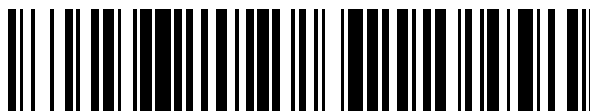


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 766**

51 Int. Cl.:

A61K 31/485 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
C07D 489/00 (2006.01)
C07C 233/16 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01)
C07D 489/12 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
C07D 489/02 (2006.01)
C07D 489/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2015** **PCT/US2015/027820**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015** **WO15168031**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2015** **E 15720244 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 3137081**

54 Título: **Dímero de buprenorfina y uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales**

30 Prioridad:

28.04.2014 US 201461985207 P
09.01.2015 US 201562101768 P
09.01.2015 US 201562176883 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2018

73 Titular/es:

ORPHOMED, INC. (100.0%)
806 Denise Court
Mill Valley, CA 94941, US

72 Inventor/es:

SINGH, NIKHILESH

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 658 766 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).

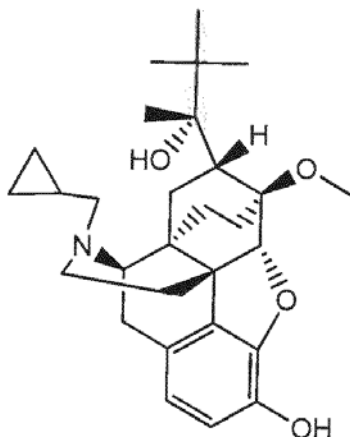
DESCRIPCIÓN

Dímero de buprenorfina y uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales

Antecedentes de la invención

Buprenorfina

- 5 [0001] La buprenorfina es un modulador semisintético del receptor opioide mixto agonista μ y antagonista κ que se utiliza para tratar la adicción a opioides a dosis más elevadas, para controlar el dolor agudo moderado en individuos no tolerantes a los opioides a dosis más bajas, y para controlar el dolor crónico moderado a dosis todavía más bajas. Su estructura es:



10 Buprenorfina

- [0002] La buprenorfina está indicada actualmente para el tratamiento del dolor por administración intravenosa, sublingual y transdérmica. La buprenorfina también está indicada para el tratamiento de la adicción a los opiáceos. Aunque la buprenorfina tiene una vida útil prolongada y se puede administrar una vez al día, la biodisponibilidad oral de la buprenorfina es muy reducida debido a su alta extracción presistémica.
- 15 Por consiguiente, se requiere la administración sublingual de buprenorfina para alcanzar unas concentraciones plasmáticas sistémicas clínicamente efectivas. Incluso con la administración sublingual, la disponibilidad en la circulación sistémica se limita aproximadamente a un 30%.

Síndrome del intestino irritable con diarrea predominante

- 20 [0003] El síndrome del intestino irritable con diarrea predominante (SII-D) es un trastorno gastrointestinal con un elevado nivel de prevalencia que se acompaña de diarrea, además de hiperalgesia visceral y somática (dolor intensificado ante estímulos colorrectales y somáticos), molestias, hinchazón y gases.

[0004] Según la International Foundation for Functional Gastrointestinal Disorders, se calcula que el SII-D afecta a unos 25-45 millones de estadounidenses. Es el diagnóstico más habitual entre los gastroenterólogos y uno de los trastornos más tratados por los médicos de atención primaria.

- 25 [0005] El síndrome del intestino irritable (SII) tiene un enorme impacto sobre la calidad de vida y conlleva unos elevados costes sociales. La enfermedad presenta una tendencia fluctuante, aunque suele ser crónica o subcrónica. Aunque no existen pruebas de que la presencia de SII implique un deterioro de la esperanza de vida del paciente, reduce de forma significativa la calidad de vida relacionada con la salud y la productividad en el trabajo. En los casos más graves, los pacientes pueden sufrir varios episodios de dolor abdominal y diarrea al día, provocando graves trastornos en sus relaciones y su lugar de trabajo.
- 30

Tratamientos para el SII-D

- [0006] Se han utilizado aglutinantes de ácidos biliares, amitriptilina, probióticos, estabilizantes de mastocitos y 5-ASA fuera de las indicaciones autorizadas para el tratamiento del SII-D, aunque sin evidencias convincentes de eficacia crónica. La loperamida antidiarréica, un opioide sintético, se ha utilizado de forma
- 35 similar, aunque la caída no inhibida de la actividad agonista del opioide μ a menudo provoca un grave estreñimiento.

- [0007] Entre los fármacos para el SII-D se encuentra LX 1033, un inhibidor de la síntesis de la serotonina en el tracto gastrointestinal, que está siendo desarrollado en estos momentos por Lexicon Pharmaceuticals. Sin embargo, su mecanismo de acción no proporciona un alivio del dolor. DNK-333 (Novartis), un antagonista de la neuroquinina, fue retirado de un estudio para el SII-D tras los ensayos de fase II por su poca eficacia.
- 40 lbutant (Menarini), otro antagonista de la neuroquinina en ensayos de Fase II, no demostró ninguna

eficacia respecto del placebo en la población general, y se está sometiendo a nuevas pruebas solo en mujeres. Se ha estudiado la rifaximina (Salix Pharmaceuticals) para el SII-D y ha demostrado una actividad moderada, aunque genera una importante preocupación el desarrollo de resistencia a los antibióticos y su eficacia continuada.

5 [0008] Latronex (alosetrón, Prometheus Laboratories, Inc.) es el único fármaco aprobado para el SII-D en los Estados Unidos, aunque solo para mujeres. No ha demostrado propiedades analgésicas. Es importante señalar que su prospecto contiene un cuadro negro de advertencia por graves efectos adversos incluyendo, en concreto, la colitis isquémica.

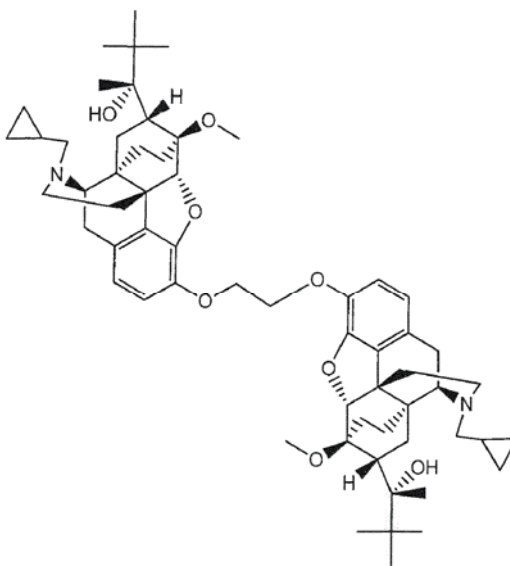
10 [0009] Hasta la fecha, en los Estados Unidos no se ha aprobado ningún fármaco para el tratamiento crónico y sin restricciones del SII-D.

[0010] Eluxadoline (Forest Laboratories, Inc.) es un agonista del receptor opioide μ y antagonista del receptor opioide δ que ha satisfecho criterios de valoración primarios de mejora de consistencia de las deposiciones y reducción del dolor abdominal en ensayos de fase II. Su efecto sobre la reducción del dolor es modesto, en el mejor de los casos, y carece de un efecto demostrable sobre la reducción de la hipersensibilidad del colon que provoca la hiperalgesia. Por otra parte, se documentaron varios casos de pancreatitis, una enfermedad potencialmente mortal, en ensayos de fase II. Se documentaron casos de pancreatitis incluso después de que pacientes con un historial conocido de enfermedad biliar fuesen excluidos de la participación en el estudio clínico. Por lo general, los agonistas μ tienen un efecto constrictor sobre el esfínter de Oddi, una válvula muscular que regula el flujo de bilis y jugos pancreáticos que va del conducto biliar al duodeno. La buprenorfina, gracias a su efecto parcial agonista μ y antagonista κ , no provoca un aumento del tono o la constricción del esfínter de Oddi. Prevemos que el dímero de buprenorfina, con la misma farmacología del receptor que la buprenorfina, tampoco tendrá ningún efecto constrictor sobre el esfínter de Oddi.

[0011] Por consiguiente, existe la necesidad desde hace mucho tiempo de un tratamiento crónico del SII-D que reduzca la motilidad intestinal, reduciendo así la incidencia de la diarrea, que sea analgésico, que no esté asociado con la pancreatitis, y que más que limitarse a tratar los síntomas, trate potencialmente la hipersensibilidad subyacente y la hiperalgesia resultante asociada con el SII-D. WO 2004/103317 describe el uso de buprenorfina en el tratamiento de la hiperalgesia gastrointestinal y D-SII. Bhounsule et al. "Gastrointestinal actions of buprenorphine: are different receptors involved?", European Journal of Pharmacology, vol. 316, n.º 2-3 (1996) divulgan varios tratamientos para el D-SII. Zakko et al. "Randomised clinical trial: the clinical effects of a novel neurokinin receptor antagonist, DNK333, in women with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome", Alimentary Pharmacology & Therapeutics, vol. 33, n.º 12 (2011) divulgan varios tratamientos para el D-SII. Camilleri M "Current and future pharmacological treatments for diarrhea- predominant irritable bowel syndrome", Expert Opinion on Pharmacotherapy 2013 Informa Healthcare GBR, vol. 1, n.º 9 (2013) divulgan dímeros de buprenorfina para su uso en medicina. US 2005/075361 divulga dímeros de buprenorfina para su uso en medicina. US2011/245287 divulga dímeros de buprenorfina para su uso en medicina. WO 03/032990 divulga el uso de opioides pegilados para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales.

