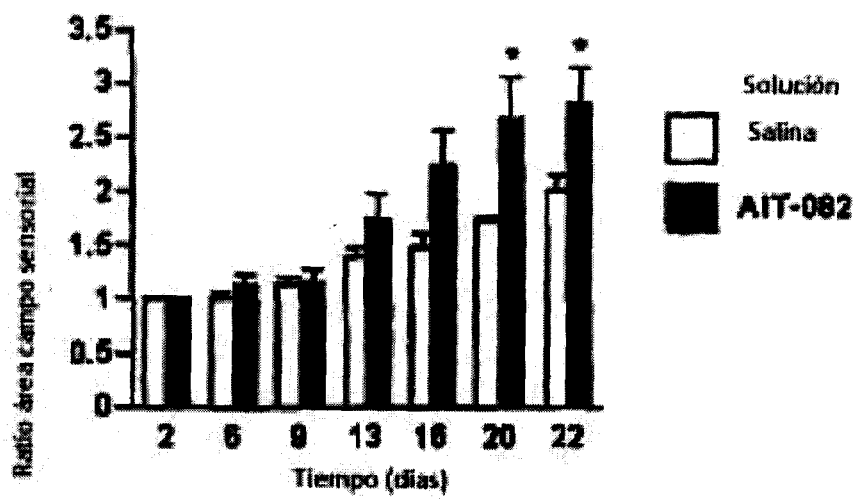


Fig. 2A

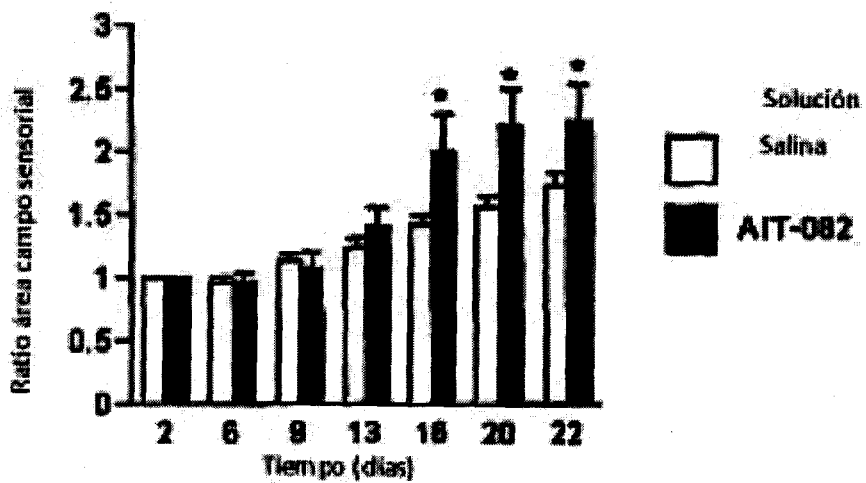


Fig. 2B

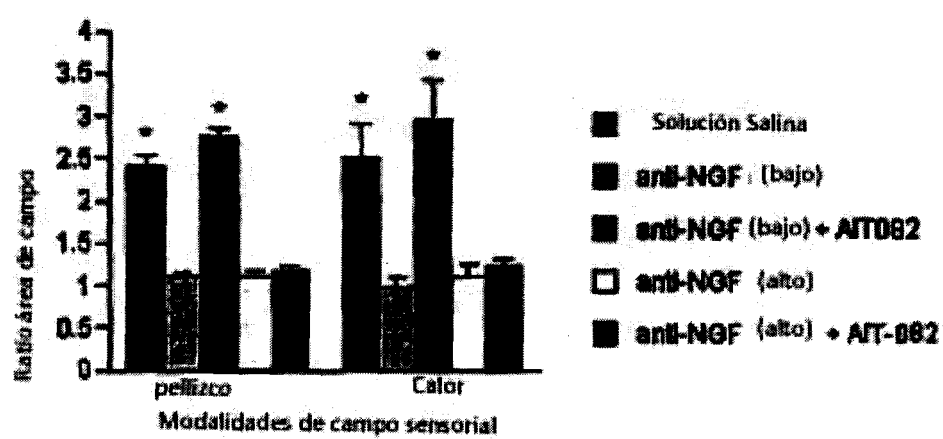


FIG.3

