

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 290**

21 Número de solicitud: 201201248

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01) **A61P 27/02** (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 31/708 (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.06.2014

71 Solicitantes:

OCUPHARM DIAGNOSTICS S.L. (100.0%)
C/ Francisco Silvela, 88, 7º B
28002 Madrid ES

72 Inventor/es:

GUZMÁN ARÁNGUEZ, Ana;
LOMA LOZANO, Patricia y
PINTOR JUST, Jesús Jerónimo

74 Agente/Representante:

PERAL CERDÁ, David

54 Título: **Mejora en la aplicación tópica de fármacos oculares mediante la administración de nucleótidos**

57 Resumen:

La presente invención describe el empleo de agonistas de receptores purinérgicos (nucleósidos polifosfatos y sus dinucleósidos análogos) para optimizar la aplicación tópica de fármacos oculares aumentando con ello su potencial terapéutico. La aplicación de los mencionados nucleótidos es capaz de modificar la expresión y funcionalidad de las proteínas que constituyen las uniones estrechas, disminuyendo así las restricciones que dichas uniones estrechas establecen a la entrada de los fármacos oculares y aumentando la permeabilidad de los epitelios de la superficie ocular al paso de compuestos farmacológicos. De esta forma mediante la aplicación de los nucleótidos se incrementa la penetración y consiguientemente la efectividad de fármacos aplicados en terapias oculares por vía tópica.

ES 2 469 290 A1

DESCRIPCIÓN

- 5 Mejora en la aplicación tópica de fármacos oculares mediante la administración de nucleótidos.

OBJETO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención describe el empleo de los nucleótidos para incrementar la penetración y consiguientemente la efectividad de fármacos aplicados en terapias oculares por vía tópica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 15 La entrada de fármacos oculares por vía tópica es aún un importante reto para la industria farmacológica debido a los innatos elementos de protección que caracterizan el ojo frente a la entrada de patógenos y sustancias extrañas y potencialmente dañinas. De hecho, debido a las restricciones fisiológicas y anatómicas del ojo solamente una pequeña fracción de la dosis administrada por vía
20 tópica (1-7%) es absorbida de forma productiva (Lang, 1995). Por ello son necesarias instilaciones frecuentes de soluciones concentradas de fármaco para lograr la acción terapéutica buscada. Una elevada frecuencia de aplicación puede generar problemas de cumplimiento del régimen prescrito por parte del paciente. Además el uso frecuente de soluciones concentradas puede producir daño a nivel de la superficie ocular (Lee et al., 2008; Ammar et al., 2011; 25 Chen et al., 2011). Asimismo una porción significativa del fármaco puede ser absorbida por la conjuntiva o llegar al sistema nasolacrimal que drena a la cavidad nasal y lleva a la absorción a la circulación sistémica produciendo también efectos secundarios indeseables (Schwartz and Calvert, 1990; Lomaestro, 2000; Frishman et al., 2001).

- 30 Entre los mecanismos de protección que limitan la biodisponibilidad de los fármacos oculares se encuentra el recambio y drenaje de la película lagrimal que reduce el tiempo de residencia precorneal del fármaco así como diferentes barreras físicas que el fármaco debe atravesar para alcanzar su blanco de acción en el ojo (Urtti, 2006; 35 Kompella et al., 2010). Dentro de dichas barreras tiene un papel clave el epitelio corneal. El epitelio corneal restringe la permeabilidad de los solutos entre las células adyacentes (lo que se denomina movimiento paracelular) y la naturaleza de la membrana plasmática de las células epiteliales puede excluir el paso de ciertas macromoléculas a través de células individuales (definido como movimiento transcelular). El movimiento paracelular de solutos, iones y agua es limitado por el complejo de proteínas que se

organizan formando las denominadas uniones estrechas o *tight junctions* (Utech et al., 2006). Además de limitar el transporte paracelular de solutos, las uniones estrechas también restringen la difusión lateral de proteínas de membrana y mantienen la asimetría entre dominio apical y basolateral de las células.

Las uniones estrechas o *tight junctions* están formadas por tres tipos de proteínas: proteínas transmembrana (occludina, claudina y moléculas adhesivas de la unión o JAM, *junctional adhesion molecule*), proteínas de membrana periféricas (*zonula occludens*: ZO-1, ZO-2, ZO-3 y MUPP-1) las cuáles tienen dominios denominados PDZ y se unen las proteínas transmembrana) y proteínas citoplasmáticas (cingulina, antígeno 7h6, etc.) (Tsukita et al., 2001). El ensamblaje de las uniones estrechas en diversos tejidos se puede ver afectado por diferentes moléculas de señalización intracelular. Así, por ejemplo, el ensamblaje de las uniones estrechas y consiguientemente la permeabilidad del endotelio vascular está modulado por cAMP (Adamson et al., 1998). Los niveles de calcio extracelulares regulan también el mantenimiento de las uniones estrechas y la función de barrera del epitelio intestinal (Ma et al., 2000). La activación de la proteína quinasa A en células epiteliales de riñón de perro y de células de mama de ratón induce la disrupción de las uniones estrechas (Klingler et al., 2000). Asimismo la activación de la proteína quinasa C en un modelo de epitelio pancreático o en células del epitelio gastrointestinal induce la disrupción de las uniones estrechas (Clarke et al., 2000; Ivanov et al., 2009) o la activación de las MAP (*mitogen activated-protein*) quinasas produce dicho efecto sobre las *tight junctions* del epitelio corneal humano (Wang et al., 2004).

Resulta interesante que algunas de las rutas asociadas con la regulación del ensamblaje de las uniones estrechas pueden estar vinculadas en algunos tejidos con la activación de los denominados receptores purinérgicos de tipo metabotrópico (P2Y). Dichos receptores purinérgicos son activados por los nucleótidos. Los nucleótidos han sido implicados en distintos procesos fisiológicos del ojo siendo estos compuestos capaces de inducir la secreción lagrimal, acelerar la cicatrización corneal o regular la presión intraocular (Guzman-Aranguez et al., 2007; Crooke et al., 2008). De hecho debido a algunas de las propiedades que presentan estos compuestos su uso ha sido sugerido para el tratamiento de distintas patologías oculares y existen varias patentes al respecto.

Así por ejemplo las patentes US 20030186917, CN 1575181, W/2002/060454A2 tratan del empleo de nucleótidos para el tratamiento de procesos edematosos oculares especialmente

enfocados a la retina. Por otro lado las patentes US 20080009463 y US 20100330164 describen el empleo de nucleótidos como agentes terapéuticos para la patología de ojo seco. Por último la patente US 20030186928 se plantea el uso de estos compuestos para regular la presión intraocular. En estos ejemplos aunque se emplean nucleótidos como los que se describen en esta patente, en ningún caso las aplicaciones tienen algo que ver con lo descrito en la presente memoria.

Entre las estrategias planteadas para mejorar la entrada de fármacos oculares por vía tópica una opción es extender el tiempo de residencia de los fármacos sobre la superficie del ojo. A tal efecto se ha planteado el uso de polímeros mucoadhesivos y potenciadores de la viscosidad (Ludwig, 2005), lentes de contacto que incluyen y liberan el fármaco (Gupta and Aqil, 2012), liposomas (Ebrahim et al., 2005), o sistemas formadores de gel in situ (Rozier et al., 1989; Sultana et al., 2006).

Alternativamente otra posibilidad es aumentar la permeabilidad de fármacos a través de barreras oculares tales como la córnea. Para ello se ha procedido a la derivatización de diferentes fármacos como prodrogras tales como *Dipiverfrin* (un diester of adrenalina, que penetra en la córnea 17-veces más rápido que la adrenalina) o el *Latanoprost* (un ester isopropil lipofílico análogo de prostaglandinas) (Rautio et al., 2008), la formación de complejos entre el fármaco y ciclodextrinas para aumentar la solubilidad de compuestos poco solubles en agua sin modificar las propiedades moleculares del compuesto (Kristinsson et al., 1996; Bary et al., 2000) o el uso de la técnica denominada iontoforesis, la cual se basa en el empleo de corrientes eléctricas débiles para mejorar la penetración de moléculas cargadas a través de las barreras tisulares (Eljarrat-Binstock and Domb, 2006).

La presente invención está también dirigida a aumentar la penetración y efectividad de los fármacos oculares a través de epitelio corneal, si bien la aproximación terapéutica planteada en esta patente se basa en el empleo de nucleótidos para tal fin y resulta completamente novedosa. Por otra parte en la patente WO 2006/016115 A2 se describe el empleo de nucleótidos para mejorar la absorción de moléculas desde la superficie del pulmón a la circulación sistémica mientras que la presente patente se centra en optimizar la aplicación tópica del fármaco mejorando la acción del mismo a nivel local, en particular su efecto en el ojo, sin buscar interés alguno en la absorción sistémica de los principios activos del compuesto.

REFERENCIAS

- 5 Adamson RH, Liu B, Fry GN, Rubin LL and Curry FE (1998) Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol* **274**:H1885-1894.
- Ammar DA, Noecker RJ and Kahook MY (2011) Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Adv Ther* **28**:501-510.
- 10 Bary AR, Tucker IG and Davies NM (2000) Considerations in the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortisone. *Eur J Pharm Biopharm* **50**:237-244.
- Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A and Mullin JM (2000) Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv Drug Deliv Rev* **41**:283-301.
- 15 Crooke A, Guzman-Aranguez A, Peral A, Abdurrahman MK and Pintor J (2008) Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* **119**:55-73.
- Chen W, Li Z, Hu J, Zhang Z, Chen L, Chen Y and Liu Z (2011) Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit. *PLoS One* **6**:e26103.
- 20 Ebrahim S, Peyman GA and Lee PJ (2005) Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* **50**:167-182.
- Eljarrat-Binstock E and Domb AJ (2006) Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. *J Control Release* **110**:479-489.
- 25 Frishman WH, Kowalski M, Nagnur S, Warshafsky S and Sica D (2001) Cardiovascular considerations in using topical, oral, and intravenous drugs for the treatment of glaucoma and ocular hypertension: focus on beta-adrenergic blockade. *Heart Dis* **3**:386-397.
- Gupta H and Aqil M (2012) Contact lenses in ocular therapeutics. *Drug Discov Today* **17**:522-527.
- 30 Guzman-Aranguez A, Crooke A, Peral A, Hoyle CH and Pintor J (2007) Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Prog Retin Eye Res* **26**:674-687.
- Ivanov AI, Samarin SN, Bachar M, Parkos CA and Nusrat A (2009) Protein kinase C activation disrupts epithelial apical junctions via ROCK-II dependent stimulation of actomyosin contractility. *BMC Cell Biol* **10**:36.
- 35 Klingler C, Kniesel U, Bamforth SD, Wolburg H, Engelhardt B and Risau W (2000) Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent

- protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol* **113**:349-361.
- Kompella UB, Kadam RS and Lee VH (2010) Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* **1**:435-456.
- 5 Kristinsson JK, Fridriksdottir H, Thorisdottir S, Sigurdardottir AM, Stefansson E and Loftsson T (1996) Dexamethasone-cyclodextrin-polymer co-complexes in aqueous eye drops. Aqueous humor pharmacokinetics in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**:1199-1203.
- Lang JC (1995) Ocular Drug-Delivery Conventional Ocular Formulations. *Adv Drug Deliver Rev* **16**:39-43.
- 10 Lee JS, Lee JE, Kim N and Oum BS (2008) Comparison of the conjunctival toxicity of topical ocular antiallergic agents. *J Ocul Pharmacol Ther* **24**:557-562.
- Lomaestro BM (2000) Fluoroquinolone-induced renal failure. *Drug Saf* **22**:479-485.
- Ludwig A (2005) The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1595-1639.
- 15 Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M and Tarnawski A (2000) Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech* **51**:156-168.
- Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jarvinen T and Savolainen J (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* **7**:255-270.
- 20 Rozier A, Mazuel C, Grove J and Plazonnet B (1989) Gelrite - a Novel, Ion-Activated, Insitu Gelling Polymer for Ophthalmic Vehicles - Effect on Bioavailability of Timolol. *International Journal of Pharmaceutics* **57**:163-168.
- 25 Schwartz MT and Calvert JF (1990) Potential neurologic toxicity related to ciprofloxacin. *DICP* **24**:138-140.
- Sultana Y, Aqil M and Ali A (2006) Ion-activated, Gelrite (R)-based in situ ophthalmic gels of pefloxacin mesylate: Comparison with conventional eye drops. *Drug Deliv* **13**:215-219.
- 30 Tsukita S, Furuse M and Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:285-293.
- Urtti A (2006) Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:1131-1135.
- Utech M, Bruwer M and Nusrat A (2006) Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol* **341**:185-195.
- 35 Wang Y, Zhang J, Yi XJ and Yu FS (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* **78**:125-136.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se basa en la capacidad de los nucleótidos de modificar la expresión y funcionalidad de las proteínas que constituyen las *tight junctions* lo que produce un aumento de la permeabilidad de los epitelios de la superficie ocular, el corneal y el conjuntival al paso de compuestos farmacológicos.

10

La invención proporciona un método para optimizar la aplicación tópica de fármacos oculares aumentando con ello su potencial terapéutico.

15 El método comprende la administración a un mamífero de una composición farmacéutica terapéuticamente efectiva de un agonista de receptores purinérgicos P2Y. Por cantidad terapéuticamente efectiva se entiende una cantidad efectiva para aumentar la permeabilidad del epitelio corneal y conjuntival incrementando la penetración del fármaco. Una cantidad efectiva puede variar dependiendo de las propiedades del fármaco y puede ser determinado por varias técnicas conocidas.

25 La presente invención demuestra que la activación con nucleótidos de los receptores purinérgicos P2Y presentes en las células de epitelio corneal y conjuntival desencadena la disminución de los niveles de las proteínas de las uniones estrechas, modificando el ensamblaje de las mismas y disminuyendo las restricciones que dichas uniones estrechas establecen a la entrada de los fármacos oculares.

35 El nucleótido será administrado previamente a la aplicación del fármaco ocular. Esta aproximación terapéutica tiene la ventaja de incrementar la eficacia del tratamiento farmacológico al mejorar el acceso del fármaco suministrado a su sitio de acción en el ojo. Además esta aproximación terapéutica tiene la ventaja de poder reducir la cantidad de fármaco ocular a aplicar para alcanzar un máximo efecto terapéutico en el ojo minimizando así los posibles efectos secundarios adversos asociados al fármaco.

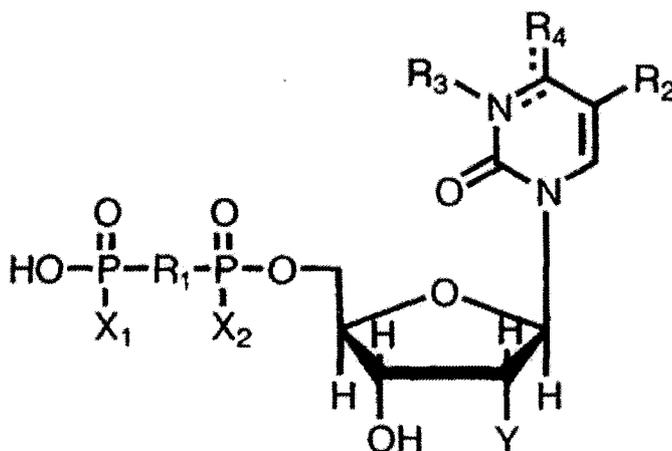
45 Los agonistas de los receptores purinérgicos incluyen nucleosidos polifosfatos y sus dinucleósidos análogos. Nucleósidos difosfatos útiles en esta aplicación incluyen uridina 5'-difosfato (UDP), adenosina 5'-difosfato (ADP) y sus análogos según la Fórmula I (Ia y Ib, respectivamente). Nucleósidos trifosfato útiles en esta aplicación incluyen uridina 5'-trifosfato (UTP), adenosina 5'-trifosfato (ATP) y sus análogos de la Fórmula II (IIa y IIb,

50

respectivamente); dinucleosidos polifosfatos de la Fórmula III son también útiles en esta aplicación.

5 UDP y sus análogos son representados por la fórmula general Ia:

Fórmula Ia



10

En donde:

- 15 X_1 y X_2 son ambos e independientemente O^-
 Y es OH ó H
 R_1 es oxígeno, imido, metileno o dihalometileno
 R_2 es hidrógeno, halógeno, alquil, alcoxi, alquil
 sustituido, alquenal, alquínal, nitro, o azido
 20 R_3 es hidrógeno, acil, alquil, arilalquil, arilalcil o puede
 estar ausente
 R_4 es OR' , SR' , NR' o $NR'R''$ en donde R' y R'' son
 independientemente hidrógeno, alquil, alquil sustituido,
 aril, aril sustituido, arilalquil, alcoxi ariloxi y cuando
 25 R_4 forma un doble enlace a través de un átomo de oxígeno o
 de azufre con el átomo de carbono en posición 4 del anillo
 de pirimidina, R' es ausente.

- El término alquil empleado se refiere a C_{1-10} inclusive,
 30 lineales, ramificados, cíclicos, saturados o insaturados,
 por ejemplo metil, etil, propil, isopropil, butil,
 isobutil, tert-butil, pentil, hexil, octil, etenil,
 propenil, butenil, pentenil, hexenil, octenil, butadienil,
 propinil, butinil, pentinil, hexinil, heptinil, alenil y
 35 opcionalmente grupos sustituidos arilalquilo y
 arilalquénilo.

5 El término "acil" se refiere a un grupo ácido orgánico donde el -OH del grupo carboxilo ha sido reemplazado con otro sustituyente (por ejemplo, representado como RCO-, en donde R es un grupo alquil o aril). Asimismo el término "acil" incluye grupos arilacil. Ejemplos específicos de grupos acil son acetil y benzoil.

10 Cuando se usa el término "aril" hace referencia a hidrocarburos aromáticos heterocíclicos de 5 o 6 átomos. Ejemplos de grupos aril incluyen ciclopentadienil, fenil, furano, triofeno, pirrol, pirano, piridina, imidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina y pirimidina.

El término alcoxi aquí usado se refiere a un C₁₋₁₀, lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado cadenas oxo-hidrocarbonadas incluyendo por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, t-butoxi y pentoxi.

15 El término "ariloxi" usado se refiere a ariloxi tales como feniloxi, y alquil, halo o alcoxi sustituido ariloxi.

20 Cuando se usan aquí los términos "alquil sustituido" y "aril sustituido" incluyen grupos alquil y aril, en los cuales uno o más átomos o grupos funcionales de los grupos aril o alquil son reemplazados con otros átomos o grupos funcionales por ejemplo, halógeno, aril, alquil, alcoxi, hidroxil, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

Los términos halo o halógeno se refieren a grupos flúor, cloro, bromo y yodo.

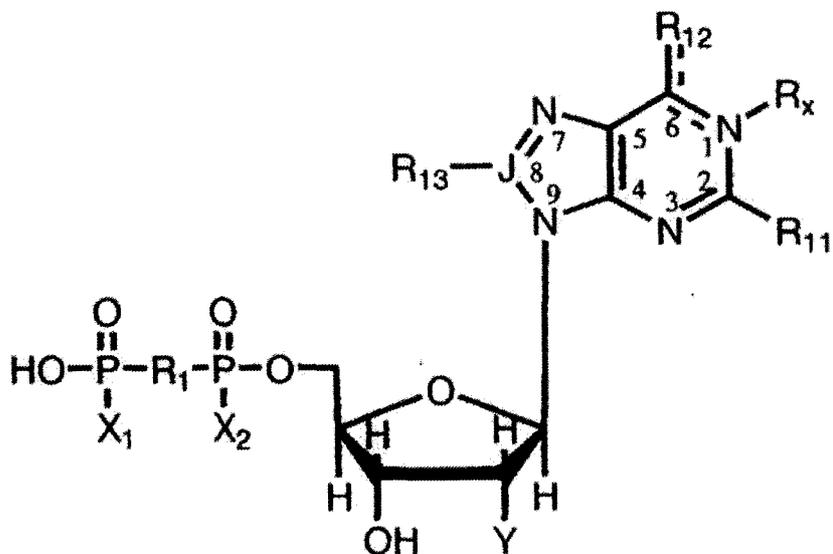
25 Los compuestos de esta fórmula Ia incluyen por ejemplo: uridina 5'-difosfato (UDP); uridina 5'-O-(2-tiodifosfato) (UDP β S); 5-bromouridina 5'-difosfato (5-BrUDP); 5-(1-feniletinil)-uridina 5'-difosfato (5-(1-feniletinil)UDP); 5-metiluridina 5'-difosfato (5-metilUDP); 4-hexiltiouridina 5'-difosfato (4-hexiltioUDP); 4-mercaptouridina 5'-difosfato (4-mercaptoUDP); 4-metoxiuridina 5'-difosfato (4-metoxiUDP).

30

ADP y sus análogos son representados por la fórmula general Ib:

Fórmula Ib

35



En donde:

R_1 , X_1 , X_2 e Y son definidos como en la fórmula Ia;

5 En donde:

R_{11} es hidrógeno, cloro, amino, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

10 R_{12} es hidroxilo, alquencil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, aciloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, aralquilaminos monosustituido, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, 15 dialquilamino, acilamino o diacilalmino;

R_x es O, H o está ausente;

20 R_{12} y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N^6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aril, nitroaril, haloaril, aralquil, o alcoxi como se define más adelante;

25 R_{13} es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define posteriormente; o $T(C_{1-6alquil})OCONH(C_{1-6alquil})W$ - en donde T y W son independientemente amino, mercapto, hidroxilo o carboxilo

o farmacéuticamente aceptables ésteres, amidas o sales de éstos.

J es carbono o nitrógeno, con la condición de que cuando J es nitrógeno, R_{13} no está presente;

5

Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

10

Los grupos arilo son opcionalmente sustituidos con alquilos inferiores, aril, amino, mono o dialquilamino, NO_2 , N_3 , ciano, carboxil, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno.

