

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 344**

51 Int. Cl.:

C07D 213/36 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08839876 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2210878**

54 Título: **Agente terapéutico para la vejiga hiperactiva**

30 Prioridad:

16.10.2007 JP 2007268785

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)
9-19, SHIMOSHINJO 3-CHOME
HIGASHIYODOGAWA-KU
OSAKA-SHI OSAKA 533-8651, JP**

72 Inventor/es:

**OKI, KENJI;
TSUJI, FUMIO;
SETOGUCHI, CHIKAKO;
SEKI, IWAO;
MURAI, MASAACKI y
SASANO, MINORU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 431 344 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

Agente terapéutico para la vejiga hiperactiva

La presente invención se refiere a un compuesto para una enfermedad mediada por el TRPV1, que contiene un derivado de urea como un principio activo.

5 El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que pertenece a la superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP), contiene seis dominios transmembranales y tiene una alta permeabilidad de iones calcio, y se llama también receptor vainilloide 1 (VR1) o receptor de la capsaicina. Como agonistas para el TRPV1 se conocen vainilloides tales como la capsaicina que es un componente picante del pimiento picante y la resiniferatoxina que es un derivado de capsaicina. Por otra parte, como antagonistas para el TRPV1 se conocen compuestos como la yodo-resiniferatoxina y la capsacepina.

El TRPV1 está situado principalmente en neuronas sensoriales, sin embargo, también es expresado en tejidos no neuronales así como en tejidos neuronales del epitelio, hueso, vejiga, tracto gastrointestinal, pulmón y muchos otros órganos viscerales.

15 Se sabe que el TRPV1 es activado por un estímulo nocivo tal como un ácido (pH 5,9 o inferior) o calor (43°C o superior), y los efectos fisiológicos producidos por la activación del TRPV1 son diversos (véase el documento de no patente 1).

La vejiga hiperactiva es una afección patológica con un síndrome que incluye la urgencia urinaria, micción frecuente e incontinencia urinaria. De acuerdo con el estudio epidemiológico realizado por la Sociedad de vejiga neurógena de Japón, la prevalencia de la vejiga hiperactiva en japoneses de 40 años o mayores es 12,4% y se calcula que el número total de pacientes con vejiga hiperactiva es aproximadamente 8,1 millones. La prevalencia tiene una alta correlación con el envejecimiento, y la prevalencia en los de 70 años o mayores alcanza 30% o más. Además, se ha mostrado que la calidad de vida (CdV) de los pacientes con vejiga hiperactiva es notablemente menor en una amplia variedad de casos que incluyen la vida diaria y el estado mental.

25 Como causas de la vejiga hiperactiva se conocen causas neurógenas tales como el trastorno cerebrovascular y lesión de la médula espinal, y causas no neurógenas tales como la obstrucción del tracto urinario inferior. Sin embargo, la mayoría de los casos son idiopáticos y la causa de la vejiga hiperactiva no se puede identificar, y se deduce que están implicados varios factores en combinación en el inicio de la vejiga hiperactiva. El tratamiento de la vejiga hiperactiva es principalmente la terapia con fármacos, y en particular, se usa un antagonista del receptor muscarínico en el tratamiento como fármaco de primera línea. Sin embargo, no se puede obtener un efecto terapéutico satisfactorio en algunos pacientes, y la observancia de la medicación a veces disminuye debido a la incomodidad tal como la sequedad de boca. Por lo tanto, se ha pedido un mayor desarrollo de un agente terapéutico para la vejiga hiperactiva (véase el documento de no patente 3 y documento de no patente 4).

Además, se considera que la activación del sistema nervioso simpático por la capsaicina a través del TRPV1 activa el metabolismo energético, que conduce a quemar grasa, es decir, antiobesidad.

35 A la luz de estas circunstancias, se han llevado a cabo estudios de si compuestos que tienen diferentes actividades se pueden aplicar a un agente terapéutico para una enfermedad mediada por TRPV1, sin embargo, los resultados no siempre son satisfactorios, y se han pedido más investigaciones para un agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1.

40 Por otra parte, el documento de patente 1 describe que un derivado de urea que es un principio activo en la presente invención, tiene una acción inhibitoria en la producción de TNF- α y se puede usar como agente terapéutico para una enfermedad autoinmunitaria tal como la artritis reumatoide (RA).

Documento de patente 1: JP-A-2002-53555

Documento de no patente 1: Dai, T. and Noguchi, K., Igaku no Ayumi (*Journal of Clinical and Experimental Medicine*), 2004, Vol. 211, No. 5, pp. 389-392

45 Documento de no patente 2: Igaku no Ayumi (*Journal of Clinical and Experimental Medicine*), Vol. 195, No. 9, 2000, 582-584, physiological Mechanism of pain generation, Tsunoda, T, and Hanaoka, K.

Documento de no patente 3: Guideline for Clinical Evaluation Methods of Drugs for Overactive Bladder (Notification No. 0628001 of the Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council of the Ministry of Health, Labour and Welfare)

50 Documento de no patente 4: *Folia Pharmacologica Japonica*, Vol. 129, No. 5, pp. 361-373

Documento de no patente 5: Kato, S. et al. , *G.I. Research*, Vol. 13, p. 367, 2005

El documento WO 2007/042906 A1 describe derivados benzocondensados sustituidos, que se pueden usar como

ligandos del receptor vainilloide, métodos para tratar con estas enfermedades, afecciones y/o trastornos modulados por receptores vainilloides, y procedimientos para prepararlos.

5 Un objetivo interesante es buscar un compuesto adecuado como agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1, en particular la vejiga hiperactiva, y encontrar un nuevo uso farmacéutico de un derivado de urea conocido.

Por lo tanto, los autores de la presente invención se centraron en derivados de urea conocidos representados por la siguiente fórmula general [I] útil como medicamento (documento JP-A-2002-53555) y llevaron a cabo estudios para buscar un agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1.

10 Como resultado, se ha encontrado que estos derivados de urea son agonistas del TRPV1. Además, se ha encontrado que estos derivados de urea son útiles como un agente terapéutico para enfermedades mediadas por el TRPV1, en particular la vejiga hiperactiva, porque los derivados tienen un efecto terapéutico en modelos experimentales de vejiga hiperactiva, realizando de esta forma la presente invención.

La invención se refiere a un compuesto como se define en la reivindicación 1.

En lo sucesivo, se describirán con detalle los respectivos grupos definidos en la fórmula general [I].

15 El sustituyente se refiere, por ejemplo, a un átomo de halógeno, un grupo trihalogenometilo, un grupo alquilo inferior, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo heterocíclico, o un grupo metoxi, preferiblemente se refiere a un átomo de halógeno, un grupo trihalogenometilo, un grupo ciclohexilo, un grupo fenilo, un grupo furanilo, un grupo tiofenilo, un grupo tiazolilo, o un grupo morfolinilo, y más preferiblemente se refiere a un grupo trihalogenometilo.

20 La sal de acuerdo con la invención no está particularmente limitada siempre que la sal sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos de las mismas incluyen sales con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, sales con un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico o un ácido tartárico, y sales con un metal alcalino o un metal alcalinotérreo tal como sodio, potasio o calcio. Además, las sales de amonio cuaternario del presente compuesto también están incluidas en la sal de acuerdo con la invención. Además, en el caso de que esté presente un isómero geométrico o un isómero óptico
25 del presente compuesto, dichos isómeros también están abarcados en el alcance de la presente invención. Además, el presente compuesto puede estar en forma de un hidrato o un solvato.

El agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1 según la invención, contiene como un principio activo, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

1-[2-(1-adamantil)etil]-1-pentil-3-[3-(4-piridil)propil]urea (Compuesto 1),

30 1-(2-(1-adamantil)etil)-3-[3-(4-piridil)propil]-1-(3,3,3-trifluoropropil)urea (Compuesto 2),

1-[3-(1-adamantil)propil]-1-propil-3-[3-(4-piridil)propil]urea (Compuesto 3),

1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[1-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea (Compuesto 4),

1-(2-(1-adamantil)etil)-3-[2-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea (Compuesto 5), y

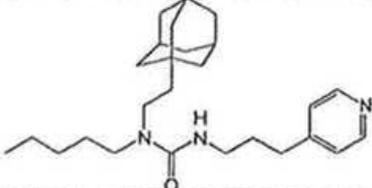
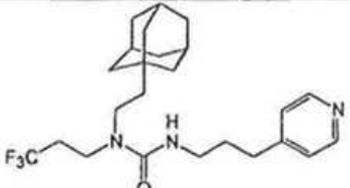
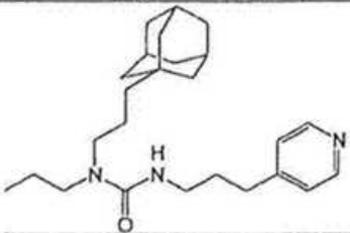
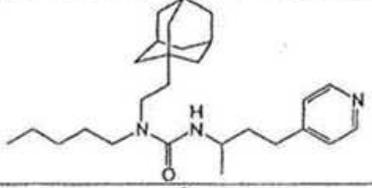
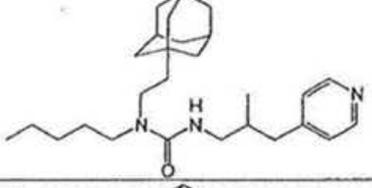
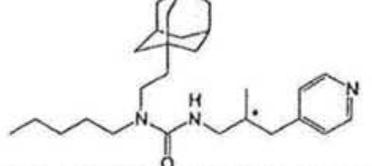
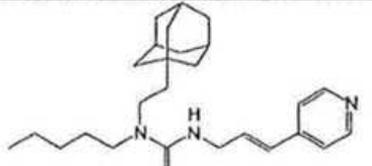
(+)-1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[2-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea (Compuesto 6),

35 como compuestos específicos preferidos entre los compuestos representados por la fórmula general [I] anterior, o una sal de los mismos.

Se prefiere en particular, un agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1 que contiene, como un principio activo, la 1-[2-(1-adamantil)etil]-1-pentil-3-[3-(4-piridil)propil]urea entre los compuestos 1 a 6 mencionados antes, o una sal del mismo.

40 Las fórmulas estructurales de los compuestos típicos incluidos en el presente compuesto se muestran a continuación.

Tabla 1

Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 4	
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7*	

* = referencia

El presente compuesto se puede preparar, por ejemplo, por el método descrito en el documento JP-A-2002-53555.

- 5 El término "dolor" como se usa en la memoria descriptiva se refiere a cualquier dolor independientemente de su naturaleza.

La expresión "receptor vainilloide" como se usa en la memoria descriptiva se refiere a cualquier receptor vainilloide tal como TRPV1 o TRPV2.

- 10 Con el fin de estudiar la utilidad del presente compuesto, primero se confirmó si el presente compuesto era o no un agonista del TRPV1. Como se describirá en detalle en la sección de "Ensayo farmacológico" a continuación, el

presente compuesto presentaba una mayor afinidad de unión para una muestra de membrana neuronal que contenía TRPV1 que la capsaicina que es un agonista conocido. Además, la acción del presente compuesto de promover la liberación de un neurotransmisor de un terminal neuronal era antagonizada por la capsacepina que es un antagonista del TRPV1.

5 Los ejemplos de la enfermedad mediada por TRPV1, es decir, la enfermedad mediada por el TRPV1, incluyen dolor, vejiga hiperactiva, disfunción gastrointestinal, obesidad, hipo, quemadura térmica producida por exposición al calor, quemadura química producida por exposición a un ácido y quemadura solar. Puesto que el presente compuesto tiene una excelente acción agonista del TRPV1, el compuesto es útil para el tratamiento de estas enfermedades mediadas por el TRPV1 y es particularmente útil como un agente terapéutico para la vejiga hiperactiva, entre estas enfermedades.

Se ha confirmado que el presente compuesto es útil como un agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1, mediante ensayos farmacológicos.

15 Recientemente, se confirmó la expresión del TRPV1 en células uroteliales, y se ha elucidado la relación entre micción y el TRPV1. Además, se ha publicado que un agonista del TRPV1 también es eficaz en la vejiga hiperactiva tanto neurogéna como no neurogéna, y Kuo et al. han publicado que un agonista del TRPV1 tal como la resiniferatoxina es clínicamente útil para el tratamiento de la vejiga hiperactiva (Kuo, H. et al., *The Journal of Urology* Vol. 176, pp. 641-645, 2006).

20 La actividad del presente compuesto como agente terapéutico para la vejiga hiperactiva se estudió usando un modelo de rata con infusión intravesical continua de disolución salina. Como se describirá con detalle en la sección de "Ensayo farmacológico" a continuación, el presente compuesto presentaba una notable actividad agonista del TRPV1 y presentaban un excelente efecto de prolongación del intervalo de micción en el modelo de rata con infusión intravesical continua de disolución salina, y por lo tanto es útil como un agente terapéutico para la vejiga hiperactiva, en particular para la urgencia urinaria, micción frecuente o incontinencia urinaria. El presente compuesto es útil como un agente terapéutico en particular para la vejiga hiperactiva neurogéna o no neurogéna. Los ejemplos de vejiga hiperactiva neurogéna incluyen vejiga hiperactiva que acompaña un trastorno del sistema nervioso central que se encuentra por encima de la protuberancia del tronco encefálico (tal como trastorno cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, demencia, tumor cerebral, encefalitis o meningitis) o trastorno de la médula espinal (tales como lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, ataxia espinocerebelosa, tumor de la médula espinal, espondilosis cervical, osificación del ligamento longitudinal posterior, estenosis espinal, trastorno vascular espinal, mielitis, o espina bífida), y los ejemplos de vejiga hiperactiva no neurogéna incluyen vejiga hiperactiva que acompaña a la obstrucción del tracto urinario inferior, vejiga hiperactiva que acompaña al envejecimiento, vejiga hiperactiva que acompaña al debilitamiento del suelo pélvico y vejiga hiperactiva idiopática.

35 El presente compuesto se puede administrar por vía parenteral u oral. Los ejemplos de la forma de dosificación incluyen un comprimido, una cápsula, un gránulo, un polvo, una inyección, una escayola, una pomada, una loción, una suspensión y una infusión intravesical. Se describen ejemplos de preparación del presente compuesto en los documentos JP-A-2002-53555 y JP-A-2003-226686, sin embargo, el método de preparación no está limitado a los métodos descritos en estos documentos de patente, y el presente compuesto se puede formular en una preparación usando una técnica ampliamente usada. Por ejemplo, una preparación oral tal como un comprimido, una cápsula, un gránulo o un polvo se pueden preparar por adición opcional al presente compuesto de un agente diluyente tal como lactosa, celulosa microcristalina, almidón o un aceite vegetal; un lubricante tal como estearato magnésico o talco; un aglutinante tal como hidroxipropilcelulosa o polivinilpirrolidona; un disgregante tal como carboximetilcelulosa de calcio o hidroxipropilmetilcelulosa de baja sustitución; un agente de recubrimiento tal como hidroxipropilmetilcelulosa, macrogol o una resina de silicona; o un agente de formación de película tal como una película de gelatina.

