

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANABELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAMAYO S.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica



Rodríguez Madrid & Asociados
NIT. 830.038.010-1

PATENTES

MARCAS

DERECHOS DE AUTOR

LICENCIAS DE USO

SOFTWARE

REGISTROS SANITARIOS

NOMBRES DE DOMINIO

PATENTS

TRADEMARKS

COPYRIGHTS

LICENSING

SOFTWARE PROTECTION

SANITARY PERMITS

DOMAIN NAME

Nuevo E-mail: rodriguezasc@cabla.net.co

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Indicación: 1. 000-097392 de Diciembre 22 de 2000
Fecha (Día): 22-12-2000
Institución: Superintendencia de Industria y Comercio
Recepción: 22-12-2000
Indicador: 1. 000-097392 de Diciembre 22 de 2000

REF : EXPEDIENTE No. 000- 097392 de Diciembre 22 de 2000

PATENTE "COMBINACIÓN DE TRIMEBUTINA CON UN ANALGÉSICO
DERIVADO DEL OPIO".

Estimados señores :

Damos alcance al expediente citado en la referencia, para reivindicar Prioridad de la Patente solicitada, con fundamento jurídico en lo establecido en el Artículo 9 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones (CAN), la fuente normativa de reciprocidad, se basa en :

a.- El artículo 4 del Convenio de París, aprobado mediante Ley 178/94, declarado exequible por la Corte Constitucional en Sentencia del 18 de Enero/96.

b.- Ley 170/94 en la cual Colombia aprobó el Acuerdo por el que se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC) suscrito en Marrakech (Marruecos) el 15 de Abril de 1994, y sus Acuerdos multilaterales, los cuales incluyen los aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio; mejor conocido como el Trip'. Dicha Ley 170 de 1997 fue declarada exequible por la Corte Constitucional el 28 de Marzo de 1995.

El Artículo 2, Ord.1, del Trip's establece que la propiedad en el Mundo será reconocida, que los países miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del convenio de París. A su vez, el artículo 4 del Convenio de París (es decir, uno de los artículos de cumplimiento obligatorio bajo Trip's) establece que la prioridad sobre la primera solicitud en el mundo será reconocida.

Por lo tanto:

Según el Artículo 10 y Artículo 10 Literal (a) de la Decisión 486/2000 CAN, Invocamos y anexamos la siguiente prioridad:

Transversal 6a. No. 27-10 "Edificio Antares - Pent House" * Teléfono: 283 09 42 * Tel. 334 72 84 - 341 7003
e-mail: rodriguez@andinet.com * Santafé de Bogotá, D. C.

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAMAYO S.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica



Rodríguez Madrid & Asociados
NIT. 830.038.010-1

PATENTES

MARCAS

DERECHOS DE AUTOR

LICENCIAS DE USO

SOFTWARE

REGISTROS SANITARIOS

NOMBRES DE DOMINIO

173 168

PATENTS

TRADEMARKS

COPYRIGHTS

LICENSING

SOFTWARE PROTECTION

SANITARY PERMITS

DOMAIN NAME

US: INUYU E-MAIL: RODRIGUEZASO@cabla.net.co

1.- Prioridad No.99125752.8

FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 -Diciembre-1999

OFICINA : EUROPA (C.E)

Debidamente Legalizada por el Ministerio de Relaciones Exteriores

2.- Traducciones de las reivindicaciones de la Primera solicitud de Patente efectuadas por Traductor Oficial avaladas por el Ministerio de Relaciones Exteriores

En consecuencia, ruego a ustedes una vez finiquitada esta diligencia, ordenar lo pertinente para que el expediente siga su curso normal.

Atentamente,

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID

C.C. No. 3'792.584-Cartagena

T.P. No. 59.363 del C.S.J

Anexo.- Lo anunciado.

Transversal 6a. No. 27-10 *Edificio Antares - Pent House * Telefax: 283 09 42 * Tel. 334 72 84 - 341 7003
e-mail:rodrusa@andinet.com * Santiago de Bogotá, D. C.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by Araceli Matus-Silva

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

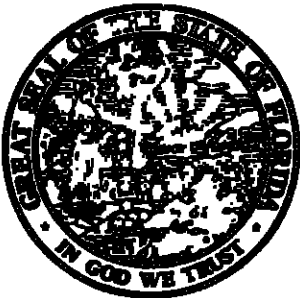
6. the Twenty-Second day of January, A.D., 2001

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2001-1235

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Katherine Harris

Secretary of State

DSDE 99 (1-99)

This document contains an artificial watermark on REVERSE. Hold at 45°. DO NOT ACCEPT UNLESS VIEWED.

"State of Florida" appears in small letters across the face of this 8 1/2 X 11" document.



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

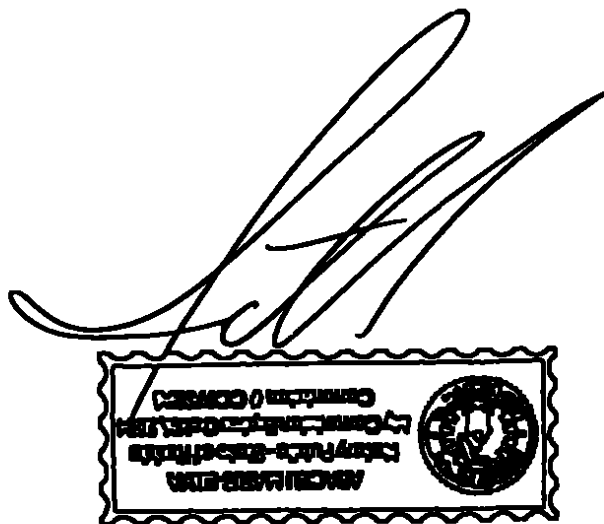
Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99125752.8



**Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag**

For the President of the European Patent Office

**Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.**

I.L.C. Hatten-Heckman

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

**DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE**

19/12/00



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

176

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 99125752.8 /

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 23/12/99 ,

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
WARNER-LAMBERT COMPANY
Morris Plains New Jersey 07950
UNITED STATES OF AMERICA

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Combination of trambutine with an opioid analgesic

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

COMBINATION OF TRIMEBUTINE WITH AN OPIOID ANALGESIC

FIELD OF THE INVENTION

5 The field of the invention is related to methods for preventing and/or treating pain. More particularly the invention concerns a combination of trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxybenzoate hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers with an opioid analgesic for preventing and/or treating pain as well as nociception.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

20

25

30

Trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl 3, 4, 5- trimethoxybenzoate hydrogen maleate; TMB] has been used in many countries since 1969 for the treatment of functional bowel disorders, including irritable bowel syndrome (IBS). The efficacy of the compound to relieve abdominal pain has been demonstrated in various clinical studies using different protocols of treatment (Littkecke, 1980 ; Moshal and Herron, 1979, Toussaint *et al.*, 1981 ; Ghidini *et al.* 1986). Trimebutine was found to display weak agonist activity for rat brain and guinea-pig (Roman *et al.*, 1987) or canine (Alleacher *et al.*, 1991) intestinal opioid receptors, without selectivity for any of the μ -, δ - and κ -subtypes. This weak activity was confirmed when using isolated intestinal fragments under transmural stimulation (Pascud *et al.*, 1987). This property could be responsible for the modulatory action of trimebutine on intestinal motility in fasted dog. Trimebutine given either intravenously or orally delays the appearance of a phase III of the migrating motor complex (MMC) in the stomach and the duodenum by inducing a premature phase III, migrating along the whole intestine (Bueno *et al.*, 1987). In man, trimebutine stimulates intestinal motility in both fed and fasted states (Grandjean *et al.*, 1989). Furthermore, trimebutine reverses the effect of stress in jejunal motility (Delis *et al.*, 1994).

2

More recently, trimebutine has been shown able to influence the activity of visceral afferents by decreasing the intensity of the recto-colonic reflex in rats as evidenced by the inhibition of colonic motility consecutive to rectal distension (Julia *et al.*, 1996). This result may be related to the beneficial effects found with trimebutine in patients with IBS and more specifically in the treatment of attacks of abdominal pain.

Pain has been defined as the sensory experience perceived by nerve tissue distinct from sensation like touch, pressure, heat or cold.

Although the precise definition of pain is difficult because of the large range of sensations as well as the variation in pain perception by different individuals, it can be classified in three categories : acute pain, inflammatory pain and chronic pain.

Generally speaking, physicians and patients are expecting more efficient and safe compounds for treating and/or preventing pain. It is the major case for chronic pain, where there is a general agreement (9th World Congress on Pain, Vienna, August 1999) that there is an unmet medical need for its treatment. NSAIDs and opiates are quite ineffective in many cases. Antidepressants are being used with inconsistent efficacy (50-60%). Certain anticonvulsants (carbamazepine, clonazepam, baclofen) may be active. In extreme cases, capsaicin and local anesthetics are being tried. However, none of these approaches is satisfactory and some patients are refractory to all of them. In some cases like trigeminal neuralgia, neurosurgery (differential thermocoagulation of Gasser ganglion) remains the only way of alleviating pain.

In this view, clinical and animal studies have shown that concomittant opiate and bupivacaine therapy improves the magnitude and duration of pain relief when compared to the effects of each drug administered separately (Moert and Melis, 1992).

In addition, since NMDA (N-methyl-D-aspartate)-type glutamate receptors are believed to play a pivotal role in the transmission of excitatory signals from primary sensory neurones to the brain through the spinal cord (Dickenson *et al.*, 1990), some strategies have been set up for the treatment of pain by administration of a combination of NMDA antagonists and an opioid analgesic (WO 99/44610). Unfortunately, some products as dextromethorphan have been reported to induce unacceptable side effects.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

178

3

From a starting point in visceral pain, the inventors found, as confirmed in the present application, that trimebutine has an inhibitory action on glutamate release through the blockade of sodium channels and also is able to act as a local anesthetic with a 17-fold higher potency than lidocaine. Surprisingly, inventors have shown that trimebutine or its stereoisomers, which is a non-NMDA receptors antagonist, administered in combination with an opioid analgesic on one hand has an inhibitory action on pain with a potentiation of opioid analgesic action and on the other hand reduces the unwanted side-effects of the said opioid analgesic among them drug dependence and constipation. Indeed, there is no general teaching in the art suggesting a combination of trimebutine or its stereoisomers with an opioid analgesic.

According to these results, it is demonstrated that trimebutine can have an action on pain conditions other than visceral pain, confirming that trimebutine is useful in the treatment and/or the prevention of pain.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to a product comprising trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-benzoate hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic. The components of the said product can be used simultaneously, separately or sequentially, as a combined preparation, in the treatment and/or prevention of pain and/or nociception.

In this regard, the opioid analgesic is preferably morphine but can also be chosen among codeine, dihydrocodeine, diacetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, levorphanol, oxycodone, alfentanil, buprenorphine, butorphanol, fentanyl, sufentanil, meperidine, methadone, nalbuphine, propoxyphene and pentazocine or acceptable salts thereof.

The invention provides also a pharmaceutical composition comprising trimebutine or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic with at least one pharmaceutical carrier or excipient.

Another embodiment of the invention is the use of trimebutine or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic for the preparation of a medicament which comprises

4

both trimebutine and the said opioid analgesic in a single dosage form or as a separate dosage forms which can be used simultaneously, separately or sequentially in the treatment and/or prevention of pain and/or nociception. In this respect, the present invention is useful to prevent and/or treat acute pain, inflammatory pain and/or chronic pain.

- 5 In the context of the invention, trimebutine is administered at dosage between 50 to 900 mg/day and preferably between 300 to 600 mg/day and the opioid analgesic is administered at dosage between 0.01 to 250 mg/day depending of the chosen opioid analgesic.

Preferably, the opioid analgesic is morphine which is administered at dosage between 2 to 220 mg/day.

- 10 The present application concerns also a method for preventing and/or treating pain and/or nociception comprising administering trimebutine and an opioid analgesic to a patient in need thereof. The administration of trimebutine and the opioid analgesic may be simultaneous, separate or sequential.

- The invention relates also to a process for the preparation of a pharmaceutical composition comprising trimebutine or its stereoisomers and an opioid analgesic, which process comprises bringing trimebutine and the opioid analgesic into association with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

20

DESCRIPTION OF DRAWINGS

- Figures 1 : Effect of TMB (A), Nor-TMB (B) and their corresponding stereoisomers on [³H]-batrachotoxin binding to rat cortical synaptosomes. Membranes are incubated with increasing concentrations of test drugs in presence of 25 µg scorpion venom and 10 nM [³H]-batrachotoxin. Non specific binding is determined in the presence of 0.3 mM verstridina. After 90 min incubation at 25°C, bound ligand is separated from free ligand by vacuum filtration through GF/B filters. Specific binding in presence of test compounds is calculated as percentage of control binding determined in absence of inhibitors. Represented values are mean ± SEM from at least 3 independent determinations performed in duplicate.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

5

Figure 2 : Effect of TMB (A), Nor-TMB (B) and their corresponding stereoisomers, on veratridine-induced glutamate release from rat spinal cord slices. Morphine and bupivacaine (C) are tested in the same conditions. Results are means $\pm$ SEM of at least 10 determinations. The slices are superfused 15 min with the test compound prior to stimulation with veratridine (40 μ M). The radioactivity collected in 5 min fractions during 30 min after the stimulation is counted and the effect of compound is determined by comparing the cumulated quantity of radioactivity released to that obtained in cells superfused with buffer alone. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, Student's test.

Figure 3 : Effect of TMB on sodium currents measured in DRG neurons. (A) Inward Na⁺ current induced every 10 s by stepping the membrane potential from -80 to -10 mV. TMB is locally applied for 20 s at 0.1 μ M (top row) and at 1 μ M (bottom row). (B) Sodium current before (control) and during TMB perfusion (same cell as in A.). (C) Peak sodium current versus pulse potential in control saline and in the presence of TMB at the concentrations indicated. The decrease in peak sodium current occurred homothetically. (D) Dose-response relationship of TMB effects on DRG Na⁺ current. Results are expressed as the Na⁺ current part (relative peak Na⁺ current) persisting in the presence of the blocker. Each point is mean $\pm$ S.E.M. of 4 to 6 experiments. Continuous curve: best fit to Hill function with IC₅₀ = 0.69 μ M, and n_H = 1.02.

Figure 4 : Local anesthetic effect of TMB (A) and lidocaine (B) as determined in the rabbit corneal reflex. The values represent the median of percentage of inhibition of corneal reflex calculated for each set of 10 stimulations. The x axis represents time (in minutes) following instillations. *P<0.05; **P<0.01 compared with the control group treated with the vehicle (Mann-Whitney U test).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

After having determined that trimebutine is able to inhibit the glutamate release involved in

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

6

the transmission of nociceptive stimulus, through the blockade of sodium channels, the inventors have confirmed that trimebutine is able to act as local anesthetic and surprisingly with a potency really higher than of lidocaine. They have also established that a combined administration of trimebutine or its stereoisomers with an opioid analgesic has a potentiating effect for treating and /or preventing pain.

In this regard, the invention provides a product comprising trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxybenzoate hydrogen malcate] or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic in order to answer the need of pain relief by an always more efficient and safe compound .

10 In this respect, the components of the said product can be used simultaneously, separately or sequentially in the treatment and/or prevention of pain and/or nociception.

Trimebutine (2-dimethylamino-2-phenylbutyl 3, 4, 5- trimethoxybenzoate hydrogen malcate, TMB) has been demonstrated to be active for relieving abdominal pain in humans.

15 Furthermore, it is known that in humans, after oral or iv administration of trimebutine , this latter serves as a metabolic precursor for N-desmethyl trimebutine (Nor-TMB). This indicates that trimebutine is acting like a bioprecursor of Nor-TMB meaning that under action of the hepatic enzymes the bioprecursor trimebutine is metabolized and gives rise to a new molecule.

20 Indeed, the administration of trimebutine in humans leads to the concomittant exposure of trimebutine, Nor-TMB and other metabolites. Therefore these compounds and particularly trimebutine and Nor- TMB are able to elicit jointly their (antinociceptive) properties.

It is therefore understood that N-desmethyl trimebutine (Nor-TMB) comprises the stereoisomers (S) N-desmethyl trimebutine and (R) N-desmethyl trimebutine and the corresponding racemate.

25 The opioid analgesics are well established as a class of analgesic agent. Sometimes they are also referred to as opiates but this term should be reserved for morphine-related chemicals. The term opioid is generally accepted to refer in a generic sense to all drugs, natural or synthetic, with morphine-like actions.

30 The synthetic or semi-synthetic opioid analgesics are derivatives of five chemical classes of compounds : phenanthrenes, pterylheptylamines, phenylpiperidines, morphinans and

benzomorphans.

In the context of the invention, the opioid analgesic is chosen among morphine, codeine, dihydrocodeine, diacetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, levorphanol, onyxmorphone, alfentanil, buprenorphine, butorphanol, fentanyl, sufentanil, meperidine, methadone, nalbuphine, propoxyphene and pentazocine or acceptable salts thereof. Preferably,

Of all of the opioid analgesics, morphine remains the most widely used and in this regard is an archetype compound. Unfortunately, apart from its useful therapeutic properties, morphine also has a number of drawbacks including sedation, respiratory depression, decreased gastrointestinal motility (resulting in constipation) and in some individuals, nausea and vomiting may occur. Another drawback always reported is the development of tolerance and physical dependence limiting the clinical use of such a compound. There is therefore a need to develop methods which enable the clinicians to use lower doses of opioid analgesics such as morphine, thereby reducing the likelihood of adverse effects including the development of tolerance and dependence, and thus avoiding two major problems : the need to escalate dosages in long term treatment cases leading to the occurrence of side effects and the risk of drug withdrawal associated with cessation of administration.

The present invention also concerns advantageously the use of trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-benzoate hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic for the preparation of a medicament to prevent and/or treat pain and/or nociception. Accordingly, the compounds of the combined preparation are either used simultaneously, separately or sequentially in the treatment and/or prevention of pain and/or nociception. It is understood that the term "pain" comprises any kind of pain with any etiology.

More particularly, the invention is useful for preventing and/or treating acute pain as well as any inflammatory pain (visceral or somatic) and chronic pain.