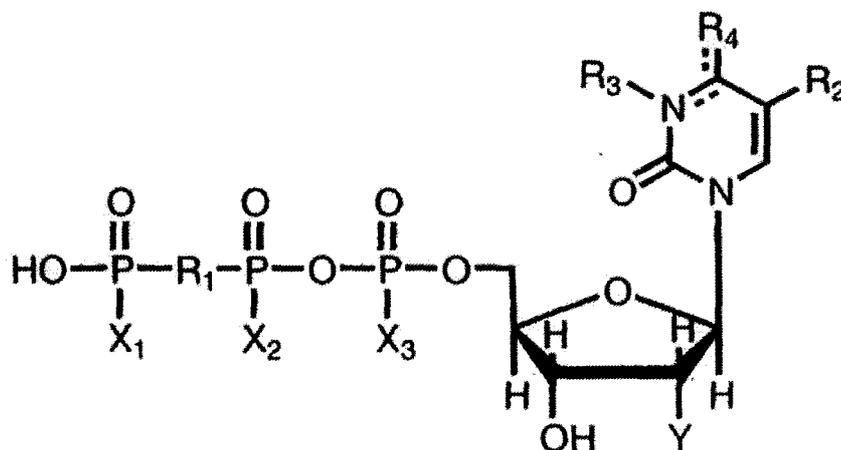
Los compuestos de esta fórmula Ib incluyen por ejemplo: 5'-adenosina difosfato (ADP) y 2-metil-SADP.

UTP y sus análogos son representados por la fórmula general IIa:

15

Fórmula IIa

20



25

En donde:

X_1 , X_2 y X_3 son cada uno independientemente ambos O^- ó S^-

30

Y es H ó OH;

R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son definidos como en la Fórmula Ia.

Preferiblemente, X_2 y X_3 son O^- , R_1 es oxígeno o imido y R_2 es H.

35

Los compuestos de esta fórmula IIa incluyen por ejemplo: uridina 5'-trifosfato (UDP); uridina 5'-O-(3-tiotrifosfato) (UTPyS).

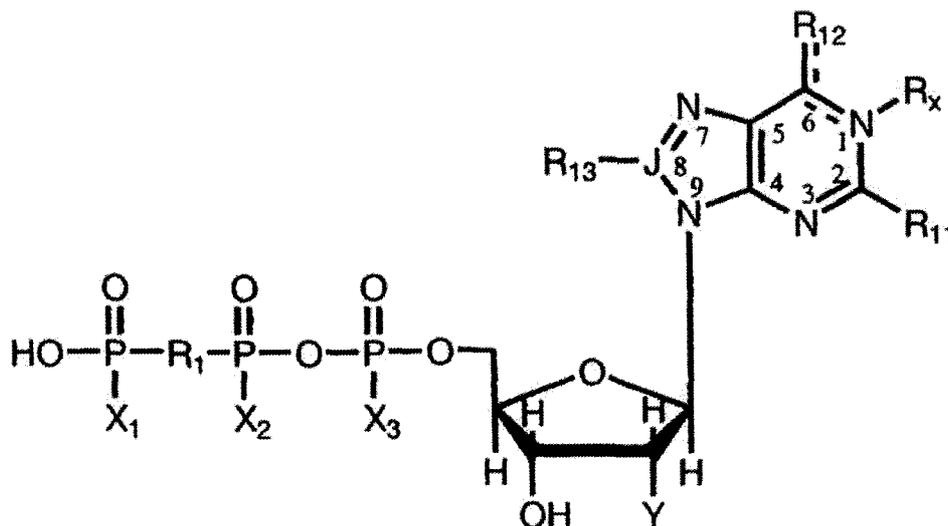
ATP y sus análogos son representados por la fórmula general I Ib:

Fórmula I Ib

5

10

15



En donde:

20

R₁, X₁, X₂, X₃ e Y son definidos como en la fórmula I Ia;

En donde:

25

R₁₁ es hidrógeno, cloro, amino, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

30

R₁₂ es hidroxilo, alquencil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, aciloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, aralquilaminos monosustituido, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilalmino;

R_x es O, H o está ausente;

35

R₁₂ y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N⁶-eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aril, o aralquil como se define más adelante;

R₁₃ es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define más

adelante; o $T(C_{1-6alquil})OCONH(C_{1-6alquil})W-$ en donde T y W son independientemente amino, mercapto, hidroxilo o carboxilo o farmacéuticamente aceptables ésteres, amidas o sales de éstos.

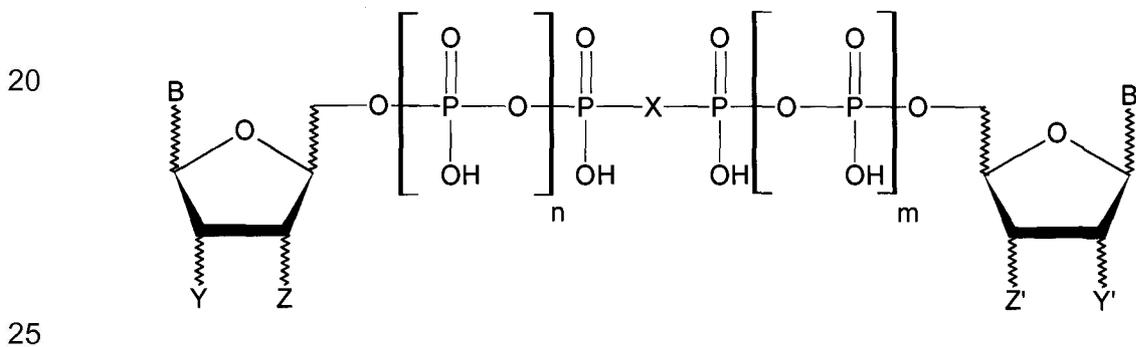
- 5 J es carbono o nitrógeno, con la condición de que cuando J es nitrógeno, R_{13} no está presente;

Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

- 10 Los grupos arilo son opcionalmente sustituidos con alquilos inferiores, aril, amino, mono o dialquilamino, NO_2 , N_3 , ciano, carboxilo, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno.

- 15 Otros de los compuestos incluidos en la presente invención son los dinucleósidos polifosfatos representados en la Fórmula III:

Fórmula III



En donde:

- 30 X es oxígeno, metileno, dihalometileno o imido

$n = 0, 1 \text{ ó } 2$

$m = 0, 1 \text{ ó } 2$

$n + m = 0, 1, 2, 3 \text{ ó } 4$

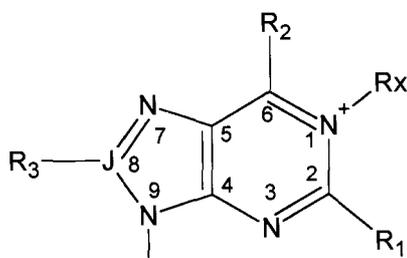
Z = OH ó H

Z' = OH ó H

Y = OH ó H

Y' = OH ó H y además

- 35 B y B' son ambos e independientemente un anillo de purina o un anillo de pirimidina como se definen en las fórmulas IV y V, unidas por las posiciones 9- ó 1- respectivamente:

Fórmula IV

En donde R_1 es cloro, amino, hidrógeno, ceto, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

R_2 , es alquenil, hidroxil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilamino.

R_x , es H, O ó está ausente.

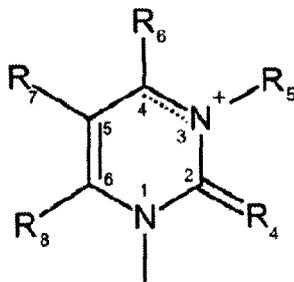
R_2 y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N^6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aralquil.

R_3 es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define más adelante.

J es nitrógeno o carbono en previsión de que cuando J es nitrógeno, R_3 está ausente.

Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser tanto lineales como ramificados.

Los grupos arilo pueden ser opcionalmente mono, di o trisustituidos con alquil, aril amino, mono o dialquilamino, NO_2 , N_3 , ciano, carboxil, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno.

Fórmula V

R₄ es oxo, hidroxilo, mercapto, tiona, amino, ciano, C₇₋₁₂ arilaloxi, C₁₋₆ alquiltio, C₁₋₆ alquiloxi, C₁₋₆ alquilamino o
 5 diC₁₋₄ alquilamino, donde los grupos alquilo están unidos
 opcionalmente para formar un heterociclo.

R₅ es hidrógeno, acetil, benzoil, C₁₋₆ alquil, C₁₋₈ alquinoil, arolil o puede estar ausente.

R₆ es hidroxilo, oxo, mercapto, tiona, C₁₋₄ alcoxi, C₇₋₁₂ arilalcoxi, C₁₋₆ alquiltio, S-fenil, ariltio, arilalquiltio,
 10 triazolil, amino, C₂₋₆ alquilamino, C₂₋₅ amino disustituido o
 di C₂₋₄ alquilamino, donde los grupos dialquil pueden ser
 opcionales ligados para formar un heterociclo o unidos para
 formar un anillo sustituido como morfolino, pirrolo etc.

R₅ y R₆ conjuntamente pueden formar un anillo imidazol de 5
 15 miembros entre las posiciones 3 y 4 del anillo de
 pirimidina y formar un derivado 3,N⁴-etenocitosina donde el
 grupo eteno es sustituido opcionalmente en las posiciones 4
 ó 5 con C₁₋₄ alquil, fenil, feniloxi, donde al menos un
 hidrógeno de C₁₋₄ alquil, fenil, feniloxi es sustituido
 opcionalmente por un grupo de entre halógenos, hidroxilo, C₁₋₄
 alcoxi, C₁₋₄ alquil, C₆₋₁₀ aril, C₇₋₁₂ arilalquil, carboxi,
 20 ciano, nitro, sulfonamido, sulfonato, fosfato, ácido
 sulfónico, amino, C₁₋₄ alquilamino y di C₃₋₄ alquilamino,
 donde los grupos dialquil pueden estar opcionalmente unidos
 para formar un heterociclo.

R₇ puede estar formado por hidrógeno, hidroxilo, ciano,
 nitro, C₂₋₆ alquil o fenil, C₂₋₈ alquinil, halógeno, C₁₋₆
 alquil, CF₃, C₂₋₃ alquenil, C₂₋₃ alquinil, alilamino,
 25 bromovinil, etil propenoato, ácido propenoico y C₂₋₈
 alquenil.

R₆ y R₇ conjuntamente pueden formar un anillo saturado o
 insaturado de 5 ó 6 miembros unidos por medio de N, O u S a
 R₆, ese anillo podría contener sustituyentes.

R₈ puede ser hidrógeno, amino, C₁₋₄ alquilamino, C₁₋₄ alcoxi, C₇₋₁₂ arilalcoxi, C₁₋₆ alquiltio, C₇₋₁₂ arilalquiltio, carboxamidometil, carboximetil, metoxi, metiltio, fenoxi y feniltio de modo que cuando R₈ es amino o amino sustituido, R₇ es hidrógeno.

5

Los diferentes agentes serán administrados en cantidades entre 10 nM y 100 µM.

10 Su administración tópica se podrá realizar de maneras diversas, por medio de vehículos portadores como gotas de líquido, lavados de líquido, geles unguentos, sprays, liposomas, nanopartículas, y también mediante dispositivos tales como lentes de contacto, implantes en el *cul de sac*, tapones lagrimales e implantes subconjuntivales y epiesclerales.

