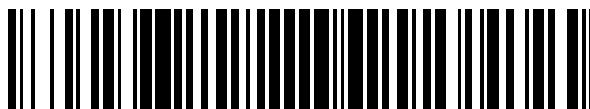


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 606**

51 Int. Cl.:

A61K 31/138	(2006.01) A61K 31/517	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01) A61K 31/565	(2006.01)
A61K 31/216	(2006.01) A61K 31/567	(2006.01)
A61K 31/4184	(2006.01) A61K 31/573	(2006.01)
A61K 31/437	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/445	(2006.01) A61P 25/02	(2006.01)
A61K 31/4545	(2006.01) A61P 29/02	(2006.01)
A61K 31/495	(2006.01)	
A61K 31/496	(2006.01)	
A61K 31/498	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015** **PCT/EP2015/068767**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16024015**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015** **E 15750066 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3180028**

54 Título: **Antagonistas de CYP2J2 en el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

14.08.2014 EP 14181086
26.09.2014 EP 14186624

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2020

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)**
Hansastraße 27c
80686 München, DE

72 Inventor/es:

SISIGNANO, MARCO;
BRENNEIS, CHRISTIAN;
SCHOLICH, KLAUS;
GEISSLINGER, GERD;
ZINN, SEBASTIAN y
PARNHAM, MICHAEL JOHN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 606 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

Antagonistas de CYP2J2 en el tratamiento del dolor

La invención proporciona antagonistas selectivos de las citocromo P450 epoxigenasas (CYP) 2J2 como agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento del dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP) según las reivindicaciones adjuntas. Los antagonistas selectivos de CYP2J2 para el uso de la invención reducen el dolor inducido por quimioterapia y, por lo tanto, permiten una dosificación mayor y mejor de la quimioterapia durante el tratamiento del cáncer.

El dolor neuropático es un síndrome de dolor persistente o crónico que puede resultar del daño al sistema nervioso, los nervios periféricos, el ganglio de la raíz dorsal, la raíz dorsal o el sistema nervioso central. Los síndromes de dolor neuropático incluyen alodinia, varias neuralgias tales como la neuralgia posherpética y la neuralgia del trigémino, el dolor fantasma y los síndromes de dolor regional complejos, tales como la distrofia simpática refleja y la causalgia. La causalgia se caracteriza frecuentemente por dolor por ardor espontáneo combinado con hiperalgesia y alodinia. Trágicamente, no existe un método existente para tratar de manera adecuada, previsible y específica el dolor neuropático establecido, ya que los métodos de tratamiento actuales para el dolor neuropático consisten simplemente en tratar de ayudar al paciente a sobrellevarlo mediante terapia psicológica u ocupacional, en lugar de reducir o eliminar el dolor experimentado. El tratamiento del dolor neuropático o crónico es un desafío para los médicos y los pacientes, ya que no hay medicamentos que se dirijan específicamente a la afección, y porque los medicamentos utilizados actualmente dan como resultado solo un pequeño alivio y se basan en su eficacia en afecciones de dolor agudo o en su eficacia para aliviar los efectos secundarios como la ansiedad y la depresión. La incidencia del dolor crónico está aumentando en la sociedad y su carga sobre la sociedad es enorme tanto en la atención médica como en la pérdida de productividad. Actualmente, no existen terapias científicamente validadas para aliviar el dolor crónico. Como resultado, la comunidad sanitaria se centra en la 'gestión del dolor' donde las terapias multimodales se usan simultáneamente con la esperanza de proporcionar alguna mejora en la calidad de vida. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de fármacos que puedan aliviar el dolor crónico.

El dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP) es un efecto secundario grave limitante de la dosis de los citostáticos, tales como taxanos, derivados de platino, alcaloides de la vinca y otros. Los síntomas generalmente comienzan con hormigueo y pueden provocar ardor, punzadas y dolor intenso, así como alodinia fría y mecánica. Debido al CIPNP, algunos pacientes suspenden la terapia anticancerígena con citostáticos demasiado pronto, lo que aumenta el riesgo de progresión tumoral. Desafortunadamente, muchas sustancias prometedoras, que ya están aprobadas para el tratamiento de diferentes tipos de dolor neuropático, tales como la gabapentina o la amitriptilina, parecen tener poco o ningún efecto analgésico en la monoterapia del CIPNP. Es necesario comprender los mecanismos celulares y moleculares para tratar o incluso prevenir el CIPNP y puede mejorar la tasa general de éxito de la terapia con citostáticos.

Estudios recientes han identificado miembros de la familia de canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRPV1, TRPA1 y TRPV4) como contribuyentes a la alodinia mecánica y fría durante la neuropatía inducida por oxaliplatino y paclitaxel. La activación o sensibilización de TRPV1 y TRPA1 puede conducir a una liberación aumentada de CGRP y sustancia P, pudiendo causar ambos inflamación neurogénica y reclutamiento de células T.

Sin embargo, no está claro qué mediadores endógenos están involucrados en la activación o sensibilización dependiente de citostáticos de los canales TRP, ya que ninguno de los citostáticos puede activar directamente los canales TRP. De forma interesante, tanto el paclitaxel como el oxaliplatino son inductores de CYP-epoxigenasas (paclitaxel: CYP2C8, CYP2C9, oxaliplatino: CYP2E1, CYP1B1). Las citocromo P450 (CYP)-epoxigenasas pueden metabolizar ácidos grasos ω -6, tales como el ácido araquidónico (AA) y el ácido linoleico (LA) generando bien epóxidos lipídicos tales como EET (ácidos epoxieicosatrienoides) o hidróxidos ω tales como 20-HETE.

El metabolismo del ácido araquidónico por las monoxigenasas del citocromo P450 conduce a la formación de varios eicosanoides biológicamente activos. Se sabe que se producen tres tipos de reacciones oxidativas. En primer lugar, la epoxidación de olefinas (catalizada por epoxigenasas) da lugar a los ácidos epoxieicosatrienoides (EET). Cuatro regioisómeros de EET importantes son [5,6]-EET, [8,9]-EET, [11,12]-EET, y [14,15]-EET. Los EET son hidrolizados por epóxido hidrolasas para formar los correspondientes ácidos dihidroxieicosatrienoides (DHET). En segundo lugar, la oxidación terminal omega conduce a la formación de ácidos hidroxieicosatetraenoides terminales omega (HETE). En tercer lugar, la oxidación alílica conduce a la formación de HETE de cadena media.

Se han identificado varias citocromo P450 epoxigenasas, incluidos los miembros de las subfamilias CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2E y CYP2J. Recientemente, se ha centrado la atención en las proteínas de la subfamilia CYP2J. Una isoforma particular, CYP2J2, se expresa altamente en los miocitos cardíacos humanos, donde el ácido araquidónico se metaboliza para producir EET. Las proteínas CYP2J2 también se encuentran en las células epiteliales en las vías respiratorias y en el intestino. A diferencia de las otras enzimas P450, las proteínas CYP2J2 se distribuyen uniformemente a lo largo del intestino, en células epiteliales y no epiteliales. Los niveles altos de las proteínas CYP2J2 se encuentran en las células de los ganglios autónomos, las células epiteliales y las células del músculo liso intestinal. Se han identificado varios homólogos de CYP2J en animales, incluidos CYP2J3 de rata, CYP2J4 de rata, CYP2J5 de ratón y CYP2J6 de ratón.

La capsaicina es un agonista altamente selectivo para el receptor vanilloide 1 receptor de potencial transitorio (TRPV1; anteriormente conocido como receptor vanilloide 1 (VR1)), un canal catiónico no selectivo dependiente de ligando expresado preferentemente en neuronas sensoriales de pequeño diámetro, especialmente aquellas fibras C que se especializan en la detección de sensaciones dolorosas o nocivas. TRPV1 responde a estímulos nocivos que incluyen capsaicina, calor y acidificación extracelular, e integrará exposiciones simultáneas a estos estímulos. El efecto inicial de la activación de los nociceptores que expresan TRPV1 (sensibles a la capsaicina) son sensaciones de ardor, hiperalgesia, alodinia y eritema. Sin embargo, después de una exposición prolongada a capsaicina a baja concentración o exposiciones únicas a capsaicina a alta concentración u otro agonista de TRPV1, los axones sensoriales de diámetro pequeño se vuelven menos sensibles a una variedad de estímulos, incluida la capsaicina o los estímulos térmicos. Esta exposición prolongada también se caracteriza por la reducción de las respuestas al dolor. Estos efectos de estadio tardío de la capsaicina se denominan frecuentemente "desensibilización" y son la razón del desarrollo de formulaciones locales de capsaicina para el tratamiento de diversos síndromes de dolor y otras afecciones.

Por lo tanto, la capsaicina, los capsaicinoides y los agonistas de TRPV1 pueden ser útiles para mejorar una pluralidad de enfermedades. Por ejemplo, pueden usarse para tratar el dolor neuropático (incluido el dolor asociado con neuropatía diabética, neuralgia posherpética, VIH/SIDA, lesión traumática, síndrome de dolor regional complejo, neuralgia del trigémino, eritromelalgia y dolor fantasma), dolor producido por etiologías nociceptivas mixtas y/o neuropáticas mixtas (p. ej., cáncer), osteoartritis, fibromialgia, dolor lumbar, hiperalgesia inflamatoria, vestibulitis vulvar o vulvodinia, pólipos sinusales, cistitis intersticial, vejiga neurogénica o hiperactiva, hiperplasia prostática, rinitis, cirugía, trauma, hipersensibilidad rectal, síndrome de ardor en la boca, mucositis oral, herpes (u otras infecciones virales), hipertrofia prostática, dermatitis, prurito, picazón, acúfenos, psoriasis, verrugas, cánceres (especialmente cánceres de piel), dolores de cabeza y arrugas.

El documento WO 2010/062900 describe un tratamiento del dolor neuropático y herpético utilizando compuestos que inhiben o minimizan la producción de metabolitos de los ácidos linoleicos oxidados.

Okubo K et al, Neuroscience 188 (2011) 148-156, describen el uso de inhibidores del canal de calcio de tipo T tales como mibefradil o NNC 55-0396 en el tratamiento del dolor neuropático inducido por quimioterapia.

Por lo tanto, hasta el día de hoy, no existe una terapia específica para el dolor neuropático disponible, en particular, el dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP), que restringe la dosificación máxima de agentes quimioterapéuticos durante el tratamiento del cáncer y causa un deterioro grave de la calidad de vida de los pacientes que reciben quimioterapia. El objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar una opción de tratamiento novedosa para combatir el dolor neuropático, específicamente CIPNP.

El problema anterior se resuelve en un primer aspecto mediante un antagonista selectivo de la citocromo P450 epoxigenasa (CYP) 2J2 para uso en la prevención o el tratamiento de CIPNP en un sujeto en donde dicho antagonista selectivo de CYP2J2 se selecciona del grupo que consiste en estradiol, fenoxibenzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina. Lo más preferiblemente, el antagonista selectivo de CYP2J2 es telmisartán, aripiprazol o lo más preferiblemente terfenadina.

El término "antagonista selectivo de CYP2J2" se refiere a los antagonistas de CYP2J2 que inhiben selectivamente la actividad, función o expresión de CYP2J2 pero no de otras enzimas relacionadas, tales como por ejemplo las moléculas de CYP3A. Para identificar si un antagonista candidato es un antagonista de CYP2J2, se puede emplear un ensayo de brillo del citocromo P450 luminogénico. Las proteínas CYP catalizan la formación de metabolitos del ácido araquidónico. Los ensayos luminogénicos de CYP utilizan prosustratos para la reacción generadora de luz de la luciferasa. Los CYP convierten los prosustratos en luciferina o un éster de luciferina, que produce luz en una segunda reacción con una mezcla de reacción de luciferasa llamada reactivo de detección de luciferina (LDR). La cantidad de luz producida en la segunda reacción es proporcional a la actividad del CYP.

Para ensayar la selectividad de un antagonista candidato de CYP2J2, se pueden emplear ensayos de CYP luminogénicos específicos para otras enzimas CYP tales como CYP3A4. La comparación de la actividad inhibidora de un antagonista candidato frente a CYP2J2 con la actividad inhibidora del mismo antagonista frente a otra proteína CYP tal como CYP3A4, por lo tanto, proporciona información sobre la selectividad del antagonista candidato.

La presente invención proporciona ahora una terapia para el dolor que comprende la inhibición de la actividad de CYP2J2 en particular que produce el compuesto metabólico 9,10-EpOME, según la invención, un sensibilizador de la percepción del dolor mediada por el canal iónico. Sorprendentemente, la inhibición de CYP2J2 de acuerdo con la invención demostró ser efectiva *in vivo* para aliviar el dolor neuropático inducido por paclitaxel en un modelo de ratón, lo que indica el uso de antagonistas selectivos de CYP2J2 como analgésico frente a CIPNP.

Una realización adicional de la invención se refiere a la prevención o tratamiento del dolor mencionado anteriormente, que comprende la administración de dicho antagonista selectivo de CYP2J2 de la invención a un sujeto que padece dicho dolor, y en donde dicho sujeto recibió, recibe o recibirá quimioterapia. Por lo tanto, el sujeto es en realizaciones preferidas un sujeto que padece, o se le ha diagnosticado, una enfermedad cancerosa.

La quimioterapia en el contexto de la invención implica preferiblemente la administración de un agente quimioterapéutico a un sujeto que necesita dicho tratamiento seleccionado de agentes antineoplásicos basados en pirimidinona tales como citarabina, 5-fluorouracilo o agentes de platino, tales como cisplatino, o taxanos, tales como paclitaxel, docetaxel o cabazitaxel, o derivados de los mismos. Se sabe que dichos agentes quimioterapéuticos inducen dolor neuropático, en particular, esto se conoce para los taxanos, que, por lo tanto, se prefieren en el contexto de la invención. El más preferido es el paclitaxel.

Además, dicha prevención o tratamiento del dolor de acuerdo con la invención comprende la administración concomitante o secuencial de dicho antagonista selectivo de CYP2J2 y dicho agente quimioterapéutico. Véase, para esta realización, también la descripción a continuación para una combinación de la invención.

El problema se resuelve adicionalmente mediante una combinación que comprende (i) un antagonista selectivo de CYP2J2 y (ii) un agente quimioterapéutico para uso concomitante o secuencial en la prevención o tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad es CIPNP, en donde el antagonista selectivo de CYP2J2 se selecciona de el grupo que consiste en estradiol, fenoxi-benzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina.