Interestingly, the inventors have established that trimebutine and also its metabolites called hereafter Nor-TMB (and preferably the (S)-enantiomer) which is one of its major metabolites in humans, inhibit glutamate release from rat spinal cord slices, through the blockade of sodium channels. Especially, trimebutine, its stereoisomers, and Nor-TMB have been studied for their affinity towards sodium channels labeled by [^3H]-batrachotoxin, their

effect on sodium currents in rat dorsal root ganglia neurons, on veratridine-induced glutamate release from rat spinal cord slices.

These results are particularly interesting since the pivotal role of glutamate and excitotoxic amino-acids (EAA) in the establishment of hyperalgesic or allodynic conditions has been evidenced by Dickenson et al., 1995. From that discovery, strategies have been set up for finding new analgesic drugs based on the inhibition of glutamate and EAA receptors. Most of the inhibitors that these strategies have generated cannot be used in human for safety reasons and it appears now that the blockade of glutamate receptors is a difficult way for drug discovery.

- 10 Furthermore, the results reported in the examples demonstrate that trimebutine, its stereoisomers and its metabolites display an analgesic activity and an inhibitory effect on pain, particularly on inflammatory pain and chronic pain.

Examples of acute pain include particularly post-operative pain and headaches.

- 15 Inflammatory pain includes any pain with an inflammatory component such as arthritis, polyarthritis, spondylarthritis, musculo-skeletal pain such as osteo-traumatic pain, as well as phantom limb pain, back pain, vertebral pain, slipped disc surgery failure, post-surgery pain, rheumatic pain, dental pain and dysmenorrhoea.

- 20 Chronic pain, according to the definition proposed by the International Association for the Study of Pain, is a pain which persists beyond normal tissue healing time (suggested three months) (International Association for the Study of Pain, classification of chronic pain. Pain, 1986, Suppl 3, S1-S226), and this implies a transition point from acute pain.

Accordingly and since chronic pain results from hyperalgesia (Dickenson et al., 1995), the present invention comprises also the prevention and/or treatment of hyperalgesia or pain related to central hypersensitivity conditions.

- 25 Examples of chronic pain include neurological pain such as neuropathies, polyneuropathies including those related to diabetes, headache, trauma, neuralgias including post-zosterian neuralgia and trigeminal neuralgia, algodystrophy, HIV-related pain, cancer-related pain, vascular pain such as pain resulting from Raynaud's syndrome, Horton's disease, arteritis, varicose ulcers.

- 30 In the context of the invention, trimebutine is administered at dosage between 50 to 900

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

9

mg/day and preferably between 300 to 600 mg/day (man with average weight of 70 kg) .

The opioid analgesic is administered at a dosage level up to conventional dosage levels for such analgesic, but preferably at a reduced level in accordance with the instant invention. Suitable dosage levels will depend upon the analgesic effect of the chosen opioid analgesic but typically suitable dosage levels are between about 0.001 to 25 mg/kg per day, preferably between 0.005 to 10 mg/kg per day and especially between 0.005 to 5 mg/kg per day or between 0.01 to 250 mg/day (man with average weight of 70 kg) depending of the chosen opioid analgesic. The compound may be administered up to 6 times per day and preferably 1 to 4 times per day.

For example, dosages may be for morphine preferably between 2 to 220 mg/day, for codeine between 20 to 60 mg/day, for fentanyl between 0.1 to 1 mg/24 hours, droperidol between 2 to 10 mg/day, for oxycodone between 20 to 80 mg every 4 hours (man with average weight of 70 kg).

When administered in combination, either as a single or as separate pharmaceutical composition(s), trimebutine or its stereoisomers and the opioid analgesic are presented in a ratio which is consistent with the manifestation of the desired effect. In particular, the ratio by weight of trimebutine to the opioid analgesic will suitably be approximately 1 to 1. Preferably this ratio will be between 0.0001 to 1 and 1000 to 1 and especially between 0.01 to 1 and 100 to 1.

In a further aspect of the invention, there is provided a pharmaceutical composition comprising trimebutine or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic.

In this context, trimebutine provided in a pharmaceutical composition in combination with an opioid analgesic is useful for preventing and/or treating the above mentioned kinds of pains. Pharmaceutical compositions include trimebutine and/or its corresponding stereoisomers including their salts and is produced by formulating the active compounds in dosage unit form with at least one solid or liquid pharmaceutical acceptable carrier or excipient.

Where it is appropriate to form a salt, the pharmaceutically acceptable salts include acetate, benzenesulfonate, benzoate, bitartrate, calcium acetate, camsylate, carbonate, citrate, edetate, edisylate, estolate, esylate, fumarate, gluceptate, gluconate, glutamate, glycolylarsanilate, hexylresorcinate, hydrabamine, hydrobromide, hydrochloride, hydrogencarbonate, hydroxynaphthoate, iodide, isethionate, lactate, lactobionate, malate, maleate, mandelate,

10

mesylate, methylnitrate, methylsulfate, mncate, napsylate, nitrate, pamoate (ambonate),
pantothenate, phosphate/diphosphate, polygalacturonate, salicylate, stearate, subacetate,
succinate or hemi-succinate, sulfate or hemi-sulfate, tannate, tartrate or hemi-tartrate,
theoclate, triethiodide, benzathine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine,
5 meglumine, procaine, aluminum, ammonium, tetramethyl ammonium, calcium, lithium,
magnesium, potassium, sodium, and zinc. (See also "Pharmaceutical salts" by Berge S.M. *et al.* (1997) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19, which is incorporated herein by reference.)

The salts of opioid analgesics are also prepared according to well known processes and said salts suitable for oral or parenteral routes are preferred.

- 10 Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. In such solid dosage forms, the active components are admixed with at least one inert customary excipient (or carrier) such as sodium citrate or dicalcium phosphate or (a) fillers or extenders, as for example, starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and silicic acid, (b) binders, as for example, carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinyl-
15 pyrrolidone, sucrose, and acacia, (c) humectants, as for example, glycerol, (d) disintegrating agents, as for example, agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain complex silicates, and sodium carbonate, (e) solution retarders, as for example paraffin, (f) absorption accelerators, as for example, quaternary ammonium compounds, (g) wetting agents, as for example, cetyl alcohol, and glycerol monostearate, (h) adsorbents, as for
20 example, kaolin and bentonite, and (i) lubricants, as for example, talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, or mixtures thereof. In the case of capsules, tablets, and pills, the dosage forms may also comprise buffering agents.

- 25 Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose as well as high molecular weight polyethyleneglycols, and the like.

Solid dosage forms such as tablets, dragées, capsules, pills, and granules can be prepared with coatings and shells, such as enteric coatings and others well known in the art. The active components can also be in micro-encapsulated form, if appropriate, with one or more of the above-mentioned excipients.

- 30 Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and elixirs. In addition to trimetbutine and/or the opioid analgesic, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art,

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

132

11

such as water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, as for example, ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, and the like. Suspensions, in addition to trimebutine and/or the opioid analgesic, may contain suspending agents, as for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, or mixtures of these substances, and the like.

Compositions suitable for parenteral injection may comprise physiologically acceptable sterile aqueous or non aqueous solutions, dispersions, suspensions or emulsions, and sterile powders for reconstitution into sterile injectable solutions or dispersions. Examples of suitable liquid carriers, diluents, solvents or vehicles include water, ethanol, polyols (propyleneglycol, polyethyleneglycol, glycerol, and the like), and suitable mixtures thereof.

These compositions may also contain adjuvants such as preserving, wetting, emulsifying, and dispersing agents. Prevention of the action of microorganisms can be ensured by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, for example sugars, sodium chloride, and the like.

Preferably the composition is in unit dosage form. In such form, the preparation is divided into unit doses containing appropriate quantities of trimebutine and/or the opioid analgesic. The unit dosage form can be a packaged preparation, the package containing discrete quantities of the preparation, for example, packaged tablets, capsules, and powders in vials or ampoules. The unit dosage form can also be a capsule, cachet, or tablet itself, or it can be the appropriate number of any of these packaged forms. Some examples of dosage unit forms are tablets, capsules, pills, powders, suppositories, aqueous and non aqueous oral solutions and suspensions, and parenteral solutions packaged in containers containing either one or some larger number of dosage units and capable of being subdivided into individual doses.

Routes of administration are preferably the oral or the parenteral routes and especially the injection routes including particularly the intravenous injection route and epidural injection route. However, any compatible route such as subcutaneous, intramuscular, intrathecal, intraperitoneal routes can also be considered in the context of the present invention.

Another embodiment of the invention is related to a method for preventing and/or

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

12

treating pain and/or nociception comprising administering trimebutine and an opioid analgesic to a patient in need thereof. In the context of the invention, the administration of the two compounds may be simultaneous, separate or sequential.

The term "patient" is intended to include any mammal and especially human whom the trimebutine and the opioid analgesic are administered.

A further embodiment of the invention provides a process for the preparation of a pharmaceutical composition comprising trimebutine or its stereoisomers and an opioid analgesic which process comprises bringing trimebutine and the opioid analgesic into association with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

The biochemical and pharmacological data reported in the examples allow a better understanding of the mechanism of action of trimebutine in combination with an opioid analgesic. They support the assumption that, besides its regulatory effects on colonic motility already reported in the past and which had been related to its weak opioid properties, trimebutine is endowed with antinociceptive properties which are due to its blocking effect on Na^+ channels. These new properties of TMB explain how this compound in combination with an opioid analgesic is a useful method for preventing and/or treating pain.

The present invention will be further disclosed in the following examples without limiting the scope of the invention.

EXAMPLES

Material and Methods

Animals.

Male Sprague-Dawley rats (IFFA Credo, Saint Germain sur l'Arbresle, France), weighing 225-250 g ($[^3\text{H}]$ -batrachotoxin binding experiments) or 350-375 g (glutamate release experiments), or pregnant rats (electrophysiological experiments) are used in this experiment and are cared for in accordance with the institutional guidelines for animal welfare: temperature $21 \pm 3^\circ\text{C}$; light/dark: 12h/12h.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

183

Drugs and media.

Trimebutine maleate, (S)-Trimebutine, (R)-Trimebutine, are synthesized according to the process disclosed in the french patent FR 2,369M (1962) and the japanese patent application published under n° 16416 (1980) and incorporated herein by reference.

Flunarizine, L-glutamic acid, lidocaine hydrochloride, bupivacaine, trypsin and DMEM-F12 are purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France), morphine from Francopia (Gentilly, France), veratridine from RBI, Bioblock Scientific (Illkirch, France), gentamicine from Boehringer Mannheim S.A. (Meylan, France). All reagents used for the preparation of buffers and solutions are of analytical grade from Merck (Merck-Clevenot, Nogent sur Marne, France).

(S)-N-desmethyl-TMB maleate is synthesized according to the process disclosed in WO 99/01417 and incorporated herein by reference.

L-[G-³H]-glutamic acid (49 Ci / mmole), is from Amerham (Les Ulis, France). Dulbecco's modified Eagle medium, Neurobasal medium, fetal calf serum were from Gibco, Life Technologies S.A.R.L. (Cergy Pontoise, France). Horse serum is from Seromed, (Berlin, Germany).

Example 1 : [³H]-batrachotoxin binding.

The purpose of the present example is to determine the affinity of the tested compounds to [³H]-batrachotoxin binding sites in rat cortical synaptosomes, representing site 2 of the sodium channel

1.1 Materials and methods**a) Synaptosomal membranes.**

Cerebral cortices from male Sprague-Dawley rats are homogenized in a glass-Teflon homogenizer in 10 volumes of ice-cold 0.32 M sucrose, 5 mM K₂HPO₄ (pH 7.4 at 4°C). The homogenate is centrifuged at 1000g for 10 min ; the new pellet is resuspended in the same volume of sucrose and recentrifuged. The new pellet is discarded and the two supernatants resulting from these two centrifugations are pooled and centrifuged at 20,000 g for 10 min. The resulting pellet is resuspended in a sodium-free assay buffer containing 50 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid), 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM

14

glucose and 130 mM choline chloride (pH 7.4 at 25°C).

b) Binding experiment.

Binding assays are initiated by the addition of 150-200 µg synaptosomal protein to an assay
5 buffer containing 25 µg scorpion venom (*Leiurus quinquestratus*), 0.1 % BSA, 10 nM [³H]-
batrachotoxin and various concentrations of test drugs (250 µl final volume). Non-specific
binding is determined in the presence of 0.3 mM veratridine. Reactions are incubated for 90
min at 25°C and the bound ligand is separated from the free by vacuum filtration through
GF/B filters (Filtermate, Packard). The filters are washed with 2x5 ml buffer (5 mM HEPES,
10 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 130 mM choline chloride, 0.01% BSA; pH 7.4 at 25°C) and
bound ligand is estimated by using liquid scintillation spectrometry (Topecount, Packard).

c) Calculations.

In all experiments examining the displacement of [³H]-batrachotoxin binding by unlabeled
15 drugs, concentration-response curves are generated using six concentrations of drugs. All
assays are performed at least three times, with each determination performed in duplicate.
Data are expressed as mean values ± SEM of at least three determinations. Displacement
curves are fits generated by Graph-Pad Software. Displacement plots are analysed by a non
linear regression analysis using the LIGAND computer program (Mc Pherson, 1985). These
20 analysis generated Hill coefficient (n_H) and IC₅₀ values. K_i values are calculated from IC₅₀
values using the Cheng-Prusoff (1973) relationship.

1.2. Results

The results presented in Figure 1 (A) and (B) show that trimebutine, its stereoisomers and its
25 metabolites displace [³H]-batrachotoxin from its binding sites to rat cortical synaptosomes
with potencies lying between that of bupivacaine (K_i = 7.14 ± 0.96) and that of flunarizine
(K_i = 0.38 ± 0.05 µM). For all compounds, the displacement of [³H]-batrachotoxin is
complete and the calculated Hill coefficient is close to 1 (fig.1).

The affinity of trimebutine is found with K_i = 2.66 ± 0.15 µM. For this compound, no
30 stereoselectivity is evident since the corresponding stereoisomers display affinities similar to
that of racemates. The values for the (S) and (R) enantiomers are : K_i = 3.31 ± 0.36 µM and
K_i = 2.89 ± 0.88 µM respectively.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

15

134

For Nor-TMB, the values for the (S) and (R) enantiomers are : $K_i = 0.80 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and $K_i = 1.26 \pm 0.07 \mu\text{M}$, respectively.

- 5 Hence, the present example demonstrates that trimebutine, Nor-TMB and the corresponding stereoisomers display affinity for [^3H]-batrachotoxin binding sites in the same order of magnitude than bupivacaine or flunarizine, two sodium channel blockers.

○ Example 2: [^3H]-glutamate release.

10

The purpose of the present example is to determine the ability of trimebutine and its metabolites to inhibit the release of glutamate from rat spinal cord slices.

- This example shows that trimebutine, its metabolites and their corresponding stereoisomers inhibit veratridine-induced glutamate release *in vitro*. Veratridine is known to induce
15 glutamate release by activating voltage-dependent Na^+ channels, resulting in Na^+ influx with consecutive reduction of the transmembrane gradient (Wermelakirchen *et al.*, 1992).

2.1 Materials and methods

a) *Buffers.*

- 20 Two buffers are prepared: an incorporation buffer (modified Krebs solution: 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.75 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 25 mM HEPES, 1 mM NaHCO_3 , 11 mM D-glucose, 67 μM EDTA, 1.1 mM L-ascorbic acid (pH 7.4) gassed with 95% O_2 and 5% CO_2) and a superfusion buffer identical to the incorporation buffer except that EDTA and ascorbic acid are omitted. Compounds to be tested and veratridine are diluted
25 in this superfusion buffer.

b) *Rat spinal cord slices.*

- After decapitation of animals, a 1.5 cm segment of lumbar spinal cord is isolated after a lumbosacral laminectomy and submerged in a ice-cold modified Krebs solution gassed with
30 95% O_2 and 5% CO_2 . After removal of the *dura mater*, all ventral and dorsal roots are cut at the root of the entry zone. Slices (250 μm thick cube-like blocks) are prepared using three

successive sections performed with a McIlwain tissue chopper.

c) *Superfusion experiments.*

Slices are incubated for 5 min at 30°C in 5 ml of incorporation buffer maintained under
5 oxygenation and containing 10 μ M L-glutamic acid and 4 μ Ci / ml [^{3} H]-glutamic acid. After
incubation, the slices are transferred into superfusion chambers in an automatic superfusion
apparatus (Brodal). The apparatus consists in a device of 20 chambers allowing to run
simultaneously 20 experiments and to control the sequence of buffers used in the superfusion
by programming of an Apple IIe computer. This system makes it possible to test various
10 experimental groups in the same run (4 groups of 5 chambers). After a washout period of 45
min, at a flow rate of 0.5 ml/min, veratridine (40 μ M) is added for 5 min to the superfusion
medium. When drugs are tested (trimabutine and its stereoisomers), they are added to the
superfusion medium 15 min before and also during veratridine application. Fractions of
superfusate corresponding to 5 min are collected during the 30 min following the stimulation.
15 At the end of the run, the slices are removed from the chambers and 2.5 ml of scintillation
liquid (Hiomic Fluor, Packard) are added to the slices and to each of the fractions. The
radioactivity is determined using liquid scintillation spectroscopy (Minaxi, Packard). The
efflux of radioactivity is assumed to be due mainly to [^{3} H]-glutamate efflux (Turner and
Dunlap, 1989).

20

d) *Data analysis.*

All values are expressed as the mean $\pm$ SEM of at least 5 determinations. Release of
radioactivity for each fraction is expressed in terms of fractional release calculated by
dividing the radioactivity in each fraction by the amount remaining in the filter. The
25 stimulation produced by veratridine is quantified by cumulating the release of radioactivity
measured in the fractions collected after the stimulation. The effect of tested compounds is
evaluated as percent of inhibition by comparing the total amounts of radioactivity released in
control chambers to those released in chambers superfused with test compounds. From these
percent inhibitions, IC₅₀ values are calculated by plotting probit values of inhibition versus log
30 values of concentrations. Statistical analyses are performed using Student's unpaired two
tailed t-test. Statistical differences are considered significant at $P < 0.05$.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

185-786

2.2. Results

The results presented in Figure 2 demonstrate that trimebutine inhibited dose-dependently veratridine-induced glutamate release at concentrations higher than 60 μM (fig.2A).