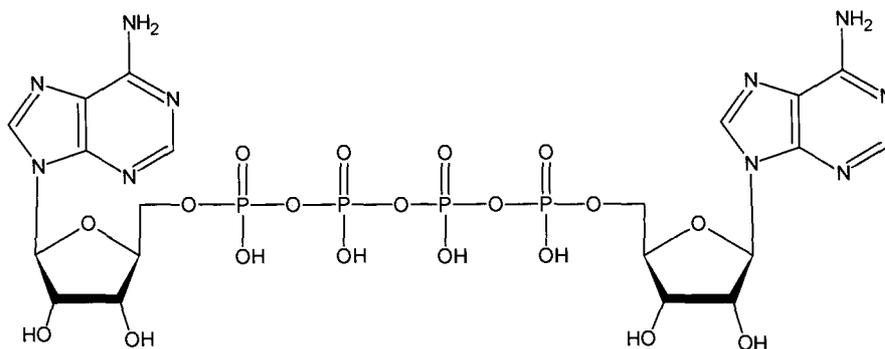
15 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

15

Ejemplo 1

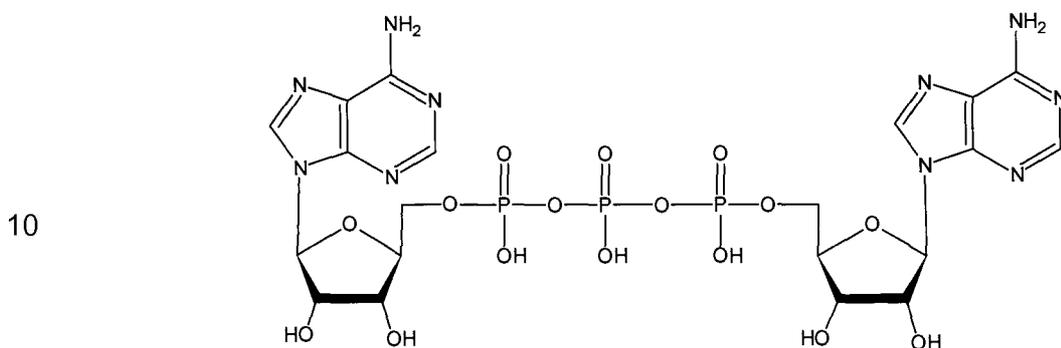
Células de epitelio corneal humano se tratan durante 5 minutos con el compuesto adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina (Ap₄A, véase fórmula VI), un dinucleótido con la estructura general descrita en la formula y con una base nitrogenada como la descrita en la formula. La concentración empleada de Ap₄A fue 100 µM. Transcurridos los 5 minutos se retira el compuesto Ap₄A y se incuban las células en su medio habitual durante distintos tiempos (1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas), finalizados los cuáles se analizaron los niveles proteicos de las *tight junctions* mediante técnicas de inmunotransferencia (*western blot*). Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió el nucleótido y ambos se compararon. Como se observa en la Figura 1 el tratamiento con el nucleótido provocó una reducción en los niveles de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-7, integrantes fundamentales de las uniones estrechas. La reducción en la cantidad de proteína resultó particularmente significativa transcurridas 2 y 4 horas. A partir de tiempos más largos de 6 horas y especialmente a 24 horas los niveles proteicos tienden a retornar hacia el valor control obtenido en ausencia del tratamiento con el nucleótido.

35

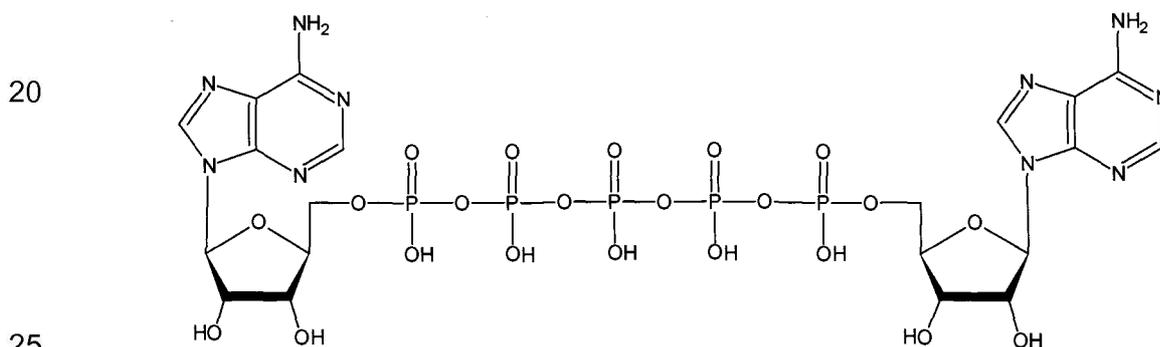
Fórmula VI

5 Ejemplo 2

Se determinaron los cambios en la permeabilidad de la barrera del epitelio de la superficie ocular mediante la evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial. Para ello, células de epitelio corneal humano sembradas en transwells de policarbonato se tratan durante 5 minutos con el dinucleósido polifosfato (dinucleótido) adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina (Ap₄A, véase fórmula VI), o con el dinucleótido adenosina 5' trifosfo 5' adenosina (Ap₃A, véase fórmula VII) o bien con el dinucleótido adenosina 5' pentafosfo 5' adenosina (Ap₅A, véase fórmula VIII). Todos estos dinucleótidos tienen la estructura general descrita en la fórmula III y la concentración empleada de cada uno de ellos fue 100 µM. Transcurridos los 5 minutos se retiran los correspondientes dinucleótidos y se incuban las células en su medio habitual procediendo a la medida de la resistencia eléctrica transepitelial de las células a distintos tiempos: 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió ningún dinucleótido y ambos se compararon. La medida de la resistencia eléctrica transepitelial se realizó empleando el sistema EVOM2 de World Precision Instruments. Como se observa en la Figura 2 el tratamiento con los distintos dinucleótidos provocó una reducción en la resistencia eléctrica transepitelial de las células de epitelio corneal humano, lo que es indicativo de un aumento de la permeabilidad al paso de sustancias de dichas células. En concreto, la disminución más acusada de la resistencia eléctrica transepitelial se observó a en el tiempo de 2 horas, retornando a las 24 horas hacia los valores mostrados por las células que no fueron expuestas al tratamiento con dinucleótidos.

5 Fórmula VII

15

Fórmula VIII

Ejemplo 3

30

Se determinaron los cambios en la permeabilidad de la barrera del epitelio de la superficie ocular mediante la evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial. Para ello células de epitelio corneal humano sembradas en transwells de policarbonato se exponen 5 minutos a diferentes nucleótidos tanto del tipo nucleósido difosfato como trifosfato. En concreto las células se tratan con:

35 nucleósido difosfato uridina 5' difosfato (UDP, véase fórmula Ia), nucleósido difosfato adenosina 5' difosfato (ADP, véase fórmula Ib), o bien con el nucleósido trifosfato uridina 5' trifosfato (UTP, véase fórmula IIa) o con el nucleósido trifosfato adenosina 5' trifosfato (ATP, véase fórmula I Ib). La concentración empleada de cada uno de ellos fue 100 μ M. Transcurridos los 5 minutos se retiran los correspondientes nucleótidos y se incuban las células

en su medio habitual procediendo a la medida de la resistencia eléctrica transepitelial de las células a distintos tiempos: 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió ningún nucleótido y ambos se compararon. La medida de la resistencia eléctrica transepitelial se realizó empleando el sistema EVOM2 de World Precision Instruments. Como se observa en la Figura 3 el tratamiento con los distintos nucleótidos provocó una reducción en la resistencia eléctrica transepitelial de las células de epitelio corneal humano, lo que es indicativo de un aumento de la permeabilidad al paso de sustancias de dichas células. En concreto, los nucleótidos ATP y UTP provocaron las bajadas más significativas y la disminución más acusada de la resistencia eléctrica transepitelial se observó a en el tiempo de 4 horas, retornando a las 24 horas hacia los valores mostrados por las células que no fueron expuestas al tratamiento con dinucleótidos.

15

Ejemplo 4

Se realizaron ensayos *in vivo* usando como modelo animal conejos de la raza Nueva Zelanda para analizar si la aplicación tópica del dinucleótido adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina (Ap_4A , véase fórmula VI) aumenta la penetración del fármaco hipotensor 5-MCA-NAT (5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine) a través de la córnea.

20

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y bebida. Estaban sometidos a ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas para evitar las oscilaciones debidas a los ciclos circadianos. Para la realización de la experimentación se siguió la directiva europea 86/609/EEC para el uso y manejo de los animales de experimentación.

25

Para evaluar la acción del Ap_4A sobre la penetración de fármacos oculares por vía tópica se instilaron en el ojo de los conejos 10 μ l del compuesto farmacológico 5-MCA-NAT (10 mM) sólo o bien se aplican inicialmente 10 μ l de Ap_4A (10 μ M) y transcurridas dos horas se instilan 10 μ l del compuesto 5-MCA-NAT (10 mM). A continuación los conejos son anestesiados para proceder a la extracción del humor acuoso de los ojos sometidos a los dos tipos de tratamiento usando una jeringa conectada a una aguja de 30-G en la zona esclerocorneal del limbo. La concentración del compuesto 5-MCA-NAT que ha alcanzado el humor acuso se analizó mediante cromatografía de alta eficacia (HPLC, *High-performance liquid chromatography*). El sistema de HPLC está formado por una bomba isocrática Waters 1515, un detector de

30
35

absorbancia 2487 dual y la columna empleada fue una Novapak C-18 de Waters. Como se puede observar en la figura 4 la concentración de 5-MCA-NAT encontrada en el humor acuso es mayor en el caso de los ojos pretratados con Ap₄A.

5

Ejemplo 5

Se realizaron ensayos *in vivo* usando como modelo animal conejos de la raza Nueva Zelanda para analizar si la aplicación tópica del dinucleótido adenosina 5' tetrafosfo
10 5' adenosina (Ap₄A, véase fórmula VI) aumenta la eficacia terapéutica del fármaco 5-MCA-NAT (5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine. Este fármaco se caracteriza por su acción hipotensora reduciendo la presión intraocular.

Los estudios de la presión intraocular se realizaron en conejos de la raza Nueva Zelanda midiéndoles la presión
15 intraocular. El ojo del conejo es especialmente interesante al ser grande y de ese modo poderse realizar medidas de presión intraocular de una manera precisa. Los animales empleados fueron normotensos ya que de ese modo la reproducibilidad de las medidas de presión intraocular y la facilidad de las mismas estaban garantizadas.

20 Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y bebida. Estaban sometidos a ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas para evitar las oscilaciones debidas a los ciclos circadianos. Para la realización de la experimentación se siguió la directiva europea 86/609/EEC para el uso y manejo de los animales de experimentación.

25 El compuesto 5-MCA-NAT (1 μ M) se aplica instilando tópicamente un volumen de 10 μ l en la superficie de la córnea. El compuesto se aplica sólo, o bien combinado con 10 μ l de Ap₄A (10 μ M). Asimismo en otros ojos se aplicaron inicialmente los 10 μ l de Ap₄A (10 μ M) y transcurridas 2 horas 10 μ l de 5-MCA-NAT (1 μ M).