La presente realización también se refiere al tratamiento de un grupo de sujetos que padece CIPNP en donde los sujetos están bajo tratamiento con un quimioterapéutico. El antagonista selectivo de CYP2J2 de la invención, por lo tanto, se puede administrar durante el mismo período de tiempo que el tratamiento contra el cáncer, o alternativamente se realiza antes o después, lo que puede ser preferible para evitar la acumulación de efectos adversos. El resultado inventivo se logra cuando los efectos fisiológicos de un antagonista selectivo de CYP2J2 de la invención y la inducción del dolor de un quimioterapéutico se combinan en un sujeto que necesita dicho tratamiento. Después de que se administra la última dosis de un medicamento durante la terapia, los efectos fisiológicos inducidos por el medicamento no disminuirán de inmediato, sino, lo más probablemente, más tarde. Por lo tanto, el uso de los antagonistas de la invención en ciclos terapéuticos secuenciales, por ejemplo, los antagonistas de la invención se administran antes de una quimioterapia en lugar de al mismo tiempo, aún conduce a una combinación de los efectos clínicos de ambos compuestos en el paciente, y por lo tanto se encuentra bajo el significado de la terapia de combinación de la presente invención.

El término "combinación" significa en este contexto una combinación de sustancias activas de dos o más sustancias activas en una formulación y también como una combinación en el sentido de formulaciones individuales de las sustancias activas administradas a intervalos específicos entre sí en un tratamiento terapéutico. Por lo tanto, el término "combinación" incluirá la realidad clínica de una coadministración de dos o más compuestos terapéuticamente efectivos, como se describe en el contexto de la presente invención.

Coadministración: en el contexto de la presente solicitud, la coadministración de dos o más compuestos se define como la administración de los dos o más compuestos al paciente dentro de un año, incluida la administración separada de dos o más medicamentos, cada uno de los cuales contiene uno de los compuestos, así como la administración simultánea si los dos o más compuestos se combinan o no en una formulación o si están en dos o más formulaciones separadas.

La combinación de la invención en una realización incluye que (i) y (ii) se combinan mediante administración secuencial o concomitante a un sujeto durante dicha prevención o tratamiento, preferiblemente en donde los antagonistas y quimioterapéuticos se administran concomitantemente durante dicha prevención o tratamiento.

Un quimioterapéutico se selecciona preferiblemente de agentes antineoplásicos basados en pirimidinona tales como citarabina, 5-fluorouracilo o agentes de platino, tales como cisplatino o taxanos, tales como paclitaxel o docetaxel, o derivados de los mismos. Lo más preferiblemente, el quimioterapéutico es paclitaxel o docetaxel.

En el contexto de la invención, también se prefiere que se administre al menos un agente terapéutico adicional efectivo contra el dolor, por ejemplo, una morfina, un analgésico opioide o no opioide u otro analgésico, a dicho sujeto.

Un sujeto de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria es preferiblemente un mamífero, preferiblemente un ser humano, lo más preferiblemente un ser humano que recibe un tratamiento quimioterapéutico, tal como un paciente con cáncer.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "antagonista de CYP" significa una sustancia que produce una disminución en la cantidad o tasa de expresión o actividad de CYP. Dicha sustancia puede actuar directamente, por ejemplo, uniéndose a CYP y disminuyendo la cantidad o tasa de expresión o actividad de CYP. Un antagonista de CYP también puede disminuir la cantidad o tasa de expresión o actividad de CYP, por ejemplo, uniéndose a CYP de tal manera que se reduzca o evite la interacción de CYP con un receptor de CYP; uniéndose a CYP y modificándolo, tal como mediante la eliminación o adición de un resto; y uniéndose a CYP y reduciendo su estabilidad. Un antagonista de CYP también puede actuar indirectamente, por ejemplo, uniéndose a una molécula reguladora o región génica para modular la función de la proteína reguladora o región génica y producir una disminución en la cantidad o tasa de expresión o actividad de CYP. Por lo tanto, un antagonista de CYP puede actuar por cualquier mecanismo que de lugar a una disminución en la cantidad o tasa de expresión o actividad de CYP.

Composiciones para tratar o prevenir el dolor

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento del dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP) en un sujeto, que comprende un antagonista selectivo de la citocromo P450 epoxigenasa 2J2 (CYP2J2) seleccionado del grupo que consiste en estradiol, fenoxibenzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, solubilizantes, rellenos, estabilizadores, aglutinantes, absorbentes, bases, agentes tamponantes, lubricantes, vehículos de liberación controlada, diluyentes, agentes emulsionantes, humectantes, lubricantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar agentes suplementarios en las composiciones. En ciertas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende albúmina sérica.

La composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., intratecal, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica (tópica) y transmucosal.

Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina; propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición inyectable debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jerigabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (p. ej., una neuregulina) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se enjuaga y expectora o traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un

lubricante tal como estearato de magnesio o Stertes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saporífero tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

5 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en la forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, las composiciones farmacéuticas se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

15 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la liberación sostenida o controlada del ingrediente activo. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de, p. ej., Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

25 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma dosificación unitaria, tal y como se usa en la presente memoria, incluye unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y de las limitaciones inherentes en la técnica de formular dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

30 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden usar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

40 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición mitad de la máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, sin embargo, sin limitarse a las mismas. En las Figuras:

50 **Figura 1:** Concentraciones de metabolitos del ácido linoleico oxidado durante CIPNP o inflamación por paclitaxel. Se muestran las concentraciones de 9,10-EpOME (a) y 12,13-EpOME (b) en los nervios ciáticos, DRG y el asta dorsal espinal 24 h después de la inyección i.p. del vehículo (negro) o paclitaxel (gris, 6mg·kg⁻¹) en ratones C57B16/N; nd: no determinado. Concentraciones de 9-HODE (c) y 13-HODE (d) en nervios ciáticos, L4-L6-DRG y la sección correspondiente del asta dorsal espinal 24 h después de la inyección i.p. del vehículo (negro) o paclitaxel (gris) en ratones C57B16/N. (e) Relación de las concentraciones de 9,10-EpOME en L4-L6-DRG y la sección correspondiente del asta dorsal 24 h después de la inyección intraplara de zimósán (12,5mg/ml, 20µl). Los datos representan la media ± SEM de 8- 10 animales por grupo; ***p <0,001, ensayo de la t de Student.

Figura 2: Efectos directos de 9,10-EpOME en neuronas del DRG. (a) La aplicación de 9,10-EpOME [10 μ M, 30 s] provoca aumentos transitorios de calcio en las neuronas del DRG que responden a alto contenido de potasio (KCl 50 mM, 30 s). Se muestra una traza representativa. (b) Relación de respuesta a la dosis de los incrementos de calcio dependientes de 9,10-EpOME en neuronas del DRG relacionadas con el número de neuronas que responden. Los datos representan la media $\pm$ SEM de cinco mediciones por concentración. (c) y (d) Los aumentos transitorios de calcio causados por 9,10-EpOME [10 μ M, 30 s] pueden interrumpirse usando medio libre de calcio que contiene EGTA (2 mM) lavado en 2 minutos antes y después de la estimulación con 9,10-EpOME. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 24 neuronas (libres de calcio) o 16 (control). (e) y (f) Los aumentos transitorios de calcio de 9,10-EpOME [10 μ M, 30 s] pueden ser bloqueados por un antagonista selectivo de TRPV1 (AMG 9810, 1 μ M) pero no por un antagonista selectivo de TRPA1 (HC-030031, 20 μ M) lavado durante dos minutos antes de la segunda estimulación con 9,10-EpOME. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 16 neuronas (control), 31 (AMG 9810) o 18 (HC-030031); * $p < 0,01$, ensayo de la t de Student.

Figura 3: 9,10-EpOME sensibiliza de manera dependiente de la dosis TRPV1 en neuronas del DRG y potencia los aumentos inducidos por capsaicina en la frecuencia de EPSC espontánea en neuronas de lámina II de cortes de médula espinal. (a) Las neuronas del DRG se estimularon doblemente con capsaicina (200 nM, 15 s cada una) y se incubaron bien con vehículo o 9,10-EpOME [1 μ M] durante dos minutos antes de la segunda estimulación con capsaicina. (b) Diferencia dependiente de la dosis en la relación entre la primera y la segunda respuesta de capsaicina usando el mismo protocolo que se describe en (a). Los datos representan la media $\pm$ SEM del siguiente número de neuronas: 27 (control), 26 (250 nM 9,10-EpOME), 21 (500 nM 9,10-EpOME), 19 (750 nM 9,10-EpOME) 41 (1 μ M 9,10-EpOME), 18 (2 μ M 9,10-EpOME) o 28 (usando AITC 50 μ M durante 20 s en lugar de capsaicina); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ensayo de la t de Student. (c) Trazas de EPSC espontáneas (sEPSC) en neuronas de la lámina II. Panel inferior, las trazas 1, 2, 3 y 4 están ampliadas e indican registros de la línea de base, 1^a capsaicina (1 mM), 9,10-EpOME (1 mM) y 2^a capsaicina (1 mM) más 9,10-EpOME, respectivamente. (d) Frecuencia de sEPSC. En comparación con la línea base de sEPSC, la capsaicina indujo aumentos profundos en la frecuencia de sEPSC (de $6,9 \pm 0,4$ Hz y $13,7 \pm 0,4$ Hz). El tratamiento de 9,10-EpOME solo, aumentó ligeramente la frecuencia de sEPSC ($8,2 \pm 0,8$ Hz) y potenció significativamente el aumento de la frecuencia de sEPSC por capsaicina ($18,7 \pm 1,1$ Hz). * $P < 0,05$, en comparación con la línea de base sin tratamiento; # $P < 0,05$, en comparación con el 1er tratamiento con capsaicina (1 mM). $n = 5$ neuronas/grupo. (E) Amplitud de las sEPSC. La capsaicina y el 9,10-EpOME no tuvieron efectos significativos sobre la amplitud de las sEPSC. $n = 5$ neuronas/grupo.

Figura 4: La sensibilización a TRPV1 por 9,10-EpOME en neuronas del DRG está mediada por un receptor acoplado a Gs y la ruta AMPc-PKA. (a) 9,10-EpOME catalizó la unión de [γ -³⁵S]-GTP en fracciones de membrana de DRG de rata. Los experimentos se llevaron a cabo usando fracciones de membrana de DRG de rata en presencia de GDP 30 μ M y vehículo (acetato de metilo al 0,7 % (v/v)), adenosina [10 μ M] o 9,10-EpOME [1 μ M] durante 30 minutos. Los datos se obtuvieron de 3 mediciones de fracciones de membrana de un total de 15 animales. Los DRG de cinco animales se agruparon para cada medición; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ensayo de Kruskal-Wallis con ensayo post hoc de comparación múltiple de Dunn. (b) Concentraciones de AMPc en cultivos de DRG enriquecidos con neuronas después de la estimulación con 9,10-EpOME, cicaprost o forskolina (1 μ M cada uno) durante 15 minutos. Los datos representan la media $\pm$ SEM de cultivos de DRG de cinco ratones. (c) y (d) La sensibilización a TRPV1 por 9,10-EpOME [1 μ M] puede reducirse mediante la preincubación con un inhibidor de PKA (dihidrocloreto de H89, 10 μ M durante 1 h). Los datos representan la media $\pm$ SEM de 15 (vehículo), 19 (EpOME) o 33 (EpOME con preincubación con H89) neuronas. (e) y (f) La sensibilización a TRPV1 por 9,10-EpOME [1 μ M] no se ve afectada por la preincubación con un inhibidor de PKC (GF 109203X, 10 μ M durante 1 h). Los datos representan la media $\pm$ SEM de 18 (vehículo), 23 (EpOME) o 39 neuronas (EpOME con preincubación con GFX); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ensayo de la t de Student; n.s. no significativo.

Figura 5: La inyección intraplantar o intratecal de 9,10-EpOME reduce los umbrales de dolor y sensibiliza los umbrales mecánicos inducidos por capsaicina en ratones de tipo salvaje. (a) y (b) Los ratones C57B1/6N recibieron una inyección intraplantar de 9,10-EpOME (10 μ M) o vehículo (DMSO al 0,3 % (v/v)) en disolución salina). Los umbrales térmicos (a) o mecánicos (b) se monitorizaron durante 5h después de la inyección. Los datos representan la media $\pm$ SEM de ocho ratones. (c) y (d) Se inyectó intratecalmente a ratones BL/6N de tipo salvaje 9,10-EpOME (10 μ M) o vehículo (DMSO al 0,3 % (v/v)) en disolución salina). Los umbrales térmicos (c) o mecánicos (d) se monitorizaron durante 2h (térmicos) o 3h (mecánicos) después de la inyección con intervalos de 15 minutos durante la primera hora e intervalos de 30 minutos durante la segunda hora. Los datos representan la media $\pm$ SEM de ocho ratones. Die Abbildungen sind nicht mitgeliefert

Figura 6: Liberación de iCGRP a partir de nervios ciáticos aislados o cultivos de DRG enriquecidos con neuronas después de la estimulación con 9,10-EpOME. (a) Liberación de iCGRP de nervios ciáticos aislados de ratones BL/6N de tipo salvaje, estimulados con las siguientes disoluciones durante 5 minutos cada uno: fluido intestinal sintético (SIF), SIF + EpOME (1 μ M) o vehículo (DMSO al 0,03 % (v/v)), SIF + EpOME (o vehículo) + capsaicina (500 nM), SIF. Los datos representan la media $\pm$ SEM de seis nervios ciáticos

individuales. (b) Liberación de iCGRP de cultivos de DRG enriquecidos con neuronas después de la estimulación bien con PBS, 9,10-EpOME, capsaicina o 9,10-EpOME + capsaicina durante 15 minutos; a: 9,10-EpOME 1 μ M, b: capsaicina 400 nM, c: 9,10-EpOME 2,5 μ M. Los datos representan la media $\pm$ SEM de cultivos de DRG de seis ratones; #, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ensayo de la t de Student. La línea discontinua indica la sensibilidad del ensayo.