Furthermore, 50 to 60% inhibition could be reached at concentrations as high as 100 μM . (R)-trimebutine presented a profile similar to the racemate whereas (S)-trimebutine presented a significant inhibition from the concentration of 3 μM (fig.2A). The estimated IC_{50} is 15.2 μM for (S)-trimebutine, whereas it could not be calculated ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) for trimebutine and (R)-trimebutine. For Nor-TMB and its stereoisomers (fig.2B), the inhibitory effect was significant ($p < 0.01$) at 3, 10 and 30 μM and IC_{50} value was 8.4 μM . (S)-Nor-TMB displayed an activity ($\text{IC}_{50} = 6.3 \mu\text{M}$) similar to that of the racemate and similar also to that of the second enantiomer (R)-Nor-TMB ($\text{IC}_{50} = 16.3 \mu\text{M}$). These results are in agreement with results from other papers reporting that compounds that inactivate voltage-dependent Na^+ channels prevent veratridine-induced glutamate release *in vitro* and *in vivo* (Lees and Leach, 1993). In a similar manner, the effect of TMB and related compounds on veratridine-induced glutamate release is due to their blocking activities on sodium channels.

When bupivacaine is evaluated under the same experimental conditions (Fig. 2C), an IC_{50} value of 8.2 μM could be estimated.

Morphine is found inactive in this paradigm up to 100 μM (fig. 2C). The lack of effect of morphine in this model suggests that the effects of trimebutine on glutamate release are not due to the opioid properties of the compounds demonstrated in previous studies (Roman *et al.*, 1987).

These results demonstrate importantly that trimebutine displays higher activities than bupivacaine.

This example is quite important given the pivotal role of glutamate and excitatory amino acids (EAA) in the transmission of nociceptive message and more particularly in hyperalgesic conditions. In this respect, the finding that TMB and its metabolites are able of reducing the extracellular concentrations of glutamate by inhibiting its release from presynaptic pools represents an exciting property of TMB in its therapeutic use as analgesic agent.

Example 3: Electrophysiological experiments.

The purpose of this example is the study of the effects of trimebutine and its stereoisomers on sodium currents.

3.1 Materials and methods

5 a) DRG neurons.

Experiments on sodium currents are performed using cultured rat dorsal root ganglia (DRG) excised from 14- to 15-day-old rat embryos. Methods for cell isolation and culture are derived from those described by Valmier *et al.* (1989). Pregnant Sprague-Dawley rats are killed by placing them in a CO₂ atmosphere for 5-6 min. Three to five embryos are removed aseptically
10 and placed in a Petri dish containing the following B medium supplemented with antibiotics (streptomycin, 50 µg/ml; penicillin, 50 U/ml). The B medium contained (in mM): 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.4 Na₂HPO₄, 0.8 MgSO₄, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 6 glucose, 10 HEPES. The dorsal root ganglia are removed from the excised spinal cord and digested for 6 min in 2 ml of Dulbecco's modified Eagle medium containing 0.1% trypsin. Cells are dissociated
15 mechanically through fire-polished Pasteur pipettes and plated in polyornithine-laminine coated dishes. The culture medium is the Neurobasal medium containing 0.5 mM glutamine and 25 µM glutamate. The cells are incubated at 37°C in 5% CO₂. Electrophysiological experiments are performed from 4-6 h to 24 h after plating.

20 b) Electrophysiology.

Conventional whole cell patch clamp experiments are performed at room temperature using an EPC7 (List) patch clamp amplifier. DRG neurons are bathed in a Hanks derived medium containing (in mM): 143 NaCl; 10 CaCl₂; 5.6 KCl, 2 MgCl₂, 5 glucose and 10 HEPES, pH
25 adjusted to 7.4 with NaOH (osmolarity, 300-310 mosm/l). For recording sodium current, calcium is replaced by Mg²⁺ in the presence of 10 mM TRA (tetraethylammonium). Patch electrodes used for recording currents are filled with the following saline (in mM): 140 CsCl, 1.1 EGTA (ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid), 5 HEPES, 2 MgCl₂, pH adjusted to 7.2 - 7.3 with CsOH (osmolarity, 290 mosm/l). The electrodes are
30 pulled in 4 steps from 1.5 mM glass capillaries (GC 150 TF, Clark Electromedical Instruments) using a P87 puller (Sutter Instruments) and fire-polished. The tip resistance is 2-3 MΩ.

Drugs are dissolved in the bath medium (from stock solutions at 10⁻³ M in DMSO

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

19

(dimethylsulfoxide)) and applied by pressure ejection (Pneumatic Picopump PV820, WPI) from glass pipettes (10 - 20 μm tip diameter) located at 50-60 μm from the recorded cell.

c) Calculations.

- 5 Data are sampled at 2 kHz. Software for stimulation, acquisition and analysis is constructed in house. The dose-response curves are constructed with various drug concentrations separated by wash periods. Each point is the mean $\pm$ SEM of 3 to 6 experiments.

Experimental points are fitted to the theoretical Hill curve using the least-square Minsq program: $y = 1 / (1 + [X]^n / IC_{50}^n)$ in which y is the fraction of Na^+ current persisting in the presence of the drug applied at the concentration $[X]$, IC_{50} is the concentration of drug that half-blocks the Na^+ current, and n is the Hill coefficient corresponding to the number of drugs required to block one Na^+ channel.

3.2 Results

15

In figure 3A are shown the effects of the successive 20 s applications of trimebutine at 0.1 and 1 μM on the sodium current of a DRG neuron. In this representative experiment, TMB induced a reversible blockade of the current amounting to 13% and 61% at 0.1 and 1 μM respectively. The blockade occurred without any evidence of changes in current kinetic (fig.3B) and voltage dependence (fig.3C). The dose-response curve obtained by applying 0.01, 0.1, 1 and 10 μM trimebutine is shown in figure 3(D) as a plot of the current part remaining in the presence of the blocker.

The inhibition parameters calculated from this curve are : $IC_{50} = 1.05 \pm 0.09$ and $n_H = 1.09 \pm 0.10$. The parameters calculated for Nor-TMB are very similar.

- 25 A kinetic study is performed using (R,S)-TMB. The unblocking rate k_{off} is determined from

the time constant $\tau_{\text{off}} = 34 \pm 4 \text{ s}$ ($n = 6$) of the exponential recovery from block: $k_{\text{off}} =$

$$1/\tau_{\text{off}} = 29 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}.$$

The blocking rate k_{on} is deduced from $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$; $k_{\text{on}} = 35-40 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. These

20
+
reaction rates defined the 3 drugs as fast Na^+ channel blockers; for instance, $10 \mu\text{M}$ (R,S)-TMB blocked the channels with a time constant of 2.2 s.

These electrophysiological data confirm the results on [^3H]-batrachotoxin binding (example 1) and glutamate release (example 2) by demonstrating that TMB, its stereoisomers and its metabolites block reversibly the sodium currents in DRG neurons with IC_{50} about $1 \mu\text{M}$. Since the Hill coefficient is about 1, the blockade appeared to occur according to a simple bimolecular reaction, i.e. one molecule of blocker interacting with one site on the Na^+ channel. Therefore, the IC_{50} value measured the dissociation constant K_D of the blockers.
Hence, the effects of trimebutine and related compounds on Na^+ currents, which appears responsible for the inhibitory effect on glutamate release, indicates a potential therapeutic effect of these compounds in pain.

Sodium channel blockers like local anesthetics are known to block the generation and conduction of nerve impulses by inhibiting the current through voltage-gated Na^+ channels in the nerve cell-membrane (Strichartz and Ritchie, 1987). The effect of TMB and related compounds on Na^+ currents, which is probably responsible for the inhibitory effect on glutamate release, indicates a potential therapeutic effect of these compounds in pain.

20 Example 4: Corneal reflex testing in rabbits

The aim of this example is to demonstrate the local anesthetic properties of trimebutine or its stereoisomers in comparison with a reference local anesthetic agent such as lidocaine.

25 4.1 Material and method

a) *Animals*:

White New-Zealand male rabbits (CEGAV, Les Hauts Noës, Saint Mars d'Egreonne, France) weighing 1.9-2.7 kg were used. Animals were housed individually in cages placed in an air-conditioned ($17-21^\circ\text{C}$) animal house kept between 45% and 65% relative humidity and with an artificial day/night cycle (12h-12h) with light on at 7.30 am.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

b) Corneal reflex testing

Test substances are administered as solutions in sterile water (Baxter, Mairie-la-Vallée, France). The concentrations of test substances are expressed as percentage (weight/volume) of active compound (base form). Each test substance at each concentration is tested on the two eyes of 5 animals (i.e. 10 measurements per substance and per concentration). On the day of the study, animals are placed in restraint cages in a quiet room. Twenty to 30 minutes later, a first measurement of the corneal sensitivity is performed. Any animal presenting a partial or complete corneal insensitivity or any ocular lesion before administration is excluded from the study. Immediately after the first measurement, 2 x 50 µl of test substances or their vehicle are applied to the cornea. The two instillations were undertaken on each eye at a one-minute interval. Corneal sensitivity is subsequently measured at 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 minutes following the instillations, and then at 2, 3 and 4 hours after the instillations. Corneal sensitivity is measured by touching gently the center of the cornea with a loop-shape nylon yarn (0.3 mm diameter). For each measurement, this operation is repeated 10 times at regular 2 second intervals. The number of stimulations producing a corneal reflex is noted for each set and for each eye.

c) Data analysis

Results are expressed as percentage of inhibition of the corneal reflex calculated for each set of 10 stimulations:

$$\% \text{ inhibition of corneal reflex} = 10 - (\text{number of stimulations inducing a corneal reflex}) \times 10$$

For each experimental group, median values are determined. The effects of test compounds are compared with those of the vehicle using a Mann-Whitney non-parametric U test at each time of measurement. Areas under curves are calculated over the first 60-minute period following instillation for each animal and each concentration by the trapezoidal method of Bourget *et al.*, 1993. The relative potency of TMB is compared to that of lidocaine hydrochloride from respective mean areas under curves using a covariance analysis.

4.2 Results

TMB produced a dose-dependent local anesthetic effect on rabbit cornea (fig.4A). The first

22

significant effects were obtained using the 0.1% concentration and lasted 20 min. An instillation of 0.3% or 1% TMB produced a complete local anesthesia lasting more than 60 min. Under the same experimental conditions, lidocaine (fig.4B) was found inactive up to the concentration of 0.3%. At the 6% concentration, the local anesthetic effect was complete only during 25 min and 60 min after the instillation, there was no more inhibition of the corneal reflex. When comparing areas under the curve, we calculated that TMB showed a potency 17-fold higher than lidocaine.

Example 5 : PGE₂-induced hyperalgesia

10

The aim of this study is to evaluate the antihyperalgesic activity of TMB, its stereoisomers and its metabolites in combination with an opioid analgesic in Prostaglandin E₂ (PGE₂)-induced hyperalgesia in the rat.

a) Animals:

Test is carried out with Sprague-Dawley male rats (100-120 grams) on arrival. They are housed 5 per cage and acclimated to the conditions of the animal room for 5 days under a 12/12 day/night cycle and a constant room temperature of 22°C. Food and water are provided ad libidum.

20

b) Test:

A solution of PGE₂ (1mg/ml) is prepared as a stock solution in a 10% (v/v) alcohol in pyrogen sterile saline and stored at 4°C for 4 days.

A solution of PGE₂ (1µg/ml) is freshly prepared twice daily in sterile saline and 100µl is injected subplanter into the left paw of rat, twice daily for 4 days. Using this protocol, hyperalgesia is present for at least a week following completion for 4 days of treatment.

25

Control animals (saline group) are given sterile saline in the same experimental conditions.

30

Hyperalgesia is measured by the Randall and Selitto's test (Randall and Selitto, 1957) using an analgesimeter (Ugo Basile). The analgesimeter is basically a device which exerts a force that increases at constant rate. The force is applied to the animal's paw which is placed on a small plinth under a cone-shaped pusher. The operator depresses a pedal-switch to start the mechanism which exerts the force. The nociceptive threshold is defined as the force at which

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

23

the rat withdraws its paw. The threshold is determined before and after treatment.

Drugs are given by subcutaneous route, 30 minutes before the second determination; Control animals (saline and PGE₂ group) received the appropriate vehicle in the same experimental conditions.

5

c) Data analysis:

Data are presented as the mean $\pm$ SEM

The level of statistical significance is determined with Student's t test (Tallarida and Murray, 1987) for paired sample and differences with $p < 0.05$ are considered statistically significant.

10

% of antinociceptive activity is calculated as follows:

15

$$\frac{\begin{array}{l} \text{mean PGE}_2/\text{treated group} - \text{mean PGE}_2/\text{vehicle group} \\ \text{after drug treatment} \quad \quad \quad \text{after vehicle treatment} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{mean saline/vehicle group} - \text{mean PGE}_2/\text{vehicle group} \\ \text{after vehicle group} \quad \quad \quad \text{after vehicle treatment} \end{array}} \times 100$$

20

The aim of the study is to evaluate TMB, its stereoisomers and its metabolites in combination with an opioid analgesic in a model of rat neuropathy.

25

The Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (IASP) Ethical Guidelines are adhered to in these studies. In particular, the duration of the experiments is as short as possible and the number of animals is kept to a minimum.

a) Animals:

30

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, France, strain designation Crl :CD(SD)BR), $n = 45$, weighing 175-200 g on arrival are used. The rats are housed at the experimental facilities for a week prior to the experiments. They are maintained on a 12 h light/dark cycle and have free access to standard laboratory food and tap water in an ambient temperature of 20-22°C.

b) Surgery:

Printed:19-12-2000

23

24

The unilateral peripheral mononeuropathy is produced on the right hind limb according to the method described by Bennett and Xia, 1988 and Attal et al., 1990. Rats are anesthetized with sodium pentobarbitone (Nembutal, 50 mg/kg I.p.). The common sciatic nerve is exposed by blunt dissection at the level of the mid-thigh; four ligatures (5-0 chromic catgut, about 1-mm spacing) are placed around the nerve.

c) Antinociceptive testing:

Experiments are carried out in a quiet room. Animals are not acclimatized to the test situations beforehand. The experimenter is unaware of the drug and doses used. Each animal receives drugs only once and is used in only one experiment. The antinociceptive action is determined by measuring the vocalization threshold elicited by pressure on both the nerve-injured and the contralateral hindpaw, using the Ugo Basile (Comerio, Italy) analgesymeter. This instrument generates a linearly increasing mechanical force applied by a dome-shaped plastic tip (diameter =1 mm) on the dorsal surface of the paw. The tip is positioned between the third and fourth metatarsus (into the sciatic nerve territory) and force is applied until the rat squeaked. For each rat, a control threshold (mean of two consecutive stable thresholds expressed in g) is determined before injecting the drugs. The vocalization thresholds are then measured every 10 min, until they return to the level of the control values.

d) Data analysis:

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. The areas under the curves (AUC) are calculated using the trapezoidal rule. Statistical significance of the data is analysed by one-way analysis of variance (ANOVA). The observed significances are then confirmed with Tukey's test. Simple regressions (linear model) are performed to establish dose-dependent effects. Statistical analyses are carried out using a statistical computer program (Statgraphics Plus, Manugistics, Rockville, MD). $P < 0.05$ is used as the criterion for statistical significance.

23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

189

184/8

References

- Alleschar HD, Ahmad S, Classen M and Daniel EE (1991) Interaction of trimebutine and JO-1196 (fedotozine) with opioid receptors in the canine ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 836-842.
- Attal, N., Jazat, F., Kayser, V. and Guilbaud, G., Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy, *Pain*, 41 (1990) 235-251.
- Barzaghi G and Rustioni A (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 27: 302-312.
- Bean BP, Cohen CJ and Tsien RW (1983) Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J Gen Physiol* 81: 613-642.
- Bennett, G.J. and Xie, Y.K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [see comments]. *Pain*, 33 (1988) 87-107.
- Bourget P and Delouis JM (1993) Review of a technic for the estimation of area under the concentration curve in pharmacokinetic analysis. *Therapie* 48: 1-5.
- Bradette M, Delvaux M, Staumont G, Fioramonti G, Bueno L and Frexinos J (1994) Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat: definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects. *Dig Dis Sci* 39: 449-57.
- Bueno L, Honde C, Pascaud X and Junien JL (1987) Effects of orally versus parenterally administered trimebutine on gastrointestinal and colonic motility in dogs. *Gastroenterol Clin Biol* 11: 90B-93B.
- Calcutt, N.A., Jorge, M.C., Yaksh, T.L. and Chaplan, S.R., Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and

lidocaine, *Pain*, 68 (1996) 293-299.

Cheng YC and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction.

5 *Biochem Pharmacol* 22: 3099-4002.

Coderre TJ and Melzack R (1992) The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12: 3665-3670.

10

Courteix, C., Eschalier, A. and Lavarenne, J., Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain, *Pain*, 53 (1993) 81-88.

15

Delis C, Walker EA, Castillo FD, Evans DF, Wingate DL, Allouche S and Van Egroo LD (1994) The effect of stress and opioid agonist on postprandial motor activity in the human small bowel Digestive disease week (a) Abstract AGA, New Orleans, USA (b) *Gastroenterology* 106: A 485.

20

Dickenson AH (1995) Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anesthesia*. 75: 193-200.

Dray A, Urban L and Dickenson A (1994) Pharmacology of chronic pain. *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 190-197.

25

Frexinos J, Fioramonti J and Bueno L (1985) Effect of trimebutine on colonic myoelectrical activity in IBS patients. *Eur J Clin Pharmacol* 28: 181-185.

Ghidini O, Saponati G and Intrieri L (1986) Single drug treatment for irritable colon: rociverine versus trimebutine maleate. *Curr Ther Res* 39: 541-548.

30

Grandjouan S, Chausade S, Couturier D, Thierman-Duffaud D and Henry JF (1989) A comparison of metoclopramide and trimebutine on small bowel motility in humans. *Aliment*

Pharmacol Ther 3: 387-393.