45 La dosis del presente compuesto se puede cambiar de forma adecuada dependiendo de los síntomas, la edad, forma de dosificación y similares. En el caso de una preparación oral, se puede administrar una vez o dividido en varias veces, en general con una dosis de 0,1 a 5000 mg, preferiblemente de 1 a 1000 mg por día.

Ejemplos

Ejemplo de preparación

50 A continuación se muestran ejemplos de preparación generales del presente compuesto como una preparación oral y una inyección.

1) Comprimido

Formulación 1 (en 100 mg)

	Presente compuesto	1 mg
	Lactosa	66,4 mg
55	Almidón de maíz	20 mg
	Carboximetilcelulosa de calcio	6 mg

Hidroxiopropilcelulosa	4 mg
Estearato magnésico	0,6 mg

5 Un comprimido de la formulación mencionada antes se recubre usando 2 mg de un agente de recubrimiento (por ejemplo, un agente de recubrimiento convencional tal como hidroxipropilmetilcelulosa, macrogol, o una resina de silicona), de modo que se puede obtener un comprimido recubierto objetivo (se puede aplicar lo mismo para un comprimido de la formulación siguiente). Además, se puede obtener un comprimido deseado cambiando de forma adecuada las cantidades del presente compuesto y los aditivos.

2) Cápsula

Formulación 1 (en 150 mg)

10	Presente compuesto	5 mg
	Lactosa	145 mg

Una cápsula deseada se puede obtener cambiando de forma adecuada la relación de mezcla del presente compuesto respecto a la lactosa.

3) Inyección

15 Formulación 1 (en 10 ml)

	Presente compuesto	de 10 a 100 mg
	Cloruro sódico	90 mg
	Hidróxido sódico	c.s.
	Ácido clorhídrico	c.s.
20	Agua purificada estéril	c.s.

Una inyección deseada se puede obtener cambiando de forma adecuada la relación de mezcla del presente compuesto respecto a los aditivos.

25 En lo sucesivo, se mostrarán los resultados de ensayos farmacológicos usando el presente compuesto, sin embargo, estos ejemplos son para entender bien la invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ensayo farmacológico

1. Actividad de unión del presente compuesto en una muestra de membrana de médula espinal de rata

30 Se sabe que el TRPV1 es expresado en neuronas sensoriales en la médula espinal de rata. Szallasi et al., han descrito la unión de la resiniferatoxina que es un agonista del TRPV1 a un receptor vainilloide contenido en una muestra de membrana, y también han descrito los resultados de un ensayo competitivo con capsacepina que es un antagonista de la capsaicina, usando una muestra de membrana neuronal de la médula espinal de rata (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 267, pp. 728-733). De acuerdo con el método de Szallasi et al., se estudió la actividad de unión del presente compuesto a un receptor vainilloide contenido en la muestra de membrana de médula espinal de rata.

35 Preparación de líquido que contiene compuesto ensayo, etc.

Se prepararon un líquido que contenía compuesto de ensayo y un líquido que contenía compuesto competitivo que contenían un compuesto de ensayo y un compuesto competitivo respectivamente, y cada uno compuesto de agua purificada que contenía 1% de DMSO. Como compuesto competitivo se usó resiniferatoxina marcada con tritio (³H-RTX), y la concentración de ³H-RTX en líquido que contenía compuesto competitivo se fijó en 0,2 nM.

40 Preparación de la muestra de membrana

Se homogeneizó médula espinal de rata según un procedimiento común, y el homogeneizado resultante se lavó varias veces, seguido de centrifugación. El sedimento resultante se suspendió en un tampón de incubación (HEPES 10 mM, pH 7,4, BSA 0,25 mg/ml, CaCl₂ 0,75 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 5,8 mM, sacarosa 137 mM) con 10 mg/ml, de modo que se preparó una muestra de membrana.

45 Ensayo de unión

Después de mezclar 5,25 µl de líquido que contenía compuesto de ensayo y 500 µl de muestra de membrana, se le añadieron 20 µl del líquido que contenía compuesto competitivo, y la mezcla resultante entera se incubó a 37°C durante 60 min. El complejo de membrana/³H-RTX resultante se recogió por filtración, seguido de lavado. Después, se midió la radiactividad con un contador de centelleo.

Análisis de los resultados del ensayo

El ensayo mencionado antes se llevó a cabo usando los líquidos que contenían compuesto de ensayo que contenían un compuesto de ensayo en diferentes concentraciones, y los resultados se analizaron como sigue.

5 La tasa de inhibición (%) del compuesto de ensayo en cada concentración se obtuvo a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{(Tasa de inhibición (\%))} = \{1 - [(\text{actividad de la unión en presencia del compuesto de ensayo (cpm)}) - (\text{radiactividad de la unión no específica (cpm)})] / [(\text{radiactividad de la unión total (cpm)}) - (\text{radiactividad de la unión no específica (cpm)})] \} \times 100$$

10 Posteriormente, se representaron gráficamente las tasas de inhibición en las respectivas concentraciones y se obtuvo la concentración inhibidora de 50% (CI₅₀) y el coeficiente de Hill, mediante un análisis de regresión no lineal. Como ecuación de regresión, se usó la siguiente ecuación logística de dos parámetros.

$$Y = \text{superior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / \{1 + 10^{[(\text{Log CI}_{50} - X) \times \text{coeficiente de Hill}]\}$$

15 En la ecuación, X representa el logaritmo de la concentración del compuesto; Y representa la tasa de inhibición (%). Y cambiaba desde el valor inferior al superior siguiendo una curva sigmoidea. Las tasas de inhibición de 0% y 100% se definieron como el valor inferior y superior, respectivamente.

Además, la constante de inhibición (valor de Ki) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación.

$$K_i = \text{CI}_{50} / (1 + (\text{concentración de ligando radiomarcado}) / (\text{constante de disociación}))$$

En la ecuación, para la constante de disociación, se usó una constante de disociación establecida en el mismo sistema de ensayo (0,046 nM como el receptor vainilloide).

20 Como resultados del ensayo del presente compuesto así obtenidos, se muestran como un ejemplo los resultados del ensayo del compuesto 1.

25 La curva de inhibición del compuesto 1 es como se muestra en la figura 1, y el valor de CI₅₀, valor de Ki y coeficiente de Hill del compuesto 1 frente al receptor vainilloide en la muestra de membrana neuronal de la médula espinal de rata eran 191 ± 28 nM (media ± ETM de los ensayos realizados por triplicado), 35,8 ± 5,2 nM, y 1,83 ± 0,449, respectivamente. Además el valor de CI₅₀ y el valor de Ki de la capsaicina obtenidos en el mismo sistema de ensayo eran 3,14 ± 0,76 μM y 0,587 ± 0,142 μM, respectivamente. A partir de estos resultados, se ha mostrado que el presente compuesto tiene una afinidad de unión extremadamente alta para el receptor vainilloide comparado con la capsaicina, que es un agonista conocido.