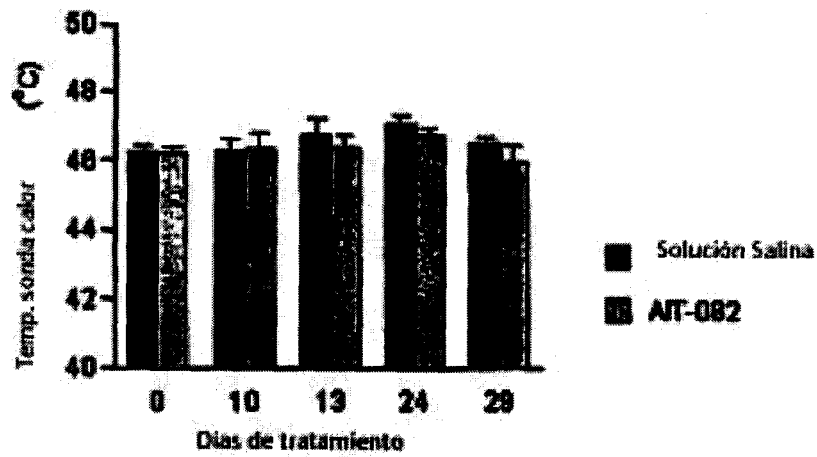


FIG. 4A

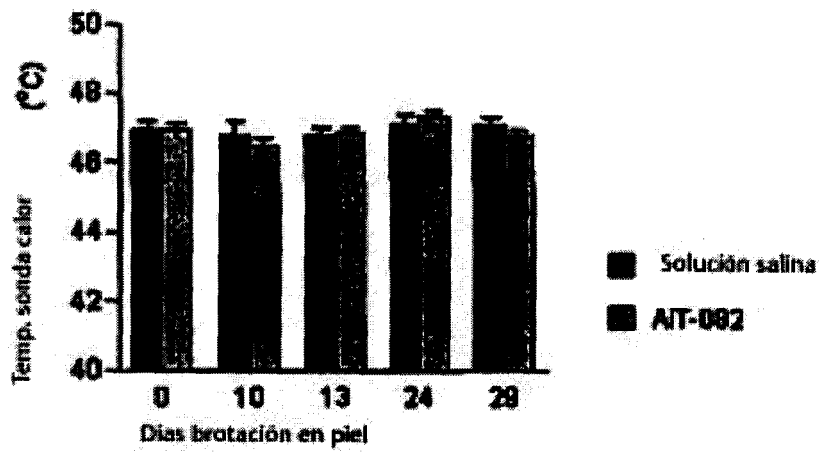


FIG. 4B

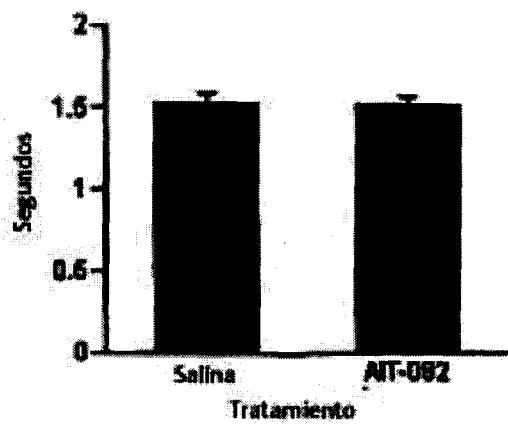


FIG. 4C

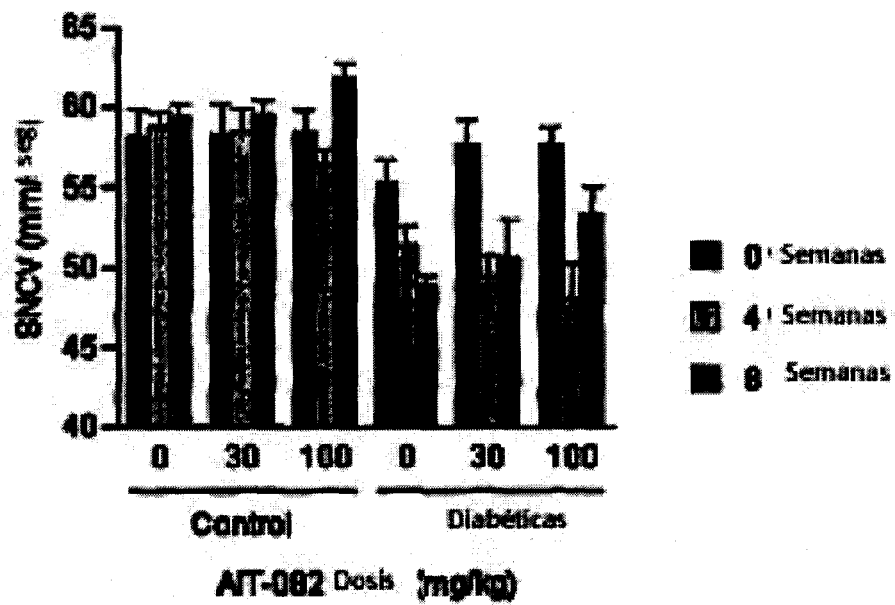