- 5 Julia V, Coelho AM, Rouzade ML, Allouche S and Bueno L (1996) Influence de la trimebutine (Débridat) sur l'hypomotricité colique et les crampes abdominales liées à la distension rectale chez le rat. *Med Chir Dig* 25: 239-242.

Lees G and Leach MJ (1993) Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine (lamictal) using primary neuroglial cultures from rat cortex. *Brain Res*. 612: 190-199.

10 Lütcke K (1980) A three part controlled study of trimebutine in the treatment of irritable colon syndrome. *Cir Med Res Op* 6: 437-443.

- 15 Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DJ and Frenk H (1993) Intrathecal treatment with dextrophan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy. *Brain Research* 605: 164-168.

Mc Pherson GA (1985) Analysis of radioligand binding experiments: a collection of computer programs for the IBM PC. *J Pharmacol Methods* 14: 213-228.

20 Meert TF and Melis W (1992) Interactions between epidurally and intrathecally administered sufentanil and bupivacaine in hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the rat. *Acta Anaesthesiol Belg* 43: 79-89.

- 25 Meunier P (1980) Effet de la trimebutine sur la motricité colique dans les colopathies. Abstract, *Gastroenterol Clin Biol* 4: 261A.

Moshal MG and Heiron M (1979) A clinical trial of trimebutine in spastic colon. *J Int Med Res* 7: 231-234.

- 30 Pascand X, Roman F, Petoux F, Vauche D and Junian JL (1987) Action de la trimebutine sur la motricité gastro-intestinale. *Gastroenterol Clin Biol* 11: 77B-81B.

Randall, L. and Selitto, J.L. (1957) *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 4, 409-419

Rawal N (1990) Indications for the use of intraspinal opioids, in *Spinal Narcotics* (Rawal N and Coombs DW eds) pp 43-61, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Reboa G, Bertoglio C, Terrizzi A and Parodi E (1976) L'azione della trimebutina sull'attività elettrica e manometrica del colon normale e patologico. *Riv Gastroenterol* 28: 1-16.

10 Roman F, Pascaud X, Taylor JE and Junien JL (1987) Interactions of trimebutine with guinea pig opioid receptors. *J Pharm Pharmacol* 39: 404-407.

Sanguinetti MC and Kass RS (1984) Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ Res* 15 55(3): 336-348.

Sehang JC, Devroede G and Pilote M (1993) Effect of trimebutine on colonic function in patients with chronic idiopathic constipation: evidence for the need of a physiologic rather than clinical selection. *Dis Colon Rectum* 36: 330-336.

20 Strichartz G and Ritchie J (1987) The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues in *Local Anesthetics Handbook of Experimental Pharmacology* (Strichartz G ed) pp 21-52, Springer-Verlag, Heidelberg.

25 Tallarida R. J and Murray R. B. (1987) *Manual of Pharmacological Calculations with Computer programs*

Taniyama K, Sano I, Nakayama S, Matsuyama S, Takeda K, Yoshihara C and Tanaka (1991) Dual effect of trimebutine on contractility of the guinea pig ileum via the opioid receptors. 30 *Gastroenterology* 101: 1579-1587.

Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M., Hobden, R.A. and Bennett, T., Functional consequences of

191 ~~788~~

29

streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system, *Pharmacol Rev*, 44 (1992) 103-150.

Toussaint J, Cremer M and Pintens H (1981) Etude en simple aveugle de trimébutine et de la mébévérine dans le côlon irritable et la dyspepsie *Acta Ther* 7: 261-268.

Triggle DJ (1997) Stereoselectivity of drug action [review]. *Drug Discovery Today* 2: 138-147.

Turner TJ and Dunlap K (1995) Prolonged time course of glutamate release from nerve terminals: relationship between stimulus duration and the secretory event. *J Neurochem* 64: 2022-2033.

Urban L, Thompson SWN and Dray A (1994) Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 17(10): 432-438.

Valmier J, Simmoneau M and Boisseau S (1989) Expression of voltage-dependent sodium and transient potassium currents in an identified subpopulation of dorsal root ganglion cells acutely isolated from 12-day-old mouse embryos. *Pflügers Arch* 414: 360-368.

Wermelskirchen D, Wilffert B and Peters TJ (1992) Veratridine-induced intoxication: an in vitro model for the characterization of anti-ischemic compounds. *Basic Clin Physiol Pharmacol* 3: 293-321.

CLAIMS

1. A product comprising trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-
5 benzoate hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic.
2. A product according to claim 1 wherein compounds can be used simultaneously,
separately or sequentially in the treatment and/or prevention of pain and/or
nociception.
3. A product according to claim 1 wherein the opioid analgesic is chosen among
10 morphine, codeine, dihydrocodeine, diacetylmorphine, hydrocodone,
hydromorphone, levorphanol, onyxmorphone, alfentanil, buprenorphine, butorphanol,
fentanyl, sufentanil, meperidine, methadone, nalbuphine, propoxyphene and
pentazocine or acceptable salts thereof.
4. A product according to claim 3 wherein the opioid analgesic is morphine or an
15 acceptable salt thereof.
5. A pharmaceutical composition comprising trimebutine [2-dimethylamino-2-
phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-benzoate hydrogen maleate] or its corresponding
stereoisomers and an opioid analgesic with at least one pharmaceutical carrier or
excipient.
- 20 6. Use of trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-benzoate
hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers and an opioid analgesic for the
preparation of a medicament to prevent and/or treat pain and/or nociception.
7. Use according to claim 6 for simultaneous, separate or sequential administration in
the treatment and/or prevention of pain and/or nociception.
- 25 8. Use according to claim 6 for the preparation of a medicament to prevent and/or treat
acute pain .
9. Use according claim 6 for the preparation of a medicament to prevent and/or treat
inflammatory pain.
10. Use according claim 6 for the preparation of a medicament to prevent and/or treat

192 ^{2/3}/₁₀

31

chronic pain.

11. Use according to claim 6 wherein the trimebutine is administered at dosage between 50 to 900 mg/day and preferably between 300 to 600 mg/day.
12. Use according to claim 6 wherein the opioid analgesic is administered at dosage
5 between 0.01 to 250 mg/day depending of the chosen opioid analgesic.
13. Use according to claim 6 wherein the morphine is administered at dosage between 2 to 220 mg/day.
14. Method for preventing and/or treating pain and/or nociception comprising administering trimebutine and an opioid analgesic to a patient in need thereof.
- 10 15. Method according to claim 14, wherein the administration of trimebutine and the opioid analgesic is simultaneous, separate or sequential.
16. A process for the preparation of a pharmaceutical composition comprising trimebutine or its stereoisomers and an opioid analgesic which process comprises bringing trimebutine and the opioid analgesic into association with a pharmaceutically
15 acceptable carrier or excipient.

1/7

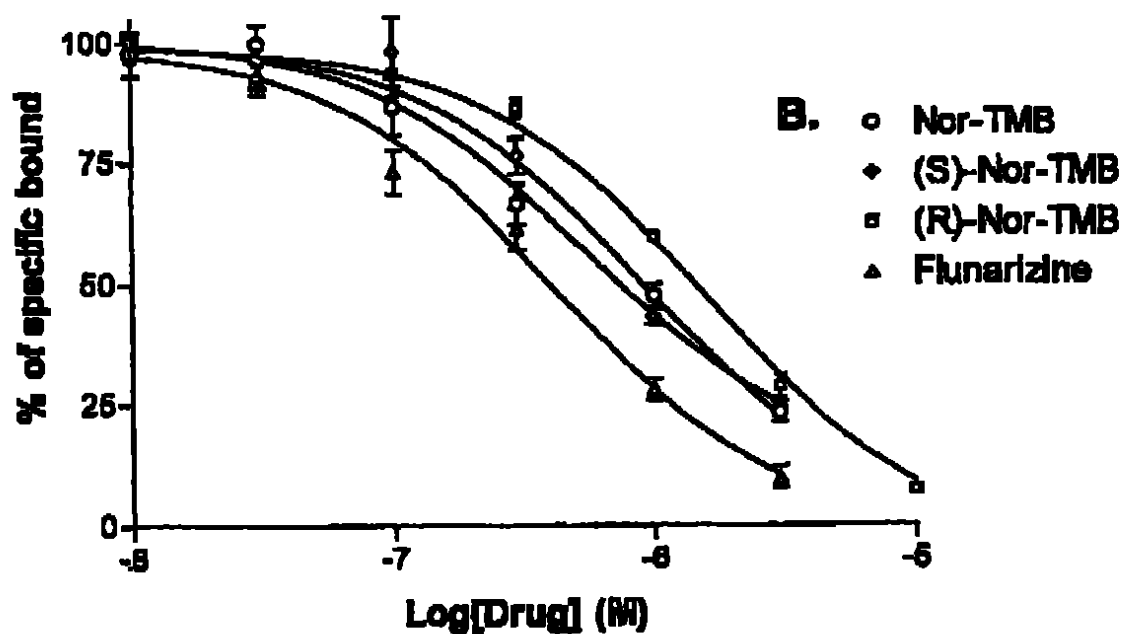
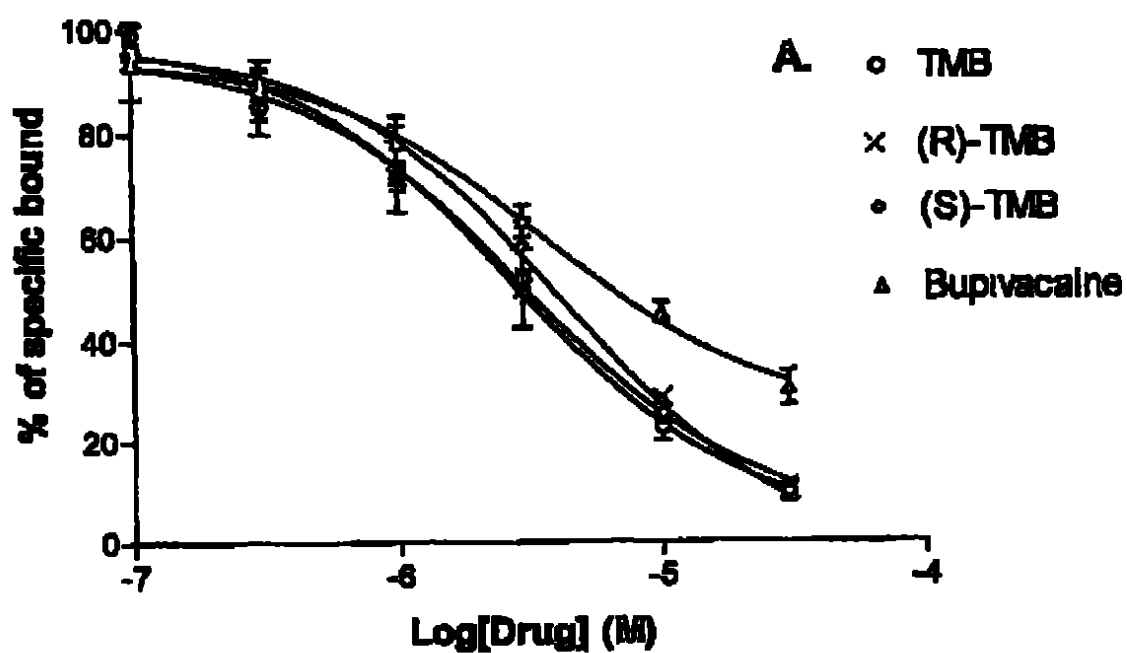