30 2. Efecto del presente compuesto en un sistema de liberación de CGRP inducida por un agonista del TRPV1 usando neuronas obtenidas de ganglios de las raíces dorsales (DRG) de rata

Se sabe que el TRPV1 es expresado en ganglios de las raíces dorsales (DRG) de rata, y que por activación de TRPV1, el CGRP, que es un neurotransmisor, es liberado de un terminal nervioso. Se estudió, según el método de Ahluwalia et al. (*European Journal of Neuroscience*, Vol. 17, p. 2611, 2003), la actividad de liberación de CGRP del presente compuesto en neuronas cultivadas obtenidas de DRG de rata.

35 Preparación del líquido que contiene compuesto de ensayo, etc.

40 Se pesó un compuesto de ensayo y se disolvió en DMSO. La disolución resultante se diluyó con un medio, de forma que se preparó un líquido que contenía compuesto de ensayo. Cada líquido que contenía compuesto de ensayo se preparó de modo que también contenía DMSO al 0,4%. Como control positivo, se usó capsaicina que es un agonista del TRPV1, y como compuesto competitivo contra el compuesto de ensayo, se usó capsacepina que es un antagonista del TRPV1, y se preparó de la misma forma un líquido que contenía compuesto competitivo.

Método de ensayo

45 Un ganglio de la raíz dorsal aislado de la médula espinal de una rata se seccionó y se trató enzimáticamente con una disolución de colagenasa/DNasa I a 37°C durante 1 h y después con una disolución de tripsina/DNasa I a 37°C durante 20 min. Las neuronas liberadas se lavaron y se recogieron, y después se sembraron en una placa de cultivo recubierta con poli-D-lisina/laminina y se cultivaron en condiciones de 37°C y CO₂ al 5% en un medio neuronal (medio de NGF/NCS) complementado con un factor de crecimiento nervioso durante 1 día. El medio se sustituyó por un medio de NGF/NCS que contenía arabinósido de citosina, y las neuronas se cultivaron más durante 2 días. El medio se sustituyó por un medio de NGF/NCS, y las neuronas se cultivaron durante 1 día. Después, las neuronas se cultivaron durante 30 min en presencia o ausencia de capsacepina, y después se añadió el compuesto 1 al medio y las neuronas se cultivaron durante 10 min. Después, se recogió el líquido sobrenadante.

La medición del CGRP en el líquido sobrenadante de cultivo se llevó a cabo usando un kit de ensayo basado en

ELISA disponible en el comercio según el protocolo adjunto con el kit. En el ensayo, cada grupo consistía en 3 ratas, y se obtuvieron la media y el ETM de la concentración de CGRP en cada líquido sobrenadante de cultivo en cada grupo. Se llevó a cabo el análisis estadístico con la prueba t de Student o la comparación múltiple de Dunnett.

Resultados del ensayo

- 5 Como ejemplos de los resultados del ensayo, en la figura 2 se muestran los resultados (media ± ETM) del estudio de sensibilidad de la dosis en la liberación de CGRP del compuesto 1 en ausencia de capsacepina, y en la figura 3 se muestran los resultados (media ± ETM) de un ensayo de inhibición competitivo para la acción de liberación de CGRP del compuesto 1 usando capsacepina 10 μM (concentración final). En estas figuras, ## indica que el valor P para la comparación con el grupo no tratado por la prueba t de Student es 1% o menor; ** indica que el valor P para la comparación con el grupo no tratado por la comparación múltiple de Dunnett es 1% o menor; y ++ indica que el valor P para la comparación con el grupo tratado con compuesto por la prueba t de Student es 1% o menor.

- 10 Como es evidente a partir de la figura 2, el compuesto 1 liberaba CGRP de una forma dependiente de la dosis y presentaba una acción de liberación de CGRP con una potencia comparable a la de la capsaicina que es el control positivo, con una concentración menor que la de la capsaicina. Por otra parte, como es evidente a partir de la tabla 3, la liberación de CGRP por el compuesto 1 era antagonizada por la capsacepina en una media comparable a la observada en el caso de la capsaicina. A partir de los resultados del ensayo, se mostró que el presente compuesto es un agonista específico del TRPV1.

A partir de los resultados de los ensayos farmacológicos descritos antes, se mostró que el presente compuesto es un excelente agonista del TRPV1.

- 20 3. Medición del influjo de calcio intracelular por el presente compuesto en células que expresan TRPV1 humano

Se sabe que el TRPV1 es un receptor de canal iónico y mediante la activación del TRPV1 se produce influjo de ion calcio intracelular. Se estudió según el método de Phelps et al. (*Eur. J. Pharmacol.*, 513: 57-66, 2005), la acción de activación del TRPV1 humano del presente compuesto, usando células CHO transfectadas con un gen que codifica el TRPV1 humano.

- 25 Preparación del líquido que contiene compuesto de ensayo, etc.

- Se suspendieron células CHO en DMEM y se sembraron en una placa de cultivo con 3,5 x 10⁴ células/pocillo. Se disolvió un compuesto de ensayo o un compuesto de control en DMSO para preparar una disolución de DMSO, y se prepararon el líquido que contenía compuesto de ensayo y el líquido que contenía compuesto de control 10 veces concentrados, cada uno de los cuales estaba compuesto de HBSS y contenía la disolución de DMSO así preparada. Como compuesto de control se usó capsaicina, y los compuestos de control y los compuestos de ensayo en el líquido que contenía compuesto de control y el líquido que contenía compuesto de ensayo se fijaron en 10 μM, respectivamente.

Ensayo de influjo de calcio

- 35 Se añadió a las células CHO un indicador de calcio y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30 min y después se incubó más a 22°C durante 30 min para lograr el equilibrio. Posteriormente, se le añadió una décima parte de volumen del líquido que contenía compuesto de ensayo, el líquido que contenía compuesto de control (concentración final: 1 μM) o disolución de HBSS, y se midió el cambio en la intensidad de la fluorescencia del indicador de la concentración de calcio intracelular.

Análisis de los resultados del ensayo

- 40 La relación de la intensidad de la fluorescencia cuando se aplicó estimulación con el compuesto de ensayo respecto a cuando se aplicó estimulación con capsaicina 1 μM usada como compuesto de control, se obtiene a partir de la siguiente ecuación, que se expresa como un porcentaje.