Breve resumen de la invención

40 [0012] La presente invención se define en las reivindicaciones. En un aspecto del presente documento, se proporciona un dímero novedoso que comprende dos moléculas del fármaco buprenorfina, conjugadas entre sí por O-alquilación a través de sus grupos fenólicos para obtener la estructura de la Fórmula (I):



Fórmula (I)

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0013] En la Fórmula (I), el compuesto es: 2,2'-((4aR,4a'R,6S,6'S,7S,7'S,12bR,12b'R)-9,9'-(etano-1,2-diilbis(oxi))bis(3-(ciclopropilmetil)-7-metoxi-1,2,3,4,5,6,7,7a-octahidro-4a,7-etano-4,12-metanobenzofuro[3,2-e]isoquinolina-9,6-diil))bis(3,3-dimetilbutan-2-ol) (Compuesto 1 o dímero de buprenorfina). Su peso molecular es 961,28.

[0014] Inicialmente, sintetizamos este dímero de buprenorfina con la intención de obtener un profármaco que impediría el abuso. Al dimerizar los compuestos originales en sus posiciones de hidrógeno fenólico, creíamos que la actividad opioide disminuiría hasta el metabolismo de primer paso en el hígado para liberar el compuesto original. Creíamos que el metabolismo del fármaco estaría facilitado por enzimas citocromo P-450 (CYP 3A4 y CYP2D6) cuando estas interactuasen con los carbonos metilénicos unidos a las moléculas de oxígeno fenólico del dímero. La O-desalquilación resultante liberaría finalmente la buprenorfina en la circulación sistémica.

[0015] Nuestras expectativas estaban respaldadas por la bibliografía relativa a la conjugación en hidrógeno fenólico en general, aunque no con nuestro enlace en particular. La idea convencional ha sido que la derivatización de los grupos fenólicos de morfínicos mediante la sustitución del hidrógeno por un sustituyente menos hidrofílico reduciría de forma significativa la potencia opioide del opioide resultante. Ver Feinberg Andrew F, et al. *Proc Natl Acad Sci. USA*, Volumen 73, n.º 11, pág. 4215 - 4219 (1976). Según R. Richards, *Opioid Analgesics* (www.facultv.smu.edu): "Un grupo fenólico libre es crucial para la actividad analgésica". En *Anesth Analg* 1984; 63:143-51 en 145 et seq, D.H. Thorpe afirma: "Otra porción de la molécula de morfina que se cree que interactúa con el receptor es la fracción fenólica. Al silenciar el grupo hidroxilo libre con un grupo metilo se reduce la potencia más de diez veces. El autor continúa citando otros estudios que demuestran que los grupos alquilo más grandes tienen un efecto todavía más perjudicial, concluyendo que "la voluminosidad...es responsable del efecto de unión reducido". Ver también las Patentes USA 8 183 376 y 8 461 171.

[0016] A pesar de estas expectativas, el dímero resultante resultó tener unas propiedades totalmente imprevistas, descartándose su utilidad como profármaco pero resultando adecuado para indicaciones muy diferentes de las que habíamos previsto inicialmente. Las fracciones de buprenorfina, lejos de presentar el obstáculo estérico que habíamos previsto, conservaron la farmacología característica de su receptor opioide. El dímero demostró ser resistente al metabolismo enzimático en el medio gastrointestinal. Es altamente resistente al deterioro, en su forma de base libre. Cuando se administra oralmente básicamente no se absorbe y por tanto no entra en la circulación sistémica. Estas observaciones fortuitas nos llevaron a concebir nuevas indicaciones para las que resultaban beneficiosas estas propiedades, es decir la analgesia periférica en el tracto gastrointestinal.

[0017] El novedoso compuesto de la invención aborda una antigua necesidad de contar con un tratamiento efectivo del SII-D que haga frente tanto al dolor como a la diarrea, que reduzca la hipersensibilidad visceral (colónica), que no tenga los inconvenientes de otros agentes utilizados para este fin y que se pueda prescribir de forma segura en un tratamiento crónico. Por consiguiente, la invención comprende el uso del compuesto

para el tratamiento del SII-D, especialmente cuando existe hipersensibilidad visceral e hiperalgesia. El compuesto también se puede utilizar como adyuvante con otros fármacos, como teduglutida, para el tratamiento de otras enfermedades intestinales como el síndrome del intestino corto, a fin de reducir de forma segura el tiempo de tránsito intestinal. Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden un dímero de buprenorfina de la Fórmula (1), formulado en forma de cápsula o comprimido oral, una cápsula o comprimido oral de liberación prolongada, una inyección depot (gradual) intramuscular o subcutánea, o un parche transdérmico.

Breve descripción de los gráficos

[0018] La Figura 1 muestra un gráfico de barras que ilustra la estabilidad del dímero de buprenorfina cuando se expone a enzimas CYP en presencia y ausencia de un cofactor.

[0019] La Figura 2 muestra un gráfico de barras que muestra la estabilidad del dímero de buprenorfina en condiciones acuosas, así como ácidas y básicas, cada una de ellas a temperatura ambiente y a 140°F durante el periodo de tiempo indicado.

[0020] La Figura 3 muestra los resultados de experimentos de unión del receptor del dímero de buprenorfina - receptor μ .

[0021] La Figura 4 muestra los resultados de experimentos de unión del receptor del dímero de buprenorfina - RECEPTOR K.

[0022] La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo funcional del agonista μ para el dímero de buprenorfina.

[0023] La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo funcional del antagonista μ del dímero de buprenorfina.

[0024] La Figura 7 muestra los resultados de biodisponibilidad oral e intravenosa de la buprenorfina y el dímero de buprenorfina.

[0025] Las Figuras 8 y 9 muestran los gráficos de deposición inducida por estrés de machos de ratón CD-1 según la evaluación del Ejemplo 7.

[0026] La Figura 10 demuestra que el dímero de buprenorfina reduce las deposiciones en función de la dosis.

[0027] La Figura 11 muestra el efecto del dímero de buprenorfina sobre la motilidad gastrointestinal en modelos postinflamatorios según el Ejemplo 7.

Descripción detallada de la invención

[0028] El dímero de buprenorfina de la invención presenta la actividad de agonista parcial del receptor μ y antagonista completo del receptor κ que caracteriza a la buprenorfina original. La actividad de antagonista del receptor κ es muy importante porque parece que tiene múltiples funciones. Dado que el dímero agonista del receptor μ descrito en el presente documento también tiene un efecto antagonista del receptor κ , la reducción por parte del agonista del receptor μ de la motilidad intestinal es moderada, reduciendo la posibilidad de estreñimiento severo. Al mismo tiempo, el efecto antagonista del receptor κ parece prevenir el efecto constrictor del agonista del receptor μ sobre el tejido del músculo liso del esfínter de Oddi, evitando la posibilidad de pancreatitis. En estudios con animales y humanos, se ha demostrado que la buprenorfina también reducía la hipersensibilidad e hiperalgesia en colon y piel. La hipersensibilidad visceral es un componente importante de la etiología del SII-D y creemos que el antagonismo del receptor K del dímero de buprenorfina jugará un papel importante en la reducción de los síntomas. Ahora también hemos demostrado en modelos animales que el dímero de buprenorfina descrito, debido tanto a su retención de la farmacología del receptor de buprenorfina como a la no absorción sistémica (es decir, no absorción del tracto intestinal), resulta adecuado para el tratamiento crónico del SII-D, al tiempo que elimina sustancialmente las perspectivas de abuso. Este sorprendente descubrimiento indica que el dímero descrito aquí sería superior a los agentes disponibles que se utilizan en el tratamiento del SII-D, porque (1) aborda la hipersensibilidad visceral (colónica) subyacente y la consiguiente hiperalgesia características del SII-D, (2) elude la posibilidad de pancreatitis asociada a la eluxadolina, (3) mitiga la diarrea sin riesgo de estreñimiento, y (4) consigue lo anterior sin los problemáticos efectos adversos a nivel sistémico y del sistema nervioso central que se atribuyen a la propia buprenorfina.

[0029] Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona una forma dimérica de buprenorfina, donde las dos moléculas de buprenorfina están unidas a través de un enlace covalente entre el grupo funcional fenólico (3-hidroxilo) de cada molécula de buprenorfina y un enlace de etileno. El enlace de etileno actúa de separador entre las dos moléculas de buprenorfina y se cree que impide que las dos voluminosas moléculas de buprenorfina adopten una forma de anillo cerrado vía interacción covalente, iónica o de Van der Waals entre otros grupos funcionales en las moléculas.

[0030] Sorprendentemente, cuando dos moléculas del fármaco se conjugan entre sí a través de un separador de etileno, donde el separador de etileno está unido al anillo de fenilo de cada molécula del fármaco por un enlace de éter, se descubre el que el dímero resultante es química y metabólicamente estable, y no se desconjuga cuando se expone a enzimas metabólicas. Por otra parte, sorprendente e inesperadamente, el dímero mantiene la actividad farmacológica del compuesto original y tiene una exposición sistémica inapreciable tras la administración oral.