Figura 7: CYP2J6 se regula al alza durante el dolor neuropático inducido por paclitaxel. (a) Curso temporal de los umbrales mecánicos de ratones C57B1/6N de tipo salvaje después de la inyección de paclitaxel (6mg·kg⁻¹ i.p.). bl: línea base, los datos representan la media $\pm$ SEM de diez ratones por grupo. Después de ocho días, se diseccionaron los nervios ciáticos, los DRG y el asta dorsal espinal. (b) Expresión de transcritos de CYP-epoxigenasa murina ocho días después de la inyección de paclitaxel (6mg·kg⁻¹ i.p.). Los datos representan la media $\pm$ SEM de los DRG de cuatro ratones por grupo, * p <0,05, ** p <0,01, ensayo de la t de Student. (c) Concentraciones de 9,10-EpOME en nervios ciáticos, DRG y el asta dorsal espinal ocho días después de la inyección i.p. del vehículo (negro) o paclitaxel (gris, 6mg·kg⁻¹) en ratones C57B16/N; ** p <0,01, ensayo de la t de Student. (d) Esquema de la síntesis de metabolitos del ácido eicosanoide y ácido linoleico en DRG murinos ocho a nueve días después del tratamiento con paclitaxel, como se revela por análisis LC-MS/MS. Las estructuras se obtuvieron de lipidmaps.org.

Figura 8: La inhibición de CYP2J6 por terfenadina reduce las concentraciones de lípidos y mejora el CIPNP inducido por paclitaxel in vivo. (a) Niveles de 9,10-EpOME mostrados en % del control determinados por LC-MS/MS en nervios ciáticos, DRG y el asta dorsal de la médula espinal ocho días después del tratamiento con paclitaxel (6mg·kg⁻¹ i.p. y 1mg·kg⁻¹ de terfenadina (gris) o vehículo (DMSO al 2 % v/v, negro)). Los datos representan la media $\pm$ SEM de los DRG de cinco ratones por grupo; * p <0,05, ** p <0,01, ensayo de la t de Student. (b) Concentraciones restantes de todos los epoxilípidos y dihidro-metabolitos medidos (9,10-EpOME, 12,13-EpOME, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME y 14,15-EET) en el nervio ciático, DRG, asta dorsal de la médula espinal y el plasma después de la administración de terfenadina (1mg·kg⁻¹). (c) Umbrales mecánicos de ratones tratados con paclitaxel durante ocho días (6mg·kg⁻¹ i.p.) que recibieron una inyección intravenosa de terfenadina (1 o 2 mg kg⁻¹) o vehículo (DMSO al 2,5 o 5 % (v/v)). Los umbrales mecánicos se monitorizaron hasta 5h después de la inyección de terfenadina o vehículo. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 8-9 ratones por grupo; #, * p <0,05, ANOVA de dos vías con ensayo post hoc de Bonferroni (*1mgkg⁻¹, # 2 mg kg⁻¹ de terfenadina). (d) Umbrales mecánicos de ratones ocho días después de la inyección de paclitaxel (6mg·kg⁻¹ i.p.) que recibieron una inyección intravenosa de Loratadina (1 mg kg⁻¹) o vehículo (DMSO al 2,5 % (v/v)). Los datos representan la media $\pm$ SEM de 6-9 ratones por grupo.

Figura 9: Correlación de los valores de inhibición calculados de CYP2J2 y CYP3A4. Los antagonistas ubicados en el cuadrante superior izquierdo son selectivos para CYP2J2. Los ensayos luminogénicos de CYP2J2 se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (<https://www.promega.de/resources/pubhub/enotes/cytochrome-p450-2j2-enzyme-assay-using-a-novel-bioluminescent-probe-substrate/>). Con el fin de ensayar la selectividad de un antagonista de CY2J2 candidato, se emplearon ensayos de CYP luminogénicos adicionales específicos para CYP3A4 y la actividad inhibidora de un antagonista de CYP2J2 candidato se comparó con la actividad inhibidora del mismo antagonista frente a CYP3A4.

SEQ ID NO: 1 a 14: Secuencias de cebadores

Ejemplos

Materiales y métodos

Animales

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y aprobados por los Comités de Ética locales para la Investigación Animal (Darmstadt) con el número de permiso F95/42. Para todos los experimentos de comportamiento, el inventor usó solo ratones C57BL/6N machos de 6-12 semanas de edad adquiridos en compañías de cría comerciales (Charles River, Sulzfeld, Alemania, Janvier, Le Geneset-Saint-Isle, FR). Para comparar los umbrales mecánicos, el inventor usó los compañeros de camada con edad y sexo concordantes.

Los ratones deficientes en receptores de prostanoïdes (DP1^{-/-}, IP^{-/-}, EP2^{-/-} y EP4^{-/-}) fueron criados en el Institute of Clinical Pharmacology, Frankfurt, como se ha descrito anteriormente.

Modelo de paclitaxel del dolor neuropático inducido por quimioterapia

El paclitaxel se disolvió en Cremophor EL/etanol 1:1 y se diluyó en disolución salina. La dosis para inyección intraperitoneal se ajustó a 6 mg/kg como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de comportamiento

Para la determinación de alodinia mecánica o hipersensibilidad térmica, los ratones se mantuvieron en jaulas de ensayo en una rejilla elevada durante al menos 2 h para permitir la acomodación. Las mediciones de línea de base se realizaron usando un Estesiómetro Plantar Dinámico o un Aparato Hargreaves (Ugo Basile, Comerio, VA, Italia) que detectan la latencia de retirada de las patas traseras después de la estimulación mecánica. Para la evaluación de los umbrales mecánicos, se empujó la varilla de acero contra la región plantar media de la pata trasera con una fuerza ascendente lineal (0-5 g durante 10 segundos, aumentando 0,5 g/s) hasta que se produjo una respuesta de retirada rápida. Los movimientos lentos de la pata no se contaron. Las latencias de retirada de la pata (PWL) se determinaron en segundos (s) $\pm$ 0,1 con un tiempo de corte de 20 s. Las patas no inyectadas e inyectadas se midieron alternativamente en intervalos de 5-10 min. Para la determinación de los umbrales térmicos, los ratones se mantuvieron en jaulas de ensayo en una placa de vidrio calentada (32 °C) durante al menos 2h el primer día para permitir la acomodación. Después, se estimuló la región plantar media de las patas con un dispositivo de calor radiante, que consistía en una lámpara de proyector de alta intensidad, hasta que se produjo la retirada. Las patas no inyectadas e inyectadas se midieron alternativamente en intervalos de 5-10 min. Para todos los ensayos de comportamiento, el investigador lo hizo de manera ciega para el tratamiento o el genotipo de los ratones.

Tratamientos: Para inyecciones periféricas, se inyectaron 20 μ l de 9,10-EpOME [5 μ M] (Cayman, Ann Arbor, MI, EE. UU.) por vía subcutánea (s.c.) en el área plantar media de la pata trasera. Los animales control recibieron los volúmenes correspondientes de DMSO (Sigma, Deisenhofen, Alemania; al 1,6% (v/v) en disolución salina). Para las inyecciones intratecales, se inyectaron 5 μ l de 9,10-EpOME [10 μ M] en DMSO al 3,2 %/disolución salina (v/v) mediante punción lumbar directa en ratones despiertos y conscientes como se ha descrito anteriormente. La terfenadina o loratadina (ambas de Tocris, Bristol, Reino Unido) se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola.

Cultivos primarios de ganglios de la raíz dorsal (DRG)

Los DRG murinos se diseccionaron de los segmentos espinales y se transfirieron directamente a HBSS enfriado en hielo con CaC12 y MgC12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). A continuación, los DRG aislados se incubaron con colagenasa/dispasa (500U/ml de colagenasa; 2,5 U/ml de dispasa) en medio neurobasal que contenía L-glutamina [2 mM], penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), B-27 y gentamicina (50 μ g/ml) (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a 37 °C durante 75 min. Después de la eliminación de la disolución de colagenasa/dispasa, las células se lavaron dos veces con medio neurobasal que contenía FCS al 10 % y se incubaron durante 10 min con tripsina al 0,05 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las etapas de lavado se repitieron y las células se disociaron mecánicamente con una pipeta Gilson de 1 ml. Finalmente, las neuronas se colocaron en placas con cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-1-lisina (Sigma, Deisenhofen, Alemania) y se incubaron con medio neurobasal que contenía L-glutamina [2 mM], penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), B-27 y gentamicina (50 μ g/ml) durante la noche hasta la evaluación por imagenología de calcio.

Experimentos de imagenología de calcio

Los experimentos de imagenología de calcio se realizaron con dos configuraciones diferentes. En primer lugar, el inventor usó un microscopio vertical Axio Scope 2 (Zeiss, Jena, Alemania) con un objetivo de inmersión en agua Achromplan 10x (Zeiss). El microscopio estaba equipado con una cámara Imago CCD y un monocromador Polychrome IV (todos TILL Photonics, Grafelfing, Alemania). Las imágenes se adquirieron cada 2 segundos a ambas longitudes de onda (340 nm y 380 nm) y se procesaron usando el software Tillvision 23. Más tarde, se usó una configuración de imagenología de calcio Leica, que consistió en un microscopio invertido Leica DMI 4000 b equipado con una cámara DFC360 FX (CCD-), filtros Fura-2 y un objetivo N-Plan 10x/0,25 Ph1 (todos de Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se tomaron cada 2 segundos y se procesaron con el software LAS AF. Para cada experimento, el inventor eligió un área con un gran número de células y monitorizó 40-110 células simultáneamente. Los experimentos de imagenología de calcio se realizaron usando neuronas del DRG 24-48 horas después de la preparación. Las células se cargaron con fura-2-AM-éster 5 μ M y Pluronic F-127 al 0,02 % (ambos Biotium, Hayward, CA) y se incubaron durante 30 a 60 min a 37 °C. Después, las células se lavaron con disolución externa (que contenía en mM: NaCl [145], CaC12 [1,25], MgC12 [1], KC1 [5], D-glucosa [10], HEPES [10]; ajustado a pH 7,3) Las mediciones de línea base se realizaron en disolución externa a una velocidad de flujo de 1 - 2 ml/min. Se generaron disoluciones libres de calcio mediante la eliminación de CaC12 y la adición de EGTA [2 mM] y se controlaron osmóticamente aumentando las concentraciones de NaCl hasta 150 mM. Se diluyeron disoluciones madre de HC-030031 (Sigma, Deisenhofen, Alemania), AMG 9810, dihidrocloruro de H89, 8-bromo-AMPC, GF 109203X (todos de Tocris, Bristol, Reino Unido) y NGF (Merck Millipore, Darmstadt, AL) en disolución externa hasta sus concentraciones finales.

PCR cuantitativa en tiempo real

Se diseccionaron los DRG lumbares de los ratones en los puntos de tiempo indicados y se extrajo el ARN usando el kit de aislamiento de ARNm mirVana™ (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). La transcripción inversa y la PCR en tiempo real se realizaron usando el sistema TaqMan® (life technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se evaluaron con el método $\Delta\Delta C(T)$ como se ha descrito anteriormente 24,25. Los siguientes oligonucleótidos se usaron para la amplificación del ADNc:

Tabla 1: Secuencias de cebador usadas para PCR cuantitativa en tiempo real de tejido murino, a = banco de cebadores MGH, ID: 160948617c2.

Gen	Directo	Inverso
CYP2C29	5'-GCCTCAAAGCCTACTGTCA-3' (SEQ ID NO 1)	5'-AACGCCAAAACCTTTAATC-3' (SEQ ID NO 2)
CYP2C37	5'-ATACTCTATATTTGGGCAGG-3' (SEQ ID NO 3)	5'-GTTCTCTCCACAAGGCAAC-3' (SEQ ID NO 4)
CYP2C38	5'-TTGCCTTCTGTAATCCCCC-3' (SEQ ID NO 5)	5'-TCTAACGCAGGAATGGATAAAC-3' (SEQ ID NO 6)
CYP2C39	5'-GGAGACAGAGCTGTGGC-3' (SEQ ID NO 7)	5'-TAAAAACAATGCCAAGGCCG-3' (SEQ ID NO 8)
CYP2C44	5'-CTTTCCAACGAGCGATTCCC-3' (SEQ ID NO 9)	5'-TGTTTCTCCTCCTCGATCTTGC-3' (SEQ ID NO 10)
CYP2J6	5'-GGCCTCCCACCTAGTGGA-3' (SEQ ID NO 11)	5'-ATAACCTCGTCCAGTAACCTCA-3' (SEQ ID NO 12)
CYP3A11	5'-GACAAACAAGCAGGGATGGAC-3' (SEQ ID NO 13)	5'-CCAAGCTGATTGCTAGGAGCA-3' (SEQ ID NO 14)

Determinación de EET por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

- 5 Extracción de muestras y estándares: La extracción de muestras se realizó como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se prepararon disoluciones madre con 2.500 ng/ml de todos los analitos en metanol. Los estándares de trabajo se obtuvieron por dilución adicional con un rango de concentración de 0,1-250 ng/ml para los EET, EpOME y DiHOME y HODE. La extracción de las muestras se realizó con extracción líquido-líquido. Por lo tanto, el medio de cultivo de tejidos o células se extrajo dos veces con 600 µl de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se retiraron a una temperatura de 45 °C bajo una corriente suave de nitrógeno. Los residuos se reconstituyeron con 50 µl de metanol/agua/ (50:50, v/v), se centrifugaron durante 2 min a 10.000xg y se transfirieron después a viales de vidrio (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) antes de la inyección en el sistema de LC-MS/MS.

- 15 Instrumentación para medir epoxilípidos y HODE: El sistema de LC-MS/MS consistió en un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo API 4000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), equipado con una fuente Turbo-V que funciona en modo ESI negativo, un Agilent 1100 binario de bomba de HPLC y desgasificador (Agilent, Waldbronn, Alemania) y un automuestreador HTC Pal (Chromtech, Idstein, Alemania) equipado con una jeringa LEAP de 25 µl (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, Alemania). El nitrógeno de alta pureza para el espectrómetro de masas fue producido por un generador de nitrógeno NGM 22-LC-MS (cmc Instruments, Eschborn, Alemania). Para la separación cromatográfica, se usaron una columna y precolumna Gemini NX C18 (150 mm x 2 mm d.i., tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro de 110 Å de Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Se empleó un gradiente lineal a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min de fase móvil con un tiempo de ejecución total de 17,5 minutos. La fase móvil A fue agua/amoniaco (100:0,05, v/v) y la B acetonitrilo/amoniaco (100:0,05, v/v). El gradiente comenzó del 85 % de A al 10 % en 12 min. Esto se mantuvo durante 1 minuto al 10 % de A. En 0,5 minutos, la fase móvil volvió al 85 % de A y se mantuvo durante 3,5 min para equilibrar la columna para la siguiente muestra. El volumen de inyección de las muestras fue de 20 µl. La cuantificación se realizó con Software Analyst V 1.4.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) empleando el método de estándar interno (espectrometría de masas con dilución isotópica). Las relaciones de área de pico de analito y área de estándar interno (eje de las y) se representaron frente a la concentración (eje de las x) y las curvas de calibración se calcularon por regresión de mínimos cuadrados con ponderación 1/concentración².

