



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 721**

51 Int. Cl.:
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05756781 .0**
96 Fecha de presentación : **05.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1773332**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de fracturas óseas.**

30 Prioridad: **05.07.2004 KR 10-2004-0052069**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73 Titular/es:
DONG WHA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.
5, Sunhwa-dong, Jung-gu
Seoul 100-130, KR

72 Inventor/es: **Lee, J. S.;**
Ku, S. K.;
Lee, J. W.;
Yang, Hee Bog y
Ryu, Jei Man

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 359 721 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento de fracturas óseas

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere, en general, a una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de fracturas óseas y, más particularmente, a una composición farmacéutica que comprende N-hidroxi-4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina, 4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina o sales farmacéuticamente aceptables.

Técnica anterior

[0002] Una fractura ósea es una rotura o fisura en un hueso con la completa o incompleta interrupción de la continuidad del hueso, placa epifísea o superficie articular. Una fractura ósea está causada mayoritariamente por algún tipo de traumatismo en un hueso. Este traumatismo puede ocurrir como resultado de un accidente de un vehículo de motor, un accidente en el puesto de trabajo, abusos físicos, estrés repetitivo, tal como ejercicio, levantamiento de pesos, etc. Las actividades normales diarias pueden causar fracturas óseas en personas con enfermedades que debilitan los huesos, tales como la osteoporosis, cáncer de hueso, o anomalías metabólicas.

Según la línea de fractura (línea a lo largo de los extremos epifíseos generados tras la fractura), las fracturas óseas se clasifican en fracturas fisuradas, fracturas de greestick, fracturas transversales, fracturas oblicuas, fracturas espirales, fracturas segmentales, fracturas conminutas, fracturas por avulsión, fracturas por compresión, fracturas hundidas, etc.

[0003] En general, tras una fractura ósea, aparece una lesión de los vasos sanguíneos, provocando hemorragias parciales y coágulos sanguíneos. Además, la matriz ósea alrededor de la región de la fractura se rompe o perfora, con la muerte de osteocitos. Durante el proceso de curación de una fractura, por tanto, los coágulos sanguíneos y los osteocitos lesionados y la matriz ósea son eliminados por macrófagos a la vez que las células osteoprogenitoras del periostio y endostio alrededor de la región de fractura proliferan de forma activa para formar tejido celular alrededor de la región de fractura y, a continuación, se integran con la región de fractura. En el tejido conectivo de la región de fractura, surge un tejido óseo mediante osificación endocondral a partir de un pequeño fragmento de cartílago, o bien, se forma un hueso inmaduro mediante osificación intramembranosa. Por consiguiente, la osificación intramembranosa del tejido mesenquimal y la osificación endocondral se observan simultáneamente en el tejido conectivo de una región de fractura. La trabécula del hueso inmaduro formada irregularmente de este modo conecta temporalmente los extremos de los fragmentos de hueso fracturado, dando lugar a la formación de un callo óseo. EL hueso tejido del callo óseo formado en la región de fractura se resorbe gradualmente a medida que progresa el proceso de curación, y experimenta una reestructuración dando lugar al desarrollo de hueso lamelar.

[0004] Como regla, la curación de fracturas se divide ampliamente en tres fases: fase inflamatoria, fase de reparación ósea y fase de remodelación.

[0005] En la fase inflamatoria, tienen lugar respuestas inflamatorias, ya que se dañan los tejidos alrededor de una región de fractura y los hematomas rellenan el espacio de la fractura.

[0006] En la fase de reparación ósea, se elimina el hematoma del espacio de la fractura y se sustituye con tejido de granulación mientras se forma el callo blando. Según el mecanismo de osteogénesis, dos procesos ocurrían simultáneamente: osificación endocondral, en que el callo blando se remodela en callo duro y la osificación fibrosa/intramembranosa, en que se forma un nuevo hueso por las células osteogénicas.

[0007] En la fase de remodelación, el tejido óseo recién formado se extiende a lo largo del tiempo mediante la acción orquestada de la resorción ósea osteoclástica y la formación ósea osteoblástica, con la corrección de las distorsiones óseas y el refuerzo de los defectos óseos.