[0031] A diferencia de la buprenorfina, se ha descubierto que el dímero de buprenorfina, preparado como se ha descrito en este documento, no se absorbe tras la administración oral y además conserva la actividad opioide μ y κ no solo en forma sino también en dirección, es decir, que ni la afinidad ni la actividad del receptor se ven comprometidas. Además, el dímero de buprenorfina descrito en el presente documento es relativamente estable al metabolismo en experimentos *in vivo* e *in vitro*. El dímero de buprenorfina parece metabólicamente estable, incluso tras la exposición en el hígado de ratones vivos, tras la inyección intravenosa. Por tanto, sorprendente e inesperadamente, a pesar de la pérdida de propiedades de absorción manifestadas por la ausencia de absorción gastrointestinal y la inactivación metabólica, la funcionalidad opioide del dímero no se pierde y sus efectos opioides gastrointestinales se manifestaron en forma de reducción de la motilidad y la respuesta antidiarréica tras la administración oral. Los efectos gastrointestinales fueron proporcionales a la dosis en los modelos de ratón, en los que la diarrea (aumento de gránulos excretados) se produce por una combinación de estrés físico y psicológico. En otro experimento con un modelo de ratón en el que se sensibilizó el colon por daño inflamatorio, la respuesta favorable persistió más allá del periodo agudo, tres semanas después del daño agudo, lo que indica posiblemente un efecto del dímero sobre el descenso de la hipersensibilidad y la hiperalgesia de las membranas colónicas del ratón.

[0032] Por otra parte, se descubrió que el dímero de buprenorfina conservaba selectivamente solo las funciones μ y κ de la buprenorfina, deshaciéndose significativamente de su función δ .

Dicho de otro modo, el dímero de buprenorfina, a diferencia de la buprenorfina, es una molécula activa μ y κ selectiva, sin actividad δ significativa.

Síntesis del dímero de buprenorfina

[0033] La síntesis del dímero de buprenorfina proporcionado en este documento se puede producir por una reacción de O-alkilación general en un diluyente orgánico (por ej., acetonitrilo, DMF, DMSO, NMP, DCM, THF, 1,4-Dioxano) en presencia de base inorgánica (por ej., hidróxido de sodio, carbonato de potasio, carbonato sódico, carbonato de cesio, bicarbonato potásico y bicarbonato sódico) o base orgánica (por ej., trietilamina, base de Hunig, DMAP y piridina) a temperatura ambiente o a temperatura elevada. Los agentes alquilantes adecuados que se pueden utilizar incluyen reactivos de diyodo, dibromo, dicloro, ditosilato, dimesilato y ditriflato (por ej., ditosilato de 1,2-etileno, dimesilato de 1,2-etileno). La base libre o una sal de buprenorfina se puede utilizar como material de partida en la síntesis.

Composiciones farmacéuticas del dímero - Generalidades

[0034] En determinadas realizaciones de este documento, se aportan composiciones que comprenden un dímero de buprenorfina de la Fórmula (I). Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable. A continuación se describen ejemplos de vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para tratar el SII con diarrea predominante.

[0035] Tal y como se apreciará, se puede utilizar una sal farmacéuticamente aceptable de un dímero en lugar de (o adicionalmente a) un dímero en cualquiera de (o todas) las composiciones y métodos de tratamiento que se debaten en el presente documento. Por tanto, en realizaciones específicas, se utiliza una sal farmacéuticamente aceptable del dímero (es decir, cualquier sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los dímeros) en los métodos de la invención. Estas sales se pueden preparar, por ej., *in situ* durante el aislamiento y purificación final del compuesto o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal formada de este modo. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable del dímero de buprenorfina se prepara utilizando ácido acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, camforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fórmico, fumático, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, hidrobrómico, hidrocórico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mónico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, silicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico o p-toluenosulfónico. Para una descripción más amplia de las sales farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en los métodos descritos aquí, consultar, por ej., S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts," 1977, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19, que se incorpora al presente por referencia en su totalidad.

[0036] El dímero de buprenorfina de la invención puede existir en forma de no solvato y solvato con diluyentes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol y similares. En general, las formas de solvato se consideran equivalentes a las formas no solvatadas a efectos de la presente invención. En una realización específica, la forma de solvato del dímero es un hidrato.

[0037] En general, la formación de sal puede mejorar la vida útil del agente terapéutico resultante. La síntesis de sal apropiada puede dar productos que son cristalinos, menos propensos a la oxidación y fáciles de manejar. Se pueden preparar diversas sales que pueden dar compuestos estables y cristalinos. Algunos ejemplos son sales de ácido hidroclicóric, sulfúric, p-toluenosulfónico, metanosulfónico, malónico, fumáric y ascórbico.

[0038] En determinadas realizaciones específicas, esta composición farmacéutica se formula en forma de una cápsula o comprimido oral, cápsula o comprimido oral de liberación prolongada (cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda), película o comprimido sublingual o película o comprimido sublingual de liberación prolongada. A continuación se describen más detalladamente ejemplos de vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables.

Métodos de tratamiento - Generalidades

[0039] En realizaciones específicas del presente documento, se proporciona un método para el tratamiento del síndrome del intestino irritable con diarrea predominante que reduce la diarrea, el dolor y la hipersensibilidad e hiperalgesia del intestino en un paciente, que comprende la administración oral de una cantidad terapéuticamente efectiva del dímero. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que produce un efecto apreciable y beneficioso en un número de pacientes estadísticamente significativo. En determinadas realizaciones, el paciente es un mamífero. En realizaciones más específicas, el paciente es un ser humano. En determinadas realizaciones concretas, el paciente es un mamífero domesticado, como un perro, un gato o un caballo.

Composiciones farmacéuticas, dosis y vías de administración

[0040] El fármaco para el SII-D estudiado aquí se puede administrar a un sujeto por vía oral en forma de preparaciones convencionales, como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, pastillas, píldoras, supositorios, suspensiones orales, jarabes, geles orales, pulverizadores, soluciones y emulsiones. Las formulaciones adecuadas se pueden preparar con métodos empleados habitualmente utilizando aditivos orgánicos o inorgánicos convencionales, como un excipiente (por ej., sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato cálcico o carbonato cálcico), un aglutinante (por ej., celulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polipropilpirrolidona, polivinilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa o almidón), un desintegrador (por ej., almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilalmidón, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, bicarbonato sódico, fosfato cálcico o citrato cálcico), un lubricante (por ej., estearato de magnesio, ácido silícico anhidroso ligero, talco o lauril sulfato de sodio), un agente aromatizante (por ej., ácido cítrico, mentol, glicina o polvo de naranja), un conservante (por ej., benzoato sódico, bisulfito sódico, metilparabeno o propilparabeno), un estabilizante (por ej., ácido cítrico, citrato sódico o ácido acético), un agente de suspensión (por ej., metilcelulosa, pirrolidona de polivinilo o estearato de aluminio), un agente dispersante (por ej., hidroxipropilmetilcelulosa), un diluyente (por ej., agua) y una cera de base (por ej., manteca de cacao, petrolato blanco o polietilenglicol).

[0041] La dosis del dímero de buprenorfina proporcionado aquí que se administrará al paciente es bastante variable y puede estar sujeta al criterio del personal sanitario. La dosis se puede variar convenientemente dependiendo de la edad, el peso corporal y el estado médico del sujeto, así como del tipo de administración. En una realización, la dosis se proporciona por día. En cualquier caso determinado, la cantidad a administrar del dímero proporcionado aquí dependerá de otros factores como la solubilidad del componente activo, la formulación utilizada y la vía de administración. La cantidad efectiva del fármaco del dímero de buprenorfina proporcionado aquí en la composición farmacéutica alcanzará un nivel que surtirá el efecto deseado y preferiblemente, por ej., entre unos 0,15 mg/kg de peso corporal de un paciente con SII-D y 7,2 mg/kg de peso corporal de un paciente, más preferiblemente entre unos 0,7 mg/kg de peso corporal de un paciente con SII-D y 3,0 mg/kg de peso corporal, y todavía más preferiblemente unos 1,5 mg/kg de peso corporal de un paciente en dosis unitaria para administración oral. Alternativamente, se administrarán entre unos 10 y 500 mg, preferiblemente entre unos 50 y 200 mg, más preferiblemente unos 100 mg a un paciente con SII-D.

[0042] El dímero de buprenorfina presentado aquí se puede administrar, por ej., una, dos o tres veces al día, aunque preferiblemente una vez al día. El dímero presentado en este documento se puede administrar oralmente por razones de comodidad. En una realización, cuando se administra oralmente, el dímero presentado en este documento se administra con alimentos y agua. En otra realización, el dímero presentado en este documento se dispersa en agua o zumo (por ej., zumo de manzana o zumo de naranja) y se administra oralmente en forma de suspensión.

[0043] Alternativamente, el dímero de buprenorfina proporcionado en el presente también se puede administrar por vía rectal u otras vías transmucosales. El modo de administración se deja a criterio del personal sanitario.

[0044] En una realización del presente documento, se proporcionan cápsulas que contienen el dímero sin un vehículo, excipiente o portador adicional.

[0045] En otra realización de este documento, se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad efectiva del dímero y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, donde el vehículo o portador farmacéuticamente aceptable puede comprender un excipiente, diluyente o una mezcla de estos.