Ensayos de unión de [35S] GTPγS

- 30 Para medir la activación de un supuesto receptor acoplado a proteína G, se realizaron ensayos de unión de GTPγS con preparaciones de membrana de DRG de ratas adultas usando 9,10-EpOME 1 µM (Cayman, Ann Arbor, MI, EE. UU.) y [35S] GTPγS fresco (1.250 Ci/mmol, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.).

Medición de iCGRP

- 35 Las mediciones de CGRP se realizaron tal como se ha descrito anteriormente 32 usando un kit de ensayo inmune de enzimas CGRP (SpiBio, Bertin pharma, Francia). Para las mediciones de CGRP de cultivos de DRG, los DRG de ratones BL/6N de tipo salvaje se diseccionaron y se trataron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron durante la noche en placas de 48 pocillos.

Análisis de los datos y estadísticas

Todos los datos se presentan como media $\pm$ s.e.m. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas en todos los experimentos de comportamiento, se usó el análisis de varianza (ANOVA) para mediciones repetidas seguido de la corrección post hoc de Bonferroni usando GraphPad Prism. Para los experimentos in vitro que compararon solo dos grupos, se realizó el ensayo de la t de Student. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Ensayos de luciferasa del citocromo P450

Los ensayos Glo de CYP2J2 y CYP3A4 se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (P450-Glo™, Promega).

Protocolo del ensayo de CYP2J2:

- 10 - Preparación de la mezcla de enzima CYP2J2 (2 nM)/sustrato Luciferina-2J2/4F12 (2 μ M) 5 μ l/pocillo usando MultiDrop
- Adición de 50 nl/pocillo de compuestos (concentración final de 10 μ M)/DMSO (concentración final del 0,5 %) usando Echo
- Incubación durante 30 min a 37 °C
- 15 - Adición de disolución de regeneración de NADPH 5 μ l/pocillo usando MultiDrop
- Incubación durante 30 min a 37 °C
- Adición de disolución de LDR-esterasa 10 μ l/pocillo usando MultiDrop
- Incubación durante 30 min a 37 °C, lectura de la luminiscencia en EnSpire.

Protocolo del ensayo de CYP3A4:

- 20 - Preparación de la mezcla de enzima CYP3A4 (2 nM)/sustrato Luciferina-IPA (7 μ M) 5 μ l/pocillo usando MultiDrop,
- Adición de 50 μ l/pocillo de compuestos (concentración final de 10 μ M)/DMSO (concentración final del 0,5 %) usando Echo,
- Incubación durante 30 min a 37 °C,
- 25 - Adición de disolución de regeneración de NADPH 5 μ l/pocillo usando MultiDrop,
- Incubación durante 30 min a 37 °C,
- Adición de disolución de LDR-esterasa 10 μ l/pocillo usando MultiDrop,
- Incubación durante 30 min a 37 °C y lectura de la luminiscencia en EnSpire.

Ejemplo 1: lípidos derivados de CYP en dolor neuropático inducido por quimioterapia

- 30 Para investigar si los lípidos derivados del CYP pueden o no desempeñar un papel en el dolor neuropático inducido por quimioterapia, los inventores inyectaron paclitaxel o vehículo en ratones BL/6N de tipo salvaje y diseccionaron los nervios ciáticos, los DRG y el asta dorsal espinal 24h después de la inyección. Las concentraciones de lípidos se determinaron usando LC-MS/MS. Se encontró que las concentraciones del metabolito del ácido linoleico oxidado 9,10-EpOME (Figura 1A) pero no de su lípido hermano 12,13-EpOME (Figura 1B) o sus metabolitos dihidro 9,10- y 12,13-DiHOME (véase la Figura 1 suplementaria) están fuertemente elevadas en DRG respectivamente (Fig. 1A). También se cuantificaron los niveles de 9- y 13-HODE (Figura 1C, 1D), que se generan durante el dolor inflamatorio y son activadores endógenos de TRPV1 33. Sin embargo, los inventores no pudieron detectar ninguna diferencia en sus niveles después del tratamiento con paclitaxel. Para investigar si el aumento de la concentración de 9,10-EpOME en DRG es específico para el tratamiento con paclitaxel, se inyectó zimósán en la pata trasera de ratones BL/6N de tipo salvaje para inducir dolor inflamatorio. Los DRG L4-L6 y la sección correspondiente del asta dorsal se diseccionaron 24h después de la inyección en el pico de inflamación. La cuantificación de lípidos por LC-MS/MS no reveló ninguna diferencia en los niveles de 9,10-EpOME durante el dolor inflamatorio (Figura 1E).
- 35
- 40

A continuación, los inventores caracterizaron 9,10-EpOME con respecto a sus efectos sobre las neuronas de DRG en experimentos de imagenología de calcio. Los inventores observaron que una estimulación corta de 30 s con 9,10-EpOME 10 μ M causó un aumento transitorio de calcio en las neuronas de DRG (Figura 2A). Los inventores realizaron un análisis de respuesta a la dosis para investigar la potencia de 9,10-EpOME en la provocación de aumentos transitorios de calcio y encontraron un máximo del 10,3 % de las neuronas de DRG que respondían a 25 μ M de 9,10-

EpOME sin un aumento significativo en el porcentaje de neuronas que responden a concentraciones más altas (Figura 2B). Para analizar si los aumentos transitorios de calcio provocados con 9,10-EpOME son el resultado de la liberación de depósitos intracelulares de calcio o por la entrada de calcio extracelular, los inventores usaron una disolución externa libre de calcio, que contenía EGTA 2 mM y neuronas de DRG estimuladas dos veces con 9, 10-EpOME 10 μ M durante 30 s. Dos minutos antes de la segunda estimulación, se introdujo la disolución externa libre de calcio y las neuronas ya no respondieron a 9,10-EpOME, lo que indica la entrada de calcio externo causada por 9,10-EpOME (Figuras 2C, 2D). El control positivo para las neuronas fue una estimulación final con KCl 50 mM durante 30 s.

Para identificar el canal iónico involucrado, se usaron antagonistas selectivos de TRPV1 (AMG 9810, 1 μ M) y TRPA1 (HC-030031, 20 μ M) con el fin de bloquear el flujo de calcio causado por 9,10-EpOME. Las neuronas de DRG se estimularon dos veces con 9,10-EpOME (10 μ M, 30 s) y las células se preincubaron con los antagonistas del canal TRP durante dos minutos antes del segundo estímulo con 9,10-EpOME. Los inventores observaron que el antagonista selectivo de TRPV1 AMG 9810, pero no el antagonista de TRPA1 HC-030031 podía bloquear el segundo aumento transitorio de calcio provocado por 9,10-EpOME, indicando que TRPV1 es el canal diana de 9,10-EpOME (Figuras 2E, 2F).

Ejemplo 2: 9,10-EpOME sensibiliza a TRPV1

A continuación, los inventores analizaron si 9,10-EpOME también era capaz de sensibilizar a TRPV1 o TRPA1 en una concentración más baja y más fisiológica (1 μ M). Por lo tanto, los inventores estimularon las neuronas de DRG dos veces con capsaicina (200 nM, 15 s) e incubaron las células durante dos minutos con 9,10-EpOME [1 μ M] o vehículo antes del segundo estímulo de capsaicina y observaron una respuesta significativamente más fuerte de las neuronas de DRG a capsaicina que se incubaron con 9,10-EpOME, lo que indica la sensibilización de TRPV1 por 9,10-EpOME (Figura 3A). Para investigar la potencia de la sensibilización a TRPV1 dependiente de 9,10-EpOME, se realizó un análisis de respuesta a la dosis usando concentraciones de 9,10-EpOME de 250 nM a 2 μ M. Se observó que un aumento dependiente de la dosis en las amplitudes de las segundas respuestas a capsaicina en comparación con el vehículo. Este efecto parece ser específico para TRPV1, porque las respuestas de TRPA1 dependientes de aceite de mostaza no pudieron ser sensibilizadas por 9,10-EpOME [1 μ M] (Figura 2B).

Para confirmar el efecto de la sensibilización de TRPV1 por 9,10-EpOME con medios electrofisiológicos, los inventores midieron sEPSC de neuronas de lámina II de cortes de médula espinal usando dos estimulaciones de capsaicina [1 μ M] e incubando las células antes del segundo estímulo de capsaicina con 9, 10-EpOME [1 μ M] (Figura 3C). El tratamiento de 9,10-EpOME solo, aumentó ligeramente la frecuencia de sEPSC. Sin embargo, en combinación con la capsaicina, la frecuencia de sEPSC estaba fuertemente potenciada (Figura 3D). Sin embargo, no se pudo observar diferencia en la amplitud de los sEPSC con 9,10-EpOME, TRPV1 o la combinación de ambas sustancias (Figura 3E).

Dado que se sabe que la sensibilización a TRPV1 mediada por lípidos implica principalmente la activación de un receptor acoplado a proteína G, el inventor realizó ensayos de GTP γ S para analizar si 9,10-EpOME es capaz de activar un GPCR en DRG y observó una señal significativamente aumentada de GTP γ S después de la incubación con 9,10-EpOME 1 μ M (Figura 4A). Para identificar el mecanismo de sensibilización de TRPV1 mediada por 9,10-EpOME, el inventor midió a continuación AMPc en cultivos de DRG enriquecidos con neuronas que fueron estimulados bien con vehículo, 9,10-EpOME, el agonista del receptor IP cicaprost o forskolina [1 μ M cada uno] durante 15 minutos. De forma interesante, el inventor observó que 9,10-EpOME causó un aumento significativo en las concentraciones de AMPc en comparación con su vehículo (Figura 4B). Estos resultados indican la activación de un receptor acoplado a G α s por 9,10-EpOME.

Dado que TRPV1 puede ser fosforilado por PKA y PKC, lo que produce en ambos casos una mayor actividad y sensibilización del canal 35, los inventores investigaron si los inhibidores de PKA o PKC pueden reducir la sensibilización de TRPV1 provocada por 9,10-EpOME en experimentos de imagenología de calcio con cultivos de neuronas de DRG de ratones BL/6N de tipo salvaje. Los inventores pudieron reproducir la sensibilización de TRPV1 dependiente de capsaicina usando el mismo protocolo que el mencionado anteriormente con estimulación doble de capsaicina y una incubación intermedia con 9,10-EpOME. Sin embargo, los inventores observaron que la preincubación con un inhibidor de PKA (dihidrocloruro de H89, 10 μ M durante 1h) causó una reducción significativa de la sensibilización de TRPV1 provocada por 9,10-EpOME. (Figuras 4C, 4D). El uso del inhibidor de PKC GF 109203X (GFX) en las mismas condiciones (10 μ M, preincubación durante 1h) no tuvo ningún efecto sobre la sensibilización de TRPV1 derivada de 9,10-EpOME (Figuras 4E, 4F), apuntando así hacia la sensibilización de TRPV1 por 9,10-EpOME mediada por PKA pero no PKC.

Los inventores ensayaron entonces los receptores de prostanoïdes acoplados a G α s para determinar su posible implicación en la sensibilización de TRPV1 dependiente de 9,10-EpOME en experimentos de imagenología de calcio. Los receptores de prostanoïdes tienen una especificidad variable para sus prostanoïdes ligandos y también pueden ser activados por otros lípidos. Sin embargo, los inventores no pudieron observar ninguna reducción en la sensibilización de TRPV1 provocada por 9,10-EpOME en los DRG de ratones deficientes para los receptores EP2 y EP4 de prostaglandina E o receptor de prostaglandina D o I (receptor DP e IP) (no mostrado). Para caracterizar los efectos in vivo de 9,10-EpOME, los inventores inyectaron el lípido en las patas traseras de ratones BL/6N de tipo salvaje y midieron los umbrales térmico (Figura 5A) y mecánico (Figura 5B) hasta 5h después de la inyección. En ambos casos, 9,10-EpOME causó una reducción significativa de los umbrales de dolor que duraron 1h (térmico) o 2h

(mecánico) después de la inyección (Figura 1A, 1B). Los inventores inyectaron entonces 9,10-EpOME por vía intratecal y midieron los umbrales térmico y mecánico en cortos intervalos de tiempo. Se observó una reducción significativa pero bastante débil de los umbrales térmicos 30 minutos después de la inyección i.t. (Figura 5C). Sin embargo, los umbrales mecánicos disminuyeron hasta 1,5 h después de la inyección i.t. de 9,10-EpOME (Figura 5D).

Dado que una mayor actividad de TRPV1 causa una mayor liberación de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) que promueve la inflamación neurogénica 37, los inventores analizaron si 9,10-EpOME es capaz de aumentar la liberación de CGRP dependiente de TRPV1. Los inventores diseccionaron los nervios ciáticos de ratones BL/6N de tipo salvaje y los incubaron con 9,10-EpOME solo [1 μ M], o junto con capsaicina [500 nM] y observaron un fuerte aumento de la liberación de CGRP con coestimulación de capsaicina y 9,10-EpOME. La liberación de CGRP fue significativamente mayor que al usar solo capsaicina o 9,10-EpOME (Figura 6A). Para investigar si este efecto también es visible en los somas de la célula, se estimularon cultivos de DRG enriquecidos con neuronas bien con 9,10-EpOME, capsaicina o ambas sustancias utilizando dos concentraciones de EpOME diferentes [1 y 2,5 μ M]. Nuevamente, la liberación de iCGRP se incrementó significativamente usando tanto EpOME como capsaicina que con cualquiera de las dos sustancias. Sin embargo, no hubo un aumento significativo en la liberación de CGRP usando 2,5 μ M de 9,10-EpOME (Figura 6B).

Ejemplo 3: CYP2J2 regula 9,10-EpOME

A continuación, se investigó cómo se regula la síntesis de 9,10-EpOME durante el CIPNP con paclitaxel. Dado que se supone que 9,10-EpOME se sintetiza por las CYP-epoxigenasas de las subfamilias 2C y 2J 16,38, los inventores examinaron la expresión de CYP-epoxigenasas murinas de estas subfamilias. Ocho días después del tratamiento con paclitaxel, los inventores observaron una meseta estable en los umbrales mecánicos de los ratones tratados con paclitaxel (Figura 7A).