FIG. 5

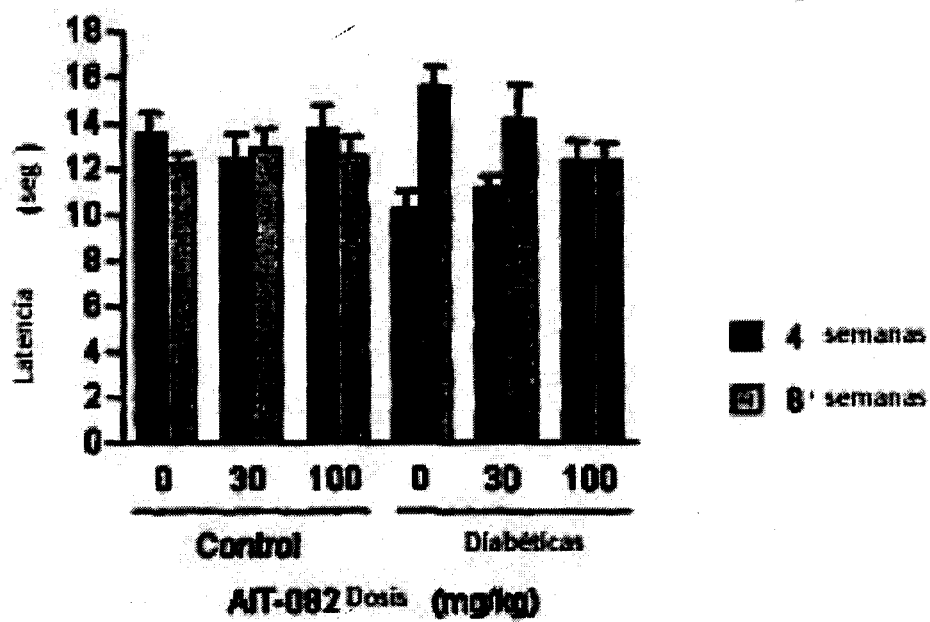


FIG. 6

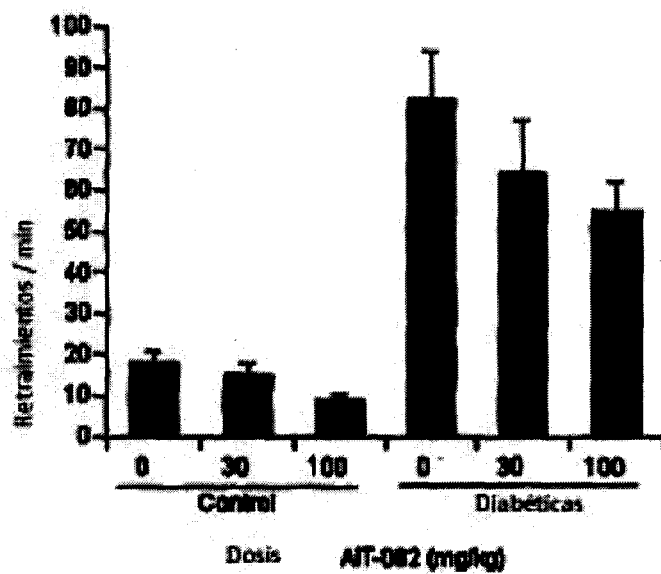


FIG. 7

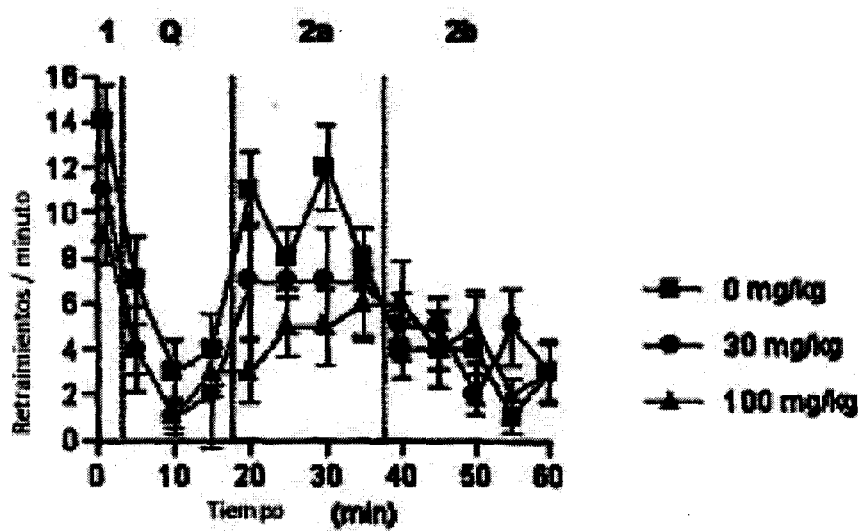


FIG. 8