- 45
$$(\text{Influjo de calcio } (\%)) = \frac{((\text{intensidad de la fluorescencia en presencia del compuesto de ensayo}) - (\text{intensidad de la fluorescencia base}))}{((\text{intensidad de la fluorescencia en presencia de compuesto de control}) - (\text{intensidad de la fluorescencia base}))} \times 100$$

Los resultados del ensayo del presente compuesto así obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	Influjo de calcio (%)
Compuesto 2	74,1
Compuesto 3	59,8
Compuesto 4	43,9
Compuesto 5	64,3
Compuesto 6	76,6
Compuesto 7*	36,1

* = referencia

4. Ensayo del efecto analgésico del presente compuesto por el método de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético (referencia)
- 5 Como método para evaluar el efecto analgésico de un fármaco, se usa ampliamente el método de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético de Anderson et al. (*Fed. Proc.*, Vol. 18, p. 412, 1959). Por consiguiente, se llevó a cabo un ensayo para la acción antinociceptiva de un compuesto de ensayo usando el método de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético en ratones, y se evaluó y estudió el efecto analgésico del compuesto de ensayo.
- 10 Preparación de disolución de ácido acético al 0,7%
- Se añadió ácido acético al 99,7% a disolución salina, de modo que se preparó una disolución de ácido acético al 0,7%.
- Método de ensayo
- 15 20 min después de la administración oral del compuesto de ensayo, se administró por vía intraperitoneal la disolución de ácido acético al 0,7% en una proporción de 0,1 ml por 10 g de peso corporal de ratón. Después, se contó el número de contracciones abdominales que se produjeron entre 10 min y 20 min después de la administración del ácido acético, para medir la acción antinociceptiva del compuesto de ensayo.
- Resultados del ensayo
- 20 Como un ejemplo de los resultados del ensayo, en la figura 4 se muestra la acción antinociceptiva del compuesto 1 (media \pm ETM). En la figura 4, * indica que el valor P para la comparación con el grupo no tratado (grupo tratado con 0 mg/kg de compuesto) por la comparación múltiple de Dunnett es menor de 5%; y ** indica que el valor P para la comparación con el grupo no tratado por la comparación múltiple de Dunnett es menor de 1%.
- Como es evidente a partir de la figura 4, el presente compuesto suprimía el número de contracciones abdominales de una forma dependiente de la dosis en el modelo de las contracciones abdominales inducidas por ácido acético.
- 25 A partir de los resultados del ensayo farmacológico descrito antes, se muestra que el presente compuesto presenta un excelente efecto terapéutico sobre el dolor, en particular un efecto inhibitor del dolor nociceptivo y es útil como un agente terapéutico para el dolor.
5. Acción del presente compuesto en la prolongación del intervalo de micción en el modelo de rata con infusión intravesical continua de disolución salina
- 30 Como método para evaluar un efecto terapéutico sobre la vejiga hiperactiva, se usa ampliamente la medición de la acción de prolongación del intervalo de micción en un modelo con infusión intravesical continua de disolución salina de Yu et al. (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, 825 (1999)). De acuerdo con el método de Yu et al., se llevó a cabo la medición de la acción de un compuesto de ensayo en la prolongación del intervalo de micción en un modelo con infusión intravesical continua de disolución salina, y se evaluó y estudió el efecto terapéutico del compuesto de ensayo en la vejiga hiperactiva.
- 35 Preparación del líquido que contiene compuesto de ensayo
- Se disolvió un compuesto de ensayo en disolución salina que contenía aceite de ricino polioxietilénico (Cremphor EL) al 1%, de modo que se preparó un líquido que contenía compuesto de ensayo.
- Preparación del agente de control comparativo
- 40 Se disolvió hidrocloreuro de oxibutinina que es un agente de control en disolución salina, de modo que se preparó un líquido que contenía agente de control.
- Animal usado
- Ratas CD (macho, ocho semanas de edad) se sometieron a cuarentena y aclimatación durante 1 semana y se

dividieron en grupos que consistían en 2 a 6 ratas y se usaron en el ensayo.

Método de ensayo

5 Todas las ratas se anestesiaron con uretano (1,2 g/kg). Se insertó un primer catéter para infusión de un agente en la vena femoral de la rata y se ligó a la misma. Se hizo una incisión de aproximadamente 2 cm a lo largo de la línea media del abdomen y se exteriorizó la vejiga. Después, se hizo una punción con una aguja 19-G en la parte superior de la vejiga, y se insertó un segundo catéter para la infusión continua de disolución salina en la vejiga a través de la punción y se ligó a la misma. El segundo catéter se conectó con una llave de tres vías, y se conectó una jeringa de 25 ml (que estaba montada en una bomba de jeringa) para la infusión intravesical de disolución salina en una abertura de la llave de tres vías, y se conectó un transductor de presión en la otra abertura.

10 Medición del intervalo de micción

Para la medición del intervalo de micción, se registró continuamente una presión de micción, y el tiempo de medición en el que la presión de micción disminuía rápidamente en una tabla de presión de micción se definió como el tiempo de medición de la micción, y el intervalo de tiempo entre dos tiempos de medición se definió como el intervalo de micción y se usó en el análisis.

15 Se infundió continuamente disolución salina en la vejiga por la bomba de jeringa a una velocidad en el intervalo de 2,4 a 4,8 ml/h, de modo que se logró un reflejo de micción estable. Se infundió un vehículo en la vena femoral a través del primer catéter y se midió el intervalo de micción. En un tiempo adecuado posterior, se confirmó que el intervalo de micción se hacía constante, y se infundió el compuesto de ensayo o el agente de control comparativo de la misma manera, y se midió el intervalo de micción.

20 Evaluación de los resultados

Para los respectivos casos de administración del vehículo y del fármaco, se calculó un valor medio del intervalo de micción que se midió dos veces para cada animal y se definió como el intervalo de micción para el animal, y se calculó un valor medio de intervalo de micción para cada grupo. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando la prueba t de dos colas.

25 Como ejemplos de los resultados del ensayo, se muestra en la figura 5 el intervalo de micción en el caso del compuesto 1, y se muestra en la figura 6 el intervalo de micción en el caso del agente de control comparativo.

Como es evidente a partir de las figuras 5 y 6, el presente compuesto presentaba una excelente acción de prolongación del intervalo de micción con una dosis extremadamente baja y la potencia era mayor que la del hidrocloreuro de oxibutinina que se usa clínicamente como agente terapéutico para la vejiga hiperactiva.

30 A partir de los resultados del ensayo farmacológico descrito antes, se muestra que el presente compuesto presenta una acción extremadamente buena de prolongación del intervalo de micción y es útil como un agente terapéutico para la vejiga hiperactiva.

6. Acción del presente compuesto en el aumento del flujo sanguíneo para el flujo sanguíneo de la mucosa gastrointestinal en la rata normal (referencia)

35 La acción de aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gastrointestinal en un animal normal es un modelo usado en la evaluación de la eficacia de fármaco de un agente terapéutico para la úlcera péptica, etc. Matsumoto et al. estudiaron la acción de la capsaicina de aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica usando el método mencionado antes (*Japanese Journal of Pharmacology*, Vol. 57, p. 205, 1991). Se evaluó según el método de Matsumoto, la acción del presente compuesto de aumentar el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica en la rata normal.

40 Preparación del líquido que contiene compuesto de ensayo

Se preparó un líquido que contenía compuesto de ensayo inmediatamente antes de usar por suspensión de un compuesto de ensayo en una disolución acuosa de metilcelulosa al 1%, que es un vehículo.

Método de ensayo

45 En la medición del flujo sanguíneo de la mucosa, se usó un medidor láser de flujo de tejidos (OMEGAFLO FLO-N1), y el flujo sanguíneo se obtuvo como un flujo sanguíneo por peso de tejido.

50 Una rata mantenida en ayunas durante 18 h o más, se sometió a laparotomía con anestesia de uretano y se exteriorizó el estómago y se montó en una cámara de perfusión. Después, se hizo una incisión a lo largo de la curvatura mayor de modo que no se causara hemorragia y se eliminó por lavado el contenido gástrico. Después, el estómago se estiró en la cámara de perfusión y se puso una sonda del medidor láser de flujo sanguíneo cerca del centro de la curvatura menor. El estómago se perfundió con disolución salina hasta que el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica se hizo estable, y el flujo sanguíneo cuando el flujo sanguíneo se mantuvo con un valor constante

se definió como el de flujo sanguíneo antes de tratamiento. Se detuvo la perfusión y se eliminó completamente la disolución salina. Después, se instiló en el mismo el líquido que contenía compuesto de ensayo y se midió el flujo sanguíneo durante 60 min.