30

Las medidas de la presión intraocular se realizaron por medio de un tonómetro Tonopen® XL. Las medidas se realizaron midiendo el nivel basal de la presión intraocular dos veces antes de la aplicación de los compuestos y con un intervalo de media hora entre ambas. Tras la aplicación de los compuestos se realizó un
35 seguimiento de la presión intraocular durante 8 horas.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos. Los cuadrados negros indican los datos obtenidos a partir del ojo en el que se aplicó únicamente solución salina (control); los

rombos rojos reflejan los resultados obtenidos cuando se aplicó únicamente el 5-MCA-NAT (5-MCA-NAT); los triángulos azules cuando se aplican simultáneamente 5-MCA-NAT y Ap₄A (Ap₄A + 5-MCA-NAT) y los triángulos verdes invertidos cuando se aplica inicialmente Ap₄A y a las dos horas 5-MCA-NAT (Ap₄A/5-MCA-NAT). El eje de las X expresa el tiempo en horas y el de las Y indica el valor de la PIO y cómo varía respecto al control (al que se le da un valor del 100 %). Como se aprecia en la figura 5, el tratamiento con 5-MCA-NAT resultó en una disminución de la presión intraocular con respecto al control. La aplicación conjunta de 5-MCA-NAT y Ap₄A también ejerció un efecto hipotensor, alcanzando el máximo efecto a las 4 h, donde se redujo la presión intraocular un 13% respecto al control. La aplicación desfasada de Ap₄A y 5-MCA-NAT (aplicado dos horas después), produjo una reducción máxima de la presión intraocular a las 4 h de un 27% respecto al control. Mientras que en la aplicación simultánea se observa una lenta y progresiva recuperación de la PIO a partir de las 4 horas, en el caso de la aplicación desfasada los valores se mantienen estables. Es decir, con este tipo de aplicación conseguimos un descenso más acusado y una mayor prolongación en el tiempo del efecto hipotensor.

Ejemplo 6

Se realizaron ensayos *in vivo* usando como modelo animal conejos de la raza Nueva Zelanda para analizar si la aplicación tópica del dinucleótido adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina (Ap₄A, véase fórmula VI) aumenta la eficacia terapéutica otro fármaco el Timolol. Este fármaco está disponible en el mercado y se caracteriza por su acción hipotensora reduciendo la presión intraocular. Los estudios de la presión intraocular se realizaron en conejos de la raza Nueva Zelanda midiéndoles la presión intraocular. El ojo del conejo es especialmente interesante al ser grande y de ese modo poderse realizar medidas de presión intraocular de una manera precisa. Los animales empleados fueron normotensos ya que de ese modo la reproducibilidad de las medidas de presión intraocular y la facilidad de las mismas estaban garantizadas.

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso a comida y bebida. Estaban sometidos a ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas para evitar las oscilaciones debidas a los ciclos circadianos. Para la realización de la experimentación se siguió la directiva europea 86/609/EEC para el uso y manejo de los animales de experimentación.

El compuesto timolol se aplica instilando tópicamente un volumen de 20 μ l en la superficie de la córnea. El compuesto se aplica sólo, o bien combinado con 10 μ l de Ap₄A (10 μ M). Asimismo en otros ojos se aplicaron
5 inicialmente los 10 μ l de Ap₄A (10 μ M) y transcurridas 2 horas 20 μ l de timolol.

Las medidas de la presión intraocular se realizaron por medio de un tonómetro Tonopen® XL. Las medidas se realizaron midiendo el nivel basal de la presión
10 intraocular dos veces antes de la aplicación de los compuestos y con un intervalo de media hora entre ambas. Tras la aplicación de los compuestos se realizó un seguimiento de la presión intraocular durante 8 horas, pese a que el máximo del efecto se obtuvo a las dos horas.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos. Como se aprecia en la figura, el tratamiento con timolol redujo la presión intraocular respecto al control. La aplicación conjunta de timolol y Ap₄A también disminuyó la presión intraocular respecto al control pero no representó una mejora en el efecto hipotensor respecto a la aplicación del timolol sólo. En cambio, la aplicación previa de Ap₄A (dos horas antes) del tratamiento con timolol si provocó una
15 mayor reducción de la presión intraocular respecto a la aplicación del fármaco sólo. En concreto la presión intraocular se redujo un 21.6% respecto al control.
20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Para facilitar la comprensión de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras:

Figura 1.- Efecto del Ap₄A sobre la expresión de ZO-1, Ocludina y Claudina-7 en células corneales epiteliales
30 humanas. Análisis de inmunotransferencia en el que en la parte superior se puede observar el efecto del Ap₄A (bandas con un signo positivo arriba, indicando la adicción de Ap₄A a las células de epitelio corneal humano) en comparación con el control (bandas con el signo negativo arriba, indicando la ausencia de tratamiento con Ap₄A), donde se aprecia que las bandas con el signo positivo arriba son
35 menos intensas que las del control. Dichas bandas, tanto en el control como en el tratado representan las correspondientes proteínas nombradas a la derecha: ZO-1, Ocludina y Claudina-7. Además para confirmar que los cambios observados son debidos a una acción específica

sobre las proteínas constitutivas de las *tight junctions* y no a cambios en la carga de proteína total empleada en el ensayo de inmunotransferencia, se analizó la expresión de la proteína GAPDH, no observándose cambios en esta proteína, lo que confirma la acción específica del Ap₄A sobre las proteínas ZO-1, Ocludina y Claudina-7. Debajo se representa en forma de diagrama de barras la cuantificación de dichas bandas, detectándose que hay un descenso en los niveles proteicos de las uniones estrechas. Los datos se expresan en porcentaje y considerando como 100% la intensidad de la banda correspondiente al control en cada tiempo.

Figura 2.-Efecto de los dinucleótidos Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A sobre la permeabilidad epitelial evaluada midiendo la resistencia eléctrica transepitelial. En los tiempos indicados se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Cada punto representa la media de 4 transwells y los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Figura 3.-Efecto de los mononucleótidos ADP, UDP, ATP y UTP sobre la permeabilidad epitelial evaluada midiendo la resistencia eléctrica transepitelial. En los tiempos indicados se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Cada punto representa la media de 4 transwells y los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Figura 4.- Concentración de 5-MCA-NAT en el humor acuoso medida usando HPLC. Se instilaron solamente 10 μ l de 5-MCA-NAT (10 mM) en los ojos de los conejos (barra de la izquierda) o bien previamente 10 μ l de Ap₄A (10 μ M) y a continuación 10 μ l de 5-MCA-NAT (10 mM) (barra de la derecha). El tratamiento previo con Ap₄A origina una mayor entrada a nivel de la córnea y por tanto mayor presencia de 5-MCA-NAT en el humor acuoso. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de 6 experimentos independientes.

Figura 5.- Efecto del compuesto hipotensor 5-MCA-NAT instilado sólo (rombos rojos), combinado con Ap₄A (triángulos azules) o tras pretratamiento de 2 horas con Ap₄A (triángulos verdes invertidos) sobre la presión intraocular. El efecto sobre la presión intraocular a lo largo del tiempo del 5-MCA-NAT (1 μ M) aplicado sólo, o simultáneamente con 10 μ l de Ap₄A (10 μ M) (Ap₄A + 5-MCA-NAT) fue estudiado durante 8 horas desde su aplicación inicial, comparándolo con el control. También se estudió el efecto del 5-MCA-NAT aplicado 2 horas después del

pretratamiento con Ap_4A . ($Ap_4A/5-MCA-NAT$). Los valores representan la media \pm el error estándar de la media.

Figura 6.- Efecto del compuesto hipotensor timolol
5 instilado sólo, combinado con Ap_4A o tras pretratamiento
de 2 horas con Ap_4A sobre la presión intraocular. El efecto
sobre la presión intraocular del timolol aplicado sólo, o
simultáneamente con 10 μ l de Ap_4A (10 μ M) ($Ap_4A + Timolol$)
fue estudiado comparándolo con el control. También se
estudió el efecto del timolol aplicado 2 horas después del
10 pretratamiento con Ap_4A . ($Ap_4A/Timolol$). Se muestra el
resultado del efecto máximo de la sustancia obtenido a las
2 horas. Los valores representan la media \pm el error
estándar de la media.

15

20

25

30

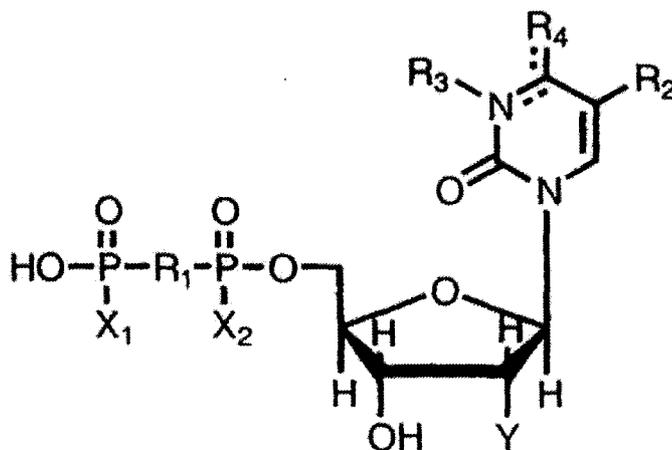
35

REINVINDICACIONES

1.-El uso de un agonista de receptores purinérgicos de nucleótidos para elaborar un medicamento para mejorar la entrada a través de la superficie ocular de fármacos oculares aplicados tópicamente a un sujeto y consiguientemente la eficacia terapéutica de dichos fármacos.

10

2.-El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agonista de receptores purinérgicos P2Y es un nucleósido difosfato de Fórmula Ia o Ib:

15 Fórmula Ia

20

En donde:

X_1 y X_2 son ambos e independientemente O^-

Y es OH ó H

25

R_1 es oxígeno, imido, metileno o dihalometileno

R_2 es hidrógeno, halógeno, alquil, alcoxi, alquil sustituido, alquenil, alquinil, nitro, o azido;

R_3 es hidrógeno, acil, alquil, arilalquil, arilalcoxi o puede estar ausente

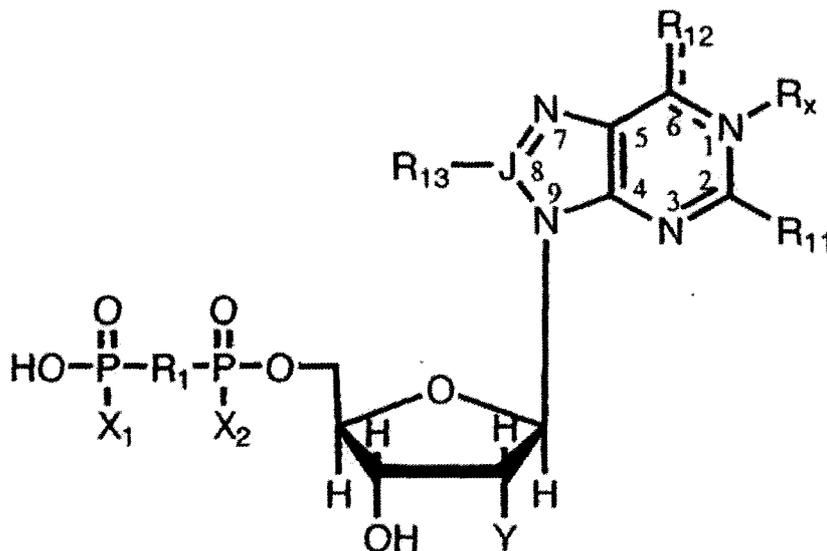
30

R_4 es OR' , SR' , NR' o $NR'R''$ en donde R' y R'' son independientemente hidrógeno, alquil, alquil sustituido, aril, aril sustituido, arilalquil, alcoxi ariloxi y cuando R_4 forma un doble enlace a través de un átomo de oxígeno o de azufre con el átomo de carbono en posición 4 del anillo

35

de pirimidina, R' es ausente.