[0046] Las composiciones orales pueden adoptar la forma de comprimidos, comprimidos masticables, cápsulas, soluciones, pastillas, suspensiones y similares. Se pueden formular composiciones que contengan una dosis diaria, o una fracción conveniente de una dosis diaria, en una dosis unitaria, que puede ser un único comprimido o cápsula o un volumen conveniente de un líquido. En una realización, las soluciones se preparan a partir de sales solubles en agua, como sal de hidrócloruro. En general, todas las composiciones se preparan según los métodos conocidos en la química farmacéutica. Se pueden preparar cápsulas mezclando el dímero presentado en este documento con un vehículo o diluyente adecuado y rellenando las cápsulas con la cantidad adecuada de la mezcla. Los vehículos y diluyentes habituales incluyen, entre otros, sustancias inertes en polvo, como almidón de muchos tipos diferentes, celulosa en polvo, especialmente celulosa cristalina y microcristalina, azúcares como fructosa, manitol y sacarosa, harinas de trigo y polvos comestibles similares.

[0047] Los comprimidos se pueden preparar por compresión directa, por granulación húmeda o por granulación seca. Por lo general sus formulaciones incorporan diluyentes, aglutinantes, lubricantes y desintegradores, además del compuesto. Típicamente los diluyentes incluyen, por ej., diversos tipos de almidón, lactosa, manitol, caolín, fosfato cálcico o sulfato cálcico, sales inorgánicas como cloruro de sodio y azúcar en polvo. También se pueden utilizar derivados de celulosa en polvo. Los aglutinantes típicos para comprimidos son sustancias como el almidón, la gelatina y azúcares como la lactosa, la fructosa, la glucosa y similares. Las gomas naturales y sintéticas también resultan convenientes, incluyendo la goma arábiga, alginatos, metilcelulosa, polivinilpirrolidina y similares. El polietilenglicol, la etilcelulosa y las ceras también pueden utilizarse como aglutinantes.

[0048] Para la formulación de un comprimido puede resultar necesario un lubricante, a fin de evitar que el comprimido y las perforaciones se adhieran en el molde. El lubricante se puede seleccionar entre sólidos deslizantes como talco, magnesio y estearato cálcico, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados. Los desintegradores de comprimidos son sustancias que se hinchan cuando se humedecen para romper el comprimido y liberar el compuesto. Estos incluyen almidones, arcillas, celulosas, alginas y gomas. Más concretamente, se pueden utilizar almidones de maíz y de patata, metilcelulosa, agar, bentonita, celulosa de madera, esponja natural en polvo, resinas de intercambio iónico, ácido alginico, goma guar, pulpa de cítricos y celulosa de carboximetilo, por ej., así como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar como aromatizante y sellante, o con agente protectores formadores de película, para modificar las propiedades de disolución del comprimido. Las composiciones también se pueden formular en forma de comprimidos masticables, por ej., utilizando sustancias como manitol en la formulación.

[0049] Cuando se desee administrar el fármaco presentado en este documento en forma de supositorio, se pueden utilizar las bases típicas. La manteca de cacao es una base de supositorio tradicional, que se puede modificar mediante la adición de ceras para elevar ligeramente su punto de fusión. Las bases de supositorio miscibles con agua que comprenden, particularmente, polietilenglicoles de diversos pesos moleculares son de uso muy extendido.

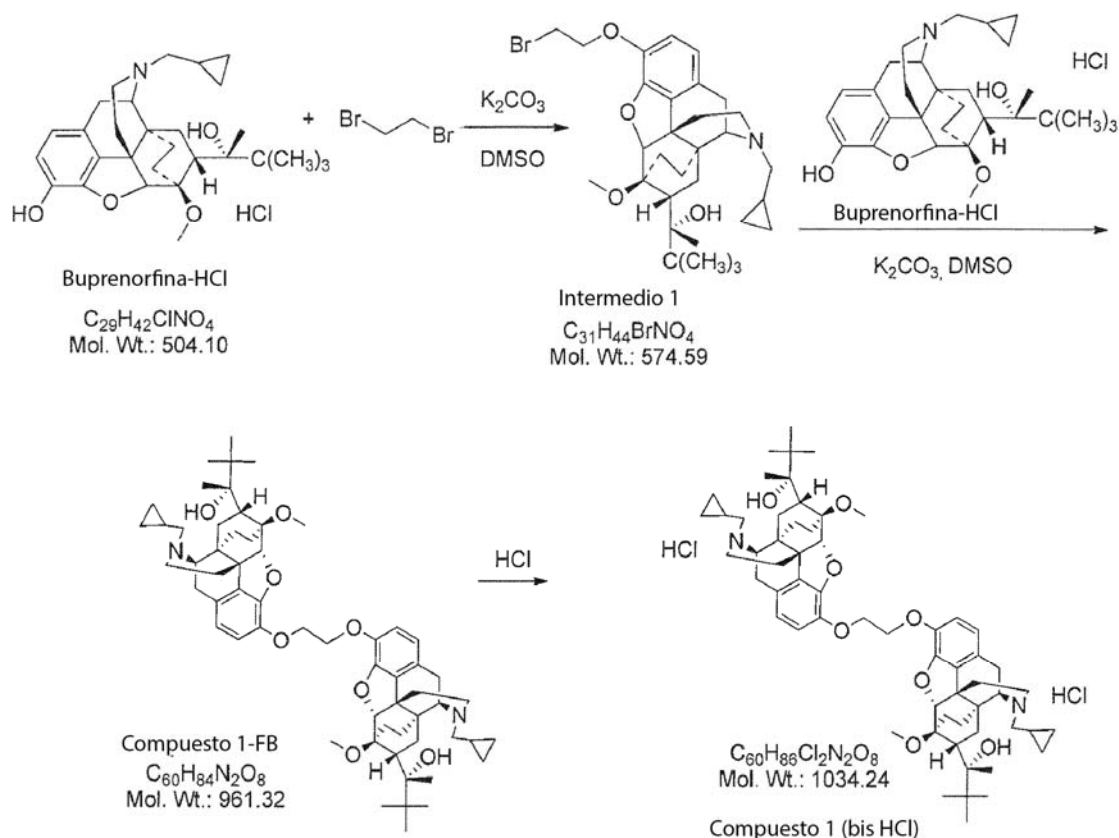
[0050] El efecto del fármaco proporcionado aquí se puede retrasar o prolongar mediante una formulación adecuada. Por ejemplo, se puede utilizar un gránulo de disolución lenta del dímero e incorporarse a un comprimido o cápsula, o un dispositivo implantable de liberación lenta. La técnica también incluye la producción de gránulos con varios índices de disolución diferentes y el relleno de las cápsulas con una mezcla de los gránulos. Los comprimidos o cápsulas pueden estar revestidos con una película resistente a la disolución durante un periodo de tiempo predecible.

EJEMPLOS

[0051] Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, sin carácter limitador, la invención reivindicada.

EJEMPLO 1: Síntesis

[0052] El dímero de buprenorfina se sintetizó como se muestra a continuación.



[0053] Se colocó HCl de buprenorfina-sal (5,0 g, 10,68 mmol, 1 equiv) y carbonato de potasio (42,73 mmol, 4 equiv) en un matraz de fondo redondo de tres cuellos y, a continuación, DMSO anhidro (50 ml, 10 vol). La mezcla se calentó hasta 60°C y se añadió 1,2-dibromoetano (9,2 mL, 106,8 mmol, 10 equiv) lentamente. La mezcla de la reacción se agitó a 60°C durante 16 h y, a continuación, se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. Las porciones orgánicas combinadas se lavaron con agua salada, se secaron (Na_2SO_4 anhidroso) y se concentraron bajo presión reducida para obtener un líquido viscoso. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílicio utilizando 0-5% MeOH/ DCM para obtener 4,2 g (69%) de Intermedio 1 en forma de un sólido espumoso de color crudo.

[0054] Se colocó HCl de buprenorfina-sal (1,74 g, 3,72 mmol) y carbonato de potasio (2,0 g, 14,87 mmol) en un matraz de fondo redondo de tres cuellos y, a continuación, DMSO anhidro (10 mL). La mezcla se calentó hasta 60°C y el Intermedio 1 (3 g, 5,22 mmol, 1,4 equiv) se disolvió en 7 mL de DMSO anhidro, añadido gota a gota durante 2 h. La mezcla de la reacción se agitó a 60 °C durante 16 h y, a continuación, se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua salada, se secó (Na_2SO_4 anhidroso), se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener un líquido viscoso. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílicio utilizando 0-5% MeOH/ DCM para obtener un dímero de buprenorfina-FB (base libre) en forma de un sólido espumoso (2,8 g, 77%).