[0008] Durante la fase de remodelación, los pacientes con una fractura ósea realizan sus vidas sin una gran dificultad, ya que el hueso recién formado se ha endurecido en cierto grado, pero el tejido óseo naciente en la fase reparadora no está suficientemente duro para que los pacientes puedan desarrollar sus vidas diarias sin dificultad. Además, la fase de reparación es larga. De este modo, es clínicamente importante para un agente curativo de una fractura que tenga la función de acortar la fase de reparación, así como de regenerar un hueso fracturado a un hueso completo mediante la inducción del complejo proceso de reparación de fracturas.

[0009] Existen varios promotores para la curación de fracturas. Se ha observado que los péptidos que tienen

funciones fisiológicamente activas, tales como proteínas morfogénicas óseas (BMP) y factores de crecimiento transformantes (TGF), están implicados en el proceso de curación de fracturas (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, pp. 2220-2224 (1989)). Además, se ha estudiado que un incremento en el nivel de AMP cíclico intracelular por el uso de un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) puede conducir a un incremento en la masa ósea. Por ejemplo, se ha descrito que se observó que ratones, en los que se había inyectado subcutáneamente cada día el inhibidor de PDE general pentoxipilina o el inhibidor de PDE4 selectivo rolipram, presentaban una mayor densidad mineral ósea de las vértebras y el fémur y mostraron hiperplasia de huesos corticales (Bone, vol. 27., 6ª edición, pp. 811-817 (2000)).

5
10 **[0010]** Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha prestado mucha atención a la osteogénesis y el proceso de curación, se han realizado amplios estudios sobre procesos de curación de fracturas desde varios puntos de vista, incluyendo factores genéticos, influencia adolescente, efecto hematopoyético, efecto de integración, injertos óseos, otros factores de inducción de la curación, etc.. (Kawamura, M y Urist MR., Clin. Orthop., 236, 240-248, 1988).

15 **[0011]** La curación de las facturas requiere un periodo significativo de tiempo y los pacientes con osteoporosis tienden a sufrir más fracturas óseas con el incremento de edad de la población. Sin alcanzar la expectación de utilidad en la curación de fracturas, se observa que los agentes terapéuticos disponibles actuales para el tratamiento de la osteoporosis, tales como calcio, estrógeno, calcitonina, vitamina D activa, bisfosfonato, etc., únicamente disminuyen el riesgo de fractura mediante la obstrucción del descenso de densidad ósea, pero no presenta la función de unir huesos fracturados o de generar tejidos óseos. El mecanismo patogénico de la osteoporosis se puede explicar mediante una matriz ósea ligera resultante de un largo mantenimiento de homeostasis ósea negativa debido a las predisposiciones genéticas o constitucionales, osteogénesis por estancamiento con resorción ósea normal, y una mayor resorción ósea con osteogénesis normal. Los agentes terapéuticos para el tratamiento de la osteoporosis son, por lo tanto, ineficaces para el tratamiento de fracturas óseas ya que el mecanismo de curación es bastante diferente entre las fracturas y la osteoporosis.

25 **[0012]** Debido a la diferencia de mecanismo entre las fracturas y la osteoporosis, los agentes anti-osteoporóticos que presentan la función de inhibir la resorción ósea, pueden obstruir la formación ósea, retrasando en realidad de este modo el proceso de curación de la fractura. Por ejemplo, se ha descrito que el incadronato disódico, un agente bisfosfonato, retrasa la curación de la fractura en los fémures de ratas administradas con el mismo (Li C et al., J. Bone Miner Res. 2001 Mar; 16(3):429-36). También se ha descrito que mientras que el pretratamiento con incadronato no influye en la curación de fracturas hasta 16 semanas después de la fractura ósea, el tratamiento continuo con incadronato aumenta el callo óseo, pero da lugar a un retraso en el proceso de remodelación (Li J et al., J. Bone Miner Res. 1999 Jun; 14(6):969-79).