Fórmula Ib



5 En donde:

R_1 , X_1 , X_2 e Y son definidos como en la fórmula Ia;

En donde:

10 R_{11} es hidrógeno, cloro, amino, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

15 R_{12} es hidroxilo, alquenil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, aciloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, aralquilaminos monosustituido, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilalmino;

R_x es O, H o está ausente;

20 R_{12} y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N^6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aril, nitroaril, haloaril, aralquil, o alcoxi;

25 R_{13} es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio, o $T(C_{1-6}alquil)OCONH(C_{1-}$

6alquil)W- en donde T y W son independientemente amino, mercapto, hidroxil o carboxilo o farmacéuticamente aceptables ésteres, amidas o sales de éstos.

- 5 J es carbono o nitrógeno, con la condición de que cuando J es nitrógeno, R₁₃ no está presente;

Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

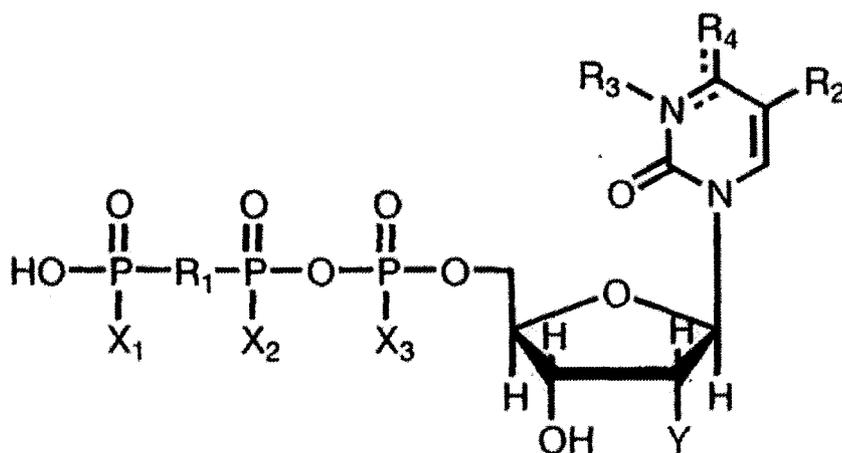
10

Los grupos arilo son opcionalmente sustituidos con alquilos inferiores, aril, amino, mono o dialquilamino, NO₂, N₃, ciano, carboxil, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato, halógeno o nada

15

3.-El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agonista de receptores P2Y es un nucleósido trifosfato de Fórmula IIa o IIb:

20 Fórmula IIa



En donde:

25

X₁, X₂ y X₃ son cada uno independientemente ambos O⁻ ó S⁻

Y es H ó OH;

R₁ es oxígeno, imido, metileno o dihalometileno

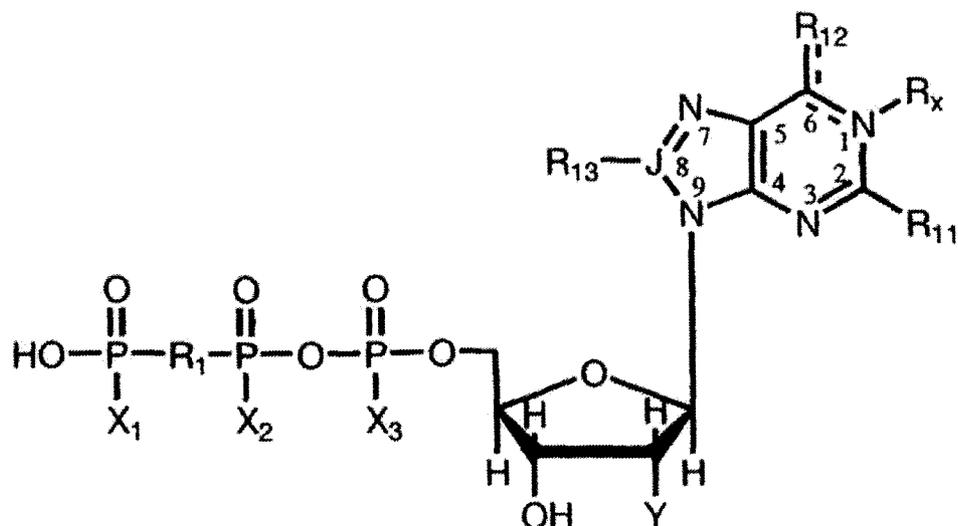
30 R₂ es hidrógeno, halógeno, alquil, alcoxi, alquil sustituido, nitro o azido;

R₃ es hidrógeno, acil, alquil, arilalquil, arilalcil o puede estar ausente

35 R₄ es OR', SR', NR', o NR'R'' en donde R' y R'' son independientemente hidrógeno, alquil, alquil sustituido,

aril, aril sustituido, arilalquil, alcoxi ariloxi y cuando R₄ forma un doble enlace a través de un átomo de oxígeno o de azufre con el átomo de carbono en posición 4 del anillo de pirimidina, R' es ausente.

Fórmula IIb



5 En donde:

R_1 , X_1 , X_2 , X_3 e Y son definidos como en la fórmula IIa;

En donde:

10 R_{11} es hidrógeno, cloro, amino, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

15 R_{12} es hidroxilo, alquencil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, aciloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, aralquilaminos monosustituido, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilalmino;

R_x es O, H o está ausente;

20 R_{12} y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N⁶-eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aril, aralquil, nitroaril, haloaril o alcoxi

25 R_{13} es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio, o T(C₁₋₆alquil)OCONH(C₁₋₆alquil)W- en donde T y W son independientemente amino,

mercapto, hidroxilo o carboxilo o farmacéuticamente aceptables ésteres, amidas o sales de éstos.

J es carbono o nitrógeno, con la condición de que cuando J es nitrógeno, R₁₃ no está presente;

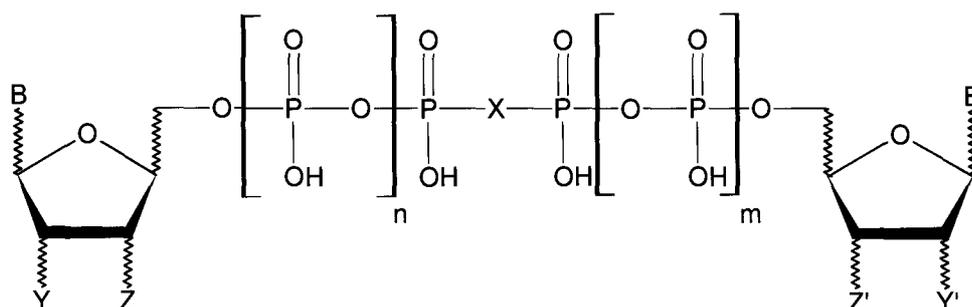
Para todos los alquilo anteriormente definidos, estos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

Los grupos arilo son opcionalmente sustituidos con alquilo inferiores, aril, amino, mono o dialquilamino, NO₂, N₃, ciano, carboxilo, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato, halógeno o nada.

4.-El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agonista de receptores P2Y es un dinucleósido polifosfato de Fórmula III:

Fórmula III

20



25 En donde:

X es oxígeno, metileno, dihalometileno o imido

n = 0, 1 ó 2

m = 0, 1 ó 2

30 n + m = 0, 1, 2, 3 ó 4

Z = OH ó H

Z' = OH ó H

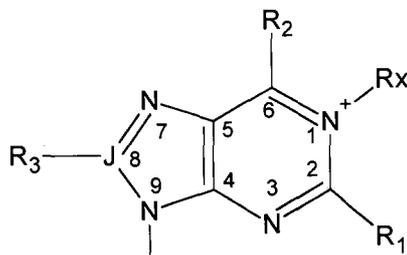
Y = OH ó H

Y' = OH ó H y además

35 B y B' son ambos e independientemente un anillo de purina o un anillo de pirimidina como se definen en las fórmulas IV y V, unidas por las posiciones 9- ó 1- respectivamente:

40

Fórmula IV



5 En donde R_1 es cloro, amino, hidrógeno, ceto, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones.

10 R_2 , es alquenil, hidroxil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilamino.

15 R_x , es H, O ó está ausente.

R_2 y R_x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N^6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aralquil.

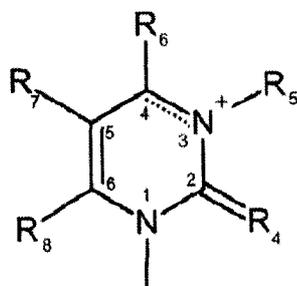
20 R_3 es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define más adelante.

J es nitrógeno o carbono en previsión de que cuando J es nitrógeno, R_3 está ausente.

25 Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser tanto lineales como ramificados.

30 Los grupos arilo pueden ser opcionalmente mono, di o trisustituidos con alquil, aril amino, mono o dialquilamino, NO_2 , N_3 , ciano, carboxil, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno.

Fórmula V



R₄ es oxo, hidroxilo, mercapto, tiona, amino, ciano, C₇₋₁₂ arilaloxi, C₁₋₆ alquiltio, C₁₋₆ alquiloxi, C₁₋₆ alquilamino o diC₁₋₄ alquilamino, donde los grupos alquilo están unidos opcionalmente para formar un heterociclo.

5

R₅ es hidrógeno, acetil, benzoil, C₁₋₆ alquil, C₁₋₈ alquinoil, arolil o puede estar ausente.

R₆ es hidroxilo, oxo, mercapto, tiona, C₁₋₄ alcoxi, C₇₋₁₂ arilalcoxi, C₁₋₆ alquiltio, S-fenil, ariltio, arilalquiltio, triazolil, amino, C₂₋₆ alquilamino, C₂₋₅ amino disustituido o di C₂₋₄ alquilamino, donde los grupos dialquil pueden ser
10 opcionales ligados para formar un heterociclo o unidos para formar un anillo sustituido como morfolino, pirrolo etc.

R₅ y R₆ conjuntamente pueden formar un anillo imidazol de 5 miembros entre las posiciones 3 y 4 del anillo de pirimidina y formar un derivado 3,N⁴-etenocitosina donde el grupo eteno es sustituido opcionalmente en las posiciones 4
15 ó 5 con C₁₋₄ alquil, fenil, feniloxi, donde al menos un hidrógeno de C₁₋₄ alquil, fenil, feniloxi es sustituido opcionalmente por un grupo de entre halógenos, hidroxilo, C₁₋₄ alcoxi, C₁₋₄ alquil, C₆₋₁₀ aril, C₇₋₁₂ arilalquil, carboxi, ciano, nitro, sulfonamido, sulfonato, fosfato, ácido sulfónico, amino, C₁₋₄ alquilamino y di C₃₋₄ alquilamino, donde los grupos dialquil pueden estar opcionalmente unidos
20 para formar un heterociclo.