[0055] Se disolvieron 5,5 g (5,7 mmol) del biconjugado (dímero de buprenorfina-FB) en 50 mL de acetato de etilo a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadieron 3,43 mL (6,9 mmol, 1,2 equiv) de 2N HCl en éter gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante otra hora y se filtró para obtener un sólido. El sólido se lavó de nuevo con 100 ml de acetato de etilo y se secó bajo vacío para obtener el dímero de buprenorfina (sal bis HCl) en forma de sólido de color blanco (5,8 g, 98 %). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 9,75 (br, 2H), 6,88 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 6,67 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 4,66 (s, 2H), 4,23-4,42 (m, 4H), 3,84-3,92 (m, 2H), 3,40 (s, 6H), 3,21-3,35 (m, 5H), 2,98-3,20 (m, 7H), 2,64-2,85 (m, 4H), 2,12-2,26 (m, 4H), 1,72-1,94 (m, 4H), 1,38-1,52 (m, 4H), 1,26 (s, 6H), 0,99 (s, 20H), 0,48-0,76 (m, 10H), 0,32-0,42 (m, 4H); MS: m/z 962 ($M + 1$)⁺

EJEMPLO 2

Composiciones farmacéuticas ilustrativas

[0056] La siguiente composición se puede utilizar para un comprimido oral del dímero de buprenorfina.

Tabla 1

Ingredientes	% en peso
Dímero	2
Lactosa	83,6
Dióxido de sílica coloidal	0,67
Celulosa microcristalina	10
Croscarmelosa sódica	3,4
Estearato de magnesio	0,33

EJEMPLO 3 – Ensayos - Ensayo *in vitro*: Estabilidad metabólica del dímero de buprenorfina

[0057] Se realizaron incubaciones del dímero (*p. Ej.*, 1 μ M) con microsomas de hígado humano (*p. Ej.*, 1 mg proteína/mL) utilizando un sistema Tecan Liquid Handling System (Tecan), o equivalente, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en 0.2- mL de mezclas de incubación (volumen final) que contenían un tampón de fosfato potásico (50 mM, pH 7.4), MgCl_2 (3 mM) y EDTA (1 mM, pH 7.4) con y sin un cofactor, sistema generador de NADPH, a las concentraciones indicadas en un formato de placa da 96 pocillos. El sistema generador de NADPH consistía en NADP (1 mM, pH 7.4), glucosa-6-fosfato (5 mM, pH 7.4) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1 unidad/mL). El dímero se disolvió en solución metanólica acuosa (metanol 0,5% en volumen o menos). Las reacciones se iniciaron típicamente por la adición del cofactor y se interrumpieron en cuatro puntos temporales designados (por ej., hasta 120 min) por la adición de un volumen igual de reactivo de terminación (por ej., acetonitrilo, 0,2 mL que contenía un estándar interno). Las incubaciones de tiempo cero se utilizaron como valor 100% para determinar el porcentaje de pérdida de sustrato. Las incubaciones se realizaron por triplicado con excepción de las muestras de tiempo cero (que se incubaron por cuadruplicado). Las incubaciones de cofactor cero (no NADPH) se realizaron a tiempo cero y en el punto temporal más prolongado. Las muestras se sometieron a centrifugación (*p. ej.*, 920 x *g* durante 10 min a 10°C) y las fracciones de supernatante se analizaron por LC-MS/MS. Se realizaron incubaciones adicionales con microsomas en los que se sustituyeron por un sustrato marcador (*p. ej.*, dextrometorfano para controlar la pérdida de sustrato) como controles positivos para determinar si el sistema de ensayo es metabólicamente competente.

[0058] Las muestras anteriores se analizaron por LC-MS/MS. Se realizó un análisis de las muestras para cada solución de incubación. Los resultados se determinaron por una comparación de los ratios de máximos durante el transcurso del experimento (típicamente documentado como "% restante del remanente original").

[0059] Los datos se calcularon con un LIMS (incluyendo Galileo, Thermo Fisher Scientific Inc. y la herramienta de notificación, Crystal Reports, SAP), el programa informático de hojas de cálculo Microsoft Excel (Microsoft Corp.) o equivalente. La cantidad de compuesto original no modificado se estimará (para determinar el porcentaje de sustrato restante en cada incubación) basándose en los ratios de máximo-área de un analito/estándar interno (IS) utilizando un LIMS, Analyst Instrument Control y Data Processing Software (AB SCIEX), o equivalente.

[0060] Resultados: Los resultados mostrados en la Figura 1 indican que el dímero de buprenorfina fue relativamente estable en presencia de enzimas microsomales durante el ensayo. Las enzimas microsomales son típicamente responsables del metabolismo de fármacos como la buprenorfina. El dímero era estable en presencia de los microsomas, con o sin el cofactor. El ensayo finalizó a las 2 horas, dado que las enzimas normalmente no son estables después de 2 horas a una temperatura de incubación de 37°C .

Ensayo de estabilidad

[0061] El objetivo de los estudios de laboratorio consistía en evaluar la facilidad con la que el paciente puede obtener buprenorfina del dímero y de este modo comprometer sus propiedades disuasorias del abuso.

[0062] Estos estudios facilitan el conocimiento de la facilidad con la que un potencial adicto podría clivar el dímero utilizando productos químicos domésticos como levadura, ácido o simplemente calentando en agua. La estabilidad del dímero de buprenorfina se evaluó a temperatura ambiente en agua corriente no tratada y en presencia de ácido (1N HCl) o base (5% de bicarbonato sódico acuoso). El dímero fue relativamente estable en estas condiciones, que no degradaron de forma apreciable la buprenorfina. Ver la Figura 2.

[0063] Resultados: Como se muestra en la Figura 2, el dímero de buprenorfina se mantuvo estable y no se degradó para liberar la buprenorfina a temperatura ambiente ni a temperatura elevada bajo condiciones de pH extremas incluso durante 30 minutos.

5 [0064] Estos estudios también facilitan el conocimiento de la estabilidad del dímero en el tracto gastrointestinal, que presenta un gradiente de pH en toda su longitud, tanto en pacientes con SII-D como en pacientes sanos. El pH oscila entre 1 debido a la secreción de ácido hidróclorico de las células parietales del estómago y 8 en el colon. La porción proximal del tracto gastrointestinal es más ácida mientras que el extremo distal es el menos ácido.

EJEMPLO 4 - Actividad de unión del receptor humano

10 [0065] Este ejemplo ilustra la unión del dímero de buprenorfina proporcionado en el presente documento a los siguientes receptores: receptor opioide μ ; receptor opioide κ ; y receptor opioide δ .

Ensayo de unión del receptor opioide μ humano

15 [0066] Se homogeneizaron membranas de células de ovario de hámster chino con sobreexpresión del receptor opioide μ humano (Perkin Elmer #RBHOMM400UA) en tampón de ensayo (50 mM Tris, pH 7.5 con 5 mM MgCl₂) utilizando un triturador de tejido de cristal, un mortero de Teflon y un agitador Steadfast Stirrer (Fisher Scientific). Los concentrados de las membranas se ajustaron a 300 μ g/mL en una placa de ensayo, una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. El compuesto a testar se solubilizó en DMSO (Pierce), 10 mM, y a continuación se diluyó en el tampón de ensayo a 3,6 nM. En una segunda placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos, conocida como placa de mezcla previa, se combinaron 60 μ L de 6X compuesto con 60 μ L de 3,6 nM ³H-Naloxona. Desde la placa de mezcla previa, se transfirieron 50 μ L a una placa de ensayo que contenía las membranas, por duplicado. La placa de ensayo se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se pretrató una placa de filtrado de 96 pocillos GF/C 96 (Perkin Elmer #6005174) con 0,3% de polietilenimina durante 30 min. Los contenidos de la placa de ensayo se filtraron a través de la placa de filtrado utilizando un Packard Filtermate Harvester, y se lavaron 3 veces con 0,9% de salino a 4°C. La placa de filtrado se secó, se selló por debajo y se añadieron 30 μ L de Microscint 20 (Packard #6013621) a cada pocillo. Se utilizó un Topcount-NXT Microplate Scintillation Counter (Packard) para medir las energías emitidas en el rango de 2,9 a 35 KeV. Los resultados se compararon con la unión máxima, sin que los pocillos presentaran inhibición. La unión no específica se determinó en presencia de 60 μ M de naloxona no etiquetada. La actividad biológica del dímero se muestra en la Figura 3.

30 [0067] Resultados: Los gráficos de la Figura 3 muestran que el dímero tiene una afinidad significativa para el receptor opioide μ . La afinidad del receptor opioide μ del dímero de buprenorfina a 10⁻⁸M (+/-10 ng) y el perfil fue similar al de la buprenorfina.

Ensayo de unión del receptor opioide κ humano

35 [0068] Se homogeneizaron membranas de células HEK-293 clonadas que expresaban el receptor opioide kappa humano (Amersham Biosciences UK Ltd, 6110558 200U) en tampón de ensayo (50 mM Tris, pH 7.5 con 5 mM MgCl₂) utilizando un triturador de tejido de cristal, un mortero de Teflon y un agitador Steadfast Stirrer (Fisher Scientific). Los concentrados de las membranas se ajustaron a 300 μ g/mL en una placa de ensayo, una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. El compuesto a testar se solubilizó en DMSO (Pierce), 10 mM, y a continuación se diluyó en un tampón de ensayo a 3,6 nM. En una segunda placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos, conocida como placa de mezcla previa, se combinaron 60 μ L de 3,6 nM ³H-diprenorfina (DPN). Desde la placa de mezcla previa, se transfirieron 50 μ L a una placa de ensayo que contenía las membranas, por duplicado. La placa de ensayo se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente. Se pretrató una placa de filtrado de 96 pocillos GF/C 96 (Perkin Elmer #6005174) con 0,3% de polietilenimina durante 30 min. Los contenidos de la placa de ensayo se filtraron a través de la placa de filtrado utilizando un Packard Filtermate Harvester, y se lavaron 3 veces con 0,9% de salino a 4°C. La placa de filtrado se secó, se selló por debajo y se añadieron 30 μ L de Microscint 20 (Packard #6013621) a cada pocillo. Se utilizó un Topcount-NXT Microplate Scintillation Counter (Packard) para medir las energías emitidas en el rango de 2,9 a 35 KeV. Los resultados se compararon con la unión máxima, sin que los pocillos presentaran inhibición. La unión no específica se determinó en presencia de 60 μ M de naloxona no etiquetada. La actividad biológica del dímero se muestra en la Figura 4.