Evaluación de los resultados

- 5 Se registraron para cada animal el flujo sanguíneo antes de tratamiento y el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica cada 5 minutos después de tratamiento con el compuesto de ensayo.

10 Como ejemplo de la acción del presente compuesto en el aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gastrointestinal, se muestra la acción del compuesto 1 en el aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica. La figura 7 muestra los valores medios de los respectivos valores máximos de las mediciones de los flujos sanguíneos antes y después de tratamiento en el caso de llevar a cabo el tratamiento sólo con vehículo (metilcelulosa al 1%) y los flujos sanguíneos antes y después de tratamiento en el caso de llevar a cabo el tratamiento con el líquido que contenía el compuesto 1. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando una prueba t de dos colas.

Como es evidente a partir de la figura 7, el presente compuesto presentaba una notable acción de aumento del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica.

- 15 7. Efecto de la disfunción gastrointestinal en el modelo de rata (referencia)

El modelo de la lesión de la mucosa gástrica inducida por indometacina es un modelo de disfunción gastrointestinal ampliamente usado en la evaluación de la eficacia de fármaco de un agente terapéutico para la úlcera. Se estudió según el método de Hoshino et al. (*Folia Pharmacologica Japonica*, Vol. 97, p. 287, 1991), el efecto del presente compuesto en un modelo de rata de lesión de la mucosa gástrica inducida por indometacina.

- 20 Preparación del líquido que contiene compuesto de ensayo

Se preparó un líquido que contenía compuesto de ensayo inmediatamente antes de usar por suspensión de un compuesto de ensayo en una disolución acuosa de metilcelulosa al 1% que es un vehículo. De la misma forma, se preparó un líquido que contenía compuesto de control, usando como compuesto de control omeprazol que es un inhibidor de la bomba de protones y se usa clínicamente como un agente terapéutico para la úlcera péptica.

- 25 Método de ensayo

30 A una rata mantenida en ayunas durante 24 h, se le administró por vía oral el líquido que contenía compuesto de ensayo, líquido que contenía compuesto de control o vehículo (grupo de control patológico), e inmediatamente después, se administró por vía subcutánea indometacina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) con una dosis de 30 mg/kg. Un grupo en el que se llevó a cabo el mismo procedimiento excepto que no se llevó a cabo el tratamiento con indometacina, se definió como un grupo de control normal. Seis horas después del tratamiento con indometacina, se inyectó por vía intravenosa una disolución de Chicago Sky Blue 6B al 5% a través de la vena de la cola y la rata se sacrificó. Después, el estómago se extirpó y se hizo una incisión a lo largo de la curvatura mayor. El estómago se lavó con disolución salina y se semifijó con disolución de formalina neutra al 1%. Se midió macroscópicamente usando calibres, la longitud del diámetro mayor del sitio de una lesión teñida de azul que incluía una equimosis.

- 35 Evaluación de los resultados

Se obtuvo un valor medio de la suma de los diámetros mayores de los sitios de las lesiones para cada animal y se definió como un índice de úlcera. Además, se calculó una relación de la inhibición de la lesión de la mucosa gástrica a partir de la siguiente ecuación.

40
$$(\text{Relación de inhibición de lesión de la mucosa gástrica (\%)}) = \{ - [(\text{índice de úlcera del grupo de administración de compuesto}) - (\text{índice de úlcera del grupo de control normal})] / [(\text{índice de úlcera del grupo de control patológico}) - (\text{índice de úlcera del grupo de control normal})] \} \times 100$$

Como ejemplo del efecto inhibitor del presente compuesto en la disfunción gastrointestinal, en la figura 8 se muestra el efecto inhibitor del compuesto 1 en la lesión de la mucosa gástrica inducida por indometacina, y la relación de inhibición de la lesión de la mucosa gástrica obtenida como se ha descrito antes se muestra en la tabla 3.

- 45 Tabla 3

Compuesto	Relación de inhibición (%)
Compuesto 1 (1 mg/kg)	67,41
Omeprazol (10 mg/kg)	69,22

Como es evidente a partir de la figura 8 y la tabla 3, el presente compuesto presentaba un efecto notable al presentar una acción de inhibición de la lesión de la mucosa gástrica con una potencia comparable a la del omeprazol que es un agente terapéutico para la úlcera péptica, con una dosis menor que la del omeprazol.

A partir de los resultados del ensayo farmacológico descrito antes, se muestra que el presente compuesto es extremadamente eficaz como un agente terapéutico para la disfunción gastrointestinal.

5 El presente compuesto es un agonista del TRPV1 y tiene un efecto terapéutico en modelos experimentales de dolor, vejiga hiperactiva y disfunción gastrointestinal, y por lo tanto es útil como un agente terapéutico para una enfermedad mediada por el TRPV1, en particular la vejiga hiperactiva.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra la curva de inhibición del compuesto 1.

La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados (media \pm ETM) del estudio de la sensibilidad de la dosis en la liberación de CGRP del compuesto 1 en ausencia de capsacepina.

10 La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de inhibición competitivo para la acción de liberación de CGRP del compuesto 1 usando capsacepina 10 μ M (concentración final).

La figura 4 es una gráfica que muestra la acción antinociceptiva del compuesto 1 (media \pm ETM).

La figura 5 es una gráfica que muestra el intervalo de micción en el caso del compuesto 1.

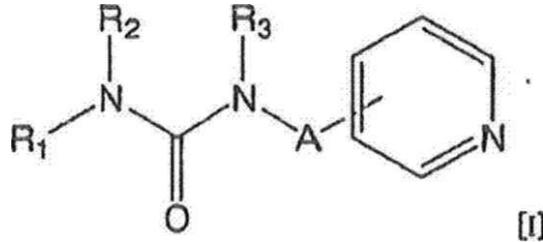
La figura 6 es una gráfica que muestra el intervalo de micción en el caso del agente de control comparativo.

15 La figura 7 es una gráfica que muestra los valores medios de los valores máximos de las mediciones de los flujos sanguíneos antes y después de tratamiento en el caso de llevar a cabo el tratamiento sólo con vehículo (metilcelulosa al 1%) y los flujos sanguíneos antes y después de tratamiento en el caso de llevar a cabo el tratamiento con el líquido que contiene el compuesto 1.

20 La figura 8 es una gráfica que muestra un efecto inhibitor del compuesto 1 en la lesión de la mucosa gástrica inducida por indometacina.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto representado por la fórmula general [I] o una sal del mismo, para usar en el tratamiento de la vejiga hiperactiva:



5 [en donde A representa un grupo trimetileno o un grupo metiltrimetileno; R₁ representa un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que puede tener un sustituyente; R₂ es un grupo adamantiletilo o un grupo adamantilpropilo; y R₃ es un átomo de hidrógeno].

10 2.- El compuesto para usar según la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: 1-[2-(1-adamantil)etil]-1-pentil-3-[3-(4-piridil)propil]urea, 1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[3-(4-piridil)propil]-1-(3,3,3-trifluoropropil)urea, 1-[3-(1-adamantil)propil]-1-propil-3-[3-(4-piridil)propil]urea, 1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[1-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea, 1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[2-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea, y (+)-1-[2-(1-adamantil)etil]-3-[2-metil-3-(4-piridil)propil]-1-pentilurea.

