

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 897**

21 Número de solicitud: 201400296

51 Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

27.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.09.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias s/n
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**CORDERO MORALES , Mario David;
BULLÓN FERNÁNDEZ , Pedro y
ALCOCER GÓMEZ , Elisabet**

54 Título: **Uso de la metformina y derivados con actividad como inductores de la fosforilación de AMPK para el tratamiento de la fibromialgia**

57 Resumen:

La presente invención tiene por objeto el uso de la metformina, derivados de la metformina y compuestos que contengan metformina con actividad como inductores de la activación de la fosforilación de AMPK para el tratamiento de la fibromialgia, reduciendo el dolor y depresión, así como parámetros biológicos disfuncionales.

El principal sector de aplicación es el farmacéutico y médico, mediante el desarrollo de comprimidos a dosis menores de las actuales para estos pacientes.

ES 2 546 897 A2

DESCRIPCIÓN

5 Uso de la metformina y derivados con actividad como inductores de la fosforilación de AMPK para el tratamiento de la fibromialgia

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención tiene por objeto el uso de la metformina, derivados de la metformina y compuestos que contengan metformina con actividad como inductores de la activación de la fosforilación de AMPK para el tratamiento de la fibromialgia, reduciendo el dolor y depresión, así como parámetros biológicos disfuncionales.

El principal sector de aplicación es el farmacéutico y médico, mediante el desarrollo de comprimidos a dosis menores de las actuales para estos pacientes.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 La fibromialgia es un síndrome de dolor crónico generalizado acompañado de otros síntomas como la depresión, ansiedad, fatiga o alteraciones del sueño. Su diagnóstico se realiza a partir de los criterios de clasificación establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (Wolfe et al., 1990) y no presenta alteraciones bioquímicas en ninguna prueba diagnóstica de rutina (Yunus et al., 1981), por lo que surge la necesidad de encontrar nuevos marcadores diagnósticos de la enfermedad. La prevalencia de la
25 fibromialgia en los países industrializados oscila entre el 2% y el 4% en la población siendo 11 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres (Lawrence et al., 2008), sin embargo los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad son aún desconocidos.

30 En los últimos años, nuevas investigaciones han aportado importantes datos para entender los mecanismos fisiopatológicos de la fibromialgia. Se ha determinado que diversas alteraciones en el metabolismo, transporte y recaptación de la serotonina (Cordero et al., 2011), así como en las citoquinas inflamatorias podrían tener un papel en la patogénesis de la fibromialgia (Cordero et al., 2013). Ningún medicamento ha mostrado una alta eficacia en el control de todos los síntomas de la fibromialgia, siendo una
35 combinación racional e individualizada de fármacos el tratamiento más adecuado de esta enfermedad. La medicación más usada en la actualidad para aliviar la sintomatología de la fibromialgia incluye analgésicos, ansiolíticos, antidepresivos tricíclicos y de otros tipos,

relajantes musculares, inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina, inductores del sueño no benzodiazepínicos, modificadores del metabolismo de la dopamina, etc. No obstante, aunque existe un amplio número de fármacos de prescripción destinados a aliviar los síntomas de la fibromialgia estos solo son altamente efectivos en un porcentaje bajo de los pacientes (alrededor del 20% de estos mejoran considerablemente), pero acompañados de numerosos efectos secundarios.

Desarrollar un nuevo fármaco puede llevar entre 10 y 17 años con un coste superior a los 800 millones de euros. Una vía más rápida para encontrar nuevos tratamientos contra una enfermedad consiste en descubrir potenciales nuevas funciones en viejos fármacos ya autorizados para otras enfermedades. Es el caso de la metformina, uno de los antidiabéticos más populares. La presente invención está basada en una nueva indicación para este viejo fármaco. La fibromialgia presenta una serie de características biológicas como estrés oxidativo, bajos niveles de ATP, disfunción mitocondrial, inflamación, baja biogénesis mitocondrial, y baja expresión de AMPK asociados a síntomas clínicos como el dolor, la fatiga, la depresión (Cordero et al., 2013a, 2013b). Todas las alteraciones descritas en la fibromialgia han sido restauradas mediante el tratamiento con metformina en células mononucleares y fibroblastos de pacientes con fibromialgia. Además, la metformina ha demostrado un fuerte efecto analgésico en otras patologías de dolor crónico como el dolor neuropático (Russe et al., 2013) o la adiposidad dolorosa (Labuzek et al., 2013). A ese respecto, nosotros hemos podido comprobar que tras la inhibición de AMPK mediante compuesto C (un inhibidor específico de la activación de AMPK) en ratones, estos presentaban síntomas propios de la fibromialgia como el dolor o la depresión. Estos animales, tras el tratamiento con metformina mostraron una recuperación en los síntomas (Ver figuras).