FIGURE 1

7/9/89

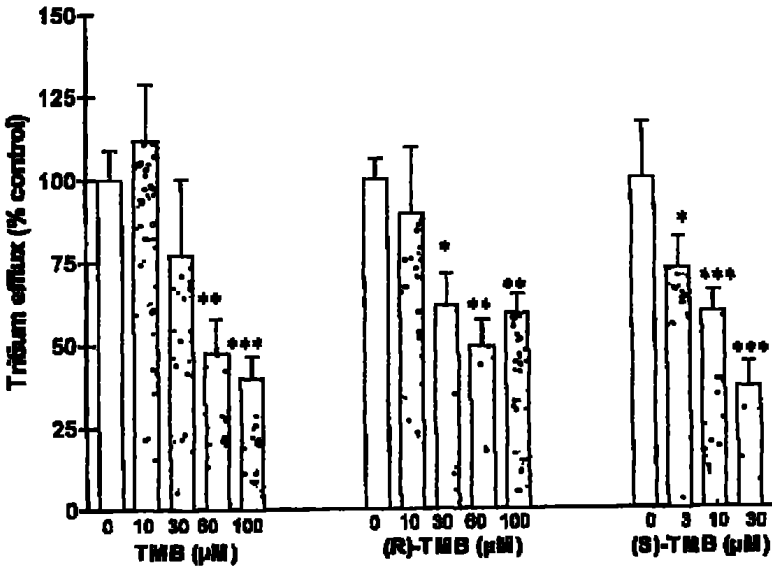


FIGURE 2A

3/7

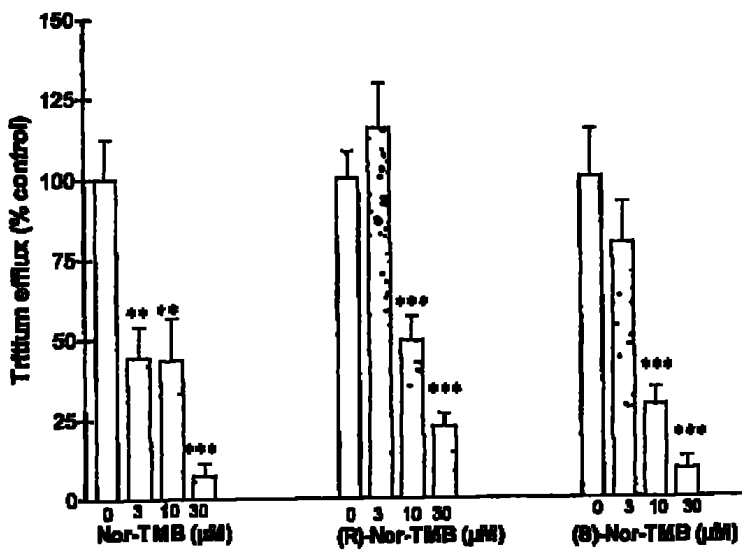


FIGURE 2B

194

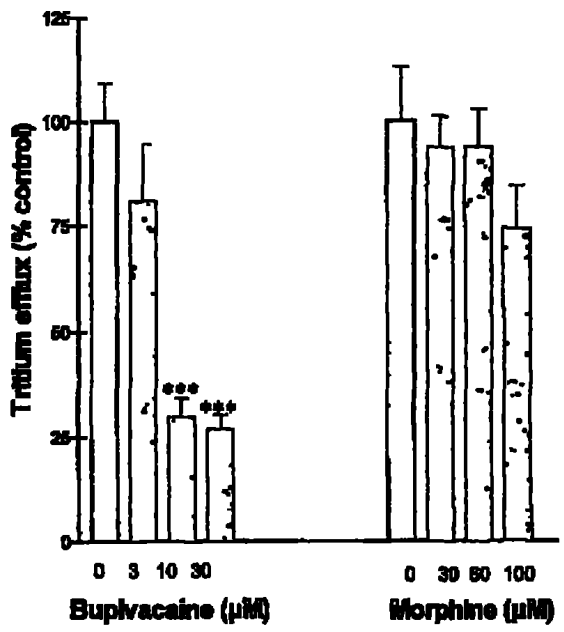


FIGURE 2C

1/3/84

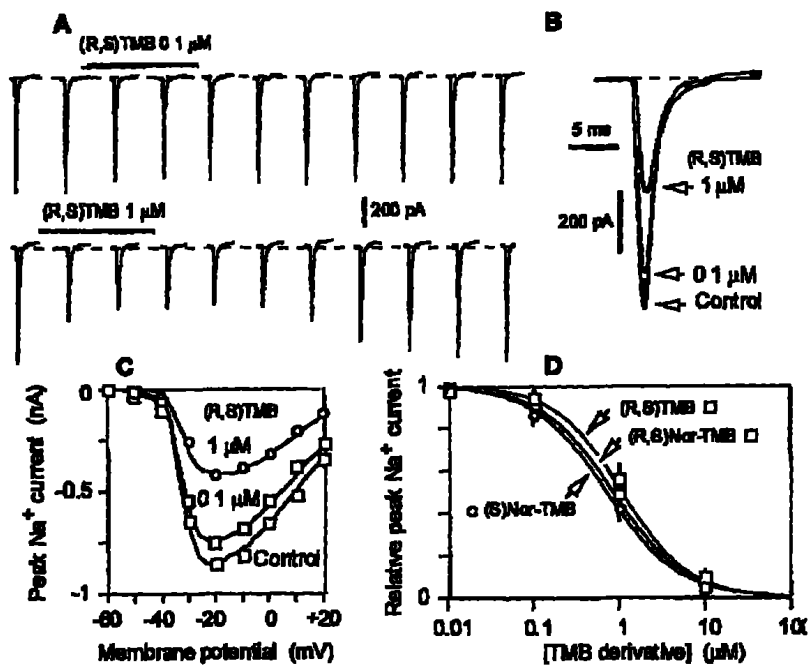


FIGURE 3

195

87

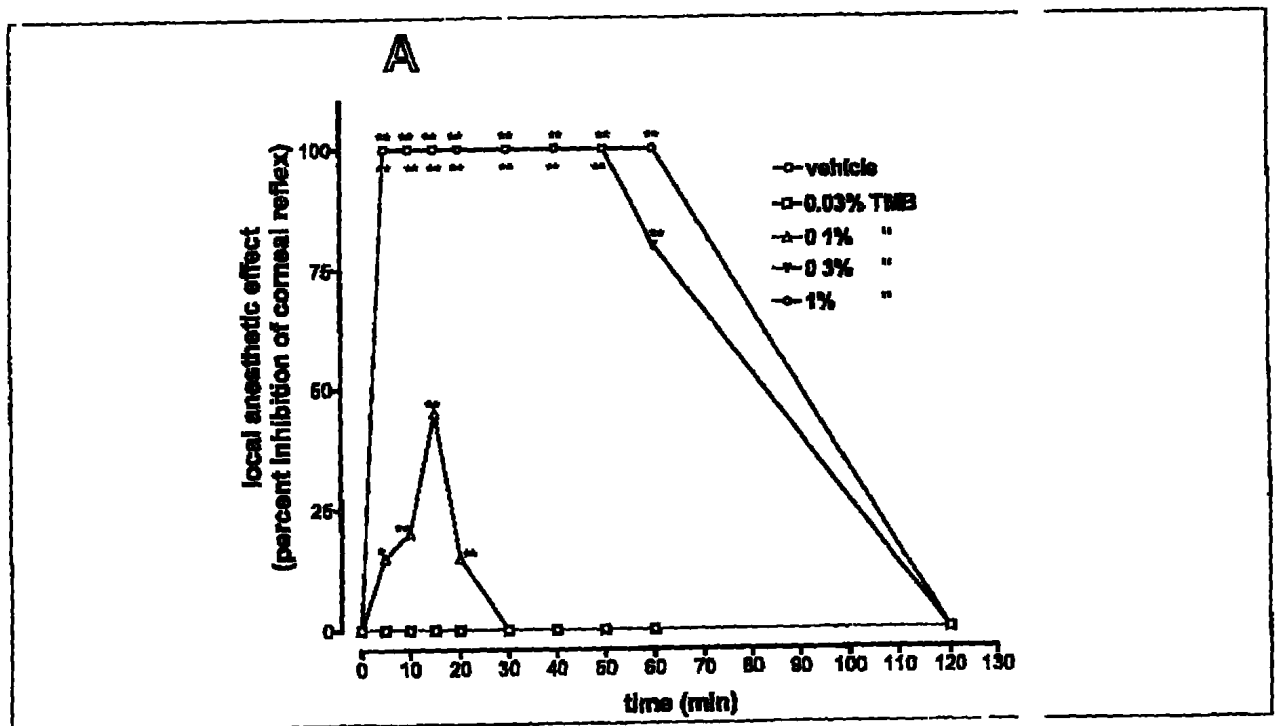


FIGURE 4 A

24/5

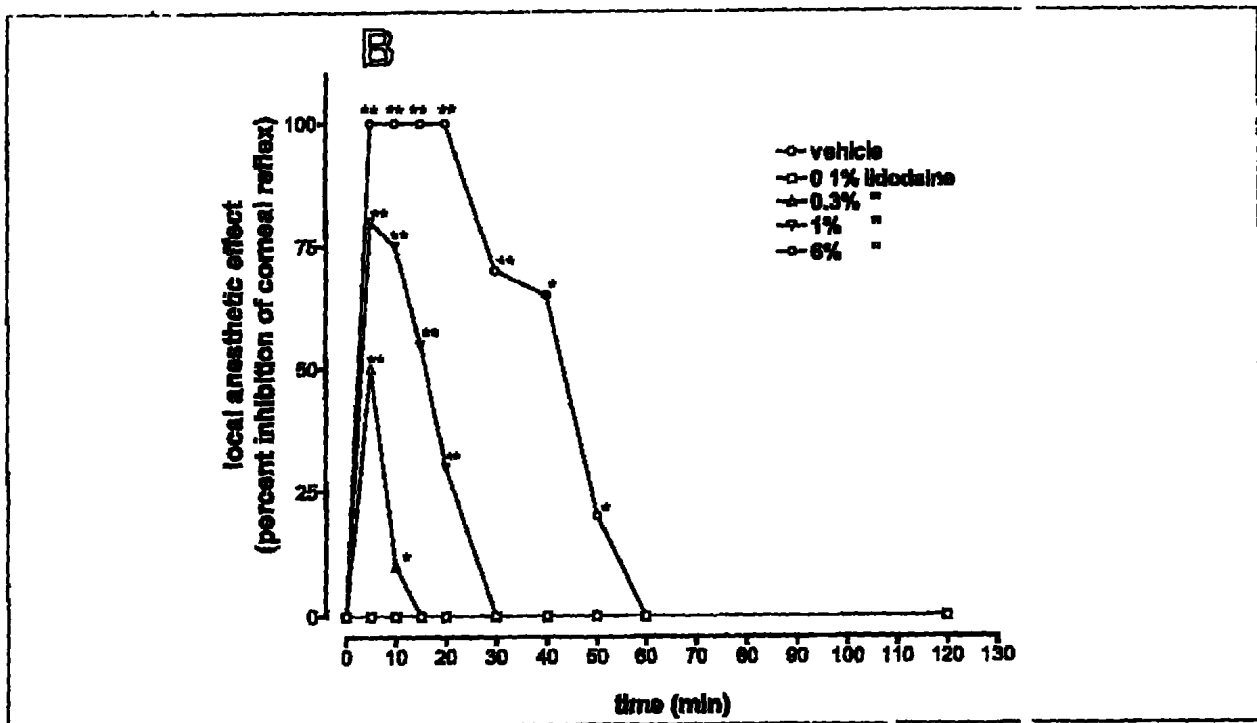
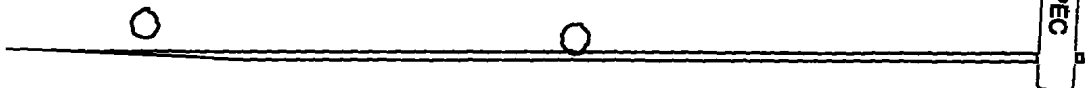


FIGURE 4 B



23-12-1999

EP99125752.8

SPEC

32

2/3
196

5

ABSTRACT

○ 10 The invention provides a combination of of trimebutine [2-dimethylamino-2-phenylbutyl-3, 4, 5- trimethoxy-benzoate hydrogen maleate] or its corresponding stereoisomers with an opioid analgesic for the preparation of a medicament to prevent and/or treat pain or nociception.

○

Printed: 19-12-2000

39

27
193
197

TRADUCCION.-----

[El documento que sigue está redactado en idioma inglés y
en otros dos idiomas]-----

CERTIFICADO.-----

Los documentos adjuntos son copias exactas de la solicitud
de patente europea descrita en la siguiente página, tal
como se presentó originalmente.-----

Solicitud de Patente N°: 99125752.8-----

Para el Presidente de la Oficina de Patente Europea. [Sigue
una firma ilegible y debajo reza:] I.L.C. HATTEN-HECKMAN.--

La Haya, 06/12/00.-----

Oficina de Patente Europea.-----

Página 2 del certificado.-----

Solicitud N°: 99125752.8.-----

Fecha de presentación: 23/12/99.-----

Solicitante (s): WARNER-LAMBERT COMPANY. Morris Plain, New
Jersey 07950. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.-----

Título de la invención: COMBINACIÓN DE TRIMEBUTINA CON UN
ANALGÉSICO DEL OPIO.-----

Estado: [en blanco]. Fecha: [en blanco]. Archivo N°: [en
blanco].-----

Clasificación de Patente Internacional: [en blanco].-----

Estados designados en la fecha de presentación:

198

20
198

AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR

Observaciones: [en blanco].-----

199 185

Combinación de Trimebutina con un Analgésico Derivado del Opio

Campo de la Invención.

El campo de la invención se relaciona con métodos para prevenir y/o tratar el dolor. En particular, la invención trata sobre una combinación de trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato] o sus correspondientes estereoisómeros con un analgésico derivado del opio para prevenir y/o tratar el dolor y también la nocicepción.

Antecedentes de la Invención

Trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil 3,4,5-trimetoxibenzoato hidrógeno maleato; TMB] se ha utilizado en varios países desde 1969 para tratar desórdenes funcionales del intestino grueso, entre los que se incluyen el síndrome del intestino irritable (SII). La eficacia del compuesto para aliviar el dolor abdominal se ha demostrado en varios estudios clínicos a través de distintos protocolos de tratamiento (Lüttecke, 1980; Moshal y Herron, 1979, Toussaint et al., 1981; Ghidini et al., 1986). Se descubrió que la trimebutina presenta una leve actividad agonista para el cerebro de las ratas y para los receptores de

200 30 46

opio intestinales de los conejos de Indias (Roman et al., 1987) o los caninos (Allescher et al., 1991) sin el criterio selectivo para ninguno de los subtipos μ , δ y k . Dicha actividad leve se confirmó al utilizar fragmentos intestinales aislados bajo una estimulación transmural (Pascaud et al., 1987). Esta propiedad podría ser la causa de la acción de modulación de la trimebutina en la motilidad intestinal de perros en ayuno. La trimebutina administrada en forma intravenosa u oral retarda la aparición de una fase III del complejo motor migratorio (CMM) en el estómago y el duodeno al inducir una fase III prematura, migrando a lo largo de todo el intestino (Bueno et al., 1987). En el hombre, la trimebutina estimula la motilidad intestinal tanto en estado de ayuno o no (Grandjouan et al., 1989). Es más, la trimebutina revierte el efecto de tensión de la motilidad yeyuno (Delis et al., 1994).

No hace mucho, se demostró que la trimebutina influyen en la actividad de los aferentes viscerales al disminuir la intensidad del reflejo recto-colónico en ratas como lo demuestra la inhibición de la motilidad colónica seguido de la distensión rectal (Julia et al., 1996). Tal resultado se lo puede asociar a los efectos beneficiosos que se hallaron con la trimebutina en

los pacientes que padecen de SII y más específicamente en el tratamiento de los ataques de dolor abdominal.

Se define al dolor como la experiencia sensorial que percibe el tejido nervioso que es diferente de las sensaciones como por ejemplo el tacto, la presión, el calor o el frío.

Si bien es difícil establecer una definición precisa de dolor dada la gran cantidad de sensaciones y variaciones en la percepción del dolor que poseen los individuos, se puede clasificar en tres categorías: dolor agudo, dolor inflamatorio y dolor crónico.

En general, los médicos y los pacientes desean compuestos más efectivos para tratar y/o prevenir el dolor. El caso más importante es el del dolor crónico, y hay un acuerdo general (9° Congreso Mundial sobre el Dolor, Viena, Agosto de 1999) de que existe una necesidad médica que aún no se ha hallado para su tratamiento. En muchos casos, los opios y NSAIDs no son efectivos. Los antidepresivos se utilizan con una eficacia poco consistente (50%-60%). Cierta tipo de anticonvulsivos (carbamazepina, clonazepam, baclofen) pueden ser activos. En casos extremos, se ha probado la capsaicina y anestésicos locales.

Sin embargo, estos enfoques no han sido satisfactorios y algunos pacientes no responden a ninguno de estos. En algunos casos, como por ejemplo la neuralgia trigeminal, la única forma que queda para aliviar el dolor es mediante neurocirugía (termocoagulación diferencial del ganglio de Gasser)

Por todo esto, los estudios clínicos y en animales han demostrado que la terapia de bupivacaine y opio aumenta la magnitud y la duración del alivio del dolor si se compara con los efectos de cada droga administrada separadamente (Meert y Melis, 1992),

Además, dado que se cree que los receptores de glutamato del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) tienen un papel fundamental en la transmisión de señales de excitación desde las neuronas sensoriales primarias al cerebro a través de la médula espinal (Dickenson et al., 1990), se han creado algunas estrategias para el tratamiento del dolor basadas en la administración de una combinación de antagonistas de NMDA y un analgésico derivado del opio (WO 99/44610). Lamentablemente, se ha informado que algunos productos como por ejemplo el dextrometorfan causan efectos secundarios inadmisibles.

Los inventores tomaron como punto de partida el dolor visceral y descubrieron, como lo confirma la presente solicitud, que la trimebutina presenta acción inhibitoria sobre la liberación de glutamato mediante el bloqueo de los canales de sodio y además actúa como una anestesia local con una potencia 17 veces mayor que la lidocaína. Inesperadamente, los inventores demostraron por un lado que la trimebutina o sus estereoisómeros, que es un antagonista de receptores sin NDMA, al administrarla con un analgésico derivado del opio presenta una acción inhibitoria sobre el dolor con una potenciación de la acción analgésica derivada del opio y, por otro lado, reduce los efectos secundarios no deseados de dicho analgésico derivado del opio entre los que se encuentran la dependencia a esta droga y la constipación. Es más, no existe una enseñanza general en la materia que proponga una combinación de trimebutina o sus estereoisómeros con un analgésico derivado del opio.

De acuerdo con estos resultados, se demostró que la trimebutina puede tener acción en condiciones de dolor además del dolor visceral, lo que confirma que la trimebutina es de utilidad en el tratamiento y/o prevención del dolor.

Resumen de la Invención.

La invención se refiere a un producto que comprende trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato] o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio. Los compuestos de este producto pueden utilizarse en forma simultánea, separada o secuencial, como una preparación combinada, en el tratamiento y/o prevención del dolor y/o la nocicepción.

De este modo, el analgésico derivado del opio es preferentemente morfina, aunque también puede seleccionarse de codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, onixmorfona, alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sulfentanil, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina o sales aceptables de los mismos.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende trimebutina o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio con al menos un portador farmacéutico o excipiente.

Otra realización de la invención se refiere al uso de trimebutina o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado

35
205

del opio para la preparación de un medicamento que comprenda tanto trimebutina como dicho analgésico derivado del opio en una forma de dosis única o como formas de dosis separadas que pueden utilizarse simultáneamente, en forma separada o secuencial en el tratamiento y/o prevención del dolor y/o la nocicepción. En este sentido, la presente invención sirve para prevenir y/o tratar el dolor agudo, dolor inflamatorio y/o crónico.

Dentro del contexto de la invención, la trimebutina se administra en dosis entre 50 y 900 mg/día y preferentemente entre 300 y 600 mg/día y el analgésico derivado del opio se administra en dosis entre 0,01 y 250 mg/día, lo cual depende del analgésico derivado del opio que se haya seleccionado.

Preferentemente, el analgésico derivado del opio es la morfina, la cual se administra en dosis entre 2 y 220 mg/día.

La presente solicitud trata también sobre un método para prevenir y/o tratar el dolor y/o la nocicepción que comprende el hecho de administrar trimebutina y un analgésico derivado del opio a un paciente que necesita del mismo. La administración de trimebutina y del analgésico derivado del opio puede ser simultánea, separada o secuencial.

La invención también se refiere a un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende trimebutina o sus estereoisómeros y un analgésico derivado del opio. Dicho proceso comprende la asociación de la trimebutina y el analgésico derivado del opio con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Descripción de los Dibujos

Figuras 1: Efecto de la TMB (A), Nor-TMB (B) y los estereoisómeros correspondientes en la unión de [^3H]-batracotoxina a los sinaptosomas corticales de la rata. Se incuban las membranas con concentraciones cada vez mayores de drogas de prueba en presencia de 25 μg de veneno de escorpión y 10 nM de [^3H]-batracotoxina. No se determina una unión específica en presencia de 0,3 mM de veratridina. 90 min después de la incubación a 25°C, el ligando unido se separa del ligando libre mediante filtración por vacío a través de filtros GF/B. La unión específica en presencia de los compuestos de prueba se calcula como porcentaje de control de la unión determinado en ausencia de los inhibidores. Los valores representados son promedio $\pm$ SEM

207

de por lo menos 3 determinaciones independientes realizadas en duplicado.

Figura 2: Efecto de la TMB (A), T Nor-TMB (B) y los estereoisómeros correspondientes sobre la liberación de glutamato inducido por veratridina de rebanadas de la médula espinal de las ratas. Se prueba la morfina y el bupivacaine (C) bajo las mismas condiciones. Los resultados son promedios $\pm$ de al menos 10 determinaciones. Las partes se fusionan 15 min con el compuesto de prueba antes de la estimulación con veratridina (40 μ M). Se cuenta la radioactividad recogida en fracciones de 5 min durante 30 min posterior a la estimulación y se determina el efecto del compuesto mediante la comparación de la cantidad de radioactividad acumulada liberada con aquella que se obtuvo en las células superfusionadas sólo con regulador de pH. *P<0,05; **P<0,001.***P<0,001 Prueba de Student.

Figura 3: Efecto de la TMB sobre las corrientes de sodio medido en las neuronas DRG. (A) Corriente de Na⁺ interna inducida cada 10 s mediante el paso del potencial de la membrana de -80 a -10mV. Se aplica trimebutina en forma local durante 20 s a 0,1 μ M (línea superior) y a 1 μ M (línea inferior). (B) Corriente de sodio antes (control) y durante la perfusión de TMB (se utiliza

la misma célula que en A). (C) Corriente de sodio pico versus potencial de pulso en solución salina de control y en presencia de TMB con las concentraciones indicadas. La disminución de la corriente de sodio pico se produjo homotéticamente. (D) Relación de la respuesta a la dosis de los efectos de TMB sobre la corriente de Na^+ en DRG. Los resultados se expresan como la parte de la corriente de Na^+ (corriente de Na^+ pico relativa) que persiste en presencia del bloqueador. Cada punto es promedio $\pm$ SEM de 4 a 6 experimentos. Curva continua: mejor adaptada a la función de Hill con $\text{IC}_{50} = 0,69 \mu\text{M}$, y $\text{NH} = 1,02$.

Figura 4: Efecto de anestesia local de TMB (A) y lidocaína (B) determinado en el reflejo de la córnea del conejo. Los valores representan el intermedio de porcentaje de inhibición del reflejo de la córnea calculado por cada grupo de 10 estimulaciones. El eje. x representa el tiempo (en minutos) luego de las instilaciones. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado con el grupo de control tratado con el vehículo (Prueba U de Mann-Whitney).

Descripción Detallada de la Invención.

Luego de haber determinado que la trimebutina es capaz de inhibir la liberación de glutamato que implica la transmisión del

estímulo nociceptivo, mediante el bloqueo de los canales de sodio, los inventores confirmaron que la trimebutina actúa como una anestesia local e inesperadamente lo hace con una potencia aun mayor que la lidocaína. También demostraron que la administración combinada de la trimebutina o sus estereoisómeros con un analgésico derivado del opio tiene un efecto de potenciación para el tratamiento y/o la prevención del dolor.

En este sentido, la invención proporciona un producto que comprende trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato] o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio para proporcionar una respuesta o satisfacer la necesidad de aliviar el dolor mediante un compuesto más eficaz y seguro.

De este modo, los componentes de dicho producto se pueden usar en forma simultánea, separada o secuencial en el tratamiento y/o prevención del dolor y/o la nocicepción.

Se ha demostrado que la trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato, TMB] es activa para aliviar el dolor abdominal en humanos.

Además, se sabe que en los humanos, luego de la administración oral o intravenosa (iv) de trimebutina, esta sirve como precursor metabólico para N-desmetil trimebutina (Nor-TMB). Esto indica que la trimebutina actúa como un bioprecursor de Nor-TMB lo que significa que bajo la acción de las enzimas hepáticas el bioprecursor trimebutina es metabolizado y origina una nueva molécula. De este modo, la administración de trimebutina en los humanos lleva a la exposición concomitante de trimebutina, Nor-TMB y otros metabolitos. Por lo tanto, estos compuestos y en particular la trimebutina y Nor-TMB son capaces de provocar conjuntamente sus propiedades (antinociceptivas).

Por lo tanto, se entiende que N-desmetil trimebutina (Nor-TMB) comprende los estereoisómeros (S) N-desmetil trimebutina y (R) N-desmetil trimebutina y el correspondiente racemato.

Los analgésicos derivados del opio se hallan bien establecidos como una clase de agente analgésico. A veces también se hace referencia a estos como opios, pero este término debería reservarse para los químicos que guardan relación con la morfina. El término "derivado del opio" se acepta generalmente para referirse de forma genérica a todas las drogas, naturales o sintéticos, que producen acciones similares a la morfina.

Los analgésicos derivados del opio sintéticos o semi-sintéticos son derivados de cinco clases químicas de compuestos: fenantrenos, fenilheptilaminas, fenilpiperidinas, morfina y benzomorfas.

Dentro del contexto de la invención, el analgésico derivado del opio se selecciona entre la morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, onixmorfona, alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sulfentanil, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina o las sales aceptables de los mismos. Preferentemente, el analgésico derivado del opio es morfina o una sal aceptable de la misma.

De todos los analgésicos derivados del opio, la morfina es la más usada y en este sentido es un compuesto arquetipo. Lamentablemente, además de las útiles propiedades terapéuticas, la morfina también tiene una cantidad de inconvenientes entre los que se incluyen efecto causado por los sedantes, depresión respiratoria, motilidad intestinal reducida (lo que causa constipación) y en algunos individuos puede aparecer náusea y vómitos. Otro inconveniente que siempre se reporta es la evolución de la tolerancia y dependencia física limitando el uso

212 ⁷⁹
[Handwritten signature]

clínico de dicho compuesto. Por lo tanto existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan que los médicos clínicos utilicen dosis menores de analgésicos derivado del opio como la morfina para así reducir la posibilidad de causar efectos adversos entre los que se incluyen la tolerancia y la dependencia, y de esta manera evitar dos grandes problemas: la necesidad de intensificar o incrementar las dosis en los tratamientos prolongados lo que llevaría a la aparición de efectos secundarios y el riesgo de la abstinencia de la droga asociado con el cese de su administración.

Por ventaja, la presente invención también trata sobre la utilización de trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato] o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio para la preparación de un medicamento destinado a prevenir y/o tratar dolores y/o nocicepción. Por lo tanto, los compuestos de la preparación combinada se utilizan tanto en forma simultánea, separada o secuencial en el tratamiento y/o prevención de dolores y/o nocicepción. Se entiende que el término "dolor" incluye a cualquier tipo de dolor con cualquier etiología.

43
213-10

Más en particular, La invención sirve para prevenir y/o tratar dolores agudos como así también cualquier dolor inflamatorio (visceral o somático) y crónico.

Curiosamente, los inventores han demostrado que la trimebutina y también sus metabolitos a los que de aquí en adelante denominaremos Nor-TMB (y preferentemente el (S)-enantiómero) que es uno de los mayores metabolitos de los seres humanos, inhibe la liberación de glutamato de rebanadas de la médula espinal de ratas, a través del bloqueo de los canales de sodio. En especial, la trimebutina, sus estereoisómeros, y la Nor-TMB se estudiaron dada la afinidad con los canales de sodio categorizados mediante [^3H]-batracotoxina, su efecto sobre las corrientes de sodio en las neuronas de las raíces de los ganglios dorsales de las ratas, en la liberación de glutamato inducida por veratridina desde las rebanadas de la médula espinal de las ratas.

Estos resultados son particularmente importantes ya que el papel principal del glutamato y los aminoácidos excitotóxicos (EAA) en el establecimiento de las condiciones de hiperalgesia y alodinia fue demostrado por Dickenson et al., 1995. A partir de ese descubrimiento se han creado varias estrategias para hallar nuevas drogas basadas en la inhibición de los receptores de EEA y

AA
214 200

glutamato. La mayoría de los inhibidores generados mediante estas estrategias no pueden utilizarse en seres humanos por razones de seguridad y, parece ser que el bloqueo de los receptores de glutamato es un camino duro para el descubrimiento relacionado con las drogas.

Además, los resultados que se informan en los ejemplos demuestran que la trimebutina, sus estereoisómeros y sus metabolitos despliegan una actividad analgésica y un efecto inhibitorio del dolor, particularmente en dolores inflamatorios y dolores crónicos.

Entre los ejemplos de dolores agudos se incluyen particularmente los dolores de cabeza y los dolores post-operatorios.

Entre los dolores inflamatorios se incluye cualquier dolor que contenga un componente inflamatorio como por ejemplo la artritis, poliartritis, espondiloartritis, dolor músculo-esquelético como el dolor osteotraumático y el dolor del miembro fantasma, dolor de espalda, dolor vertebral, falla quirúrgica de un disco movido, dolor post-quirúrgico, dolor reumático, dolor en los dientes y dismenorrea.

El dolor crónico, de acuerdo con la definición propuesta por la Asociación Internacional para el Estudio de Dolores, es un dolor que persiste por más del tiempo normal de curación de los tejidos (el tiempo sugerido es de tres meses) (International Association for the Study of Pain, clasificación de dolor crónico. Dolor, 1986, Sup. 3, S1-S226), y esto implica un punto de transición a partir del dolor agudo.

Por consiguiente y dado que el dolor crónico es causado por la hiperalgesia (Dickenson et al., 1995), la presente invención comprende también la prevención y/o el tratamiento de la hiperalgesia o el dolor relacionado a las condiciones de hipersensibilidad central.

Entre los ejemplos de dolor crónico se encuentran los dolores neurológicos como las neuropatías, polineuropatías que incluyen aquellas relacionadas con la diabetes, dolor de cabeza, trauma, neuralgias que incluyen la neuralgia post Zoster y la neuralgia trigeminal, dolores relacionados con el VIH, dolores relacionados con el cáncer, dolor vascular como por ejemplo el dolor causado por el síndrome de Raynaud, la enfermedad de Horton, artritis, úlceras varicosas. Dentro del contexto de la invención, la trimebutina se administra en dosis entre 50 y 900 mg/día y

preferentemente entre 300 y 600 mg/día (para un hombre con un peso promedio de 70 kg).

El analgésico derivado del opio se administra en una dosis iguales a los niveles de las dosis convencionales, preferentemente a un nivel reducido de acuerdo con la presente invención. Los niveles de dosis adecuados dependerán del efecto analgésico del analgésico derivado del opio que se haya elegido, pero los niveles de las dosis que son adecuados se encuentran entre 0,001 y 25mg/kg diarios, preferentemente entre 0,005 y 10 mg/kg diarios y especialmente entre 0,005 y 5 mg/kg diarios o entre 0,01 y 250 mg/día (para un hombre con un peso promedio de 70 kg) lo que depende del analgésico elegido. El compuesto puede administrarse hasta 6 veces diarias y preferentemente entre 1 y 4 veces diarias.

Por ejemplo, las dosis pueden ser para la morfina entre 2 y 220 mg/día, para la codeína entre 20 y 60 mg/día, fentanil entre 0,1 y 1 mg/24 horas, dropediol entre 2 y 10 mg/día, oxicodona entre 20 y 80 mg cada 4 horas (para un hombre con un peso promedio de 70 kg).

217

Si se lo administra para una terapia combinatoria o en combinación, ya sea en forma única o como una composición(es) farmacéutica(s) separada, la trimebutina o sus estereoisómeros y el analgésico derivado del opio se presentan con una proporción consistente con la manifestación del efecto que se desea. En particular, la proporción en peso de trimebutina para el analgésico derivado del opio será adecuada aproximadamente 1 a 1. Preferentemente, dicha proporción será entre 0,0001 y 1 y 1000 y 1, y especialmente entre 0,01 y 1 y 100 y 1.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende trimebutina o sus correspondientes estereoisómeros y un analgésico derivado del opio.

Dentro de este contexto, la trimebutina que se proporciona en una composición farmacéutica en combinación con un analgésico derivado del opio sirve para prevenir y/o tratar los tipos de dolores antes mencionados. Las composiciones farmacéuticas incluyen la trimebutina y/o sus estereoisómeros correspondientes que incluyen sus sales y se produce mediante la formulación de los compuestos activos en forma de dosis por unidad con al menos un excipiente o portados farmacéuticamente aceptable ya sea sólido o líquido.

48
218

Si la formación de una sal es adecuada, las sales que son farmacéuticamente aceptables incluyen acetato, bencensulfonato, bitartrato, acetato cálcico, camsilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicololarsanilato, hexilresorcinato, hidrabramina, hidrobromuro, hidrocloruro, hidrogencarbonato, hidroxinaftoato, iodida, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato o hemi-succinato, sulfato o hemi-sulfato, tanato, tartrato o hemi-tartrato, teoclato, trietiodida, benztatina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaína, aluminio, amonio, tetrametilamonio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, y zinc. (Véase además "Sales Farmacéuticas" de Berge S.M. et al. (1997) P. De la Ciencia Farmacéutica (del inglés: J.Pharm.Sci) 66:1-19, incorporado a la presente a modo de referencia.)

Las sales de los analgésicos derivados del opio también se preparan de acuerdo con procesos muy conocidos y se prefieren dichas sales adecuadas para las vías parenteral u oral.

Las formas de dosificación sólida para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, los componentes activos se mezclan con por lo menos un excipiente (o portador) tradicional como por ejemplo el citrato de sodio o el fosfato dicálcico o (a) rellenos o extensores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerina, (d) agentes desintegrantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos complejos, y carbonato de sodio, (e) retrasadores de solución, como por ejemplo parafina, (f) aceleradores de absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes de humedad, como por ejemplo, alcohol cetílico, y monoestearato de glicerina, (h) absorbentes, como por ejemplo, caolina y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, tabletas, y píldoras, las formas de dosificación también pueden contener agentes reguladores del pH.

Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden utilizarse como rellenos en cápsulas gelatinosas de relleno duro o blando utilizando excipientes tales como la lactosa y los polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Las formas de dosificación sólida como las tabletas, "dragées", cápsulas, píldoras, y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cáscaras, como por ejemplo recubrimientos entéricos y otros muy conocidos en la materia. Los componentes activos pueden encontrarse también en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes arriba mencionados.

Entre las formas de dosificación líquida para la administración oral se encuentran las emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la trimebutina y/o el analgésico derivado del opio, las formas de dosificación sólida pueden contener diluyentes inertes que normalmente se utilizan en la materia, como por ejemplo agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsificadores, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, acetato de etilo, alcohol bencílico, y similares. Las

suspensiones, además de la trimebutina y/o el analgésico derivado del opio pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitán y polietilensorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias y similares.

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles y fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para su reconstitución en dispersiones o soluciones inyectables estériles. Entre los ejemplos de portadores, diluyentes, solventes o vehículos líquidos se encuentra el agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerina, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes como por ejemplo los agentes dispersantes, emulsificantes, de humedad, y conservantes. Se puede asegurar la prevención de la acción de los microorganismos mediante varios agentes antifúngicos y antibacterianos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También sería conveniente la inclusión

59
222

de agentes isotónicos, como por ejemplo azúcares, cloruro de sodio, y similares.

Preferentemente, la composición se presenta en forma de dosificación por unidad. De esta forma, la preparación se divide en dosis por unidad que contienen las cantidades apropiadas de trimebutina y/o el analgésico derivado del opio. La forma de dosificación por unidad puede ser una preparación en paquete, dicho paquete contendrá cantidades discretas de la preparación, por ejemplo, tabletas en paquetes, cápsulas, y polvos en frascos o ampollas. La forma de dosificación por unidad también puede ser una tableta, sachet o cápsula en sí, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas empaquetadas. Algunos ejemplos de formas de dosificación por unidades son las tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, supositorios, soluciones y suspensiones orales acuosas o no acuosas, y soluciones parenterales empaquetadas en envases que contienen una unidad o un número mayor de unidades de dosificación y capaces de subdividirse en dosis individuales.

Las vías de administración son preferentemente la vía oral o parenteral y especialmente las vías inyectables entre las que se incluyen en particular la vía de inyección intravenosa y la vía

de inyección epidural. Sin embargo, cualquier vía que sea compatible como por ejemplo la vía subcutánea, intramuscular, intratecal, o intraperitoneal también pueden considerarse dentro del contexto de la presente invención.

Otra realización de la invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar el dolor y/o la nocicepción que comprende el hecho de administrar trimebutina y un analgésico derivado del opio a un paciente que necesita del mismo. Dentro del contexto de la invención, la administración de los dos compuestos puede ser simultánea, separada o secuencial.

El término "paciente" busca incluir a cualquier mamífero y especialmente a cualquier ser humano a quien se le administra la trimebutina y el analgésico derivado del opio.

Otra realización de la invención proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende trimebutina o sus estereoisómeros y un analgésico derivado del opio. Dicho proceso comprende la asociación de la trimebutina y el analgésico derivado del opio con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La información bioquímica y farmacológica que se reporta en los ejemplos permite una mejor comprensión del mecanismo de acción de la trimebutina en combinación con un analgésico derivado del opio. Apoya la suposición de que, además de los efectos de regulación de la motilidad colónica que ya se ha reportado anteriormente y que se había relacionado con sus leves propiedades opioides, la trimebutina se halla dotada de propiedades antinociceptivas dado el efecto de bloqueo ejercido en los canales de Na^+ . Estas nuevas propiedades de la TMB explican cómo el compuesto en combinación con un analgésico derivado del opio es un método útil para la prevención y/o el tratamiento del dolor.

En los ejemplos que se citan a continuación se revelará la presente invención en más detalle sin limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

Material y Métodos.

Animales.

55
225

Se utilizan en este experimento ratones Sprague-Dawley (IFFA Credo, Saint Germain sur l'Abressele, Francia), con un peso de 225-250 g (para los experimentos de unión de [^3H]-batracotoxina) o de 350-375g (para los experimentos de liberación de glutamato), o ratas embarazadas (para los experimentos electrofisiológicos) y se les brinda el cuidado de acuerdo con los lineamientos institucionales de bienestar animal: Temperatura $21 \pm 3^\circ\text{C}$; luz/oscuridad: 12h/12h.

Drogas y Medios.

Se sintetiza Trimebutina maleato, (S)-Trimebutina, (R)-Trimebutina de acuerdo con el proceso que se revela en la patente francesa FR 2.2369M (1962) y en la solicitud de patente japonesa publicada con el n° 16416 (1980) las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia.

Se obtiene flunarizina, ácido L-glutamático, hidrocloruro de lidocaína, bupivacaine, tripsina y DMEM-F12 en Sigma (St Quentin Fallavier, Francia), morfina en Francopia (Gentilly, Francia), veratridina en RBI, Bioblock Scientific (Illkirch, Francia), gentamicina en Boehringer Mannheim S.A. (Meylan, Francia). Todos los reactivos que se utilizan para la preparación de los

86/220
226

reguladores de pH y las soluciones son de grado analítico de Merck (Merck-Clevenot, Nogent sur Marne, Francia). Se sintetiza (S)-N-desmetil-TMB maleato de acuerdo con el proceso revelado en WO 99/01417 la cual se incorpora a la presente a modo de referencia.

El Ácido L-[G-³H]-glutámico (49 Ci/mmol), es de Amersham (Les Ulis, Francia). El medio Eagle modificado de Dulbecco; medio Neurobasal, "scrum" de feto de ternero se obtuvo de Gibco, Life Technologies S.A.R.L (Cergy Pontoise, Francia). El suero de caballo es de Seromed, (Berlín, Alemania)

EJEMPLO 1: Unión de [³H]-batracotoxina.

El objetivo de este ejemplo es determinar la afinidad de los compuestos probados a los sitios de unión de [³H]-batracotoxina en los sinaptosomas corticales de las ratas, representando el sitio 2 del canal de sodio.

1.1. Materiales y Métodos.

a) Membranas del sinaptosoma.

22287

Las cortezas cerebrales de los ratones Spargue-Dawley son homogeneizadas en un homogenizador de Teflón en 10 volúmenes de hielo 0,32M de sacarosa, 5mM K_2HPO_4 (pH 7,4 a 4°C). El material homogéneo se centrifuga a 1000g por 10 min; se deja en suspensión nuevamente este nuevo comprimido en un mismo volumen de sacarosa y se recentrifuga. Se descarta el nuevo comprimido y los dos sobrenadantes que se obtienen de las dos centrifugaciones son agrupadas y centrifugadas a 20.000 g por 10 min. El comprimido que se obtiene se deja en suspensión nuevamente en una solución reguladora de pH de prueba libre de sodio que contiene 50 mM HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), 5,4 mM KCl, 0,8 mM $MgSO_4$, 5,5mM de glucosa y 130 mM de cloruro de colina (pH 7,4 a 25°C)

b) Experimento de Unión.

Los ensayos de unión se inician mediante la adición de 150-200µg de una proteína del sinaptosoma a una solución reguladora de pH de prueba que contiene 25µg de veneno de escorpión (*Leireus quinquestriatus*), 0,1% BSA, 10nM de [^3H]-batracotoxina y varias concentraciones de drogas de prueba (el volumen final es 250µl). No se determina una unión específica en presencia de 0,3nM de veratridina. Se incuban las reacciones durante 30 min a 25°C y se

58
228

separa el ligando unido del libre mediante filtración por vacío a través de filtros GF/B (Filtermate, Packard). Se lavan los filtros con 2x5ml de una solución reguladora de pH (5mM HEPES, 1,8mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , 130mM de cloruro de colina, 0,01% de BSA; pH 7,4 a 25°C) y el ligando unido se estima por espectrometría de escintilación líquida (Topcount, Packard).

C) Cálculos.

En todos los experimentos en los que se examina el desplazamiento de la unión de [^3H]-batracotoxina mediante drogas sin rotular, las curvas que señalan la concentración-respuesta se generan utilizando seis concentraciones de drogas. Todos los ensayos se llevan a cabo al menos tres veces, y cada determinación se realiza en duplicado. La información se expresa con valores promedio $\pm$ SEM de al menos tres determinaciones. Las curvas de desplazamiento son medidas justas generadas por un Graph-Pad Software. Se analizan las líneas de desplazamiento mediante un análisis de regresión no lineal usando el programa de computación LIGAND (Mc Pherson, 1985). Estos análisis generaron un coeficiente(nH) Hill y valores IC_{50} . Los valores K_i se calculan a partir de los valores IC_{50} utilizando la relación de Cheng-Prusoff (1973).

54
229

1.2 Resultados.

Los resultados que aparecen en la Figura 1 (A) y (B) demuestran que la trimebutina, sus estereoisómeros y sus metabolitos desplazan a la [^3H]-batracotoxina de sus sitios de unión a los sinaptosomas corticales de los ratones con potencias que se encuentran entre aquellas del bupivacaine ($K_i = 7,14 \pm 0,96$) y las de la flunaricina ($K_i = 0,38 \pm 0,05 \mu\text{M}$). Para todos los compuestos, el desplazamiento de la [^3H]-batracotoxina es completo y el coeficiente de Hill calculado se halla cercano a 1 (fig.1).

La afinidad de la trimebutina se encuentra con $K_i = 2,66 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Para este compuesto, no es evidente estereoselectividad ya que los estereoisómeros correspondientes despliegan afinidades similares a aquellas de los compuestos racémicos. Los valores para los enantiómeros (S) y (R) son: $K_i = 3,31 \pm 0,36 \mu\text{M}$ y $K_i = 2,89 \pm 0,88 \mu\text{M}$ respectivamente.

Para Nor-TMB, los valores para los enantiómeros (S) y (R) son: $K_i = 0,80 \pm 0,04 \mu\text{M}$ y $K_i = 1,26 \pm 0,07 \mu\text{M}$, respectivamente.

230

Por lo tanto, el ejemplo presente demuestra que la trimebutina, la Nor-TMD y sus estereoisómeros correspondientes tienen afinidad por los sitios de unión de [^3H]-batracotoxina en la misma magnitud que el bupivacaine o la flunaricina, dos canales de bloqueo de sodio.

Ejemplo 2: Liberación de [^3H]-glutamato

El objeto de este ejemplo es determinar la capacidad de la trimebutina y sus metabolitos para inhibir la liberación de glutamato de rebanadas de la médula espinal de las ratas. Este ejemplo muestra que la trimebutina, sus metabolitos y sus correspondientes estereoisómeros inhiben la liberación de glutamato inducida por la veratridina *in vitro*. Se sabe que la veratridina induce la liberación de glutamato mediante la activación de los canales de Na^+ de tensión-dependientes, lo que lleva a una emanación de Na^+ con una consecutiva reducción del gradiente transmembrana (Wermelskirchen et al., 1992).

2.1 Materiales y Métodos.

a) Reguladores de pH.

Se preparan dos soluciones reguladoras de pH: una solución reguladora de pH de incorporación (solución de Krebs modificada: 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, 1 mM NaHCO₃, 11 mM D-glucosa, 67 µM EDTA, 1,1 mM de ácido ascórbico (pH 7,4) gasificado con 95% O₂ y 5% CO₂) y una solución reguladora de pH de superfusión idéntica a la solución reguladora de pH de incorporación salvo que se suprime el ácido ascórbico y el EDTA. Se diluyen los compuestos que van a probarse y la veratridina en esta solución reguladora de pH de superfusión.

b) *Rebanadas de la médula espinal de las ratas.*

Luego de decapitar a los animales, se separa un segmento de 15 cm de médula espinal lumbar después de una laminectomía lumbosacra y se lo sumerge en una solución de Krebs modificada por hielo con 95% O₂ y 5% CO₂. Luego de quitar la duramadre, se cortan todas las raíces ventrales y dorsales en la raíz de la zona de entrada. Las partes (bloques en forma de cubos de 250 µm) se preparan mediante la utilización de tres secciones sucesivas llevadas a cabo con una cortadora de tejido McIlwain.

c) *Experimentos de Superfusión.*

92
232/80

Se incuban las partes durante 5 min a 30°C en 5 ml de una solución reguladora de incorporación que se mantiene bajo oxigenación y que contiene 10 μ M de ácido L-glutámico y 4 μ Ci/ ml de ácido [^{3} H]-glutámico. Luego de la incubación, las partes se transfieren a cámaras de superfusión en un aparato de superfusión automático (Brandel). El aparato consiste en un dispositivo de 20 cámaras que permiten llevar a cabo 20 experimentos de forma simultánea y controlar la secuencia de los reguladores de pH utilizados en la superfusión mediante la programación de una computadora Apple IIe. Este sistema permite probar varios grupos experimentales de una vez (son 4 grupos de 5 cámaras). Después de un período de 45 min de lavado, a un ritmo de corriente de 0,5 ml/min, se agrega veratridina (40 μ M) por 5 min al medio de superfusión. Al momento de probar las drogas (trimebutina y sus estereoisómeros), estas se agregan al medio de superfusión 15 min antes y también durante la aplicación de veratridina. Fracciones de la superfusión que corresponden a 5 min se recogen durante los 30 min seguidos a la estimulación. Al final de la secuencia, se quitan las partes de las cámaras y se agregan 2,5 ml de líquido de escintilación (Hionic, Fluor, Packard) a las rebanadas y a cada una de las fracciones. La radioactividad se determina mediante escintilación líquida espectroscópica (Minaxi,

2338

Packard). Se supone que la emanación de radioactividad está lista principalmente para la emanación de [^3H]-glutamato (Turner y Dunlap, 1989).

d) *Análisis de la información.*

Todos los valores se expresan como la media $\pm$ SEM de al menos 5 determinaciones. La liberación de radioactividad para cada fracción se expresa como liberación fraccional calculada mediante la división de la radioactividad en cada fracción por la cantidad que queda en el filtro. La estimulación producida por la veratridina se cuantifica al acumular la liberación de radioactividad medida en las fracciones recogida luego de la estimulación. El efecto de los compuestos probados se evalúa en forma de porcentaje de inhibición comparando las cantidades totales de radioactividad liberada en las cámaras de control con aquellas liberadas en las cámaras que fueron superfusionadas con los compuestos de prueba. A partir de estos porcentajes de inhibición, los valores IC_{50} se calculan al alinear los valores de prueba de la inhibición versus los valores logarítmicos de las concentraciones. Los análisis estadísticos se realizan mediante la Prueba t no apareada de dos colas de Student. Las diferencias estadísticas se consideran significantes $P < 0,05$.

234225

2.2 Resultados

Los resultados que se aprecian en la Figura 2 demuestran que la trimebutina inhibió la liberación de glutamato inducida por veratridina dosis dependiente en concentraciones mayores a 60 μM (fig.2A). Además, entre el 50 y el 60% de la inhibición se puede alcanzar en concentraciones mayores a 100 μM . La (R)-trimebutina presentó un perfil similar al compuesto racémico mientras que la (S)-trimebutina presentó inhibición significativa a partir de la concentración de 3 μM (fig. 2*). El IC_{50} estimado es 15,2 μM para (S)-trimebutina, mientras que no pudo calcularse ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) para la trimebutina y para la (R)-trimebutina. Para la Nor-TMB y sus estereoisómeros (fig.2B), el efecto inhibitorio fue significativo ($p < 0,01$) a 3, 10 y 30 μM y el valor IC_{50} fue 8,4 μM . La (S)-Nor-TMB presentó una actividad ($\text{IC}_{50} = 6,3 \mu\text{M}$) similar a la del compuesto racémico y también a la del segundo enantiómero (R)-Nor-TMB ($\text{IC}_{50} = 16,3 \mu\text{M}$). Estos resultados concuerdan con los resultados de otros trabajos que reportan que los compuestos que desactivan los canales de Na^+ de tensión-dependientes previenen la liberación de glutamato inducida por veratridina *in vitro* e *in vivo* (Lees y Leach, 1993). De forma similar, el efecto de la TMB y compuestos relacionados sobre la liberación de glutamato

235 *BS*

inducida por veratridina se debe a sus actividades de bloqueo en los canales de sodio.

Cuando se evalúa el bupivacaine bajo las mismas condiciones experimentales (Fig. 2C), se puede estimar un valor IC_{50} de 8,2 μM .

Se halló que la morfina es inactiva en este paradigma de hasta 100 μM (fig. 2C). La falta del efecto de la morfina en este modelo sugiere que los efectos de la trimebutina sobre la liberación de glutamato no se deben a las propiedades derivadas del opio de los compuestos que se demostraron en estudios anteriores (Roman et al., 1987).

Los resultados demuestran de manera importante que la trimebutina despliega actividades mayores que el bupivacaine.

Este ejemplo es bastante importante dado el papel principal que tiene el glutamato y los aminoácidos de excitación (EAA) en la transmisión del mensaje nociceptivo y más particularmente en condiciones hiperalgésicas. En este sentido, el descubrir que la TMB y sus metabolitos pueden reducir las concentraciones extracelulares del glutamato al inhibir su liberación de las

23623

piletas presinápticas representa una propiedad emocionante de la trimebutina en el uso terapéutico como agente analgésico.

EJEMPLO 3: Experimentos electrofisiológicos.

El objeto de este ejemplo es el estudio de los efectos de la trimebutina y sus estereoisómeros sobre las corrientes de sodio.

3.1 Materiales y Métodos

a) *Neuronas DRG.*

Los experimentos en las corrientes de sodio se realizan con ganglios de las raíces dorsales de ratas cultivados (DRG) extirpados de embriones de 14-15 días. Los métodos para cultivar y aislar las células se derivan de aquellos que se describen en Valmier et al. (1989). Se matan las ratas Sprague-Dawley poniéndolas en una atmósfera de CO₂ durante 5-6 min. Se quitan entre tres y cinco embriones en forma aséptica y se los ubica en un plato de Petri que contiene el siguiente medio B suplementado con antibióticos (estreptomicina, 50 µg/ml; penicilina, 50 U/ml). El medio B contenía (en mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,4 Na₂HPO₄, 0,8 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 6 glucosa, 10 HEPES. Se quitan los ganglios de

GJ
2372

la espina dorsal de la médula espinal extirpada y se los asimila por 5 min en 2 ml del medio Eagle de Dubecco modificado con 0,1% de tripsina. Se disocian las células mecánicamente mediante pipetas de Pasteur lavadas a fuego y se las ubica en platos recubiertos con poliornitina-laminina. El medio de cultivo es el medio Neurobasal que contiene 0,5 mM de glutamina y 25 μ M de glutamato. Las células son incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Los experimentos electrofisiológicos se llevan a cabo desde 4-6 h hasta las 24h posteriores al recubrimiento.

b) Electrofisiología

Los experimentos con pinza de parche de célula completa convencionales se realizan a temperatura ambiente con un amplificador de pinza de parche EPC7 (List). Las neuronas DRG se bañan en un medio derivado de Hanks que contiene (en mM): 143 NaCl; 10 CaCl₂; 5,6 KCl, 2 MgCl₂, 5 de glucosa y 10 de HEPES, el pH se ajusta a 7,4 con NaOH (osmolaridad, 300-310 mosm/l). Para registrar la corriente de sodio, el calcio se reemplaza por Mg²⁺ en presencia de 10 mM de TEA (tetraetilamonio). Los electrodos parche que se utilizan para registrar las corrientes se rellenan con la siguiente solución salina (en mM): 140 CsCl; 1,1 EGTA (ácido etilenglicol-bis (éter β -aminoetílico) N, N, N', N-

238

tetraacético), 5 HEPES, 2 $MgCl_2$, pH ajustado a 7,2-7,3 con CsOH (osmolaridad, - 290 mosm/l) Los electrodos son jalados en 4 pasos de 1,5 mM de capilares vítricos (GC 150 TF, Clark Electromedical Instruments) utilizando un dispositivo jalador P87 (Sutter Instruments) y se limpian a fuego. La resistencia de punta es 2-3 MΩ.

Las drogas se disuelven en el baño (medio) (para las soluciones en reserva a $10^{-2}M$ en DMSO (dimetilsulfóxido)) y se aplican mediante expulsión por presión (Pneumatic Picopump PV820, WPI) desde las pipetas de vidrio (10-20 μm de diámetro límite) ubicadas a 50-60 μm de la célula registrada.

c) Cálculos

Se prueba la información a 2 kHz. El Software para la estimulación, adquisición y análisis se construye dentro de la casa. Las curvas de respuesta a las dosis se construyen con varias concentraciones de drogas separadas por periodos de lavado. Cada punto es el promedio $\pm SEM$ de 3 a 6 experimentos.

Los puntos experimentales se ajustan a la curva de Hill teórica utilizando el menor cuadrado del programa Minic: $y=1/(1+[X]^n)$

59
239233

$/IC_{50}^n$) donde y es la fracción de la corriente de Na^+ que persiste en presencia de la droga aplicada en concentración $[X]$, IC_{50} es la concentración de droga que bloquea la mitad de la corriente de Na^+ , y n es el coeficiente Hill que corresponde al número de drogas que se requieren para bloquear un canal de Na^+

3.2 Resultados

En la figura 3A se muestran los efectos de las 20 aplicaciones sucesivas de trimebutina a 0,1 y 1 μM en la corriente de sodio de una neurona DRG. En este ejemplo representativo, la TMB indujo un bloqueo de la corriente que asciende al 13 y 61% en 0,1 y 1 μM respectivamente. El bloqueo ocurrió sin evidenciar cambios en la corriente cinética (figura.3B) ni en la dependencia del voltaje (fig. 3C). La curva de respuesta a la dosis que se obtuvo al aplicar 0,01, 0,1, 1 y 10 μM de trimebutina se muestra en la figura 3(D) como una línea de la parte de la corriente que queda en presencia del bloqueador.

Los parámetros de inhibición que se calculan a partir de esta curva son: $IC_{50}=1,05 \pm 0,09$ Y $n_H 1,09 \pm 0,10$. Los parámetros calculados para la Nor-TMB son muy parecidos.

240

Se lleva a cabo un estudio cinético mediante la utilización de (R,S)-TMB. Utilizando (R,S)-TMB. El índice de desbloqueo K_{off} se determina por la constante de tiempo $\tau_{off} = 34 \pm 4$ s ($n=6$) de la recuperación exponencial del bloqueo: $K_{off}=1/\tau_{off}$ $29 \cdot 10^{-3} s^{-1} \mu M^{-1}$. Estos índices de reacción definieron a las 3 drogas como bloqueadores rápidos de los canales de Na^+ ; por ejemplo, $10 \mu M$ (R,S)-TMB bloquearon los canales con una constante de tiempo de 2,2s.

Esta información electrofisiológica confirma los resultados de la unión de [^3H]-batracotoxina (ejemplo 1) y la liberación de glutamato (ejemplo 2) al demostrar que la TMB, sus estereoisómeros bloquean en forma reversible las corrientes de sodio en las neuronas DRG con IC_{50} en $1 \mu M$. Dado que el coeficiente Hill es de 1 μM , el bloqueo pareció ocurrir de acuerdo con una simple reacción biomolecular, es decir, una molécula del bloqueador que interactúa en un sitio en el canal de Na^+ . Por lo tanto, el valor IC_{50} midió la constante de disociación KD de los bloqueadores.

De aquí que los efectos de la trimebutina y compuestos relacionados sobre las corrientes de Na^+ , la cual parece ser

24/2/83

responsable del efecto inhibitorio en la liberación de glutamato, indica un efecto terapéutico potencial de estos compuestos en el dolor.

Se sabe que los bloqueadores de los canales de sodio como por ejemplo las anestésicas locales bloquean la generación y la conducción de los impulsos nerviosos mediante la inhibición de la corriente a través de los canales de Na^+ de voltaje suprimido en la membrana celular (Strichartz and Ritchie, 1987). El efecto de la TMB y compuestos relacionados sobre las corrientes de Na^+ , la cual probablemente sea responsable del efecto inhibitorio en la liberación de glutamato, indica un efecto terapéutico potencial de estos compuestos en el dolor.

Ejemplo 4: Prueba del reflejo de la córnea en conejos.

El propósito de este ejemplo es demostrar las propiedades de anestesia local que posee la trimebutina o sus estereoisómeros comparado con un agente anestésico local como es la lidocaína.

4.1 Material y Método

a) Animales

5/2
242

Se utilizaron conejos blancos macho de Nueva Zelanda (CEGAV, Les Hauts Noës, Saint Mars d'Egrenne, Francia) con un peso de 1,9-2,7 kg. Los animales fueron alojados en jaulas ubicadas en una casa para animales con aire acondicionado (17-21°) con una humedad relativa que se mantuvo entre el 45% y el 65% y en un ciclo de día/noche artificial (12h-12H) con luz a las 7.30 a.m.

b) Prueba del reflejo de la córnea.