R₇ puede estar formado por hidrógeno, hidroxilo, ciano, nitro, C₂₋₆ alquil o fenil, C₂₋₈ alquinil, halógeno, C₁₋₆ alquil, CF₃, C₂₋₃ alquenil, C₂₋₃ alquinil, alilamino, bromovinil, etil propenoato, ácido propenoico y C₂₋₈ alquenil.
25

R₆ y R₇ conjuntamente pueden formar un anillo saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros unidos por medio de N, O u S a R₆, ese anillo podría contener sustituyentes.

R₈ puede ser hidrógeno, amino, C₁₋₄ alquilamino, C₁₋₄ alcoxi, C₇₋₁₂ arilalcoxi, C₁₋₆ alquiltio, C₇₋₁₂ arilalquiltio,
30

carboxamidometil, carboximetil, metoxi, metiltio, fenoxi y feniltio de modo que cuando R_8 es amino o amino sustituido, R_7 es hidrógeno.

- 5 5.-El uso de acuerdo con las reivindicaciones 2,3 o 4, donde el residuo azucarado es ribosil o desoxiribosil.
- 6.-El uso de acuerdo con las reivindicación 5, donde el residuo azucarado es cualquiera de los siguientes tipos:
- 10 ribofuranosil, 2'-desoxiribofuranosil, 3'-desoxifuranosil
2',3'-didesoxiribofuranosil, arabinofuranosil, 3'-
desoxiarabinofuranosil, xilofuranosil, 2'-
desoxixilofuranosil y lixofuranosil.
- 15 7.-El uso de acuerdo con las reivindicación 2, donde dicho nucleósido difosfato pueda ser 5'-uridina difosfato (UDP) o 5'-adenosina difosfato (ADP).
- 8.-El uso de acuerdo con las reivindicación 3, donde dicho
- 20 nucleósido trifosfato pueda ser 5'-uridina trifosfato (UTP) o 5'-adenosina trifosfato (ATP).
- 9.-El uso de acuerdo con las reivindicación 4, donde dicho dinucleósido polifosfato pueda ser adenosina 5' tetrafosfo
- 25 5' adenosina (Ap_4A), dinucleótido adenosina 5' trifosfo 5' adenosina (Ap_3A) o el dinucleótido adenosina 5' pentafosfo 5' adenosina (Ap_5A).
- 10.-El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4
- 30 donde los compuestos administrados tengan una concentración entre 10 nM y 100 μ M.
- 11.-El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 donde la administración del agonista de receptores de
- 35 nucleótidos se realice a través de un vehículo portador seleccionado de un grupo consistente en gotas de líquido, lavados con líquido, geles, ungüentos, sprays, liposomas y nanopartículas.
- 40 12.-El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 donde la administración del agonista de receptores de nucleótidos se realice a través de un dispositivo portador del agente purinérgico seleccionado de un grupo consistente en lentes de contacto, implantes en el *cul de sac*, tapones
- 45 lagrimales e implantes subconjuntivales y epiesclerales.

Figura 1

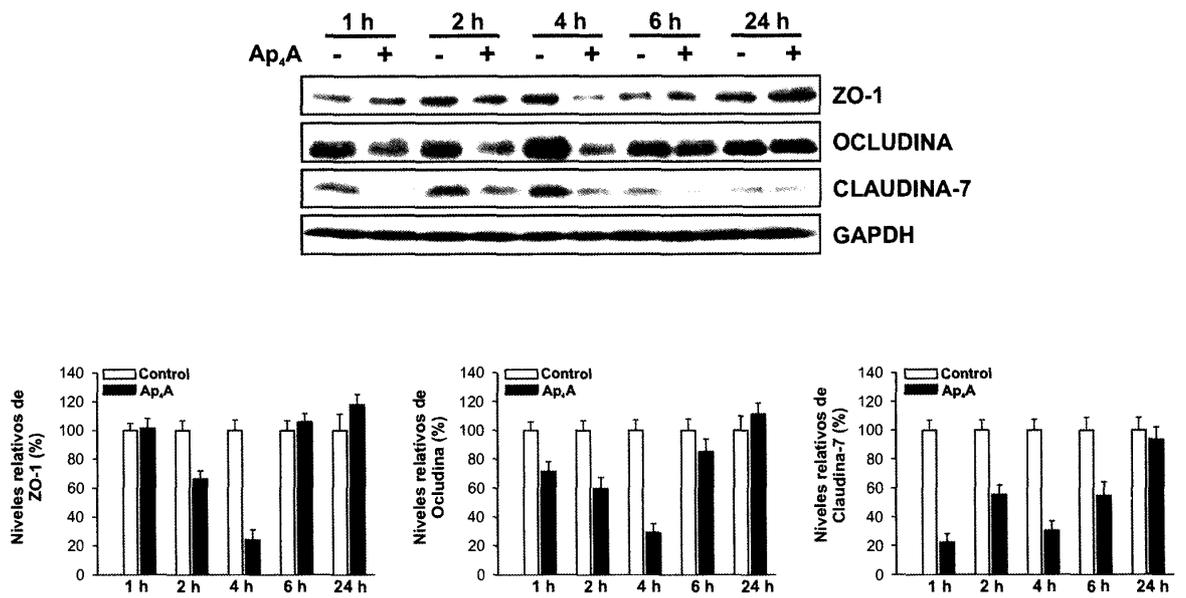


Figura 2

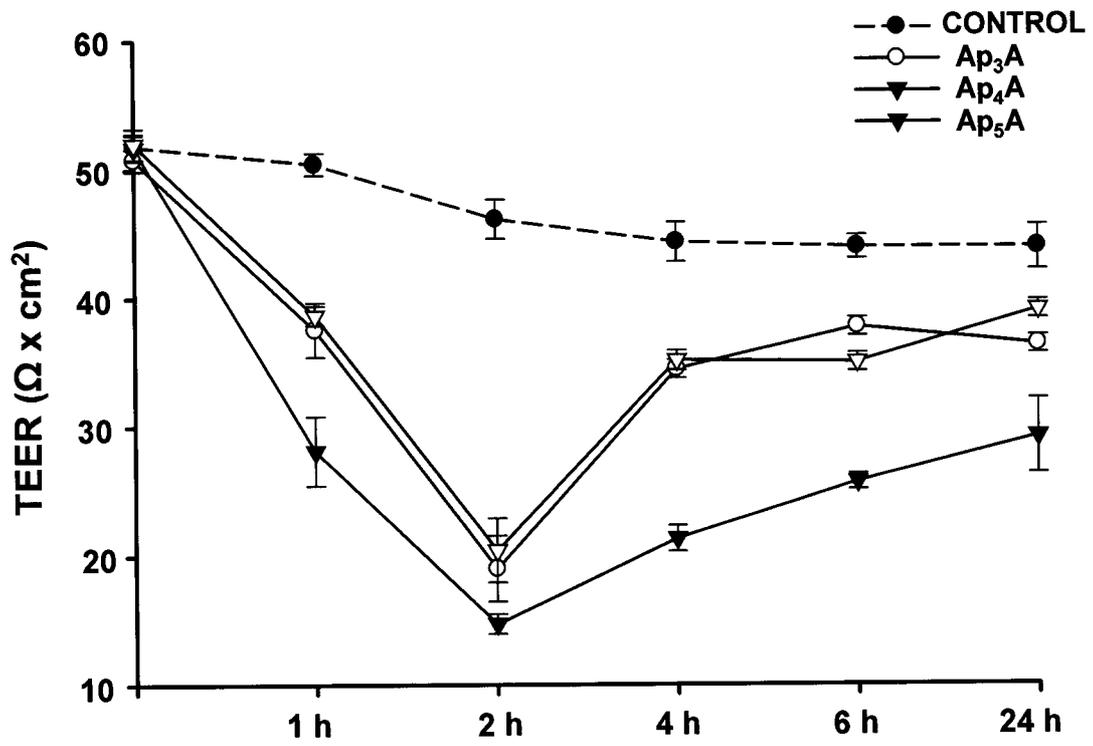


Figura 3

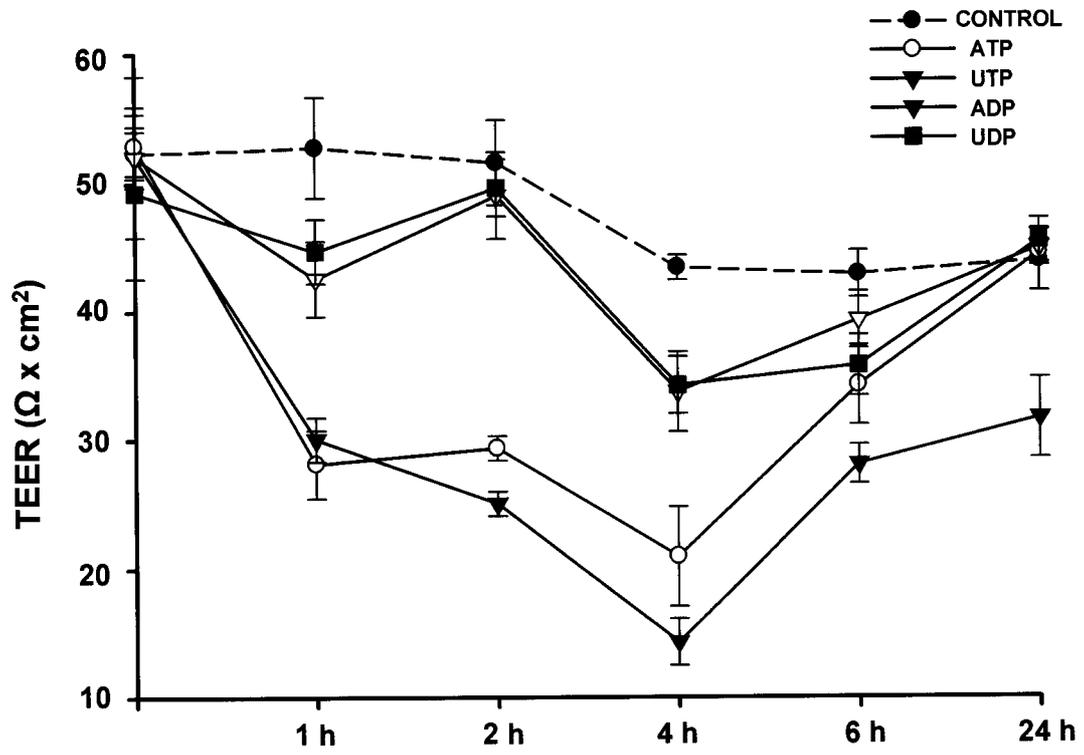


Figura 4

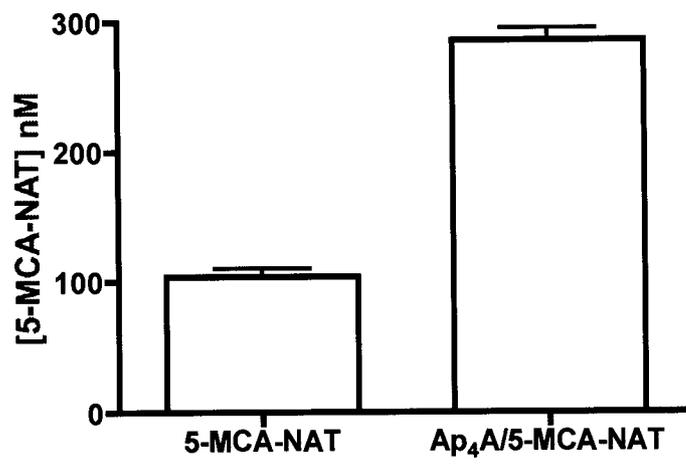


Figura 5

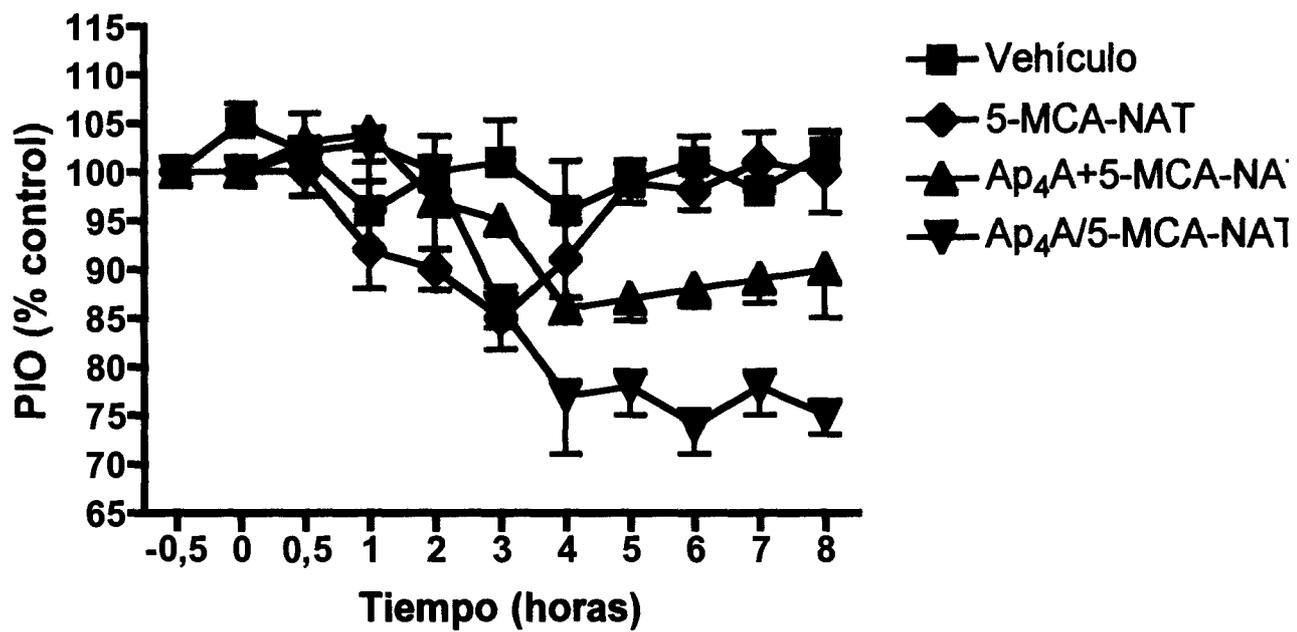
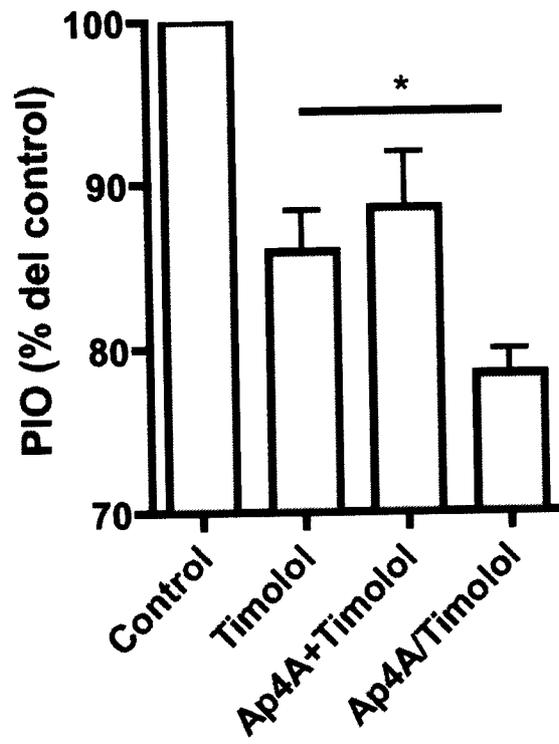


Figura 6





②① N.º solicitud: 201201248

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TAKAHASHI, J. "Effect of nucleotide P2Y ₂ receptor agonists on outward active transport of fluoescin across normal blood-retina barrier in rabbit". Experimental Eye Research 2004, Volumen 78, páginas 103-108. Ver página 103, resumen.	1-12
A	GUZMÁN-ARÁNGUEZ, A. & PINTOR, J. "Focus on Molecules: Purinergic P2Y ₂ receptor". Experimental Eye Research 2012, Volumen 105, páginas 83-84. [Disponible en línea el 28.04.2012]. Ver página 83, apartado 2; página 84, apartado 4.	1-12
A	TANAKA, N. et al. "Myosin light chain kinase and Rho-kinase participate in P2Y receptor-mediated acceleration of permeability through the endothelial cell layer". Journal of Pharmacy and Pharmacology 2005, Volumen 57, páginas 335-340. Ver página 335, resumen; página 338, columna 2, párrafo 2.	1-12
A	SKAPER, S.D. et al. "The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders". The FASEB Journal (The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology) 2010, Volumen 24, páginas 337-345. Ver página 337, resumen; página 341, columna 1, párrafo 1.	1-12
A	KINOSHITA, N. et al. "Activation of P2Y receptor enhances high-molecular compound absorption from rat ileum". Journal of Pharmacy and Pharmacology 2006, Volumen 58, páginas 195-200. Ver página 195, resumen.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.03.2014

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H19/10 (2006.01)
C07H19/20 (2006.01)
C07H21/02 (2006.01)
C07H21/04 (2006.01)
A61K31/7072 (2006.01)
A61K31/708 (2006.01)
A61K31/7084 (2006.01)
A61K47/24 (2006.01)
A61P27/02 (2006.01)

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

C07H, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.03.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TAKAHASHI, J. Experimental Eye Research 2004, Vol. 78, pp. 103-108.	2004
D02	GUZMÁN-ARÁNGUEZ, A. & PINTOR, J. Experimental Eye Research 2012, Vol. 105, pp. 83-84	28.04.2012
D03	TANAKA, N. et al. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2005, Vol. 57, pp. 335-340	2005
D04	SKAPER, S.D. et al. The FASEB Journal 2010, Vol. 24, pp. 337-345.	2010
D05	KINOSHITA, N. et al. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2006, Vol. 58, pp. 195-200	2005

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

El objeto de la invención es el uso de un **agonista de receptores purinérgicos** de nucleótidos **para elaborar un medicamento para mejorar la entrada a través de la superficie ocular**, y *por* tanto, la eficacia de fármacos aplicados tópicamente a un sujeto.

El documento D01 divulga el efecto provocado por determinados nucleótidos agonistas del receptor P2Y₂ en el transporte activo de fluoresceína a través de la barrera sangre-retina (BRB) de conejo *in vivo*. Así, la administración intravítrea de INS542 [P¹-(uridina 5')-P⁴-(2'-deoxicidina 5')tetrafosfato, sal tetrasódica] aumentó el transporte activo de fluoresceína a través de dicha barrera hacia el exterior en el ojo sano. Estos datos indican que la activación de los receptores P2Y₂ *in vivo* estimula el transporte activo a través del epitelio pigmentario de la retina (ver página 103, resumen).

El documento D02 divulga un estudio sobre el receptor purinérgico P2Y₂, que puede ser estimulado por nucleótidos (ATP y UTP), además de por ciertos dinucleótidos, como diadenosina tetrafosfato, que son componentes activos de los fluidos que bañan las estructuras oculares relevantes, como son la córnea y el epitelio conjuntivo (ver página 83, apartado 2). La activación del receptor P2Y₂ en la superficie ocular promueve la secreción de cloruro y el transporte neto de fluidos a las lágrimas desde el epitelio conjuntivo. De esta manera, la estimulación del receptor P2Y₂ favorece la secreción de lágrimas *in vivo* y afecta a la composición de éstas, aumentando la liberación de glicoproteínas de mucina. La capacidad de los receptores P2Y₂ para estimular el transporte de fluidos e iones en las células epiteliales ha conducido al desarrollo de agonistas de estos receptores con diversas acciones terapéuticas (ver página 84, apartado 4).

Los documentos D01 y D02 divulgan la influencia de diversos agonistas de receptores purinérgicos en el transporte de fluoresceína, fluidos e iones, sugiriendo su posible aplicación terapéutica como fármacos, pero no recogen su uso para mejorar la entrada de otros fármacos a través de la superficie ocular.

El documento D03 divulga un estudio que demuestra que la estimulación del receptor P2Y acelera la entrada de macromoléculas a través de la capa de células epiteliales (ver página 335, resumen). Para elucidar el mecanismo de esta aceleración se realizaron ensayos de entrada de fluoresceína isoctiocianato dextrano (FD-4) a través de una monocapa de células endoteliales de vena umbilical humana, en presencia de un agonista del receptor P2Y (2meS-ATP), que favorece el proceso, y de un inhibidor de quinasa de cadena ligera de miosina (ML-9) o un inhibidor de Rho-quinasa (Y-27632). Los resultados sugieren que la fosforilación de la miosina de cadena ligera puede jugar un papel importante en la regulación purinérgica de la entrada de macromoléculas a través del endotelio vascular, lo que podría utilizarse para el diseño eficaz y la aplicación de nuevas tecnologías de sistemas de liberación de fármacos (ver página 338, columna 2, párrafo 2).

El documento D04 recoge un estudio sobre los receptores purinérgicos, en concreto los P2X, canales catiónicos activados por ATP. Algunos subtipos de estos receptores tienen la capacidad de cambiar su selectividad tras una exposición prolongada a ATP, lo que da lugar a una progresiva dilatación del poro del canal, y, en consecuencia, al desarrollo de permeabilidad a moléculas de hasta 900 Da (ver página 337, resumen; página 341, columna 1, párrafo 1).

Del mismo modo, el documento D05 divulga el papel de los nucleótidos extracelulares como importantes reguladores del transporte iónico a través del epitelio intestinal, y por tanto, el efecto de los mismo en la absorción de fármacos en el intestino (ver página 195, resumen). El documento divulga también ensayos realizados utilizando fluoresceína isotiocianato dextrano (FD-4) como compuesto modelo para investigar los efectos de los nucleótidos de purina en la absorción de fármacos que presentan una escasa permeabilidad en el intestino.

Los documentos D03-D05 divulgan el efecto de diversos agonistas de receptores purinérgicos en el transporte de moléculas a través de células epiteliales en general o intestinales, y su aplicación potencial como promotores de la entrada de fármacos. Sin embargo, no sugieren el uso de estos agonistas para mejorar la entrada de otros fármacos a través de la **superficie ocular**.

Por tanto, los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga o contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de un agonista de receptores purinérgicos de nucleótidos para elaborar un medicamento para **mejorar la entrada a través de la superficie ocular**, objeto de la presente solicitud.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-12** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.