Por otro lado, otro de los parámetros encontrados en pacientes con fibromialgia es la activación del complejo inflammasoma (Cordero et al., 2013c) el cual, está relacionado con el dolor en ratones tras la inhibición de AMPK (Ver figuras). El inflammasoma es un grupo de proteínas que participan en el sistema de detección y erradicación intracelular, siendo un aspecto fundamental del sistema inmune innato. Los modelos animales relacionados con alteraciones moleculares del complejo inflammasoma son modelos genéticos y no existen referencias sobre su relación con el dolor generalizado. La metformina ha demostrado una inhibición del inflammasoma en las células de pacientes con fibromialgia así como en los ratones con AMPK inhibido.

Por tanto, la metformina actúa activando el AMPK con las consecuentes reducciones de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e inflamación, así como activación de la síntesis de ATP y biogénesis mitocondrial en la fibromialgia, y controlando los síntomas asociados a la fibromialgia. EN la actualidad, se han descrito nuevas funciones de la metformina, gracias a estas habilidades, que han servido para el tratamiento de otras patologías diferentes a la Diabetes tipo II, como el síndrome metabólico (WO/2013/159190), Distrofia Miotónica tipo 1 (20130085169), enfermedades autoinmunes (1020130031229), Cáncer (20120220664).

Es de gran importancia el hecho de que la metformina sea una droga que ya está comercializada, ya que ha pasado la fase I clínica satisfactoriamente y ha sido aprobada para su uso en humanos por su seguridad. Por tanto, si se decidiera utilizarla para otra indicación terapéutica, se conseguiría alcanzar la fase clínica de desarrollo en un tiempo mucho más corto que los modelos tradicionales basados en nuevas entidades químicas de largo desarrollo preclínico. Nosotros proponemos utilizar la metformina como fármaco para la fibromialgia permitiendo, según nuestros datos, su uso a dosis reducidas respecto a su uso en la Diabetes tipo II.

La metformina cuenta con una amplia variedad de formas en venta que han demostrado seguridad en los pacientes:

COMPETACT Comp. recub. con película 15 mg/850 mg

DIANBEN Comp. recub. con película 850 mg

DIANBEN Polvo para sol. en sobres 850 mg

DIANBEN Polvo para sol. oral en sobres 1000 mg

EFFICIB Comp. recub. 50 mg/1000 mg

EUCREAS Comp. recub. con película 50 mg/1000 mg

EUCREAS Comp. recub. con película 50 mg/850 mg

GLUBRAVA Comp. recub. con película 15 mg/850 mg

ICANDRA Comp. recub. con película 50/1000 mg

ICANDRA Comp. recub. con película 50/850 mg

JANUMET Comp. recub. con película 50 mg/1000 mg

JENTADUETO Comp. recub. con película 2,5/850 mg

KOMBOGLYZE Comp. recub. con película 2,5/1000 mg

KOMBOGLYZE Comp. recub. con película 2,5/850 mg

METFORMINA ACTAVIS Comp. recub. con película 850 mg

METFORMINA ADLER-APOTHEKE Comp. recub. con película 1000 mg

METFORMINA ADLER-APOTHEKE Comp. recub. con película 850 mg

METFORMINA ALDO-UNION Comp. recub. con película 850 mg

- METFORMINA ALMUS EFG Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA APOTEX Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA AUROBINDO Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA BLUEFISH Comp. recub. con película 850 mg
- 5 METFORMINA CINFA EFG Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA COMBIX Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA DAVUR Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA DRAGENOPHARM Comp. recub. con película 1000 mg
- METFORMINA DRAGENOPHARM Comp. recub. con película 850 mg
- 10 METFORMINA EDIGEN Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA KERN PHARMA Comp. recub. con película 1000 mg
- METFORMINA KERN PHARMA EFG Comp. recub. con película 850 mg
- METFORMINA MYLAN Comp. recub. con película 1000 mg
- METFORMINA MYLAN Comp. recub. con película 850 mg

15

Bibliografía

- Cordero MD, de Miguel M, Moreno-Fernández AM. Mitochondrial dysfunction in fibromyalgia and its implication in the pathogenesis of disease. *Med Clin (Barc)*. 2011 Mar 12;136(6):252-6.
- 20 Cordero MD, Díaz-Parrado E, Carrión AM, Alfonsi S, Sánchez-Alcazar JA, Bullón P, Battino M, de Miguel M. Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in fibromyalgia? *Antioxid Redox Signal*. 2013a Mar 1;18(7):800-7.
- Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Culic O, Carrión AM, Alvarez-Suarez JM, Bullón P, Battino M, Fernández-Rodríguez A, Sánchez-Alcazar JA). Can Coenzyme Q10
- 25 Improve Clinical and Molecular Parameters in Fibromyalgia? *Antioxid. Redox. Signal*. 2013b. 19:1356-61.
- Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Culic O, Carrión AM, de Miguel M, Díaz-Parrado E, Perez-Villegas EM, Bullon P, Battino M, Sánchez-Alcázar JA . NLRP3 Inflammasome is activated in Fibromyalgia: the effect of Coenzyme Q10. *Antioxid Redox Signal*. 2012c.
- 30 doi:10.1089/ars.2013.5198.
- Labuzek K, Liber S, Suchy D, Okopień BA. A successful case of pain management using metformin in a patient with adiposis dolorosa. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013 Jun;51(6):517-24.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 2008;58:26-35.

Russe OQ, Möser CV, Kynast KL, King TS, Stephan H, Geisslinger G, Niederberger E.
5 Activation of the AMP-Activated Protein Kinase Reduces Inflammatory Nociception. *J Pain*. 2013 Nov;14(11):1330-40.

Wolfe F et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 160-172.

10 Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, et al. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum* 1981; 11:151-71.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 Figura 1: Niveles de síntesis de ATP intracelular en células mononucleares de sangre (BMCs) de pacientes con fibromialgia tras el tratamiento con metformina

Figura 2: Niveles de producción de radicales libre de oxígeno (ROS) en BMCs de pacientes con fibromialgia tras el tratamiento con metformina.

Figura 3: Niveles séricos de IL-1 β (a) e IL-18 (b) en sobrenadantes de las células de
20 pacientes tratadas con metformina (pg/ml).

Figura 4: Niveles de protección de la metformina tras la exposición de fibroblastos de pacientes con fibromialgia a peróxido de hidrógeno. %muerte celular.

Figura 5: Niveles de síntesis de ATP intracelular en células mononucleares de sangre (BMCs) del modelo experimental por inhibición de la fosforilación de AMPK tras el
25 tratamiento con metformina

Figura 6: Niveles de citrato sintasa (masa mitocondrial) en el modelo experimental por inhibición de la fosforilación de AMPK (Actividad enzimática) y tras el tratamiento con metformina.

Figura 7: Niveles séricos de peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo en
30 el modelo experimental por inhibición del AMPK y tratamiento con metformina (nMol/ml).

Figura 8: Niveles séricos de IL-1 β (a) e IL-18 (b) en sueros de ratones a los que se les inhibió la fosforilación de AMPK y tras el tratamiento con metofibromialgiaina (pg/ml).

Figura 9: Evaluación nociceptiva del modelo (latencia en segundos). Porcentaje de animales con dolor.

Figura 10: Evaluación de depresión (tiempo de inmovilidad, segundos). Porcentaje de animales con síntoma.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La fibromialgia es una enfermedad caracterizada por dolor crónico de gran prevalencia siendo casi un 5% de la población mundial (Lawrence et al., 2008). El estudio de los mecanismos moleculares del dolor, y más concretamente de la fibromialgia constituye uno de los retos de la ciencia, y por tanto para la industria farmacéutica en su misión de desarrollar fármacos cada vez más eficaces para su abordaje. Mediante los estudios en muestras biológicas procedentes de pacientes con fibromialgia, se han demostrado numerosas alteraciones asociadas a la fisiopatología de la fibromialgia como ya hemos descrito. La metformina ha demostrado un importante potencial para la restauración de estas alteraciones, siendo por ello objeto de nuevas funciones en otras patologías por las que ha generado patentes, enumeradas en el apartado anterior.

Nuestra invención ofrece un nuevo uso de un fármaco ya conocido, que ha pasado las fases clínicas que demuestran su seguridad, y que a dosis reducidas respecto a las de uso en la Diabetes tipo II que ofrecen nuevo y efectivo tratamiento para la fibromialgia. Su puesta en el mercado sería en poco tiempo a que solo habría que preparar comprimidos de menor dosis, y su efectividad en cuanto al dolor para la fibromialgia viene acompañada de la mejora de otros síntomas, eliminando aquellos efectos secundarios adscritos a los tratamientos comunes a la fibromialgia y con baja efectividad como el estrés oxidativo o la disfunción mitocondrial. Además, la metformina y compuestos inductores de AMPK son moléculas pequeñas, lo que le confieren características idóneas para su conjugación en vehículos como nanopartículas o liposomas de cara a su direccionamiento a diferentes tejidos. Por otro lado, podrían ser aplicadas mediante inyectables en pacientes con dificultades digestivas. La metformina es además, una molécula pequeña lo que es idóneo para el desarrollo de fármacos a partir de metformina con otras moléculas que ayuden a la mejora de su función en la patología como antioxidantes o aminoácidos que potencien su efecto, así como coadyuvantes que mejoren la disponibilidad biológica del principio activo.

La metformina ha demostrado su seguridad en pacientes con diabetes mellitus tipo II, así como nuevas funciones que se están desarrollando en la actualidad, por su efecto en la activación del metabolismo, vía AMPK, induciendo la baja de peso del paciente. Su mínima dosis de uso es un comprimido al día de alguna de sus formas comerciales que son 850mg o 1000mg. En nuestros estudios hemos comprobado que a niveles por debajo de la dosis de uso normal, la efectividad es significativa. Este efecto puede ser extrapolable a cualquier composición que contenga metformina, así como inductores de la fosforilación de AMPK, siendo este, el eje central del mecanismo terapéutico de la metformina y compuestos inductores de AMPK en la fibromialgia.

- 5
- 10 Para estudiar el papel de la fosforilación de AMPK en pacientes con fibromialgia, se indujo la activación de AMPK en BMCs de 20 pacientes con metformina, un potente estimulador de AMPK. Después de este tratamiento, en las BMCs de los pacientes se mostró una recuperación importante de los niveles de ATP (Figura 1) y una disminución de ROS mitocondrial (Figura 2) e interleuquinas del inflammasoma IL-1 β and IL-18 (Figura 3), ambas alteraciones comunes que normalmente se encuentran en el BMCs de los pacientes con fibromialgia (Cordero et al., 2013b). Por otro lado, la metformina proporciona un efecto protector a las células de pacientes con fibromialgia sometidas a factores estresantes como el estrés oxidativo. Fibroblastos de pacientes con fibromialgia muestran un incremento de la muerte celular al ser sometidas a bajas dosis de peróxido de hidrógeno, mientras que al ser cometidas al mismo y añadiendo metformina, la muerte celular era reducida importantemente (Figura 4).
- 15
- 20

- La metformina ha demostrado también tener un efecto en los síntomas inducidos por la deficiencia de la activación de AMPK. Para ello, un modelo ha sido desarrollado en ratones no cosanguíneos de la cepa Swiss de 2-3 meses de edad, mediante la inducción de una deficiencia de la activación de AMPK por administración de compuesto C — (6-[4-(2-Piperidin-1-il-etoxi)-fenil]]-3-piridin-4-il-pirazol [1,5-a] pirimidina,, un potente inhibidor de la fosforilación del AMPK. Los ratones inyectados intraperitonealmente 1 veces al días, siendo la dosis final diaria de 20 mg/Kg/día. Otro grupo de ratones recibió el tratamiento de compuesto C además de metformina. El tratamiento se realiza hasta el día del sacrificio de los animales. La inhibición de AMPK indujo en los ratones alteraciones propias de la fibromialgia que fueron restauradas por la metformina como déficit de ATP (Figura 5) y citrato sintasa (masa mitocondrial) (Figura 6), peroxidación lipídica (Figura 7), así como activación de las interleuquinas del inflammasoma IL-1 β and IL-18 (Figura 8).
- 25
- 30

- Tras los cinco primero días de administración de compuesto C, se realizaron determinaciones conductuales para evaluar los síntomas. El test de placa caliente
- 35

muestra una disminución de la latencia de respuesta al estímulo térmico tanto a temperaturas no dolorosas ($T^a < 50^{\circ}\text{C}$) como dolorosa ($T^a > 50^{\circ}\text{C}$), lo cual refleja alodinia e hiperalgesia respectivamente un incremento de dolor en los ratones tratados con compoound c (Figura 9). Otro síntoma asociado con el dolor en la fibromialgia es la depresión. Ratones tratados con compuesto C, además de mostrar dolor generalizado, al ser evaluados mostraron depresión, usando la prueba de suspensión de la cola, mostraron mayor parálisis a lo largo de la prueba, un rasgo que se considera refleja depresión (Figura 10).

10 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

Con el fin de evaluar el efecto de la metformina en modelos in vitro de fibromialgia, usaremos células mononucleares aisladas de pacientes con fibromialgia y mantenidas en condiciones de cultivo, con medio RPMI al 10% de suero y 5% de CO_2 . Paralelamente, se usaran fibroblastos de piel, aislados de pacientes con fibromialgia y mantenidos en cultivo con medio DMEN al 20% de suero y 5% de CO_2 . Estos cultivos nos permitirán evaluar la toxicidad de diferentes dosis de metformina y compuestos inductores de la fosforilación de AMPK mediante la cuantificación de apoptosis y crecimiento celular por conteo de núcleos de células vivas. Una vez encontrada la dosis idónea de trabajo, por debajo de 5mM, podremos cuantificar la protección frente a estímulos estresantes con el efecto de peróxido de hidrógenos, un radical libre muy potente. Por citometría de flujo, se evaluará la producción de ROS antes y después del tratamiento por debajo de 5mM. Otros parámetros a esas dosis a cuantificar serán el ATP, mediante luminometría, citrato sintasa como marcador de masa mitocondrial, mediante espectrofotometría de cinética enzimática, interleuquinas inflamatorias mediante ELISA.

Con el fin de seguir el efecto de la metformina en un modelo in vivo de déficit de AMPK, usaremos ratones a los que se les administrará compuesto C, un inhibidor específico de la fosforilación de AMPK, en el tiempo, y se realizará una caracterización conductual de los ratones una semana antes de comenzar las administraciones de compuesto C, así como 7, días después de la primera administración. Este diseño experimental nos dará una visión de cómo la metformina inhibe los efectos inducidos por el déficit de AMPK y su influencia en la conducta de los ratones, siguiendo con especial interés las pruebas que delaten una alteración de la nocicepción (hot plate, dolor visceral [J Neurochem (2007) 103:2629-39] y dolor muscular [J Neurosci (2007) 27:10000-6]). Antes de comenzar la

administración de compuesto C y metformina y posteriormente a las pruebas de conducta dolorosa se complementarán con otros test conductuales que denoten otros síntomas que presentan los enfermos de fibromialgia:

Test de depresión: Suspensión por el rabo, natación forzada.

- 5 Tras acabar el tratamiento con compuesto C y metformina, los ratones serán sacrificados y se obtendrán:

Sangre: La sangre será el punto de partida para obtener suero o bien aislar leucocitos. En el suero se realizarán medidas de glucosa, triglicéridos, colesterol, lactato, proteínas, potencial redox, proteína oxidada, etc. En los leucocitos se medirá ATP, interleuquinas inflamatorias, estrés oxidativo, masa mitocondrial.

10

Músculo esquelético estriado: En las necrosias de músculo se realizarán mediciones de ATP, interleuquinas inflamatorias, actividades mitocondriales, actividad citocromo c oxidasa y morfología y número de mitocondrias.

15

En pacientes, es posible el uso para evaluar sus efectos en la fibromialgia mediante dosis por debajo de su uso en la diabetes. La evaluación del paciente antes y después del tratamiento con metformina de 200 a 400 mg diarios sería posible mediante test de impacto de la fibromialgia, escalas visuales de dolor, test de depresión de Beck, etc.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la metformina, derivados o compuestos que contengan metformina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibromialgia y sus síntomas, mediante comprimidos que la contengan en dosis reducidas, en un intervalo de 200 a 400mg diarios
- 10 2. Uso de compuesto derivados de la metformina con potencial inductor de la fosforilación de AMPK para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la Fibromialgia y sus síntomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
- 15 3. Uso de la la metformina, derivados o compuestos que contengan metformina con actividad como inductores de la fosforilación de AMPK para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibromialgia y sus síntomas, mediante inyectables, intravenosos o intramusculares, incorporado a un “vehículo” como nanopartículas o liposomas en terapia dirigida pasiva o activa, así como otros compuestos o coadyuvantes, que mejoren la disponibilidad biológica del principio activo o potencien su efecto, siendo la dosis final diaria de 200 a 400mg al día.

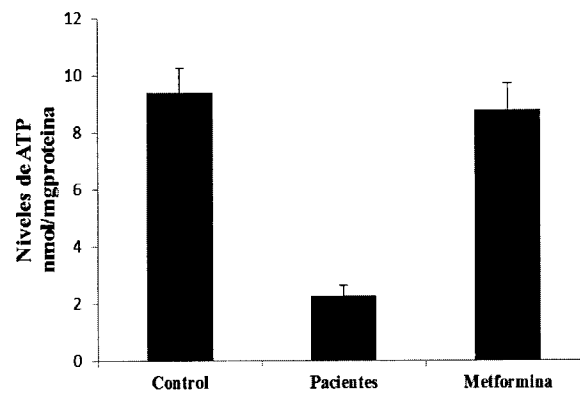


Figura 1

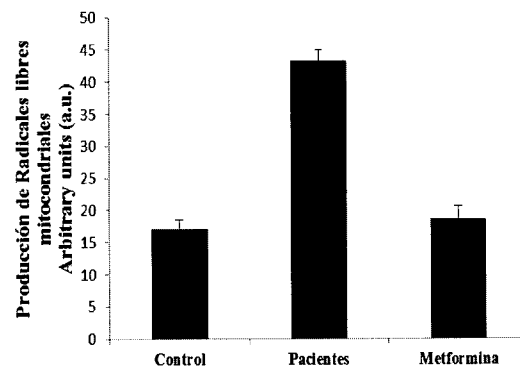


Figura 2

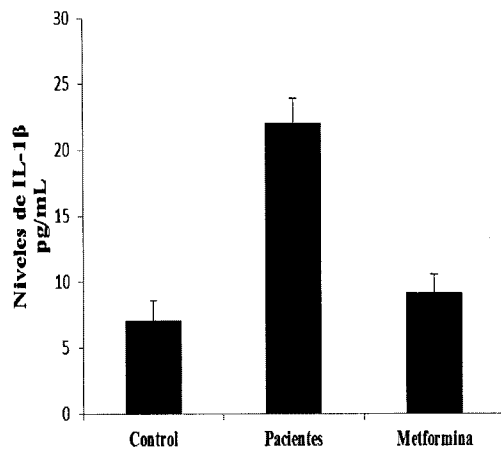


Figura 3A

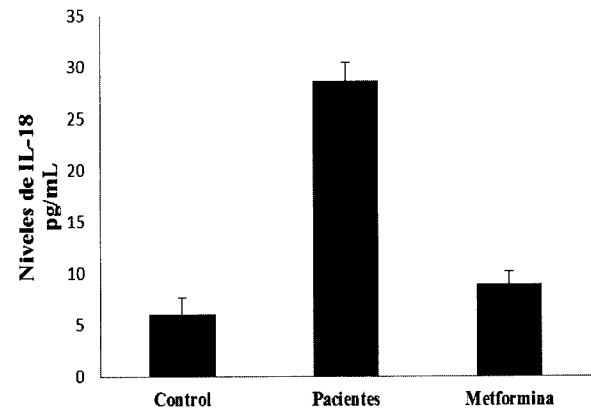


Figura 3B

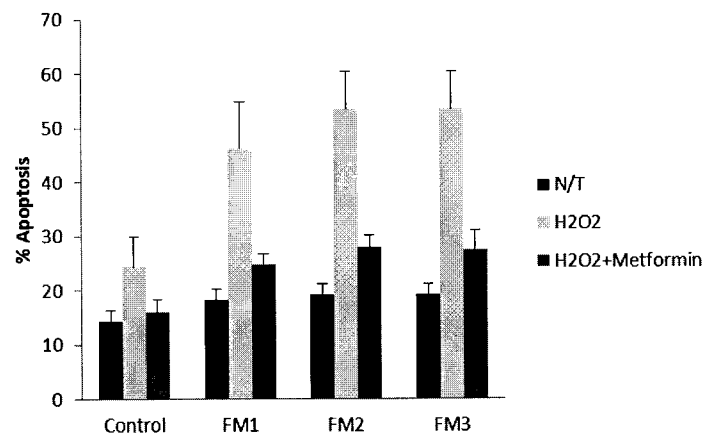


Figura 4

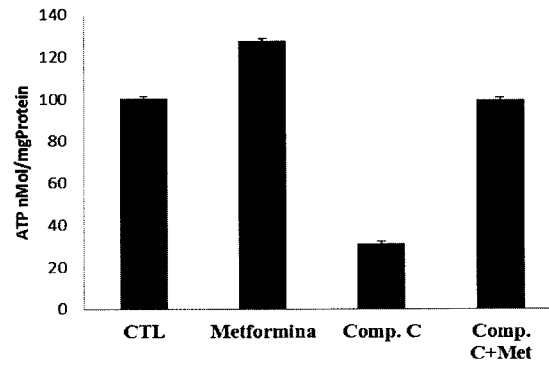


Figura 5

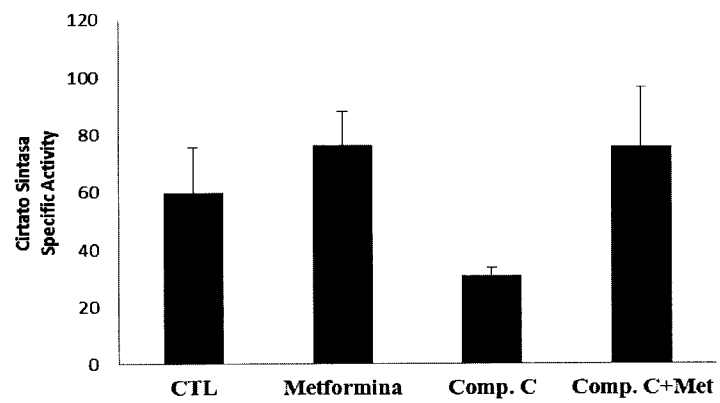


Figura 6

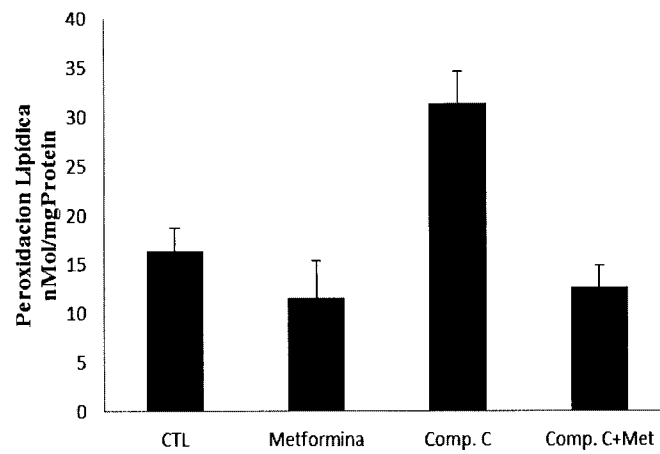


Figura 7

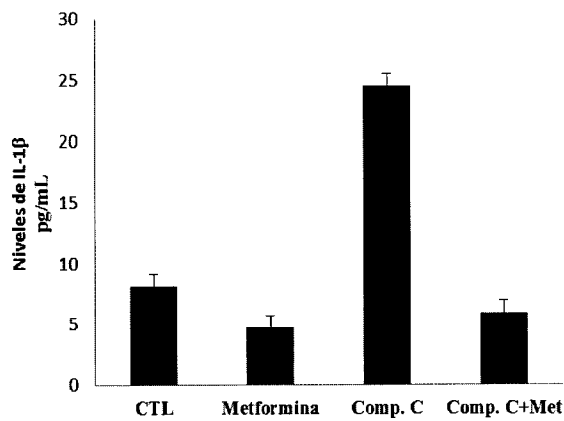


Figura 8.A

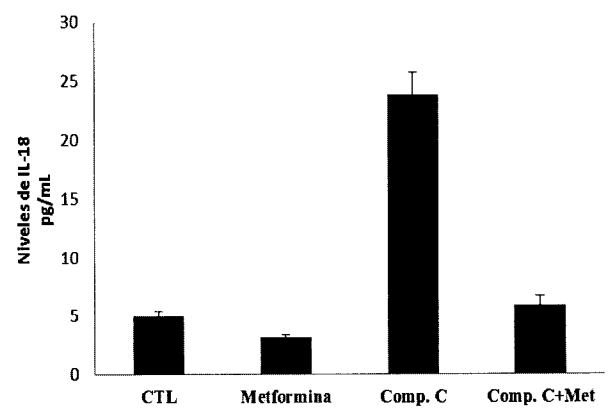


Figura 8.B

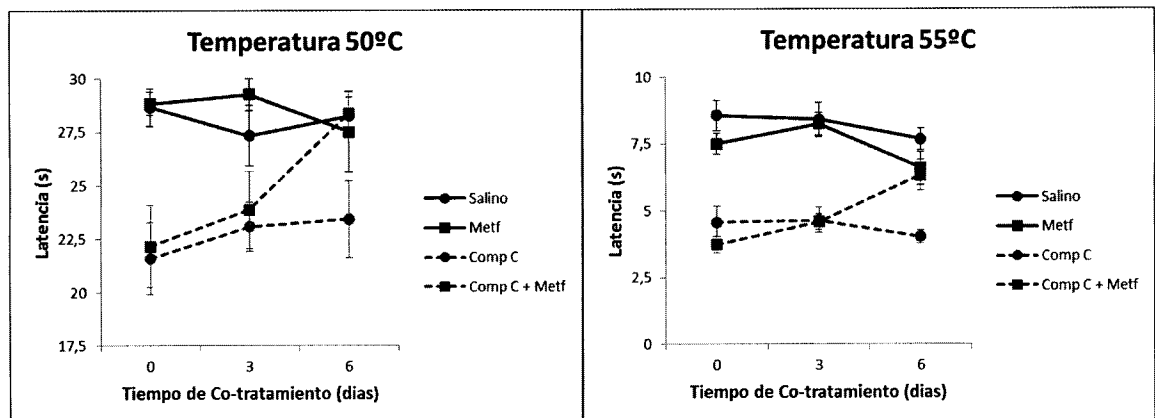


Figura 9

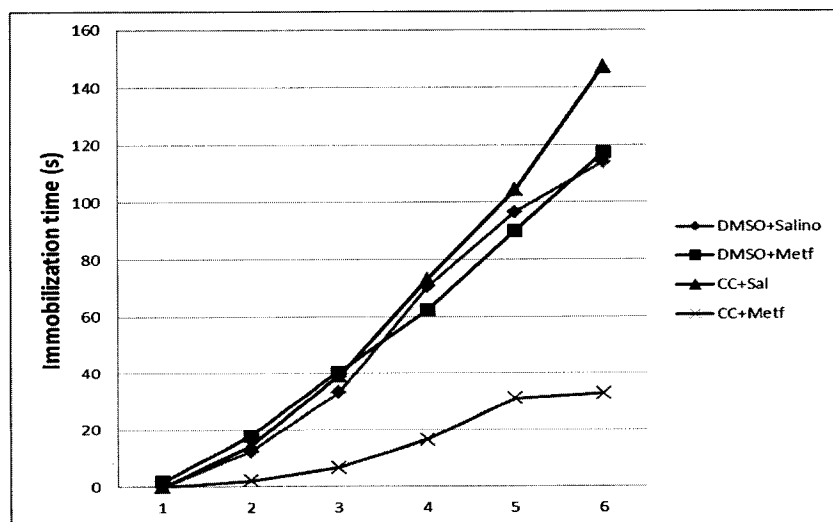


Figura 10