Los inventores diseccionaron entonces los DRG de ratones tratados con vehículo y paclitaxel e investigaron la expresión de CYP2C29, CYP2C37, CYP2C38, CYP2C39, CYP2C44, CYP2J6 y CYP3A11 murinos. Sin embargo, las isoformas de CYP 2C29 y 2C44 no se pudieron detectar en los DRG murinos. Los inventores observaron que CYP2J6 mostró la expresión más fuerte en los DRG de ratones tratados con paclitaxel en comparación con el tratamiento con vehículo (Figura 7B). Esta expresión aumentada de CYP2J6 se correlaciona con niveles aumentados de 9,10-EpOME ocho días después del tratamiento con paclitaxel, según lo analizado por la medición por LC-MS/MS del nervio ciático, los DRG lumbares y la médula espinal.

Ejemplo 4: Los antagonistas de CYP2J2 inhiben la síntesis de 9,10-EpOME y reducen el CIPNP

La terfenadina, un potente inhibidor del CYP2J2 humano, que es la proteína análoga del CYP2J6 murino, se usó como antagonista. Como los sitios de interacción de Terfenadina y el CYP2J2 humano ya se han descrito, los inventores alinearon los aminoácidos del CYP2J6 murino y el CYP2J2 humano y encontraron todos los sitios de interacción posibles con Terfenadina (Leu83, Met116, Ile127, Phe30, Thr315, Ile376, Leu378, Val380, Leu402 y Thr488) en la misma posición en ambas proteínas, excepto Arg117, que se cambia a glutamina. Sobre la base de la sorprendente similitud de la secuencia de aminoácidos entre CYP2J2 y CYP2J6, la terfenadina también interacciona con CYP2J6 e inhibe la proteína. Para investigar los efectos de la terfenadina en los niveles de lípidos, los inventores inyectaron a ratones que habían recibido paclitaxel ocho días antes 1 mg·kg⁻¹ de terfenadina i.v. Después de dos horas, los inventores diseccionaron el nervio ciático, los DRG y la médula espinal dorsal y cuantificaron los epoxilípidos en estos tejidos. Los inventores pudieron observar una reducción significativa de las concentraciones de 9,10-EpOME en todos los tejidos investigados (Figura 8A). Los inventores también observaron que las concentraciones restantes de todos los epoxilípidos medidos y sus (9,10-EpOME, 12,13-EpOME, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME y 14,15-EET) se redujeron significativamente en los DRG, el asta dorsal espinal y el plasma, pero no en el nervio ciático de los animales tratados con terfenadina, respectivamente (Figura 8B).

Los inventores investigaron entonces si el tratamiento con terfenadina puede reducir el CIPNP inducido por paclitaxel en ratones. Por lo tanto, el inventor inyectó terfenadina (1 o 2 mg·kg⁻¹ o vehículo (DMSO) por vía intravenosa en ratones que ya habían recibido paclitaxel ocho días antes. Los inventores midieron los umbrales mecánicos de los ratones 1, 2, 4 y 5h después de la inyección de terfenadina y pudieron observar un aumento significativo en los umbrales mecánicos de los ratones que fueron tratados con terfenadina, con una duración de 2h. Sin embargo, no se pudieron observar diferencias significativas entre las dos dosis (Figura 8C). Dado que la terfenadina es un antagonista del receptor de histamina-1, los inventores usaron loratadina, otro antagonista del receptor H1 que no inhibe el CYP2J2, para investigar si los efectos antinociceptivos están realmente causados por la inhibición del CYP2J2, o el receptor de la histamina-1. Sin embargo, el tratamiento con loratadina no redujo el CIPNP inducido por paclitaxel en comparación con el vehículo (Figura 8D).

Ejemplo 5: Cribado de nuevos antagonistas selectivos de CYP2J2

La Biblioteca de Medicamentos v2 Screens-Well® aprobada por la FDA fue cribada para detectar nuevos antagonistas selectivos de CYP2J2 para su uso en el contexto de la invención descrita en la presente memoria. La reacción enzimática basada en la luciferasa CYP-Glo se usó para analizar la actividad de CYP2J2 y como control no selectivo CYP3A4. La terfenadina se usó como control positivo en los experimentos. Los resultados de ambos cribados se

muestran en la figura 9. Los antagonistas que mostraron más de un 60 % de inhibición frente a CYP2J2 y aproximadamente un 0 % de inhibición de CYP3A4 se consideran antagonistas selectivos de CYP2J2 y son útiles para los métodos y usos como se describe en la presente memoria, y se enumeran en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2:

ID del compuesto	Inhibición promedio de CYP2J2 (%)	Inhibición promedio de CYP3A4 (%)	Nombre
c054	84,4	12,1	Estradiol
c089	75,0	17,9	Fenoxibenzamina·HCl
c124	80,8	-23,5	Loratadina
c146	78,2	-4,3	Propionato de clobetasol
c244	73,7	-43,3	Mesilato de doxazosina
c246	78,0	-26,2	Fenofibrato
c314	64,0	5,1	Levonorgestrel
c337	92,8	15,5	Aripiprazol
c440	76,8	-18,5	Halcinonida
c485	89,5	7,6	Telmisartán
c516	79,1	-82,9	Clofazimina
c542	87,6	12,9	Levotiroxina·Na
c595	81,8	14,0	Alosetrón·HCl
c596	75,9	10,7	Fluocinonida
c606	93,6	-6,8	Liotironina·Na
c608	71,5	17,4	Dihidrocloruro de meclizina

5

Discusión

9,10-EpOME es capaz de sensibilizar a TRPV1 en neuronas de DRG a través de un mecanismo dependiente de AMPc-PKA en concentraciones submicromolares, lo que da lugar a la posterior liberación de iCGRP de los DRG. Ya se ha demostrado que otros metabolitos de ácido linoleico oxidado (OLAM), tales como 9 y 13-HODE, que se producen durante el calentamiento excesivo de la piel, son agonistas directos de TRPV1 y contribuyen a la hiperalgesia inflamatoria. Los inventores también pudieron detectar 9 y 13-HODE en tejido murino, principalmente en tejidos periféricos.

Los inventores usaron el inhibidor de CYP2J2 terfenadina para reducir la síntesis de 9,10-EpOME y pudieron reducir los niveles de epoxilípidos hasta aproximadamente el 50 %. El tratamiento con terfenadina dio lugar a una hipersensibilidad mecánica reducida en ratones durante el CIPNP por paclitaxel. Los antagonistas de CYP2J2 y sus homólogos son, por lo tanto, útiles para tratar o prevenir el CIPNP, lo que se confirmó porque los animales que fueron tratados con loratadina, un antagonista selectivo del receptor H1, que no afecta a CYP2J2, no mostraron una mejora en el CIPNP por paclitaxel, lo que indica así que el efecto que se observó con la terfenadina se debe a la inhibición de CYP2J2 y no del receptor de histamina 1.

El dolor neuropático inducido por quimioterapia y las disfunciones sensoriales posteriores siguen siendo los efectos secundarios más graves de los citostáticos. Especialmente durante el tratamiento con paclitaxel, se puede observar un síndrome de dolor agudo temprano que parece estar mediado por la sensibilización de las neuronas nociceptivas. Sin embargo, no hay información disponible sobre mediadores endógenos que puedan contribuir a este estado patofisiológico. Según los datos del inventor, la sensibilización a TRPV1 dependiente de 9,10-EpOME y el aumento de la actividad de las neuronas nociceptivas pueden contribuir así al síndrome de dolor agudo de paclitaxel (P-APS).

Actualmente, existe una fuerte necesidad médica no satisfecha de agentes terapéuticos para el CIPNP. El tratamiento de pacientes con antioxidantes o sustancias neuroprotectoras, tales como la amifostina o el glutatión no logró mejorar el CIPNP en grandes ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo, y una reciente revisión Cochrane concluye que actualmente no hay evidencia de terapia funcional de CIPNP con estas sustancias. Además, los antioxidantes pueden interferir con los efectos antineoplásicos de los citostáticos. Recientemente, se ha reportado que

30

el tratamiento con N-acetil cisteína (NAC) y vitamina E aumentó la proliferación de células tumorales pulmonares y el crecimiento tumoral en ratones al reducir el daño en el ADN. A este respecto, los inhibidores de CYP2J2 pueden ser superiores al uso de antioxidantes, porque se ha reportado que incluso reducen el crecimiento del cáncer in vitro e in vivo activando la caspasa-3, Bax y Bcl-2 y reduciendo la migración y adherencia de las células tumorales.

5 Listado de secuencias

<110> Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.

<120> ANTAGONISTAS DE CYP2J2 EN EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

<130> F30742WOEP

<140> EP15750066.1

<141> 14-08-2015

<150> EP14181086.1

<151> 14-08-2014

<150> EP14186624.4

<151> 26-09-2014

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 1

gcctcaaagc ctactgtca 19

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 2

aacgccaaaa cctttaatc 19

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 3

atactctata ttgggcagg 20

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 5 <400> 4
 gttcctccac aaggcaac 18
 10 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 <400> 5
 20 ttgccttctg taatcccc 19
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 30 <400> 6
 tctaacgcag gaatggataa ac 22
 <210> 7
 35 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de cebador
 <400> 7
 ggagacagag ctgtggc 17
 45 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 <400> 8
 55 taaaaacaat gccaaaggccg 20
 <210> 9
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador

<400> 9

5 cttccaacg agcgattccc 20

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia de cebador

15 <400> 10

tgtttctcct cctcgatctt gc 22

20 <210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 11

ggcctccac ctagtgga 19

30 <210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia de cebador

35 <400> 12

ataacctcgt ccagtaacct ca 22

40 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 13

gacaaacaag cagggatgga c 21

50 <210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

55 <220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 14

60 ccaagctgat tgctaggagc a 21

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista selectivo de la citocromo P₄₅₀ epoxigenasa 2J2 (CYP2J2) para uso en la prevención o tratamiento del dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP) en un sujeto, en donde dicho antagonista selectivo de CYP2J2 se selecciona del grupo que consiste en estradiol, fenoxibenzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina.
5
2. El antagonista selectivo de CYP2J2 para uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto recibió, recibe o recibirá quimioterapia.
3. El antagonista selectivo de CYP2J2 para uso según la reivindicación 2, en donde la quimioterapia implica la administración de paclitaxel, docetaxel o cabazitaxel, o derivados de los mismos.
10
4. Una combinación que comprende (i) un antagonista selectivo de CYP2J2 y (ii) un agente quimioterapéutico para uso concomitante o secuencial en la prevención o tratamiento de CIPNP, en donde el antagonista selectivo de CYP2J2 se selecciona del grupo que consiste en estradiol, fenoxibenzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina.
15
5. La combinación para uso según la reivindicación 4, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de paclitaxel, docetaxel o cabazitaxel, o derivados de los mismos.
6. La combinación para uso según la reivindicación 4 o 5, en donde (i) y (ii) se combinan por administración secuencial o concomitante a un sujeto durante dicha prevención o tratamiento, preferiblemente en donde los antagonistas se administran concomitantemente durante dicha prevención o tratamiento.
20
7. El antagonista selectivo de CYP2J2 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o la combinación para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se administra a dicho sujeto al menos un terapéutico adicional efectivo frente al dolor.
8. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento del dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia (CIPNP) en un sujeto, que comprende un antagonista selectivo de la citocromo P₄₅₀ epoxigenasa 2J2 (CYP2J2) seleccionado del grupo que consiste en estradiol, fenoxibenzamina-HCl, propionato de clobetasol, mesilato de doxazosina, fenofibrato, levonorgestrel, aripiprazol, halcinonida, telmisartán, clofazimina, levotiroxina-Na, alosetrón-HCl, fluocinonida, liotironina-Na, dihidrocloruro de meclizina y terfenadina; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
25

Figura 1:

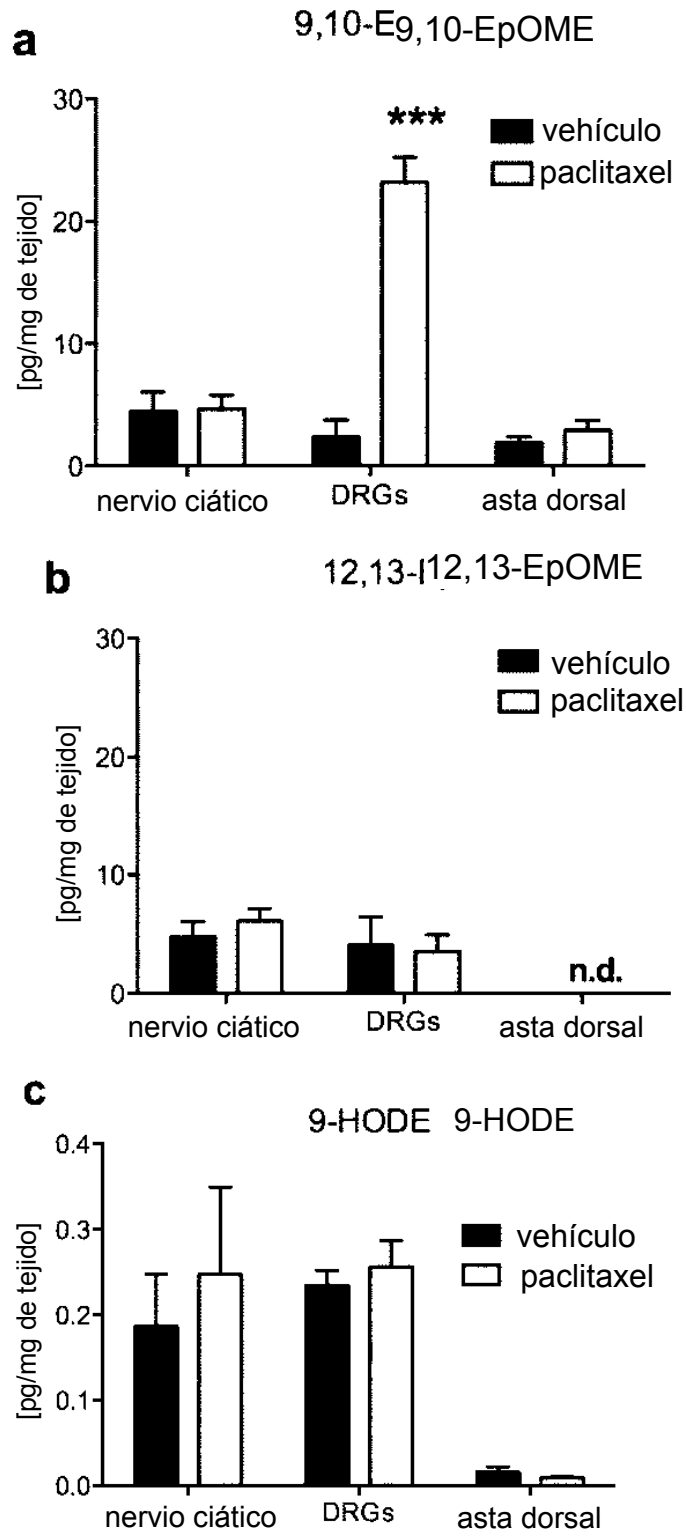


Figura 1 continuación:

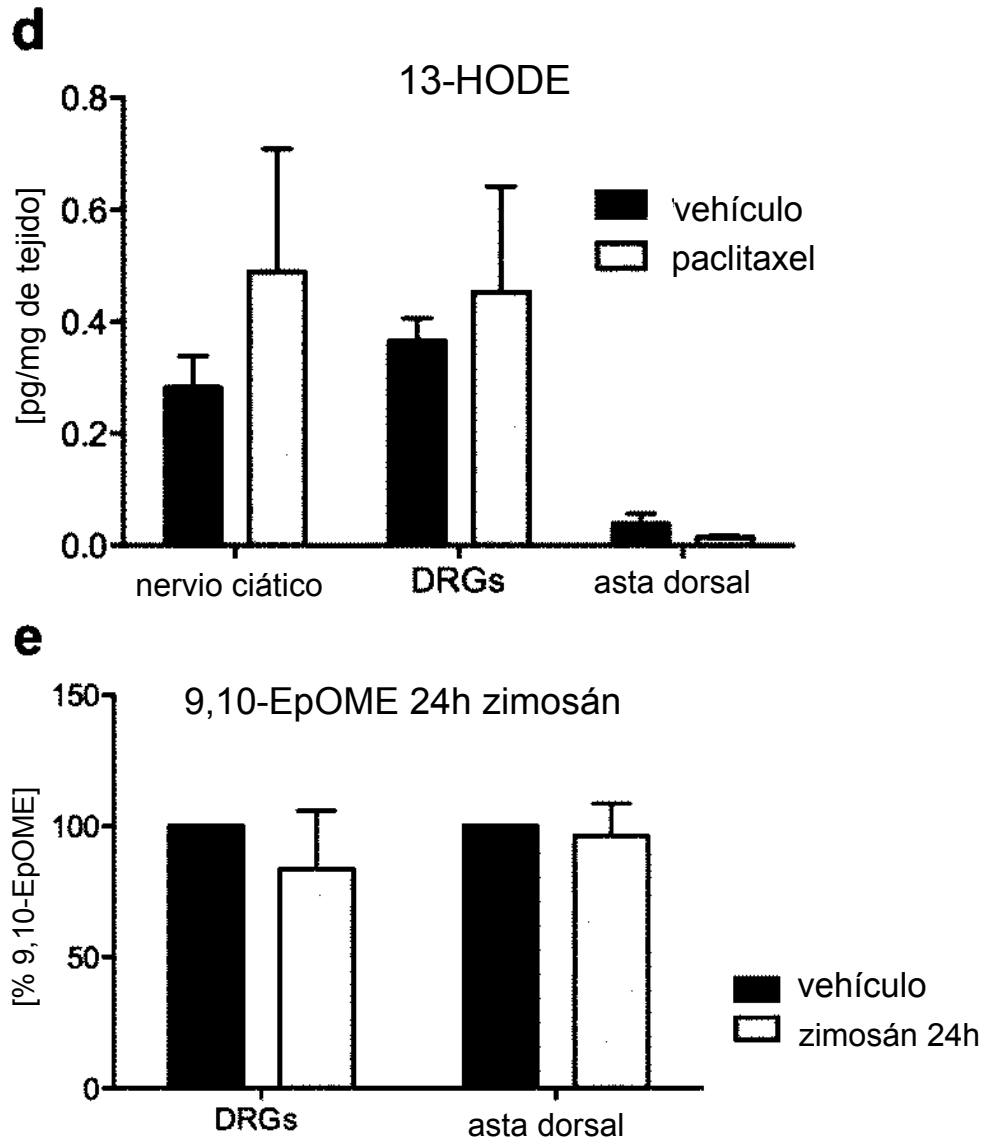


Figura 2:

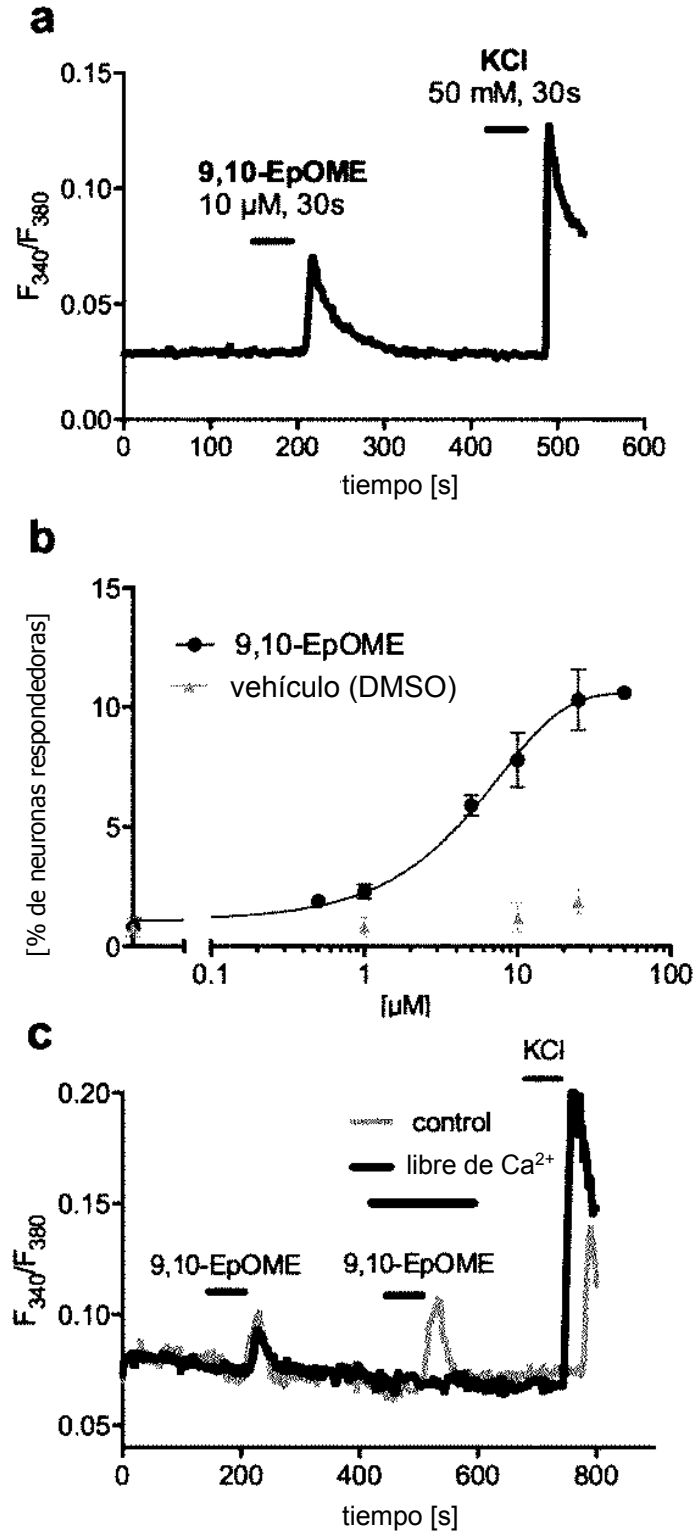


Figura 2 continuación:

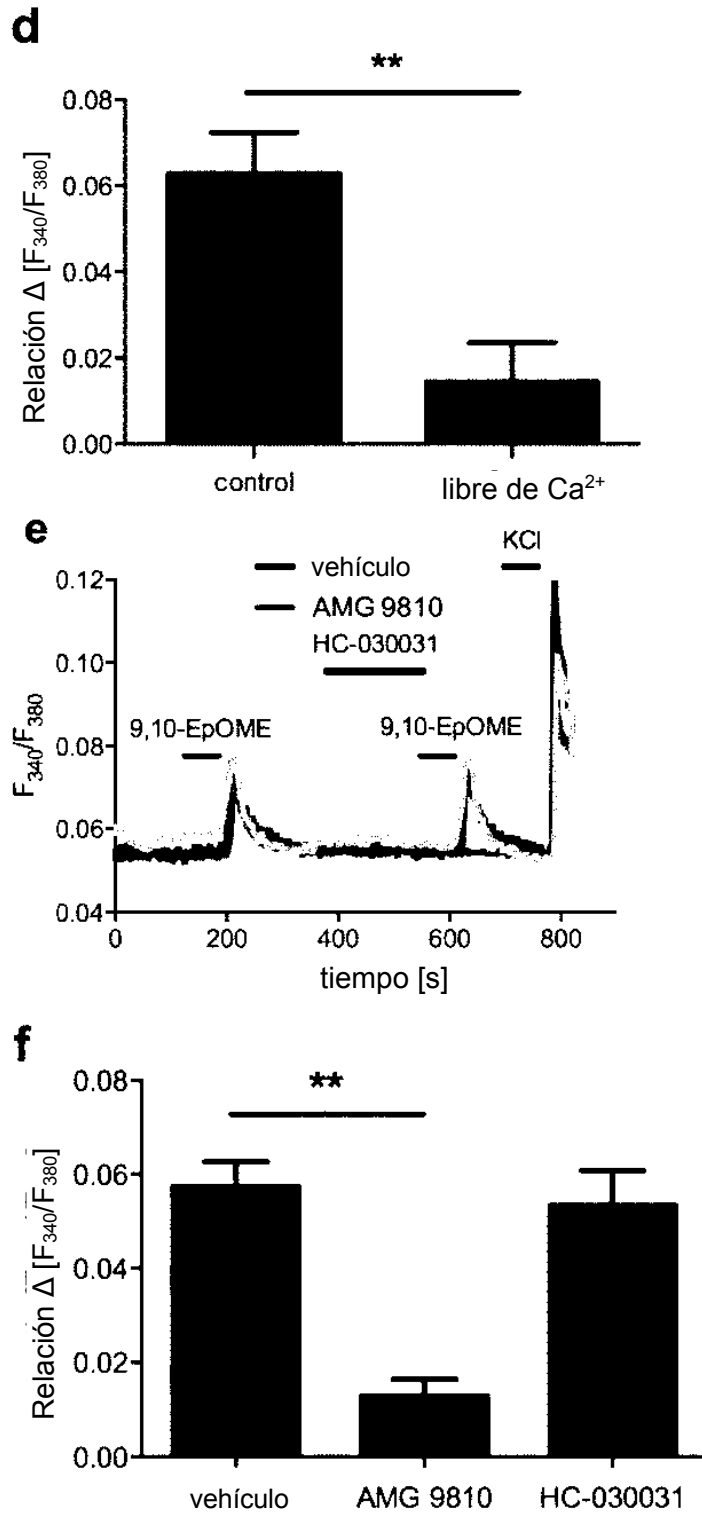
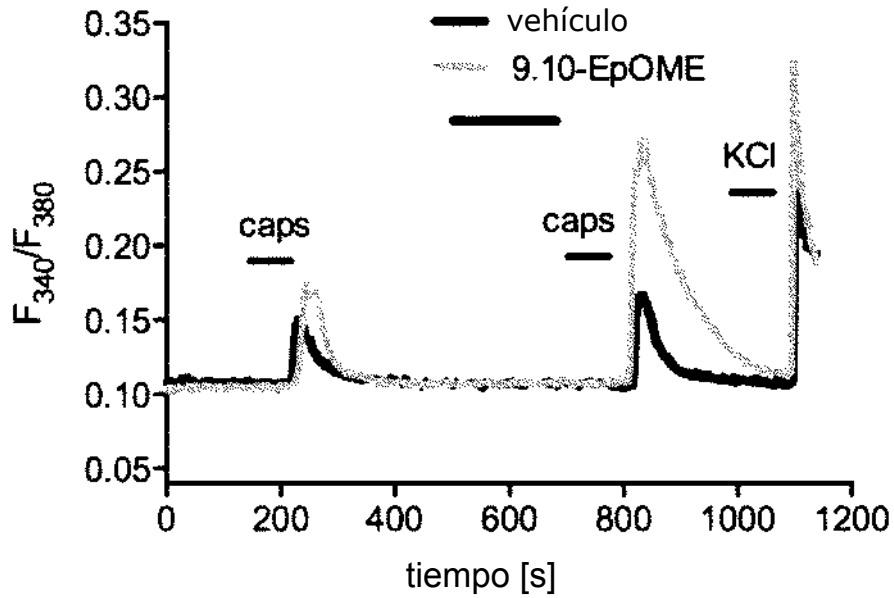


Figura 3:

a



b

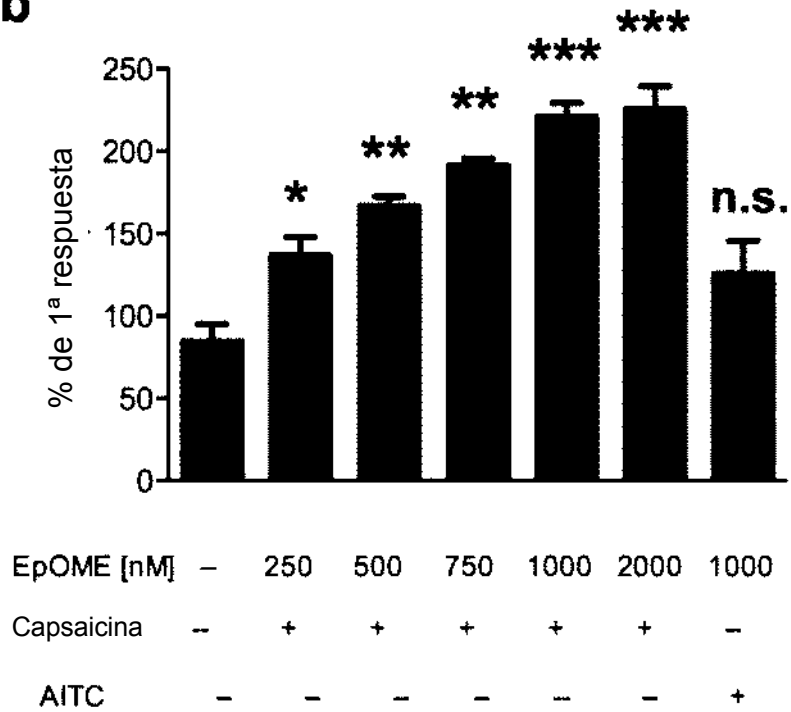


Figura 3 continuación:

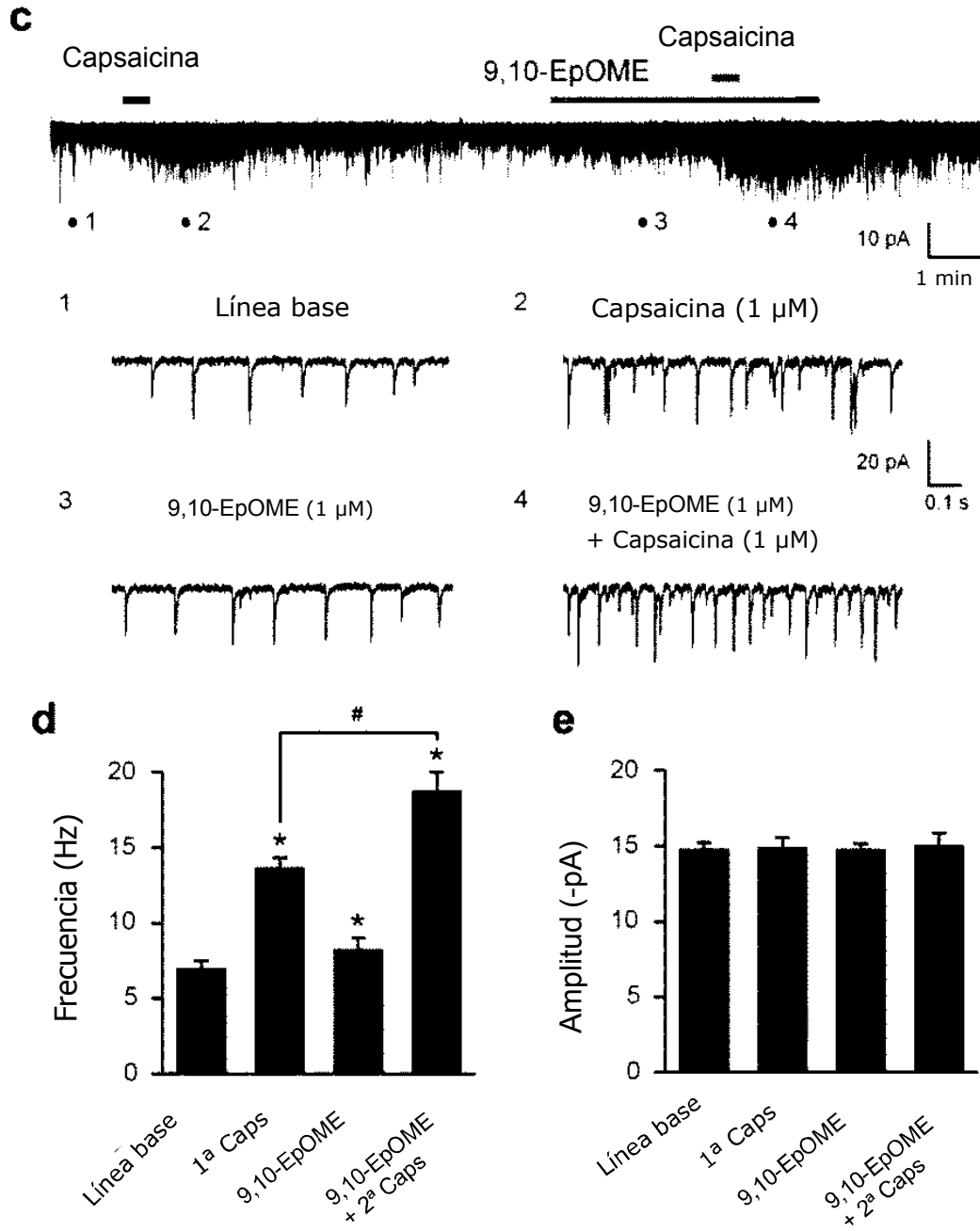


Figura 4:

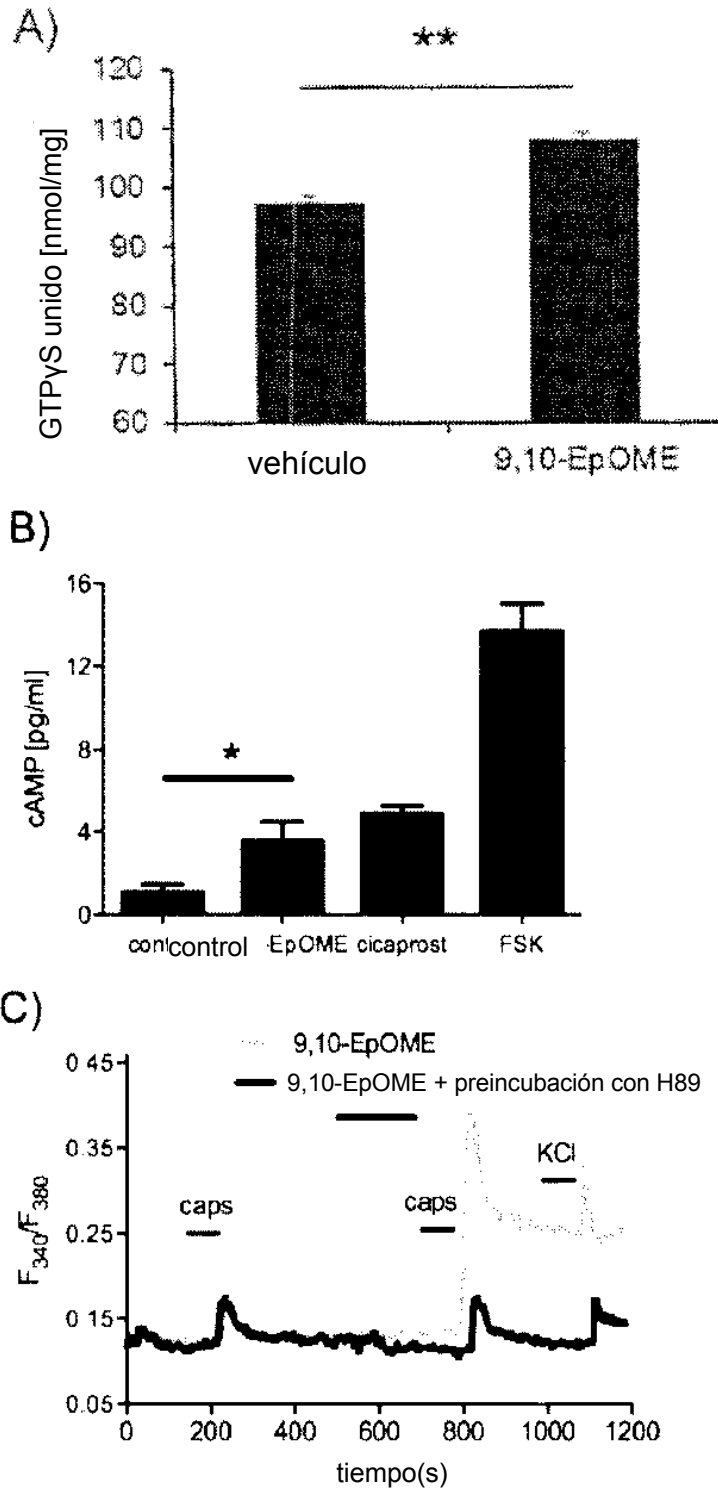


Figura 4 continuación:

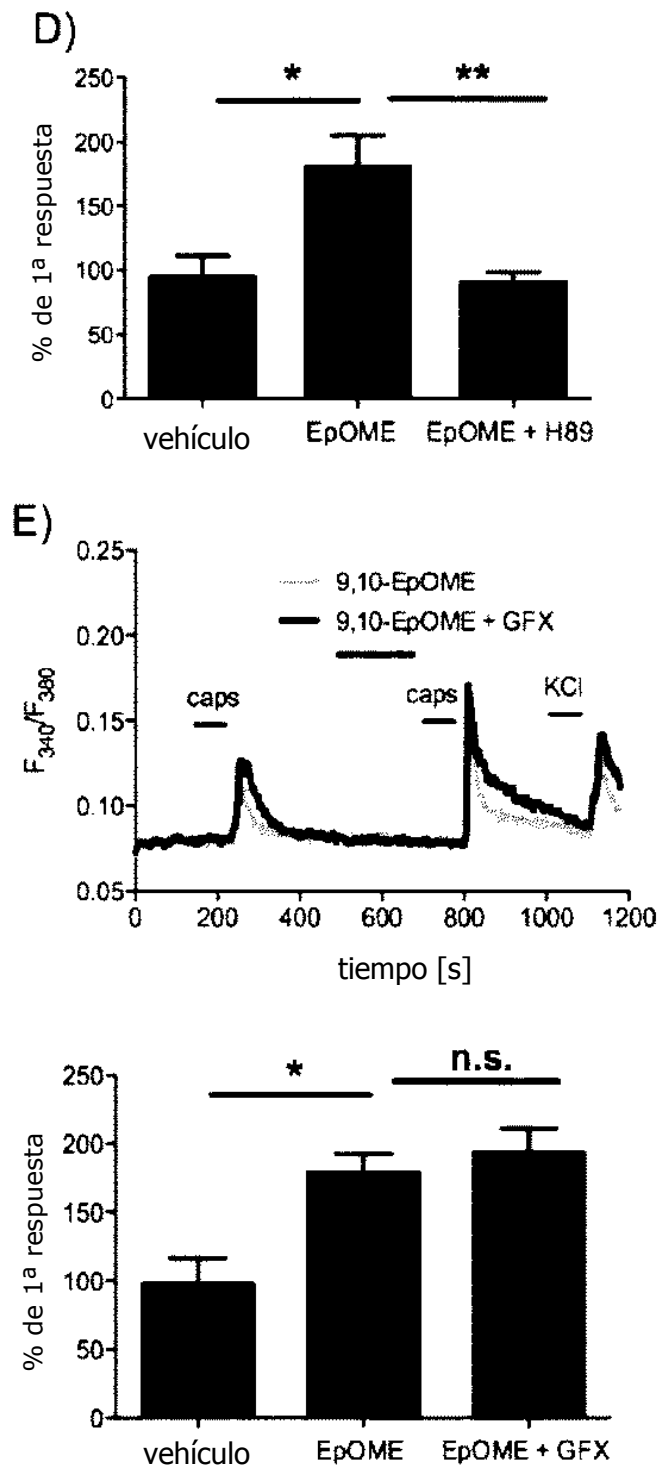


Figura 5:

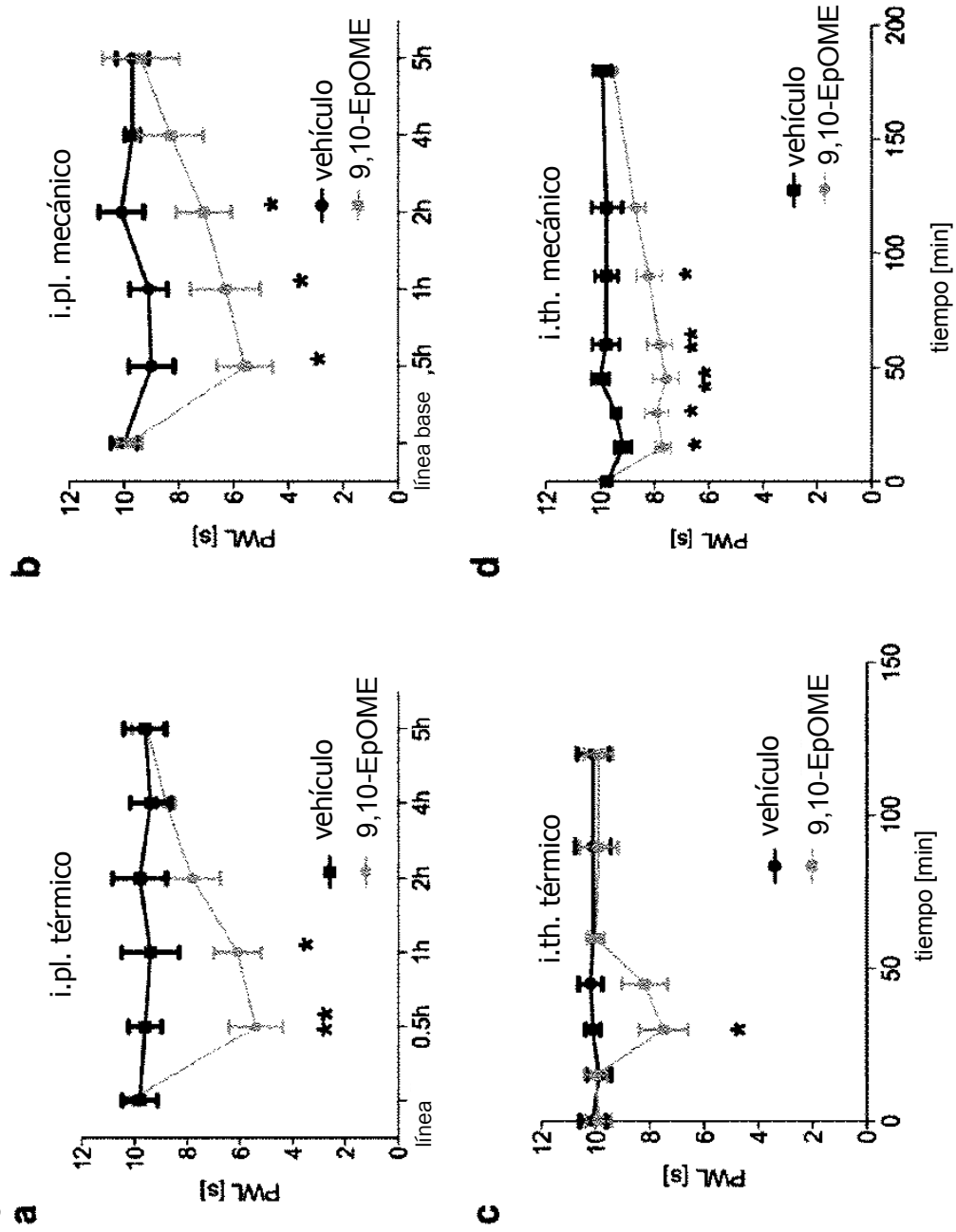


Figura 6:

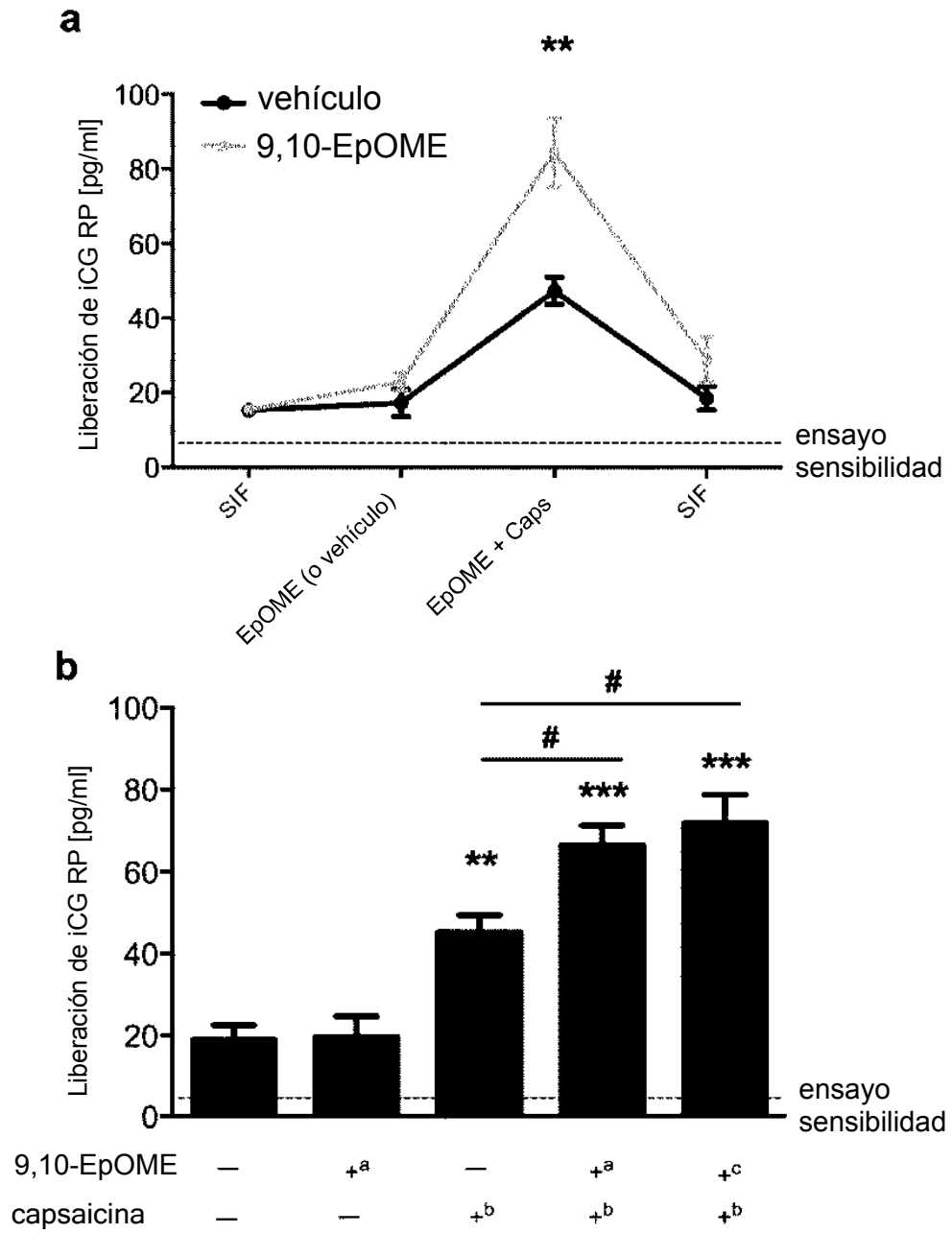
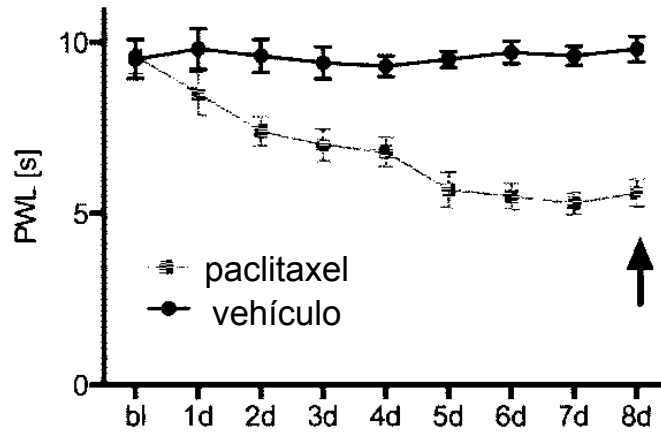
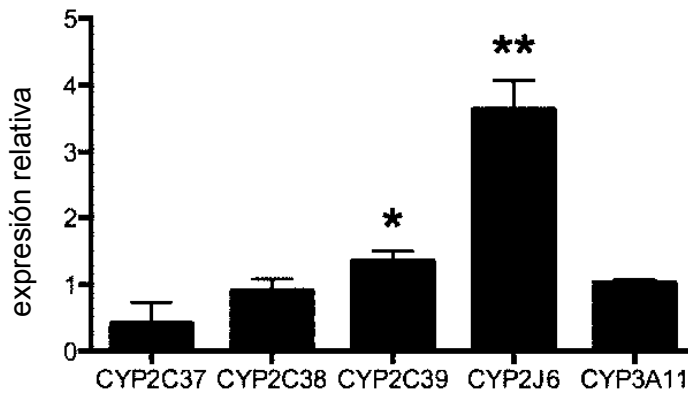


Figura 7:

a



b



c

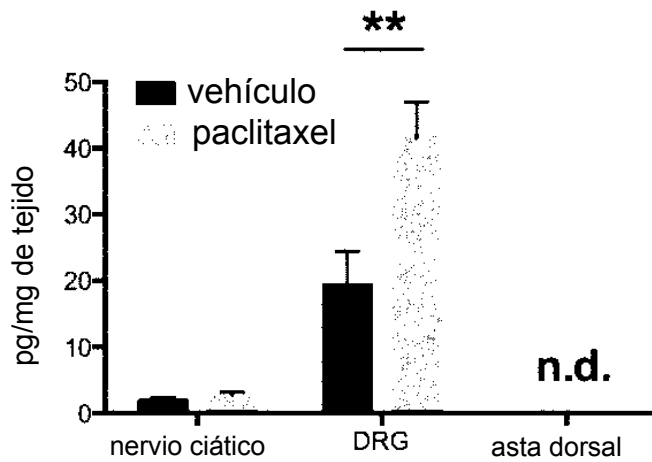


Figura 7 continuación:

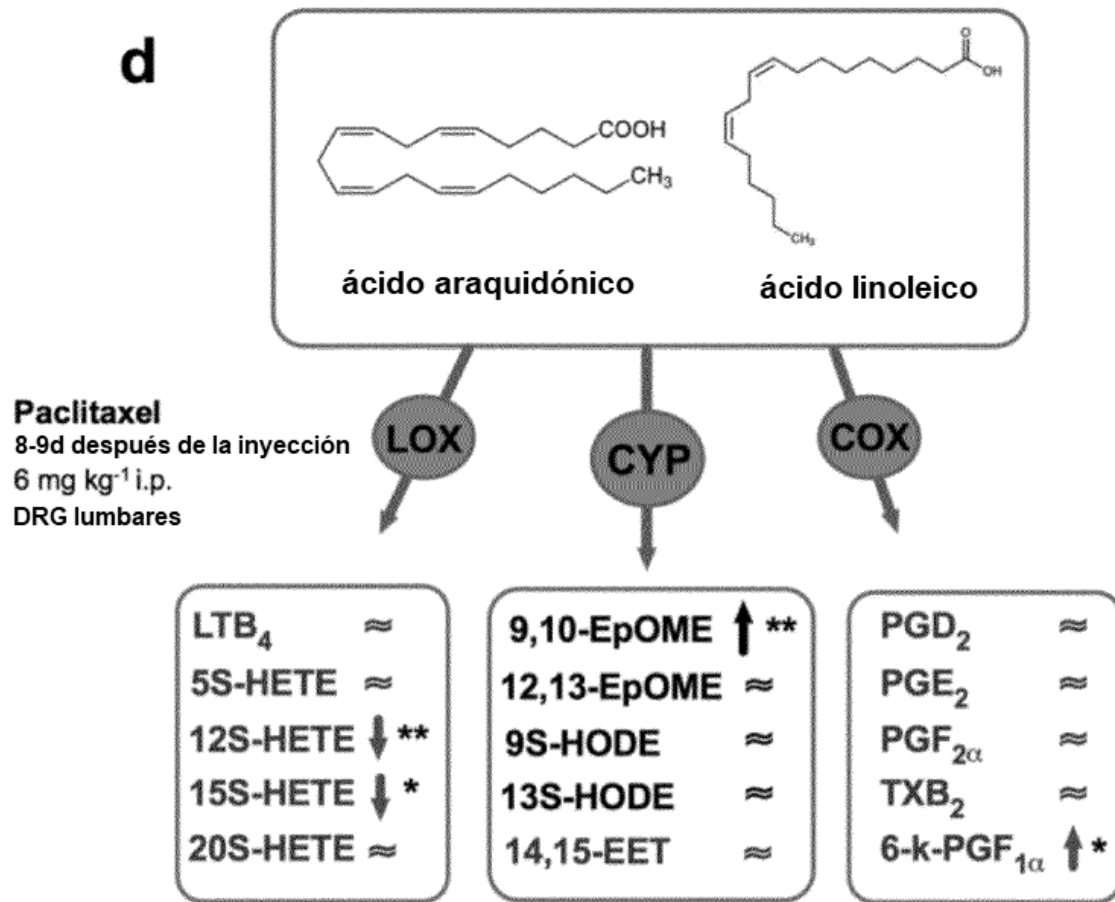


Figura 8:

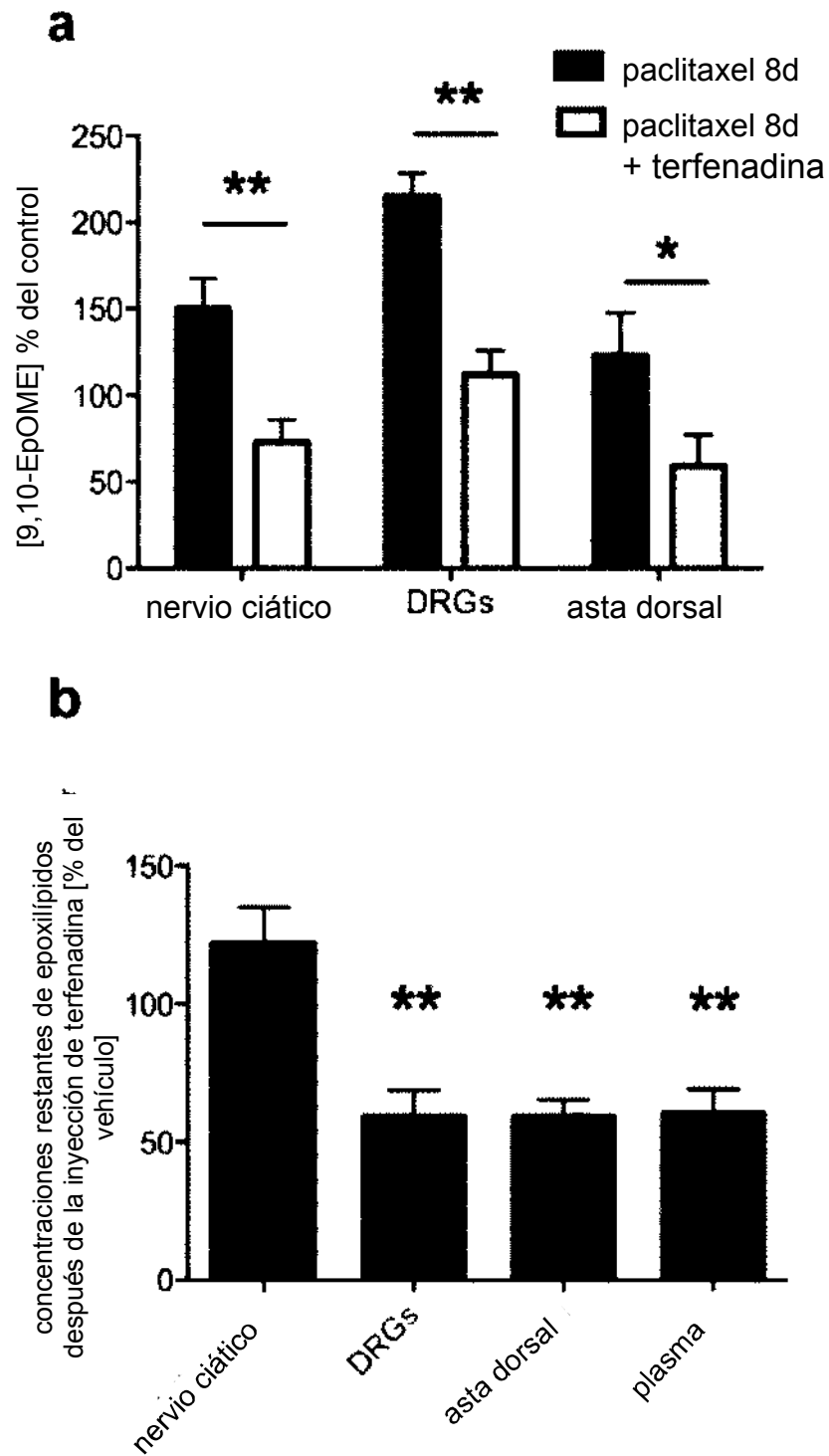


Figura 8 continuación:

