

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 304**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2006 E 06805305 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 1926499**

54 Título: **Uso de lípidos terapéuticamente activos junto con el procedimiento de producción de lípidos terapéuticamente activos específicos de órganos/tejidos**

30 Prioridad:

21.09.2005 DE 102005045152

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

30.04.2014

73 Titular/es:

**PAT GMBH (100.0%)
Hans-Grässel-Weg 9b
81375 München, DE**

72 Inventor/es:

STREMMEL, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 458 304 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de lípidos terapéuticamente activos junto con el procedimiento de producción de lípidos terapéuticamente activos específicos de órganos/tejidos

5 La presente invención se refiere a un lisofosfolípido que está enlazado covalentemente a ácidos gálicos o a asialoglicoproteínas para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del hígado. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de lípidos terapéuticamente eficaces específicos del hígado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del hígado, caracterizado por que la lisofosfatidiletanolamina (LisoFE) está unida al grupo carboxilo del ursodesoxicolato (UrsoDOCA), grupo que ha sido convertido en un éster, para formar un compuesto Liso-FE.

15 Determinados lípidos terapéuticamente ventajosos son eficaces como proinflamatorios o antiinflamatorios (ANES y colaboradores - Nat. Cell. Biol. 2003; 6: 793-802). El documento WO 01/51003 divulga conjugados de lípidos con ácidos gálicos para uso médico. Incluso en modelos in vitro de modelos de macrófagos y fagosomas, se pudo demostrar un efecto terapéutico de la fosfatidilcolina (FC) y la lisofosfatidilcolina (LisoFC) en el caso de la concentración de estos lípidos en las células afectadas sobre las actividades inflamatorias o en caso de alteración del metabolismo (ANES y colaboradores - Nat. Cell. Biol. 2003, 5: 793-802). La acción terapéutica de la FC ya se había demostrado a modo de ejemplo en un modelo animal, la aplicación tópica de la fosfatidilcolina con efecto antiinflamatorio en modelos de rata protege la mucosa del colon frente a la colitis inducida por ácido acético y ácido trinitrobenzenosulfónico (FABIAN y col. Digestion 1992, 53: 35-44; MOURELLE y col. - Gastroenterology 1996; 110: 1903-7). Este principio también se aplicó en los seres humanos en el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria crónica frecuente, colitis ulcerosa. Se pudo demostrar que la administración oral de fosfatidilcolina en forma de administración de liberación lenta con liberación en el intestino delgado inferior y en el intestino grueso, inhibe significativamente la actividad inflamatoria de la colitis ulcerosa (STREMMEL y col. - Gut 2005; 54: 966-997, Patente Europea 1105141 B1). En comparación con un grupo de control tratado con placebo, se ha logrado como promedio un aumento del 70% de la actividad clínica en el 90% de los pacientes tratados con la FC. Al cabo de 3 meses, más de la mitad de los pacientes incluso alcanzaron la remisión clínica. Al mismo tiempo, los hallazgos endoscópicos y la histología en el intestino delgado inferior y en el intestino grueso, así como la calidad de vida de los pacientes mejoraron.

35 Sobre la base de los presentes resultados, es probable que las enfermedades asociadas a inflamaciones en otras células, tejidos y órganos, también se puedan tratar con lípidos con actividad antiinflamatoria además del tratamiento en el intestino delgado y el intestino grueso. Sin embargo, no es de esperar que la administración sistémica no selectiva, por ejemplo, de fosfatidilcolina logre el nivel de eficacia antiinflamatoria necesaria in situ, por lo que sería necesaria una administración local. Por lo tanto, por ejemplo, los lípidos antiinflamatorios se pueden administrar localmente como tales en el caso de trastornos inflamatorios locales como, por ejemplo, en la administración tópica de áreas inflamadas de la piel, en la instilación de cavidades articulares en el caso de la artrosis, en la inhalación de preparaciones adecuadas en el sistema bronquial para el tratamiento de la inflamación de los pulmones o en la instilación de suspensiones de lípidos en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, el esófago, estómago, duodeno y recto.

45 Se ha visto que la administración local en los órganos parenquimatosos como el hígado, el corazón y el cerebro es más difícil. Aunque esto podría llevarse a cabo como una perfusión local de las suspensiones de lípidos terapéuticamente eficaces o usando técnicas de embolización reversibles para lograr una concentración local elevada en estos órganos, estas no representan alternativas reales a la administración local en cuanto a la duración de la perfusión y los riesgos que son de temer con el uso de la técnica de embolización.

50 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un uso de lípidos terapéuticamente eficaces para su concentración en órganos/tejidos específicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, isquémicas o degenerativas y/o para estimular la regeneración del tipo mencionado en la introducción en todos los órganos, tejidos y células para prevenir riesgos y las perfusiones de larga duración, cuyo uso conduce a una concentración terapéuticamente eficaz de los lípidos en los órganos, tejidos y células.

55 El objeto anterior se consigue de acuerdo con la invención mediante las características de las reivindicaciones de patente 1, 7 y 8. Por consiguiente, el uso de estos lípidos terapéuticamente eficaces se configura de manera tal que los lípidos se unen durante la administración a ácidos gálicos o a asialoglicoproteínas como moléculas portadoras, para lo cual existen en las células de los órganos y/o tejidos sistemas de absorción específicos de las células.

60 El objeto anterior se consigue además con las características de la reivindicación 6. Por consiguiente, un procedimiento para la producción de lípidos terapéuticamente eficaces, específicos de órganos/tejidos del tipo mencionado en la introducción se configura de tal manera que la lisofosfatidiletanolamina (LisoFE) está acoplada al grupo carboxilo del de ursodesoxicolato (UrsoDOCA), grupo que ha sido convertido en un éster para formar un compuesto LisoFE-DOCA.

65

Se ha reconocido de acuerdo con la invención que una concentración específica de estos lípidos se puede conseguir también en órganos parenquimatosos para evitar técnicas de embolización o perfusión utilizando lípidos que están unidos a moléculas portadoras si existen sistemas de absorción específicos de células, tejidos u órganos para las moléculas portadoras. Además, se sabe que las células no pueden absorber lípidos complejos, tales como, por ejemplo, fosfatidilcolina y, por lo tanto, los lisofosfolípidos, que se puede demostrar que se incorporan a las células, se unen a las moléculas portadoras. Por consiguiente, es posible la absorción de los lípidos terapéuticamente eficaces selectivamente en las células, tejidos u órganos a una concentración terapéuticamente eficaz mediante este "sistema dirigido" específico de la célula. Así, por ejemplo, se puede obtener una concentración terapéuticamente eficaz de los lípidos en las células del hígado que han sufrido cambios inflamatorios con los compuestos lipídicos producidos de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 6.

De manera particularmente ventajosa, los lípidos terapéuticamente eficaces tienen acción antiinflamatoria o proinflamatoria. Si en las células, tejidos u órganos se consigue la acumulación específica de los lípidos proporcionada por las moléculas portadoras o debida a la administración directa, por inhalación o por administración gota a gota de los lípidos terapéuticamente eficaces, tales como por ejemplo, fosfatidilcolina o lisofosfatidilcolina (LisoFC), estos pueden ejercer un efecto antiinflamatorio. Además de la simple sustitución de cualquier lípido ausente, el efecto terapéutico se imparte además mediante una actividad antiinflamatoria intrínseca de los lípidos por la influencia sobre los mediadores y las vías de transmisión de la señal. De esta manera, por ejemplo, las reacciones inflamatorias que se producen como respuesta fisiológica, por ejemplo, frente a mecanismos que provocan daño mecánico/degenerativo, relacionado con patógenos, isquémico, inducido por radicales libres, inmunológico o mecanismos que provocan daño debido a medicaciones, drogas, sustancias químicas o radiación, se pueden tratar con los lípidos terapéuticamente eficaces. Cuando estos lípidos se absorben en macrófagos o en otras células de defensa y del sistema inmunitario, también es posible un efecto inmunosupresor.

El uso de lípidos proinflamatorios está especialmente indicado para una regeneración deseada. Dado que la inflamación (provocada por mediadores tales como, por ejemplo, IL6 y TNF α) frecuentemente tiene como resultado la inducción de una regeneración, la regeneración, reparación e hiperplasia de las células se puede propagar mediante los lípidos proinflamatorios utilizados terapéuticamente, aplicados de nuevo por vía tópica. Por ejemplo, se puede usar la capacidad de regeneración del hígado para permitir posteriormente resecciones hepáticas parciales más amplias en el caso del desarrollo de un tumor (en otros segmentos del hígado). De manera particularmente ventajosa, se prefiere el uso de lípidos proinflamatorios en los órganos en los que la masa celular ha alcanzado un nivel de génesis crítico debido a enfermedad crónica o pérdida inducida por un accidente/intervención quirúrgica.

Es especialmente ventajoso el uso de lípidos eficaces proinflamatorios antes de la resección hepática parcial extensa planificada, por ejemplo, con el fin de eliminar una metástasis hepática con el fin de inducir una masa de células hepática suficiente en el hígado restante. Para ello, el lípido proinflamatorio se instila selectivamente antes de la operación en el hígado restante que sigue existiendo.

Además, el efecto proinflamatorio puede promover la inmunoestimulación en células malignas y, por lo tanto, se puede usar para terapia antitumoral (por ej., inducción de la apoptosis).

Además, es ventajoso el uso de ligandos de origen natural que existen en el organismo como moléculas portadoras a las que los lípidos se unen de manera covalente. Los ligandos son en consecuencia reconocidos por los receptores específicos de las células de los sistemas de transportador asociados a la membrana basolateral, mediante los que se introducen los lípidos en la célula. Así, los lípidos se unen covalentemente, por ejemplo, a los ácidos gálicos o a las asialoglicoproteínas como ligandos para una absorción específica en el hepatocito. En particular, cabe mencionar como un sistema de transportador específico del hepatocito, el polipéptido cotransportador de Na⁺/taurocolato (proteína transportadora del NTCP), mediante el cual el 90% de los ácidos gálicos se introducen en las células hepáticas.

Con respecto a la aparición del efecto antiinflamatorio o proinflamatorio en la célula, los lípidos, tales como la lisofosfatidilcolina (LisoFC) o la lisofosfatidiletanolamina (LisoFE), se pueden liberar de los ligandos tras su absorción en el compartimiento citoplasmático de la célula. Esto tiene lugar, por ejemplo, mediante hidrólisis en el citoplasma. Si, como en el caso anteriormente mencionado, la lisofosfatidiletanolamina se introduce en la célula, después de la liberación del ligando, tiene lugar una conversión enzimática de la LisoFE para formar la FC con acción antiinflamatoria eficaz.

Se pueden usar en general todas las vías de administración para el uso de los lípidos terapéuticamente eficaces para su administración, tales como, por ejemplo, la administración directa, por inhalación, gota a gota (instilación), oral, intravenosa o intraperitoneal. En particular, es adecuada la administración directa como se ha descrito anteriormente para el uso de lípidos antiinflamatorios para tratar la piel dañada por la inflamación o la inyección en las articulaciones o los espacios subaracnoideos. La administración oral, intravenosa o intraperitoneal es particularmente apropiada para la concentración selectiva de los lípidos terapéuticamente eficaces en órganos parenquimatosos, tejidos y en células con cambios inflamatorios. La administración intravenosa de los lípidos unidos a las moléculas portadoras es particularmente adecuada porque llegan a los órganos, tejidos o células correspondientes directamente a través de la corriente sanguínea sin atravesar la pared del intestino, como en la

administración oral, lo que implica el riesgo de absorción completa de los lípidos por las células intestinales.

5 En general, el tratamiento a base de lípidos en conjunto proporciona una buena eficacia clínica con un perfil pequeño o inexistente de efectos secundarios debido a que son lípidos naturales que existen en el organismo y no son inmunogénicos. Esto permite administrar localmente altas dosis de estos lípidos, permaneciendo las concentraciones sistémicas en el intervalo de los límites fisiológicos.

10 En la actualidad hay varias posibilidades de configurar y desarrollar la enseñanza de la presente invención de manera ventajosa. Para ello, se puede hacer referencia, por un lado, a las reivindicaciones adjuntas y, por otro lado, a la siguiente explicación de una realización preferida que explica el procedimiento reivindicado para producir lípidos terapéuticamente eficaces específicos de órganos/tejidos.

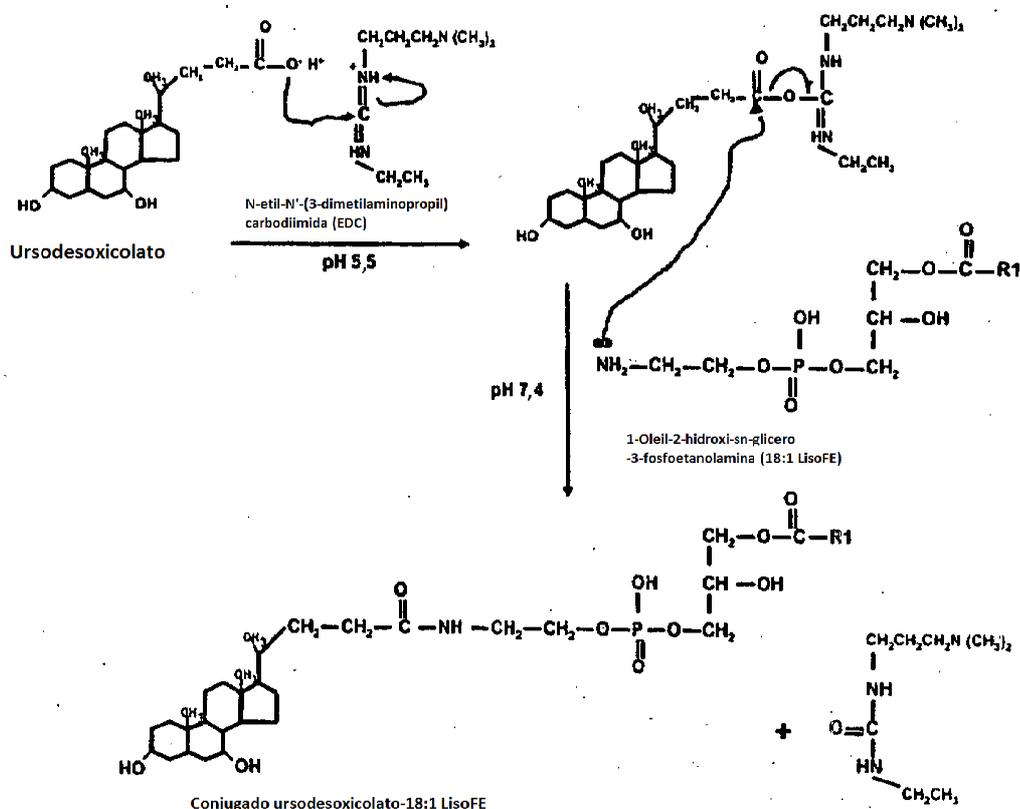
Ejemplo

15 Ejemplo de concentración de fosfolípidos antiinflamatorios en hepatocitos para suprimir la inflamación del hígado.

20 Los lípidos complejos, tales como la fosfatidilcolina (FC) no pueden ser absorbidos como tales en las células. La absorción se lleva a cabo en forma de lisofosfolípidos, los cuales están unidos covalentemente a un ligando, tal como, por ejemplo, un ácido gálico o una asialoglicoproteína, los cuales son así absorbidos mediante transportadores de los ácidos gálicos (por ejemplo, NTCP) de la membrana plasmática basolateral de los hepatocitos e introducidos en el compartimento citoplasmático de las células. Para ello, por ejemplo, se puede unir covalentemente lisofosfatidilcolina (LisoFC) a los ácidos gálicos, por ejemplo, al desoxicolato (DOCA). Sin embargo, la síntesis de un compuesto combinado lisofosfolípido-DOCA con lisofosfatidiletanolamina (LisoFE) es químicamente mucho más ventajoso. La siguiente reacción se puede realizar por ejemplo: en primer lugar, el grupo carboxilo del urso-DOCA es convertido por una carbodiimida en un éster activado. A continuación, se produce el acoplamiento a la LFE. Esta conjugación del grupo de cabeza permite el paso del compuesto LisoFE-DOCA mediante los transportadores de ácidos gálicos a las células hepáticas. En esa localización, la Liso-FE se puede liberar de nuevo por escisión hidrolítica y convertirse enzimáticamente a continuación para formar la FC antiinflamatoria.

30 En comparación, se puede llevar a cabo una conjugación de la cadena acilo, en la cual el DOCA se une a la cadena lateral acilo de la posición Sn-1 o Sn-2 de la FC. Tras la exposición con fosfolipasa A2 o A1, el grupo lateral Sn-1 o Sn-2 debe convertirse para formar un compuesto alcohol. Este se hace unir a un intermedio de la reacción entre la piridina y el éster de DOCA activado y la carbodiimida.

35 El siguiente esquema de reacción ilustra la reacción descrita anteriormente:



5 Con el fin de examinar la concentración selectiva del compuesto DOCA-LisoFE, se incubaron células HepG2 (hepatocitos) con un conjugado ursodesoxicolato-1-palmitoil, 2-NBD-FE marcado con fluorescencia (a 50 μ M) durante 10 min a 37 $^{\circ}$ C, se lavó y a continuación se trató con seroalbúmina bovina al 5% para eliminar el conjugado de la membrana plasmática externa de las células. A continuación, las células se observaron en un microscopio con contraste de fase y con luz fluorescente.

10 La Figura 1 muestra en la imagen A la observación al microscopio óptico de células HepG2 después de la incubación con conjugado ursodesoxicolato-1-palmitoil, 2-NBD-PE con contraste de fase y la imagen B muestra el examen al microscopio de fluorescencia de las células mostradas en A.

15 La Figura 1 muestra en la imagen A y la imagen B células HepG2 (hepatocitos) después de la incubación con un lípido terapéuticamente eficaz de acuerdo con la invención (conjugado ursodesoxicolato-1-palmitoil, 2-NBD-PE) el cual se resalta para ilustrar la concentración en las células con un marcador fluorescente. Al contrario que con las células HepG2 observadas en A con contraste de fase, en el examen con microscopio de fluorescencia, las mismas células presentan una coloración amarilla-verde intensa en el citoplasma pero no en el núcleo de la célula.

REIVINDICACIONES

1. Lisofosfolípido que está unido covalentemente a ácidos gálicos o a asialoglicoproteínas, para su uso para el tratamiento de enfermedades hepáticas inflamatorias, isquémicas o degenerativas.
5
2. Lisofosfolípido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el lisofosfolípido la lisofosfatidilcolina o la lisofosfatidiletanolamina.
3. Lisofosfolípido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el ácido gálico el ursodesoxicolato o el desoxicolato
10
4. Lisofosfolípido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el lisofosfolípido puede ser liberado después de ser absorbido en las células del ligando.
- 15 5. Lisofosfolípido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual se administra directamente, por inhalación, gota a gota, por vía oral, intravenosa o intraperitoneal
- 20 6. Procedimiento para la producción de lípidos terapéuticamente eficaces hepatoespecíficos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del hígado, caracterizado por que la lisofosfatidiletanolamina (LisoFE) se une al grupo carboxilo del ursodesoxicolato (UrsoDOCA), grupo que ha sido convertido en un éster, para formar un compuesto LisoFE-DOCA
- 25 7. Compuesto LisoFE-DOCA que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Composición farmacéutica que contiene el compuesto LisoFE-DOCA de acuerdo con la reivindicación 7.

Fig. 1