55 [0069] Resultados: La Figura 4 describe el perfil agonista del receptor opioide κ del monómero de buprenorfina y del dímero. Ni el monómero ni el dímero de buprenorfina han perdido su afinidad por el receptor κ . Cualitativamente, como sucede con la buprenorfina, la unión del dímero de buprenorfina al receptor opioide κ aumenta con la concentración. Se calcula que en aproximadamente 1 μ g, el perfil de afinidad del receptor opioide κ del dímero era similar al de la buprenorfina.

Ensayo de unión del receptor opioide δ humano

[0070] El ensayo fue diseñado para comprobar la capacidad de un compuesto de interferir en la unión de natriindol tritiado en el receptor opioide δ humano de subtipo 2. Se homogeneizaron membranas de células de

ovario de hámster chino con sobreexpresión del receptor opioide δ humano de subtipo 2 (Perkin Elmer #RBHODM400UA) en tampón de ensayo (50 mM Tris, pH 7.5 con 5 mM $MgCl_2$) utilizando un triturador de tejido de cristal, un mortero de Teflon y un agitador Steadfast Stirrer (Fisher Scientific). La concentración de las membranas se ajustó a 100 $\mu g/mL$ en una placa de ensayo, una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. El compuesto a testar se solubilizó en DMSO, 10 mM, y a continuación se diluyó en tampón de ensayo a 6 veces la concentración final deseada. El ligando, 3H -natrindol (Perkin Elmer #NET-1065) también se diluyó en tampón de ensayo a 6 nM. Se transfirieron partes alícuotas de 3H -natrindol (50 μL) a una placa de ensayo que contenía las membranas por duplicado. La placa de ensayo se incubó durante 30 horas a temperatura ambiente. Se pretrató una placa de filtrado de 96 pocillos GF/C 96 (Perkin Elmer #6005174) con 0,3% de polietilenimina durante 30 min. Los contenidos de la placa de ensayo se filtraron a través de la placa de filtrado utilizando un Packard Filtermate Harvester, y se lavaron 3 veces con 0,9% de solución salina a 4°C. La placa de filtrado se secó, se selló por debajo y se añadieron 30 μL de Microscint 20 (Packard #6013621) a cada pocillo. Se utilizó un Topcount-NXT Microplate Scintillation Counter (Packard) para medir las energías emitidas en el rango de 2,9 a 35 KeV. Los resultados se compararon con la unión máxima, sin que los pocillos recibieran ningún inhibidor. La unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de natrindol no marcado. La actividad biológica del dímero de buprenorfina se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	IC50	Ki
Dímero de buprenorfina	7,6 nM	2,87 nM

[0071] Con respecto a los receptores opioides μ y κ , el dímero tenía una escasa afinidad para el receptor δ .

EJEMPLO 5 - Actividad de estimulación del receptor

[0072] Este ejemplo ilustra la capacidad del compuesto del dímero de buprenorfina proporcionado en el presente documento para estimular la señalización mediada por el receptor opioide μ .

Ensayos funcionales agonista y antagonista del receptor opioide μ : Ensayo de unión de [^{35}S] GTP γ S en membranas de células de ovarios de hámster chino que expresan receptores μ humanos (CHO-hMOR)

[0073] Las membranas de células CHO-hMOR se adquirieron en Receptor Biology Inc. (Baltimore Md). Unos 10 mg/ml de proteína de membrana se suspendieron en 10 mM TRIS-HCl pH 7.2, 2 mM EDTA, 10% sacarosa, y la suspensión se mantuvo en hielo. Se añadió 1 mL de las membranas a 5 mL de tampón de ensayo de unión en frío que contenía 50 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 1 mM EDTA. La suspensión de las membranas se homogeneizó con un Polytron y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El supernatante se centrifugó a 18.000 rpm durante 20 minutos. Los gránulos se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de ensayo con un Polytron.

[0074] Las membranas se preincubaron con gránulos de SPA recubiertos con aglutinina de germen de trigo (Amersham) a 25°C, durante 45 min en el tampón de ensayo. El gránulo de SPA (5 mg/ml) junto con las membranas (10 $\mu g/ml$) se incubaron con 0,5 nM [^{35}S]GTP γ S en el tampón de ensayo. La unión basal se produjo por tanto en ausencia de compuesto del ensayo añadido; esta unión no modulada se consideró al 100%, con la unión estimulada del agonista subiendo hasta niveles muy superiores a este valor. Se utilizó un rango de concentraciones del agonista del receptor SNC80 para estimular la unión de [^{35}S]GTP γ S. La unión basal y no específica se testaron en ausencia de agonista; la determinación de la unión no específica incluyó 10 μM de GTP γ S sin marcar.

[0075] El dímero de buprenorfina se testó para determinar la función como antagonista evaluando su potencial para inhibir la unión de GTP γ S estimulada por agonista, utilizando D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Om-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP) como estándar. La radioactividad se cuantificó en un Packard Top Count. Se calcularon los parámetros siguientes:

% de estimulación = [(cpm compuesto de ensayo - cpm no específico)/(cpm basal - cpm no específico)] * 100

% de inhibición = (% estimulación por 1 μM SNC80 - % de estimulación por 1 μM SNC80 en presencia de compuesto de ensayo) * 100 / (% de estimulación por 1 μM SNC80 - 100).

[0076] EC₅₀ se calculó utilizando GraphPad Prism. En las Figuras 5 y 6 se representa un gráfico del compuesto testado.

[0077] Resultados: Los datos mostrados en la Figura 5 indican que el dímero es un potente agonista μ . Los resultados también indican que la actividad del receptor opioide μ del dímero a 10⁻⁶M (+/- 1 μg) es similar a la de la buprenorfina. Los datos de la Figura 6 muestran que el dímero no funciona como antagonista μ .

EJEMPLO 6**Estudio farmacocinético *in vivo***

[0078] Los estudios farmacocinéticos con animales se realizaron en el John Hopkins Medical Institute. Los animales utilizados fueron ratones CD-1 (unos 35 gms, n = 3 por punto temporal). Los fármacos testados fueron buprenorfina y dímero de buprenorfina. Dosis 10 mg/kg IV y sonda nasogástrica. Se tomaron muestras de sangre cuando habían transcurrido 0 y 30 minutos, y 1, 2, 6 y 24 horas. Las muestras de sangre para el fármaco se analizaron tras obtener el plasma y por LC/MS/MS como sigue:

[0079] Se preparó una curva estándar en plasma de ratón salpicado con el fármaco de ensayo (10-25000 nM). Las muestras de plasma (50 µL) se extrajeron en 300 µL de acetonitrilo que contenía losartán o buprenorfina-d₄ como estándar interno. Los extractos se centrifugaron a 16000 x g a 4°C durante 5 minutos. Los supernatantes (250 µL) se transfirieron a un nuevo tubo y se secaron bajo N₂ a 45°C durante 1 hora. Las muestras se reconstituyeron con 100 µL de 30% acetonitrilo, se agitaron y se centrifugaron. Los supernatantes (90 µL) se transfirieron a viales LC y 10µL se inyectaron en LC/MS. Ver la Figura 7.

[0080] Resultados: La Figura 7 ilustra los perfiles de concentración de plasma del dímero de buprenorfina tras 10 mg de dosis oral e intravenosa. El gráfico indica que la biodisponibilidad absoluta del dímero, medida como un ratio de la superficie bajo la curva de concentración tras la dosis oral e IV, era del 1% o inferior, mientras que la del monómero era aproximadamente del 30%.

EJEMPLO 7**Ensayo *in vivo*: Producción fecal inducida por estrés**

[0081] Los animales utilizados en los estudios eran machos de ratones CD-1, con un peso medio de 30-35 gramos, con una media de 5 ratones por grupo de dosis. Por lo general los ratones convivían en colonias, con unos 3 animales por jaula de policarbonato con acceso a alimentos y agua a voluntad. El día del experimento fueron transportados a la sala de procesos donde se colocaron individualmente en jaulas de 20 cm de ancho x 20 cm de profundidad por 15 cm de alto, equipadas con un suelo de malla metálica, tras la administración intragástrica del compuesto de ensayo. Durante el ensayo los animales tuvieron acceso a agua a voluntad. El suelo de malla metálica de la jaula crea un entorno novedoso que provoca estrés a los ratones. El número de gránulos excretados se determinó cada hora. Los resultados se muestran en las Figuras 8-10.

[0082] Resultados: Las Figuras 8 y 9 muestran que las dosis orales del dímero de buprenorfina redujeron de forma significativa la producción fecal de los ratones respecto del placebo (vehículo). Las dosis investigadas eran de 25 y 50 mg por kg. Los resultados no variaron incluso cuando los animales con producción fecal cero (lo que sugiere sensibilidad extrema) fueron retirados del análisis. La Figura 10 muestra que la producción fecal en ratones desciende con la dosis, lo que indica un verdadero efecto farmacológico.