Fig. 1

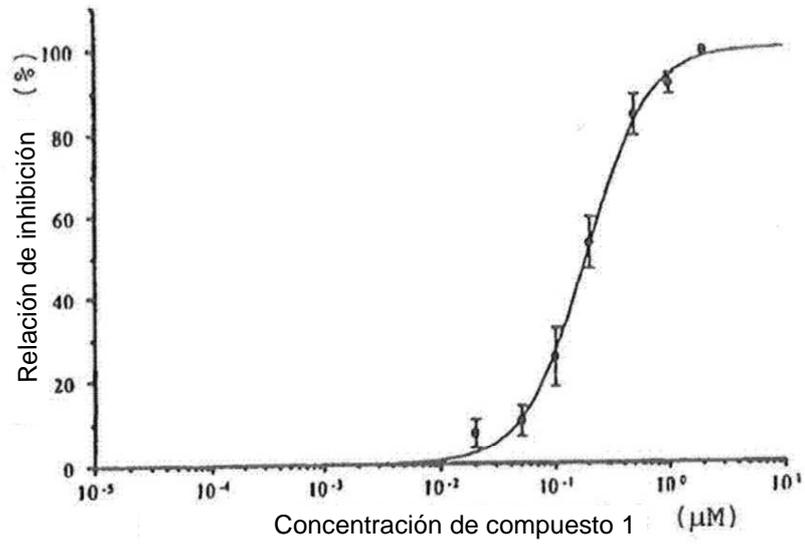


Fig. 2

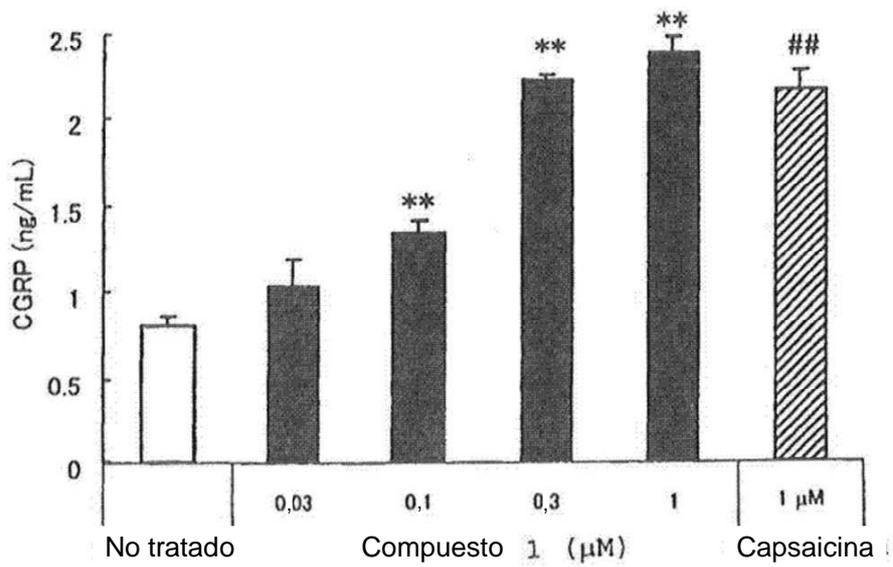


Fig. 3

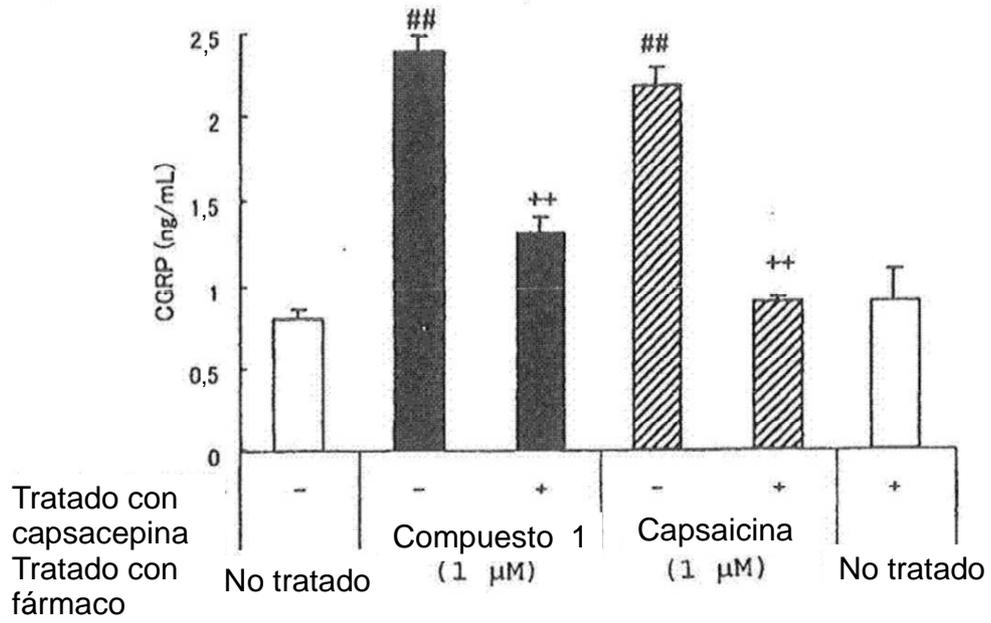


Fig. 4

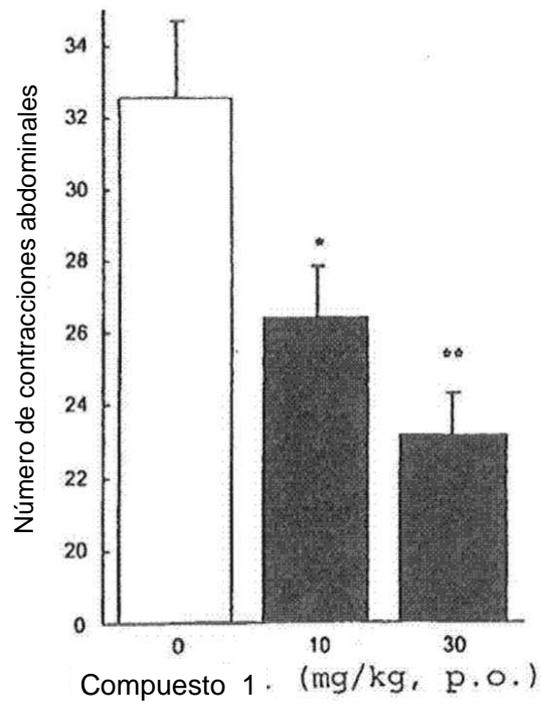


Fig. 5

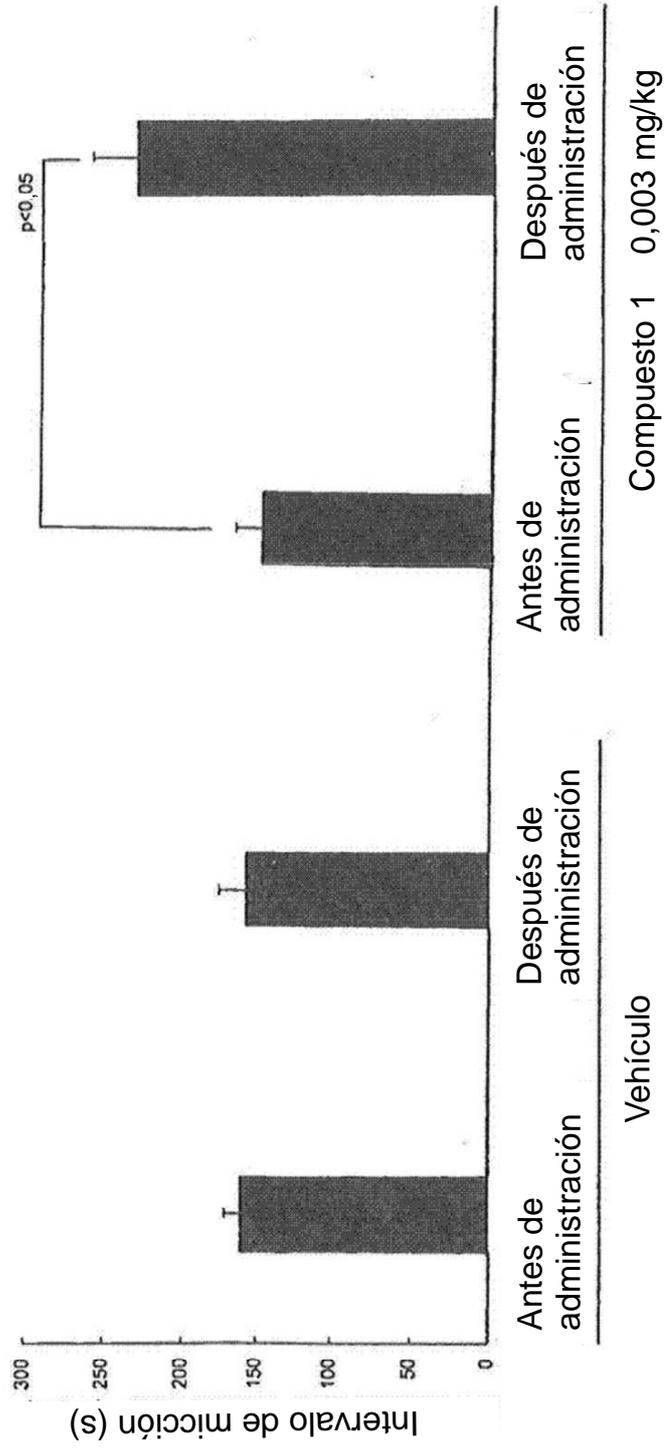


Fig. 6

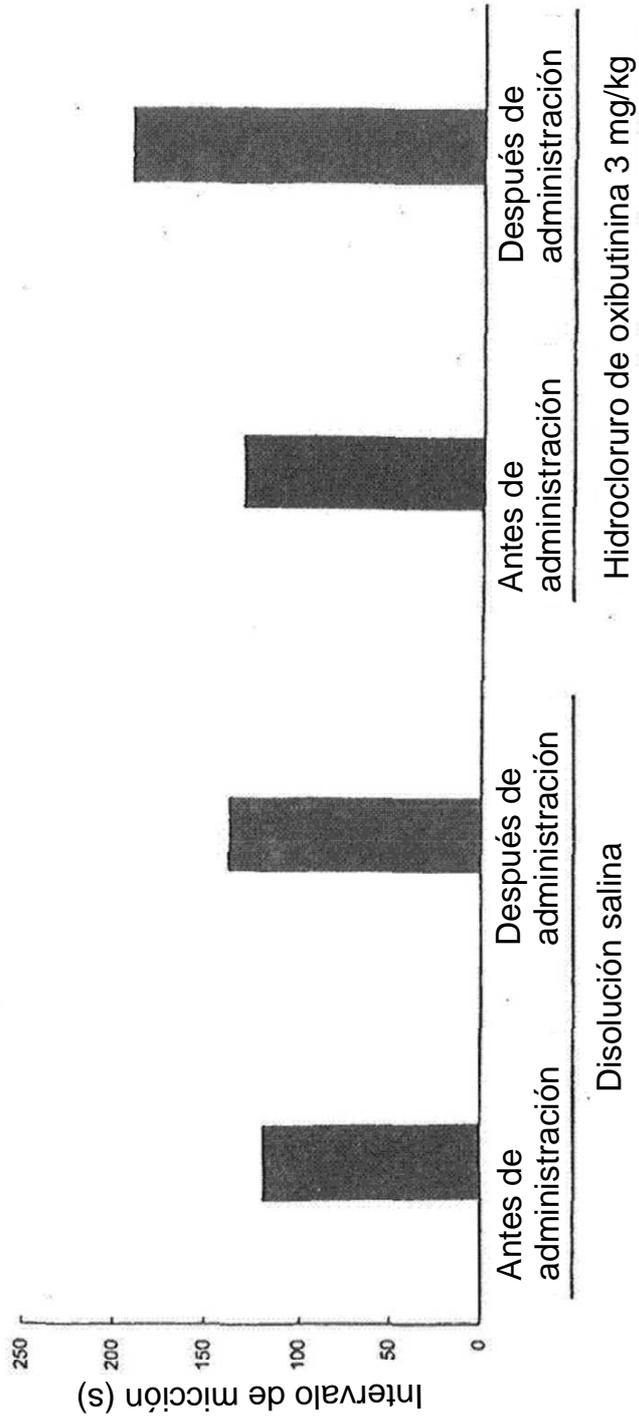


Fig. 7

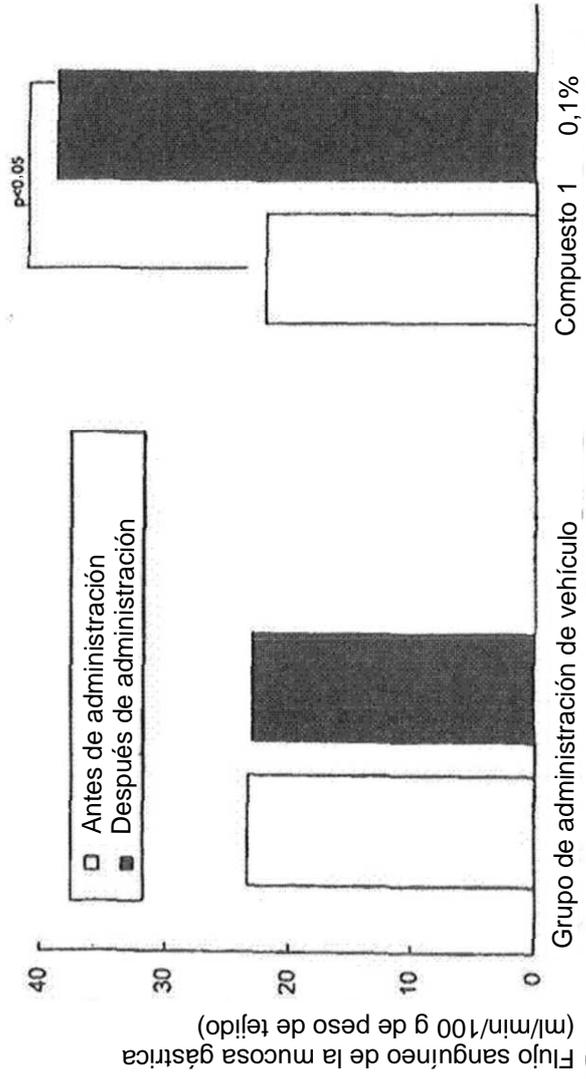


Fig. 8