Las sustancias de prueba se administran como soluciones en agua estéril (Baxter, Maurepas, Francia). Las concentraciones de las sustancias de prueba se expresan como porcentaje (peso/volumen) de compuesto activo (forma base). Cada sustancia de prueba en cada una de sus concentraciones de prueba sobre los dos ojos de 5 animales (es decir, 10 medidas por sustancia y por concentración). El día que se realiza el estudio, se ubica a los animales en jaulas cerradas en un ambiente tranquilo. Luego de 20 o 30 minutos, se realiza una primera medición de la sensibilidad de la córnea. Se excluye de este estudio a cualquier animal que tenga insensibilidad en la córnea total o parcial. Inmediatamente después de tomar la primer medición, se aplican 2 x 50 µM de las sustancias de prueba o de su vehículo. Se procedió con las dos

243 ~~243~~

instilaciones de cada ojo con un minuto de intervalo. Posteriormente, la sensibilidad en la córnea se mide a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos después de las instilaciones, y luego a las 2, 3, y 4 horas después de las instilaciones. La sensibilidad en la córnea se mide tocando suavemente el centro de la córnea con un hilo de nilón con forma de rulo. (0,3 mm de diámetro). Para cada medición, esta operación se repite 10 veces a intervalos regulares de 2 segundos. Se anota el número de estimulaciones que produce un reflejo en la córnea para cada grupo y para cada ojo.

c) Análisis de la información

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del reflejo de la córnea calculado para cada grupo de 10 estimulaciones:

% de inhibición del reflejo de la córnea = $\frac{10 - \text{número de estimulaciones que llevan a un reflejo en la córnea}}{10} \times 100$

x10

Para cada grupo experimental, se determinan valores promedios. El efecto de los compuestos de prueba se comparan con aquellos del vehículo mediante la utilización de una Prueba U sin parámetros

244

de Mann-Withney en cada tiempo de la medición. Las áreas bajo curvas se calculan durante el período de los primeros 60 minutos que le siguen a la instilación para cada animal y cada concentración mediante el método trapezoide de Bourget et al., 1993. La potencia relativa de la TMB se compara a la del hidrocloreuro de lidocaína a partir de las áreas promedio respectivas bajo curvas mediante la utilización de un análisis de covarianza.

4.2 Resultados.

La TMB causó un efecto anestésico local dosis dependiente en la córnea de los conejos (fig. 4^a). Los primeros efectos significantes se obtuvieron con la concentración del 0,1% y duraron 20 min. Una instilación de un 0,3% o un 1% de TMB provocó una anestesia local completa que duró más de 60 minutos. Bajo las mismas condiciones experimentales, se encontró que la lidocaína (fig. 4B) era inactiva hasta llegar a una concentración de 0,3%. Con una concentración de un 6%, el efecto de anestesia fue completo sólo por 25 min y 60 min después de la instilación, ya no existía una inhibición en el reflejo de la córnea. Al comparar las áreas bajo la curva, se calculó que la TMB demostró tener una potencia 17 veces mayor que la lidocaína.

245/83

EJEMPLO 5: Hiperalgnesia inducida por PGE₂

El propósito de este estudio apunta a evaluar la actividad antihiperalgésica de la TMB, sus estereoisómeros y sus metabolitos en combinación con un analgésico derivado del opio en la hiperalgnesia inducida por Prostaglandina E2 (PGE) en la rata.

a) *Animales:*

Se prepara una solución de PGE₂ (1mg/ml) como una solución de almacenamiento en un 10% (v/v) de alcohol en solución salina estéril de apirógeno y se almacena a 4°C durante 4 días..

Se prepara una solución de PGE₂ (1µg/ml) en el momento dos veces al día en solución salina estéril y se inyectan 100 µM en la región subplantar en la pata izquierda de la rata, dos veces por día durante cuatro días. Con este protocolo, la hiperalgnesia se presenta por lo menos durante una semana posterior a la finalización durante 4 días de tratamiento.

A los animales que se hallan bajo control (del grupo de solución salina o naif) se les proporciona solución salina estéril en lugar de PGE₂ bajo las mismas condiciones experimentales.

246/240

Se mide la hiperalgesia con la prueba de Randall y Settillo (Randall y Settillo, 1957) mediante un analgesímetro (Ugo Basile). El analgesímetro es básicamente un dispositivo que ejerce una fuerza que se incrementa a un ritmo constante. La fuerza se aplica a la pata del animal la cual se apoya sobre un zócalo pequeño bajo un propulsor de forma cónica. El operador baja un interruptor de pedal para encender el mecanismo que ejerce la fuerza. El umbral de nocicepción se define como la fuerza, expresada en gramos, en el que la rata retrae la pata. El umbral se determina antes y después del tratamiento.

Las drogas se aplican por vía subcutánea, 30 minutos antes de la segunda determinación; los animales que estaban bajo control (el grupo tratado con solución salina y el grupo tratado con PGE_2) recibieron el vehículo apropiado sin droga bajo las mismas condiciones experimentales.

C) *Análisis de la información:*

La información se representa como el promedio $\pm$ SEM

El nivel de importancia estadística se determina mediante la prueba t de Student (Tallarida y Murray, 1987) para la muestra

242

apareada y las diferencias con $p < 0,05$ se consideran importantes estadísticamente.

El % de actividad analgésica o antinociceptiva se calcula de la siguiente manera:

Promedio del grupo tratado con PGE_2 después del tratamiento con drogas	Promedio del grupo vehículo/ PGE_2 después del tratamiento con el vehículo
-----X 100	

promedio del grupo vehículo/solución salina después del tratamiento con el vehículo	promedio del vehículo/ PGE_2 después del tratamiento con el vehículo
---	--

EJEMPLO 6: Mononeuropatía en ratas

El propósito del estudio apunta a evaluar la TMB, sus estereoisómeros y sus metabolitos en combinación con un analgésico derivado del opio en un modelo de neuropatía en ratones.

El Comité para la Investigación y Asuntos Éticos de la Asociación Internacional para el Estudio de Lineamientos Éticos sobre Dolores (IASP) se adhieren a estos estudios. En particular, la duración de los experimentos es lo más corta posible y se utiliza un mínimo número de animales.

a) Animales:

Se utilizan ratones Sprague-Dawley recién llegados (Charles River, Francia, denominación de la raza Crl:CD(SD)BR), n=45, con un peso de 175-200 g. Se ubican a los ratones en las instalaciones experimentales durante una semana previa a los experimentos. Se los mantiene en un ciclo de luz/oscuridad de 12h y tienen acceso libre a la comida de laboratorio estándar y al agua de la canilla a temperatura ambiente de 20-22°C.

b) Cirujía:

249 29
245

La mononeuropatía periférica unilateral se produce en el miembro posterior derecho de acuerdo con el método que se describe en Bennett y Xie, 1988 y en Attal et al., 1990. Se anestesian los ratones con pentobarbitona de sodio (Nembutal, 50 mg/kg i.p) Se expone el nervio ciático común mediante disección directa, a nivel del muslo medio; se ubican cuatro ligaduras (hilo de sutura crómico de 5-0, espacio aproximado de 1 mm) alrededor del nervio.

c) Prueba antinociceptiva:

Los experimentos se llevan a cabo en un ambiente tranquilo. No se aclimatiza a los animales de antemano a las situaciones de prueba. La persona que realiza el experimento no tiene conocimiento de la droga y mide las dosis que se utilizan. Cada animal recibe drogas sólo una vez y se lo utiliza para un sólo experimento. La acción antinociceptiva se determina mediante el umbral de vocalización provocado mediante la presión del nervio herido y la pata trasera contralateral con la utilización del analgesímetro de Ugo Basile (Comerio, Italia). Dicho instrumento genera una fuerza mecánica que aumenta en forma lineal aplicada por una punta plástica con forma de cúpula (diámetro = 1mm) en la superficie dorsal de la pata. La punta se ubica entre el tercer y

0

0

La información se expresa como promedio $\pm$ SEM. Las áreas bajo las curvas (AUC) se calculan mediante la regla trapezoide. La importancia estadística de la información se analiza mediante un análisis único de la varianza (ANOVA). La importancia que se observa se confirma luego con la prueba de Tukey. Se llevan a cabo regresiones simples (modelo lineal) a fin de establecer efectos de dosis dependencia. Los análisis estadísticos se llevan a cabo mediante un programa de computación estadístico (Stagraphics Plus, Manugistics, Rockville, MD). $P < 0,05$ es el criterio utilizado para la importancia estadística.

251 21 25

Referencias

Allescher HD, Ahmad S, Classen M y Daniel EE (1991) Interaction of trimebutine and JO-1196 (fedotozine) with opioid receptors in canine ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 257:836-842

Attal, N., Jazat, F., Kayser, V. Y Guilbaud, G., Further evidence for 'pain related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy, *Pain* 41 (1990) 235-251

Battaglia G y Rustioni A (1988) Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. *J Comp Neurol* 27: 302-312.

Bean BP, Cohen CJ and Tsien RW (1983) Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J Gen Physiol* 81: 613-642.

Bennett, G.J. y Xie, Y.K., A peripheral mononeuropathy in rats that produces disorders of pain sensation like those seen in man [see comments], *Pain*, 33 (1988) 87-107

252
91
26

Bourget P and Delouis JM (1993) Review of a technic for the estimation of area under the concentration curve in pharmacokinetic analysis. *Therapie* 48: 1-5

Bradette M, Delvaux M, Staumont G, Fioramonti G, Bueno L y Frenxinos J (1994) Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat: definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects. *Dig Dis Sci* 39:449-57

Bueno L, Honde C, Pascaud X y Junien JL (1987) Effects of orally versus parenterally administered trimebutine on gastrointestinal and colonic motility in dogs. *Gastrointestinal Clin Biol* 11: 90B-93B.

Calcutt, N.A., Jorge, M.C., Yaksh, T.L. y Chaplan, S.R., Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine, *Pain*, 68 (1996) 293-299

Cheng YC y Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction *Biochem Pharmacol* 22: 3099-4002.

253
83

Coderre TJ y Melzack R (1992). The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12: 3665-3670

Courteix, C., Eschallier, A. Y Lavarenne, J., Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain, *Pain*, 53 (1993) 81-88

Delis C, Walker EA, Castillo FD, Evans DF, Wingate DL, Allouche S y Van Egroo LD (1994) El efecto de un agonista derivado del opio y de la tensión en la actividad motora post-prandial en el intestino delgado en humanos. Semana de las enfermedades digestivas (a) Resumen AGA, Nueva York The effect of stress and opioid agonist on postprandial motor activity in the human small bowel Digestive disease week (a) Abstract AGA, New Orleans, USA (b) *Gastroenterology* 106: A 485

Dickenson AH (1995) Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anesthesia* 75: 193-200

Dray A, Urban L y Dickenson A (1994) Pharmacology of chronic pain, *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 190-197

254218

Frexinos J, Fioramonti J y Bueno L (1985) Effect of trimebutine on colonic myoelectrical activity in IBS patien. *Eur J Clin Pharmacol* 28: 181-185 .

Ghidini O, Saponati G e Intrieri L (1986) Single drug treatment for irritable colon: rociverine versus trimebutine maleate. *Curr Ther Res* 39: 541-548

Grandjouan S, Chaussade S, Couturier D, Thierman-Duffaud D y Henry JF (1989) A comparison of metoclopramide and trimebutine on small bowel motility in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 3:387-393

Julia V, Coelho AM, Rouzade MI, Allouche S y Bueno L (1996) Influence de la trimébutine (Débridat) sur l'hipomotricité colique et les crampes abdominales liées à la distension rectale chez le rat. *Med Chir Dig* 25: 239-242

Lees G y Leach MJ (1993) Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine (lamictal) using primary neuroglial cultures from rat cortex. *Brain res* 612: 190-199

Lütecke K (1980) A three part controlled study of trimebutine in the treatment of irritable colon syndrome. *Cur Med Res Op* 6:437-443 .

Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DJ y Frenk H (1993) Intrathecal treatment with dextrorphan or ketamine potently reduces pain-related behaviours in a rat model of peripheral mononeuropathy. *Brain Research* 605: 164-168

Mc Pherson GA (1985) Analysis of radioligand binding experiments: a collection of computer programs for the IBM PC. *J Pharmacol Methods* 14: 213-228

Meert TF y Melis W (1992) Interactions between epidurally and intrathecally administered sufentanil and bupivacaine in hidroxiopropil- β -ciclodextrin in the rat. *Acta Anesthesiol Belg* 43:79-89

Meunier P (1980) Effet de la trimébutine sur la motricité colique dans les colopathies. Resumen, *Gastroenterol Clin Biol* 4: 261A

Moshal MG y Herron M (1979) A clinical trial of trimebutine in spastic colon. *J Int Med Res* 7:231-234

256

256

Pascaud X, Roman F, Petoux F, Vauche D y Junien JL (1987) Action de la trimebutine sur la motricité gastro-intestinale. *Gastroenterol Clin Biol* 11:77B-81B

Randall, L y Selitto, J.L (1957) *Arch Int Pharmacodyn.* 4, 409-419

Rawal N (1990) Indications for the use of intraspinal opioids, in *Spinal Narcotics* (Rawal N and Coombs DW eds) pp 43-61, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Reboa G, Bertoglio C, Terrizzi A y Parody E (1976) L'azione della trimebutina sull'attività elettrica e manometrica del colon normale e patologico. *Riv Gastroenterol* 28: 1-16

Roman F, Pascaud X, Taylor JE y Junien JL (1987) Interactions of trimebutine with guinea pig opioid receptors. *J Pharm Pharmacol* 39: 404-407

Sanguinetti MC y Kass RS (1984) Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac purkinje fiber dihydropyridine calcium channels antagonists. *Circ Res* 55(3):336-348.

Schang JC, Devroede G yPilote M (1993) Effect of trimebutine on colonic function in patients with cronic idiopathic constipation: evidence for the need of a physiologic rather than clinicalselection. *Dis Colon Rectum* 36: 330-336.

Strichartz G y Ritchie J (1987) The action of local anaethetics on ion channels of excitable tissues in *Local Anaethetics Handbook of Experimental Pharmacology* (Strichartz G ed) pp 21-52, Springer-Verlag, Heidelberg.

Tallarida R.J y Murray R.B (1987) Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs

Taniyama K, Sano I, Nakayama S, Matsuyama S, Takeda K, Yoshihara C y Tanaka (1991) Dual effect of trimebutine on contractility of guinea pig ileum via the opioid receptors. *Gastroenterology* 101: 1579-1587.

Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M., Hebden, R.A. y Bennet, T., Functional consequences of streptozocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system, *Pharmacol Rev*, 44 (1992) 103-150.

Toussaint J, Cr mer M y Pintens H (1981) Etude en simple aveugle de trimébutine et de la m b v rine dans le c lon irritable et la dyspepsie *Acta Ther* 7:261-268

Triggle DJ (1997) Stereoselectivity of drug action [revisión]. *Drug Discovery Today* 2:138-147.

Turner TJ y Dunlap K (1995) Prolonged time course of glutamate release from nerve terminals: relationship between stimulus duration and secretory event. *J Neurochem* 64: 2022-2033.

Urban L, Thompson SWN y Dray (1994) Modulation of spinal excitability: co-operation between neurkinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 17(10): 432-438.

Valmier J, Simmoneau M y Boisseau S (1989) Expression of voltage-dependent sodium and transient potassium currents in an identified subpopulation of dorsal root ganglion cells acutely isolated from 12-day-old mouse embryos. *Pfugers Arch* 414:360-368.

Wermelskirche D, Wilffert B y Peters TJ (1992) Veratridine-induced intoxication: an in vitro model for the characterization

of anti-ischemic compounds. *Basic Clin Physiol Pharmacol* 3:293-321

Reivindicaciones

1. Un producto que comprende trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato], sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio.
2. Un producto de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque los compuestos pueden utilizarse en forma simultánea, separada o secuencial en el tratamiento y/o la prevención del dolor y/o la nocicepción.
3. Un producto de acuerdo con la reivindicación 1, 17 o 25 caracterizado porque el analgésico derivado del opio se selecciona de la morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, onixmorfona, alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sulfentanil, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina o sales aceptables de los mismos.
4. Un producto de acuerdo con la reivindicación 3 caracterizado porque el analgésico derivado del opio es morfina o una sal aceptable de la misma.


SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1.991

5. Una composición farmacéutica que comprende trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato], o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio con al menos un excipiente o portador farmacéutico.
6. Uso de trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato], N-desmetil trimebutina, o sus estereoisómeros correspondientes y un analgésico derivado del opio para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor y/o la nocicepción.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 para la administración simultánea, separada o secuencial en el tratamiento y/o prevención del dolor y/o la nocicepción.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor agudo.


SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1.991.

92
262

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor inflamatorio.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor crónico.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la trimebutina se administra en dosis entre 50 y 900 mg/día y preferentemente entre 300 y 600 mg/día.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque el analgésico derivado del opio se administra en dosis entre 0,01 y 250 mg/día lo cual depende del analgésico derivado del opio que se haya elegido.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la morfina se administra en dosis entre 2 y 220 mg/día.
14. Método para prevenir y/o tratar el dolor y/o la nocicepción que comprende la administración de trimebutina y un analgésico derivado del opio a un paciente que necesita del mismo.



SERGIO EZEQUIEL LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1-981

15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque la administración de trimebutina y del analgésico derivado del opio es simultánea, separada o secuencial.
16. Un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende trimebutina o sus estereoisómeros y un analgésico derivado del opio. Dicho proceso comprende la asociación de la trimebutina y el analgésico derivado del opio con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.


SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1.991

[Siguen cinco páginas con figuras numeradas del 1 al 4B]

RESUMEN

La invención proporciona una combinación de trimebutina [2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxi-benzoato hidrógeno maleato] o sus estereoisómeros correspondientes con un analgésico derivado del opio para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor o la nocicepción.

265 74 250

EL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL HA REVISADO LA TRADUCCION DE LAS REIVINDICACIONES DE ESTE DOCUMENTO Y ESTA CORRECTA

APOSTILLE
(CONVENCION DE LA HAYA DE 5 OCTUBRE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS

ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. FUE FIRMADO POR: ARACELI MATUS-SILVA

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO DE LA FLORIDA

4. LLEVA EL SELLO DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE LA FLORIDA

CERTIFICADO

5. EN TALLAHASSE, FLORIDA

6. EL VEINTIDOS DE ENERO DE 2001

7. POR EL SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE LA FLORIDA

8. NO. 2001-1235

FIRMA KATHERINE HARRIS
SECRETARIO DE ESTADO


SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1.991

1910
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

telom
m65816-2

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO CEESE PELA
LAS FUNCIONES DE LA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 MAR -6 A 1943

JEFE DE LEGALIZACION
SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.