Ensayo *in vivo*: Efecto sobre un tiempo de tránsito GI alterado tras un proceso inflamatorio

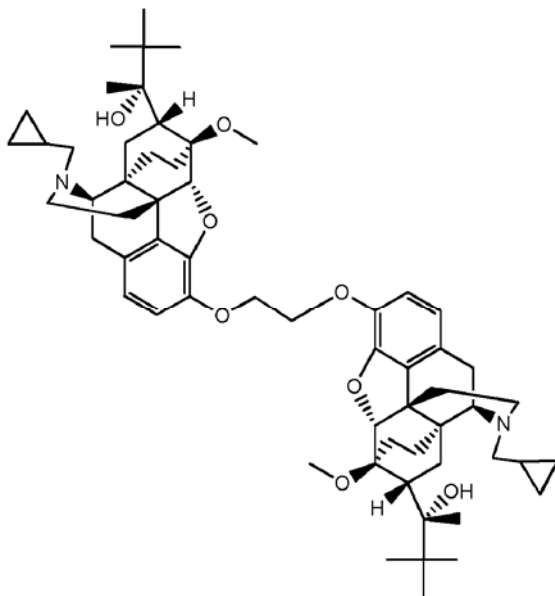
[0083] Este ensayo fue diseñado para medir el efecto de la sustancia de ensayo sobre la hipersensibilidad gastrointestinal que se produce tras la inflamación. El tránsito GI alterado postinflamatorio se indujo en machos de ratones CD-1 inyectando aceite de mostaza recién abierto (95% isotiocianato de alilo puro, 0,5% etanol) El efecto del estrés sobre la motilidad GI se evaluó 3 o 4 semanas más tarde, cuando a pesar de que ya no había inflamación, el tracto GI continuaba en un estado hipersensible. El efecto de la sustancia de ensayo se midió tras la administración oral (sonda intragástrica) y sometiendo a los animales a estrés ambiental, al alojarlos en jaulas de 20 cm de ancho x 20 cm de profundidad x 15 cm de alto, equipadas con un suelo de malla metálica. Durante el ensayo los animales tuvieron acceso a agua a voluntad. El suelo de malla metálica de la jaula crea un entorno novedoso que provoca estrés a los ratones. El número de gránulos excretados se determinó cada hora/dos horas. Ver la Figura 11.

[0084] Tal y como se muestra en la Figura 11, el dímero de buprenorfina a 25 mg por kg redujo de forma significativa la motilidad gastrointestinal, medida por la producción fecal en modelos postinflamatorios. El gráfico también muestra que el aumento de la producción fecal en los ratones no tratados con aceite de mostaza fue transitorio y no duró más de una hora. El aumento de la producción fecal de los animales tratados con aceite de mostaza persistía incluso a las dos horas. El dímero continuó controlando la motilidad gastrointestinal incluso a las dos horas y los resultados fueron estadísticamente significativos.

[0085] Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento se incluyen únicamente a título ilustrativo. En la medida en que exista un conflicto entre las solicitudes de prioridad y la presente solicitud, cualquier incoherencia se resolverá en favor de la presente solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de un dímero de buprenorfina con la Fórmula (I):



Fórmula (I)

- 5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. El compuesto del dímero de buprenorfina de la reivindicación 1, donde el compuesto adopta la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
3. El compuesto del dímero de buprenorfina de la reivindicación 1, donde el compuesto adopta la forma de una base libre.
- 10 4. Una composición farmacéutica que contiene un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de un dímero de buprenorfina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. El compuesto del dímero de buprenorfina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en un método de tratamiento de la hiperalgesia gastrointestinal, donde el método comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del dímero de buprenorfina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. El compuesto del dímero de buprenorfina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en un método de tratamiento del síndrome del intestino irritable con diarrea predominante (SII-D) en un paciente, donde dicho método consiste en la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto del dímero de buprenorfina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. El compuesto del dímero de buprenorfina para su uso de conformidad con la reivindicación 6, donde el paciente es un ser humano y donde la dosis administrada es de entre 0,1 mg/kg del peso corporal del paciente y 7,2 mg/kg del peso corporal del paciente.
- 25 8. El compuesto del dímero de buprenorfina para el uso de conformidad con la reivindicación 6, donde el paciente es un ser humano y donde la dosis administrada es de entre 10 y 50 mg al día.

Figura 1

Estabilidad del dímero de buprenorfina cuando se expone a enzimas CYP en presencia y ausencia de un cofactor

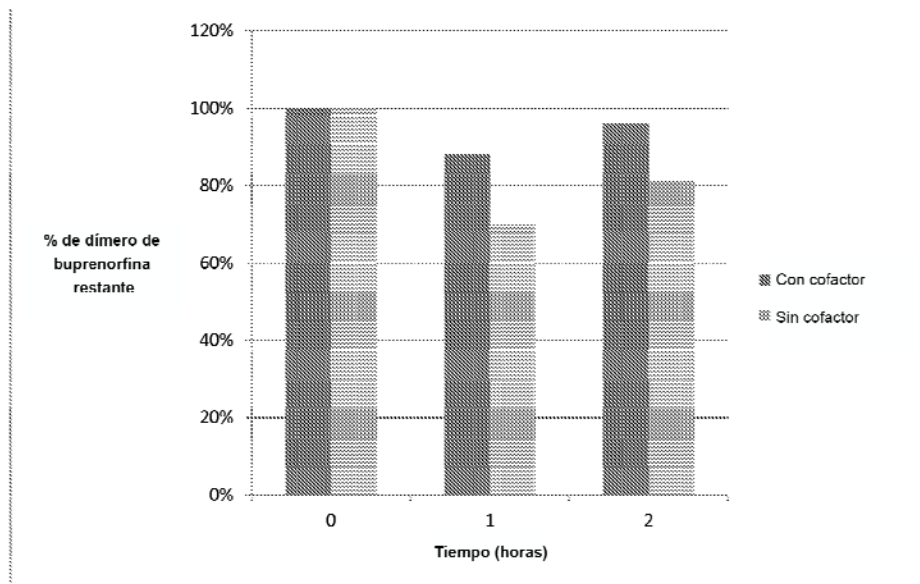


Figura 2

Estabilidad del dímero de buprenorfina en condiciones acuosas, así como en condición ácida y básica, cada una de ellas a temperatura ambiente y a 140°F durante el periodo de tiempo indicado.

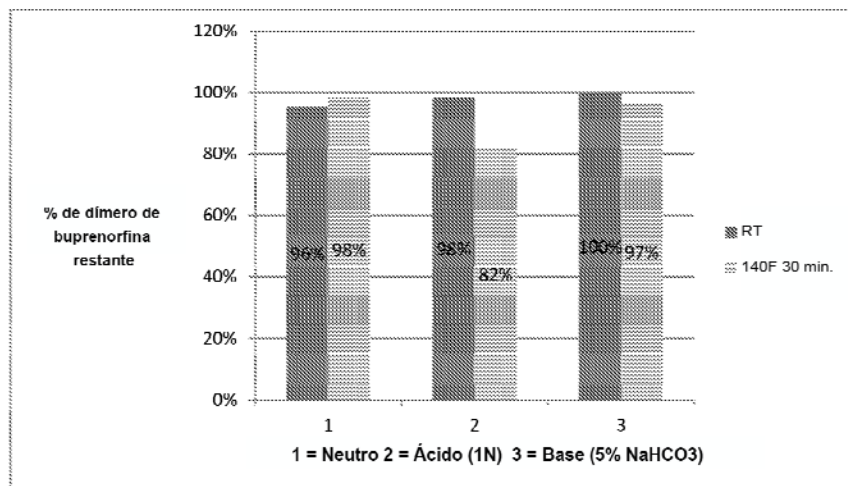


Figura 3

Resultados de los experimentos de unión del receptor del dímero de buprenorfina - receptor μ

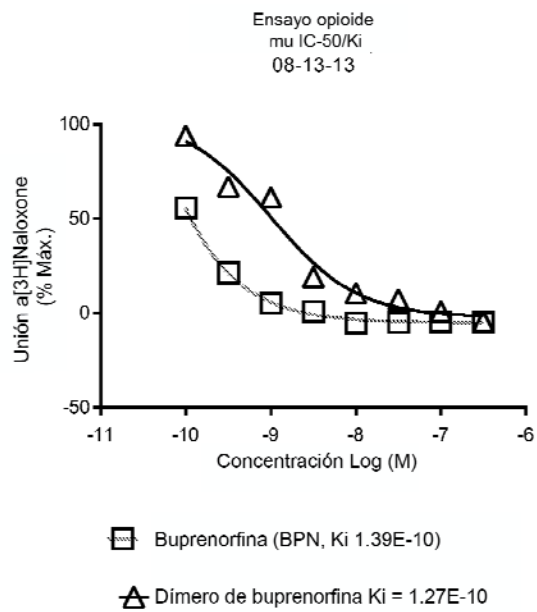


Figura 4

Resultados de los experimentos de unión del receptor del dímero de buprenorfina - receptor κ .

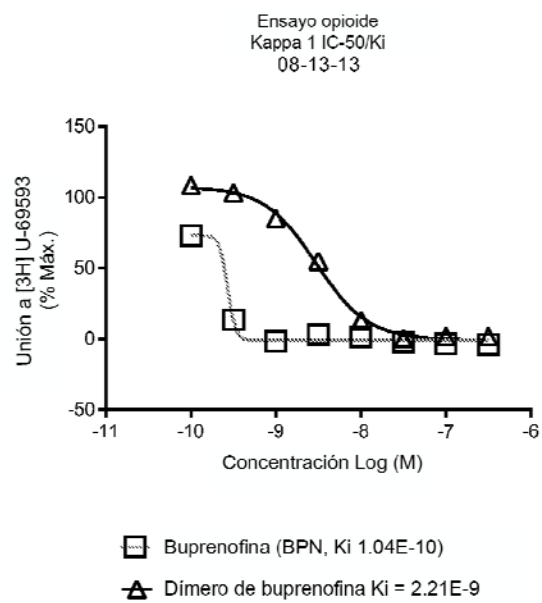


Figura 5

Resultados del ensayo funcional del agonista μ para el dímero de buprenorfina

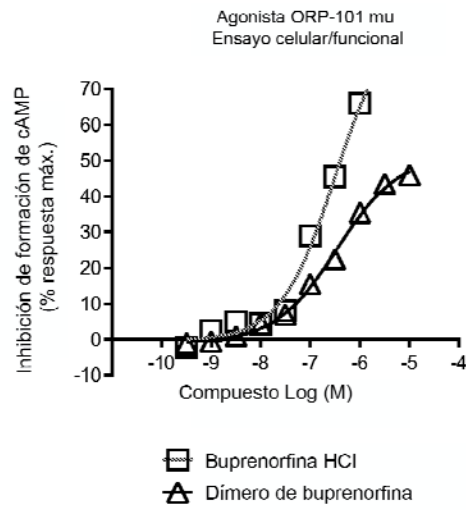


Figura 6

Resultados del ensayo funcional del antagonista μ para el dímero de buprenorfina

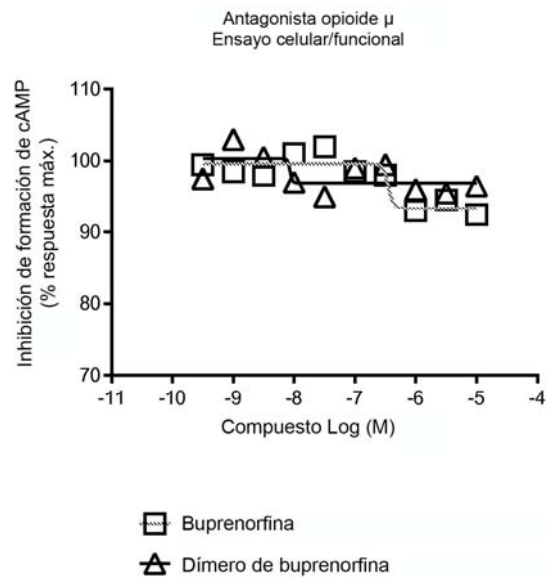


Figura 7

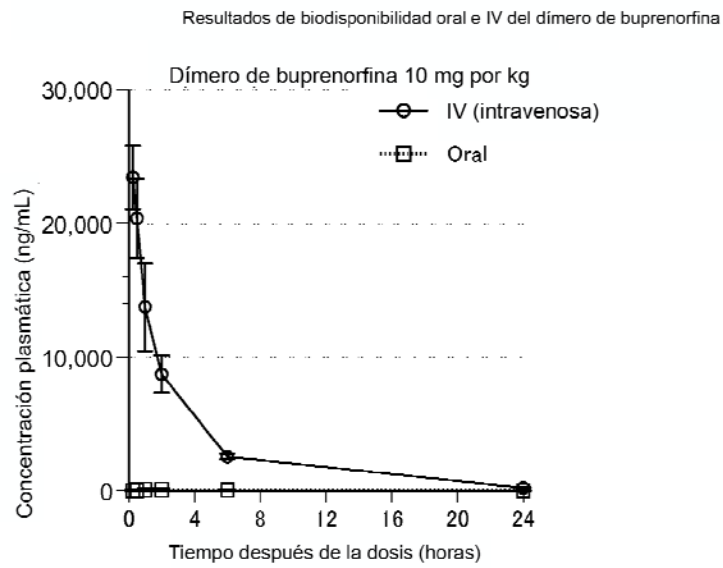


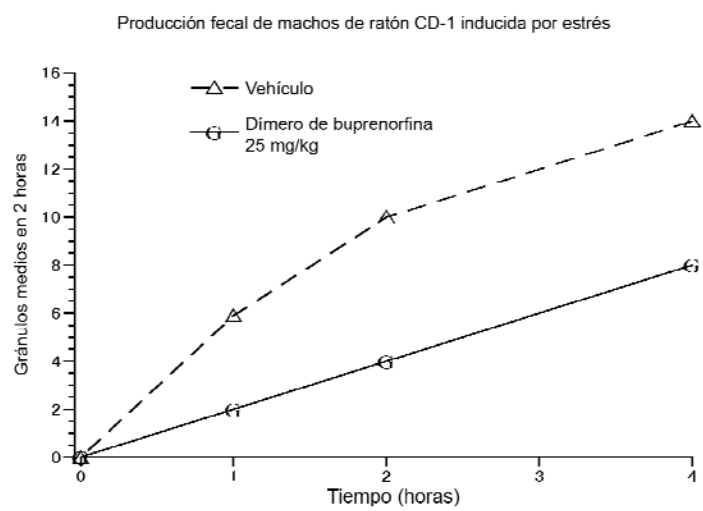
Figura 8

Figura 9

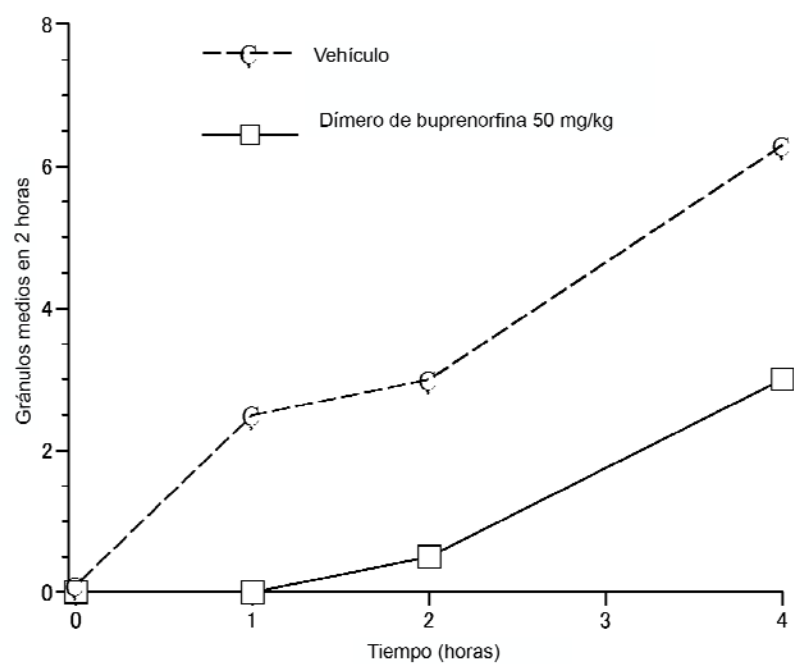


Figura 10

El dímero de buprenorfina reduce la producción fecal en función de la dosis

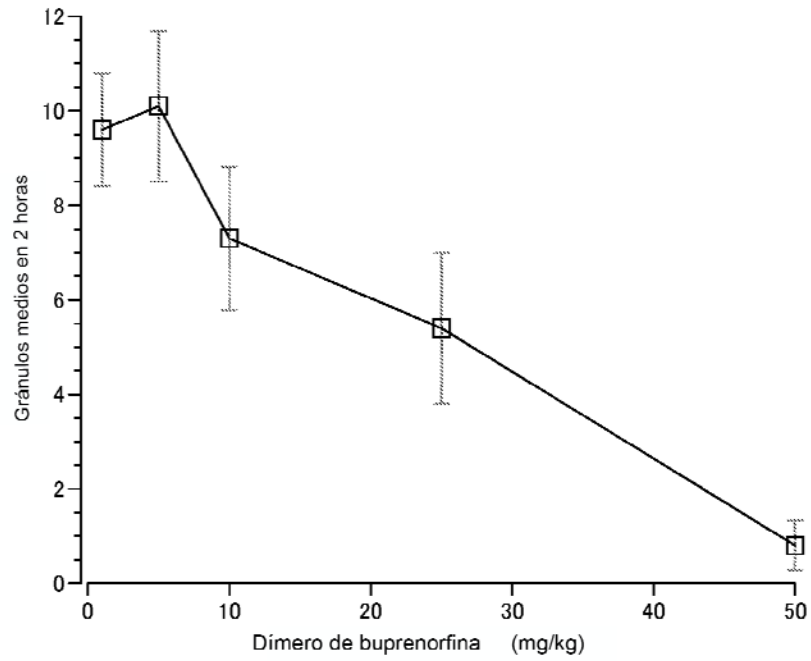


Figura 11

Efecto del dímero de buprenorfina sobre la motilidad gastrointestinal en modelos postinflamatorios