30 **[0013]** Se ha descrito que el bFGF, conocido como un biomarcador de la formación ósea muy asociado con la osteoporosis, no presenta una relación con la curación de fracturas (Xu et al., Chin. J. Traumatol. 6, 160-166, 2003).

35 **[0014]** Por estas razones, los agentes terapéuticos actualmente disponibles para el tratamiento de la osteoporosis no son adecuados para aplicar a fracturas óseas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de un agente curativo para fracturas óseas que tenga un gran efecto terapéutico en las fracturas óseas, independientemente de la asociación con la osteoporosis.

40 **[0015]** En el camino hacia la presente invención, el estudio intenso y profundo sobre la curación de fracturas realizado por los presentes inventores, dio lugar al hallazgo de que la N-hidroxi-4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina y la 4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina, desarrollados como un medicamento para el tratamiento de la osteoporosis por los presentes inventores (Publicación de Patente Coreana No Examinada No. 10-2003-8654 y WO03/007947), pueden aumentar la densidad ósea y la fuerza del callo óseo formado durante el proceso de curación de una fractura y pueden inducir la osificación endocondral y la osificación intramembranosa en tejido conectivo, mostrando de este modo efectos curativos excelentes en fracturas, a pesar de las grandes diferencias entre los mecanismos de la osteoporosis y las fracturas.

Descripción de la invención

55 **[0016]** Por consiguiente, la presente invención ha tenido en cuenta los problemas anteriores que aparecen en la técnica anterior y un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de fracturas óseas, que comprende N-hidroxi-4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina, 4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}-benzamidina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

60 **[0017]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar dichos compuestos o una sal farmacéuticamente

aceptable de los mismos, para su uso en el tratamiento de fracturas óseas.

Breve descripción de los dibujos

- 5 **[0018]** La figura 1 es una microfotografía que muestra muestras de tejido en tiras de la octava vértebra extraídas después de la inducción de la fractura, teñidas con tricromo de Masson.

Modo óptimo para llevar a cabo la invención

- 10 **[0019]** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de fracturas óseas, que comprende un compuesto de benzamidina representado por la siguiente fórmula química 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

Fórmula Química 1

15

20



en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo.

- 25 **[0020]** El compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 se puede utilizar en forma de sales farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica. Se prefieren sales por adición de ácido preparadas con ácidos libres farmacéuticamente aceptables. Los ácidos libres adecuados para su uso en la presente invención puede ser ácidos inorgánicos u ácidos orgánicos. Entre los ejemplos de ácidos inorgánicos se incluyen ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido sulfúrico, ácidos fosfórico, etc., y los ácidos orgánicos se pueden ejemplificar por ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido trifluoroacético, ácido metano sulfónico, ácido benceno sulfónico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido glucónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido 4-morfolin etano sulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-nitrobenzenosulfónico, ácido hidroxil-O-sulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido galactourónico, ácido embónico, ácido glutámico y ácido aspártico.

- 35 **[0021]** El compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 se puede preparar según procesos conocidos (Lee, Sung-Eun, Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB4 Related Disease, Busan National University, una tesis para el título de doctor, 1999. 8).

- 40 **[0022]** El término "fractura ósea", tal como se utiliza en la presente invención, significa una de varias lesiones físicas de un hueso, basadas en una interrupción completa o incompleta de la continuidad de un hueso, que se clasifican según la localización anatómica (epífisis, metáfisis, diáfisis, intraarticular, proximal, parte media, distal, etc., grado de la fractura (completa, incompleta), dirección de la fractura (transversal, oblicua, espiral, longitudinal), presencia de heridas abiertas (abierta, cerrada), número de fracturas (simple, lineal, segmental, conminuta, etc.), estabilidad de la fractura (estable, inestable), desplazamiento de la fractura, etc.

45

[0023] En comparación con un grupo no tratado, se observó que un grupo tratado con el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 según la presente invención, presentaba un callo óseo significativamente disminuido en volumen en un patrón dependiente con la dosis, pero aumentaba tanto la densidad ósea como la fuerza del hueso, de manera importante, en un patrón dependiente con la dosis ($p < 0,01$ o $p < 0,05$).

50

[0024] El tratamiento con el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 permitía que el callo óseo disminuyera significativamente en el tejido conectivo y en el tejido cartilaginoso, mientras que aumentaba el contenido de tejido óseo de manera importante ($p < 0,01$ o $p < 0,05$), en comparación en ausencia de tratamiento. Tanto la disminución en el tejido conectivo y tejido cartilaginoso como el aumento en tejido óseo son dependientes con la dosis.

55

[0025] Además, el número de osteoclastos en un callo óseo aumentaba significativamente tras el tratamiento con el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1, en comparación con la ausencia de tratamiento, en la fase temprana del proceso de curación de la fractura ($p < 0,01$), y el patrón de incremento era dependiente con la dosis.

60

[0026] En la fase tardía del proceso de curación de fracturas, un grupo tratado con el compuesto de benzamidina de

Fórmula Química 1 presentaba un callo óseo con un número de osteoclastos menor de manera importante, en comparación con un grupo no tratado ($p < 0,01$), lo cual indica que la osificación ya se estaba produciendo en un cierto grado.

5 [0027] En resumen, el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 es un agente curativo eficaz para las fracturas óseas, con las funciones de inducción de la pérdida y osificación del callo óseo formado durante el proceso de curación de fracturas. Con más detalle, el compuesto de benzamidina de la presente invención incrementa los componentes celulares del callo óseo en la fase temprana del proceso de curación de la fractura ósea e induce la osificación endocondral y la osificación intramembranosa en la fase tardía en el proceso de curación de la fractura ósea.

10 [0028] La composición de la presente invención puede comprender además por lo menos un ingrediente eficaz que tenga una función equivalente o similar con la del compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 o su sal farmacéuticamente aceptable.

15 [0029] La composición de la presente invención puede comprender además uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Un portador adecuado se puede seleccionar del grupo que consiste en solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, una solución de dextrosa, una solución de maltodextrina, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos, y se puede complementar adicionalmente, si es necesario, con otros aditivos habituales, tales como un antioxidante, una solución tampón, un agente estático, etc. En combinación con un diluyente, un dispersante, un tensoactivo, un aglutinante y un lubricante, la composición de la presente invención también se puede formular en formas de dosificación inyectables, tales como soluciones acuosas, suspensiones, emulsiones, etc., pastillas, cápsulas, gránulos y comprimidos. Además, dependiendo del tipo de ingrediente o enfermedad, la formulación se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica o tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Science ((última versión), Mack Publishing Company, Easton PA).

25 [0030] Según los objetivos, la composición de la presente invención se puede administrar oralmente o parenteralmente (por ejemplo, de manera intravenosa, subcutánea, intraabdominal o tópica). La cantidad de la dosis de la composición de la presente invención varía dependiendo del peso corporal, edad, género, estado de salud, dieta, periodo del tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción, gravedad de la enfermedad, etc. Cuando todos estos factores se tienen en cuenta, el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 se administra una vez o muchas veces en una dosis de aproximadamente 10 a 1.000 mg/kg por día, y preferiblemente en una dosis de aproximadamente de 50 a 500 mg/kg por día.

30 [0031] Para la prevención y el tratamiento de la lesión física del hueso que comprende la fractura, la composición de la presente invención se puede utilizar sola o en combinación con cirugía, terapia hormonal, terapia química y/o un controlador de la respuesta biológica.

35 [0032] Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se indican para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO: Efecto de la inducción de la curación de fracturas en modelo de rata inducido con una fractura de costilla

40 [0033] El compuesto benzamidina de Fórmula Química 1 se analizó por su efecto terapéutico sobre la fractura ósea en modelos de ratas sometidos a una fractura de costilla. Empezando desde 2 días después de la inducción de la fractura de costilla, se continuó la administración del compuesto de benzamidina durante una, dos, tres y cuatro semanas. Se observaron cambios en el peso corporal, ganancia de peso corporal, volumen del callo óseo, densidad ósea, fuerza del hueso, y la histopatología ósea.

50 1. Animales experimentales y organización de crianza.

[0034] Se adaptaron un total de 80 ratas S.D. (10 semanas de vida, BioGenomics, Corea) a un medio de laboratorio durante 12 días antes de ser utilizadas en los experimentos. Mientras se guardaban en una relación de dos o tres por jaula de plástico, los animales experimentales se mantuvieron en una habitación de crianza bajo temperatura controlada (20 a 25°C) y humedad (30 a 35%). Bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, a las ratas se les permitió el libre acceso a alimentos y agua corriente.

2. Preparación y administración de muestra

60 [0035] Se disolvieron completamente 10 mg y 50 mg de N-hidroxi-4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}benzamidina en 5 ml agua destilada esterilizada. El compuesto de benzamidina en las soluciones se

administró de forma oral en dosis de 10 mg y 50 mg por kg de peso corporal una vez al día durante una, dos, tres y cuatro semanas desde el día 2 de la intervención quirúrgica.

3. Inducción de la fractura de costilla

5

[0036] Todos los animales experimentales se anestesiaron con clorhidrato de quetamina y clorhidrato de xilazina y se sometieron a una operación para inducir una fractura en la octava y novena costilla. En este aspecto, las costillas se cortaron transversalmente con tijeras para operaciones. Después de inducir la fractura, las costillas fracturadas se ensamblaron para alinearse entre sí y se cerró la cavidad de la herida a través de la sutura de la piel.

10

4. Cambio en el peso corporal y ganancia de peso

[0037] En todos los animales experimentales se midió el peso corporal un día antes de la operación, el día de la operación, el día de la administración y los días 7, 14, 21 y 28 después de la administración. Con el fin de reducir la diferencia entre individuos debido a la ingesta de alimentos, todos los animales experimentales se privaron de alimento durante 18 horas o más en el día de la medición. Además, para minimizar la diferencia de cambio en el peso corporal de animales individuales, se calculó la ganancia de peso corporal durante los periodos de tiempo desde el día de la operación hasta los días 7, 14, 21 y 28 después de la administración.

15

20 **[0038]** Los resultados se proporcionan en la Tabla 1 siguiente.

TABLA 1

| Grupos experimentales | | Cambios en la ganancia de peso corporal (g) | | | |
|-----------------------------------|------------|---|-------------|-------------|-------------|
| | | Días después de la administración | | | |
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 18,80±12,07 | 40,20±25,07 | 63,40±15,68 | 71,60±15,82 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 16,00±13,55 | 44,40±14,54 | 46,40±22,39 | 61,20±22,81 |
| | 50 (mg/kg) | 14,80±08,81 | 36,82±29,52 | 68,60±16,65 | 84,40±23,37 |

[0039] Tal como se observa en la tabla 1, no se observaron cambios significativos en la ganancia de peso corporal en todos los periodos experimentales, indicando que prácticamente no había errores atribuibles a la administración de sustancias experimentales o diferencias individuales entre animales experimentales.

25

5. Volumen del callo óseo.

[0040] En el día del sacrificio, el callo óseo formado alrededor de las costillas octava y novena fracturadas se separó de los tejidos adyacentes y se extrajo de todos los animales experimentales. Se midieron los callos óseos sin núcleo por sus diámetros largos y cortos en milímetros. El volumen del callo óseo se calculó a partir de las mediciones utilizando la siguiente fórmula matemática 1

30

Fórmula 1

35

$$\text{Volumen de callo óseo} = \frac{1}{2} \times (a \times b^2)$$

a: diámetro largo de callo óseo,

b: diámetro corto de callo óseo.

40 **[0041]** Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 siguiente.

TABLA 2

| Grupos experimentales | | Cambios en el volumen de callo óseo (mm ³) | | | |
|-----------------------------------|------------|--|------------|------------|------------|
| | | Días después de la administración | | | |
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 35,35±7,96 | 19,09±3,11 | 11,69±4,15 | 9,25±3,00 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 12,84±4,42* | 5,47±1,81* | 4,73±2,13* | 3,96±2,41* |
| | 50 (mg/kg) | 8,62±3,43* | 4,36±1,44* | 3,84±1,86* | 3,37±0,79* |

*: Significancia en comparación con el control (p<0,01)

[0042] Tal como es evidente a partir de la tabla 2, el volumen de callo óseo según la curación de la fractura disminuyó significativamente en el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, en comparación con el grupo de control no tratado (p<0,01), en un patrón dependiente con la dosis.

45

[0043] De este modo, se observa que el compuesto de benzamidina de Fórmula Química I induce la pérdida del callo óseo formado durante el proceso de curación de la fractura.

6. Observación histopatológica

5

[0044] La octava costilla sin núcleo después de la inducción de la fractura se fijó en formalina neutra al 10%, seguido de descalcificación mediante el cambio de una solución de descalcificación (ácido fórmico al 2,24%, hidróxido sódico 0,5 N) por una solución fresca una vez al día durante cinco días. Después de completar la descalcificación, la costilla se bañó en parafina. El tejido bañado en parafina se troceó con un grosor de 3 a 4 µm, se tiñó con hematoxilina-eosina o tricromo de Masson y se observó a través de un microscopio óptico.

10

[0045] Los resultados se muestran en la figura 1.

[0046] Se observó que el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, tal como se muestra en la figura 1, presentaba mayor tejido óseo en el callo óseo en todos los periodos de administración, al contrario del grupo no tratado, y se observó que el mayor comportamiento del tejido óseo era dependiente con la dosis.

15

[0047] Por lo tanto, el compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 puede inducir la formación ósea en el callo óseo formado tras la fractura.

20

[0048] A partir de la muestra de tejido de costilla preparada anteriormente, se examinaron las cantidades del tejido conectivo, tejido cartilaginoso y óseo en el callo óseo utilizando un sistema de procesamiento Analysis Image (SIS Alemania) y se representan como porcentajes en las tablas 3 a 5 a continuación.

[0049] Además, se midió el número de osteoclastos en el callo óseo, particularmente, en un área de 200 µm² en la superficie de la fractura en que comenzó la osificación endocondral, utilizando un sistema de procesamiento Analysis Image (SIS Alemania).

25

[0050] Los resultados se proporcionan en la tabla 6 siguiente.

30

TABLA 3

| Grupos experimentales | | Cambios en el contenido de tejido conectivo del callo óseo – días después de la administración (% relativo al callo óseo total) | | | |
|--------------------------------|------------|---|------------|------------|------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 51,34±11,55 | 19,43±2,01 | 15,10±2,96 | 7,14±2,73 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 33,19±3,06 | 6,28±0,72* | 5,55±1,42* | 3,20±0,89* |
| | 50 (mg/kg) | 29,51±5,70** | 6,06±0,44* | 3,58±0,62* | 2,59±0,52* |

*: Significancia en comparación con el control (p<0,01),
 **: Significancia en comparación con el control (p<0,05)

[0051] Tal como se observa en la tabla 3, en el grupo administrado con compuesto de benzamidina disminuyó el contenido de tejido conectivo en el tejido de callo óseo de una forma dependiente con la dosis, en comparación con el grupo no tratado, con una significancia de p<0,01 o p<0,05.

35

[0052] Como resultado, se identifica el compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 para inducir la sustitución de tejido óseo por tejido conectivo en el callo óseo formado tras la fractura, es decir, la osificación.

TABLA 4

| Grupos experimentales | | Cambios en el contenido de tejido cartilaginoso en el callo óseo – días después de la administración (% relativo al callo óseo total) | | | |
|--------------------------------|------------|---|-------------|-------------|------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 43,28±4,66 | 39,49±2,79 | 24,93±4,13 | 17,78±2,30 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 24,79±5,43* | 23,77±3,44* | 18,51±2,29* | 6,59±2,02* |
| | 50 (mg/kg) | 22,42±5,45* | 20,09±6,38* | 11,49±2,31* | 5,37±1,38* |

*: Significancia en comparación con el control (p<0,01)

40

[0053] El tejido cartilaginoso en el tejido de callo óseo, tal como es evidente a partir de la tabla 4, disminuyó significativamente en el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, en comparación con el grupo no tratado, en un patrón dependiente con la dosis (p<0,01).

[0054] Por consiguiente, se identifica el compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 para inducir la

45

sustitución de tejido óseo por tejido cartilaginoso en el callo óseo formado tras la fractura, es decir, la osificación endocondral.

TABLA 5

| Grupos experimentales | | Cambios en el contenido de tejido óseo en el callo óseo – días después de la administración (% relativo al callo óseo total) | | | |
|-----------------------------------|------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 1,92±0,70 | 38,21±4,92 | 54,49±6,04 | 66,88±5,68 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 37,95±6,44* | 54,31±9,50** | 66,71±5,41** | 83,30±4,43* |
| | 50 (mg/kg) | 39,24±14,12* | 55,94±8,38* | 74,07±8,43* | 87,27±8,97** |

*: Significancia en comparación con el control ($p < 0,01$)

5 **: Significancia en comparación con el control ($p < 0,05$)

[0055] Tal como se observa en la tabla 5, el tejido óseo en el callo óseo aumentó significativamente en el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, en comparación con el grupo no tratado ($p < 0,01$ ó $p < 0,05$), en un patrón dependiente de la dosis.

10

[0056] De este modo, se identifica el compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 para inducir la osificación del callo óseo formado durante el proceso de curación de la fractura.

TABLA 6

| Grupos experimentales | | Cambios en la población de osteoclastos en el callo óseo – días después de la administración (Cantidad presente en 200 μm^2 de callo óseo) | | | |
|-----------------------------------|------------|---|-------------|-------------|-------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 15,80±1,92 | 21,80±3,35 | 56,80±3,03 | 41,60±11,46 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 43,80±3,83* | 50,60±2,70* | 31,00±6,67* | 21,60±3,58* |
| | 50 (mg/kg) | 42,60±4,62* | 53,60±2,41* | 22,20±3,03* | 17,60±2,97* |

*: Significancia en comparación con el control ($p < 0,01$)

15

[0057] En la fase temprana del proceso de curación de la fractura, tal como se observa en la tabla 6, el número de osteoclastos en el callo óseo se incrementó en el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, en comparación con el grupo no tratado con una significancia $p < 0,01$, y se observó que el número de osteoblastos aumentaba a medida que aumentaba la dosis. De este modo, la administración del compuesto de benzamidina de la Fórmula Química 1 conduce a un incremento dependiente de la dosis en componentes celulares en el callo óseo en la fase temprana del proceso de curación de fracturas.

20

[0058] En la fase tardía del proceso de curación de fracturas, un grupo tratado con el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 presentaba un callo óseo con un menor número de osteoclastos con una significancia ($p < 0,01$), en comparación con el grupo no tratado, lo que indica que la osificación ya estaba produciendo en cierto grado.

25

[0059] En conclusión, el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 es muy útil como agente curativo para fracturas óseas con la función de inducir la osificación del callo óseo formado tras la fractura.

30 7. Medición de la densidad ósea de callo óseo.

[0060] En la novena costilla sin núcleo después de la inducción de la fractura se midió la densidad ósea alrededor del callo óseo utilizando absorptimetría de rayos X de energía dual (DEXA, PXLmus; Lunar Medison, WI) y se calcula la densidad ósea en mg/cm^2 en la tabla 7.

35

TABLA 7

| Grupos experimentales | | Cambios en la densidad ósea del callo óseo – Días después de la administración (mg/cm^2) | | | |
|-----------------------------------|------------|--|------------|-------------|-------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 0,12±0,04 | 0,22±0,03 | 0,28±0,08 | 0,39±0,07 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 0,24±0,04* | 0,32±0,04* | 0,39±0,04** | 0,55±0,06** |
| | 50 (mg/kg) | 0,24±0,03* | 0,32±0,04* | 0,44±0,07** | 0,57±0,04** |

*: Significancia en comparación con el control ($p < 0,01$)

** : Significancia en comparación con el control ($p < 0,05$)

[0061] En el grupo administrado con el compuesto de benzamidina, tal como es evidente a partir de los datos de la tabla 7, se aumentó la densidad ósea del callo óseo, en comparación con el grupo no tratado, con una significancia

de $p < 0,01$ o $p < 0,05$, y se aumentó la densidad ósea a medida que aumentaba la dosis.

[0062] Por lo tanto, se identifica el compuesto de benzamidina de la Fórmula química 1 para incrementar la densidad ósea del callo óseo formado tras la fractura.

5

8. Medición de la fuerza del hueso del callo óseo

[0063] Se determinó la fuerza del hueso alrededor de la cara de la fractura en la que se formó un callo óseo en la novena costilla sin núcleo después de la inducción de la fractura a partir de las pruebas de flexión en tres puntos utilizando un sistema de análisis de material Instron (Instron 6022; Instron, Estados Unidos; velocidad 20 mm/min).

10

[0064] Los resultados se proporcionan en la tabla 8 siguiente.

TABLA 8

| Grupos experimentales | | Cambios en la fuerza del hueso del callo óseo – Días después de la administración (Nos de impactos aplicados) | | | |
|--------------------------------|------------|---|------------|------------|-------------|
| | | 7 días | 14 días | 21 días | 28 días |
| Control | | 1,24±0,28 | 1,53±0,51 | 2,06±0,18 | 2,38±0,22 |
| Compuesto de Fórmula Química 1 | 10 (mg/kg) | 2,15±0,42** | 2,57±0,65* | 3,10±0,40* | 3,26±0,40** |
| | 50 (mg/kg) | 2,35±0,47** | 2,84±0,34* | 3,23±0,35* | 3,35±0,38** |

*: Significancia en comparación con el control ($p < 0,01$)
 **: Significancia en comparación con el control ($p < 0,05$)

15

[0065] Tal como se observa en la tabla 8, en el grupo administrado con el compuesto de benzamidina se incrementó la fuerza del hueso, en comparación con el grupo no tratado, con una significancia $p < 0,01$ ó $p < 0,05$ en un patrón dependiente con la dosis.

20

[0066] En consecuencia, se identifica el compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 para incrementar la fuerza del hueso en el callo óseo formado tras la fractura.

9. Estadística

25

[0067] Todos los valores se representan como la media \pm desviación estándar y se analizó la significancia estadística de las diferencias en relación con el control utilizando la prueba de suma de rangos Mann-Whitney U-Wilcoxon con la ayuda de PSS (Release 6.1.3., SPSS Inc., USA).

30

[0068] Así mismo, se observó que las sales de ácido metanosulfónico y sales clorhidrato de N-hidroxi-4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il)fenoxi]pentoxi}benzamidina, y 4-{5-[4-(5-isopropil-2-metil-1,3-tiazol-4-il) fenoxi] pentoxi} benzamidina y sus sales de ácido metanosulfónico y sales de clorhidrato mostraban los mismos efectos de curación que los indicados anteriormente.

Ejemplo de preparación:

35

1. Preparación de polvo

[0069]

40

Compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 2 g
 Lactosa 0,5 g
 Manitol 0,5 g

[0070] Los ingredientes se mezclaron y llenaron en un saco hermético para preparar un agente en polvo.

45

2. Preparación de comprimido

[0071]

50

Compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 100 mg
 Almidón de maíz 50 mg
 Celulosa microcristalina 50 mg
 Lactosa 100 mg
 Povidona 15 mg
 Estearato de magnesio 2 mg

[0072] Se preparó una mezcla de los ingredientes en un comprimido utilizando un método de compresión general.

3. Preparación de cápsula

5

[0073]

| | | |
|----|---|--------|
| | Compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 | 100 mg |
| | Almidón de maíz | 50 mg |
| | Celulosa microcristalina | 50 mg |
| 10 | Lactosa | 100 mg |
| | Povidona | 15 mg |
| | Estearato de magnesio | 2 mg |

15 [0074] Se rellenó una mezcla de ingredientes en una cápsula de gelatina según un procedimiento típico para producir un agente en cápsula

4. Preparación de una cápsula blanda

[0075]

| | | |
|----|---|--------|
| 20 | Compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 | 100 mg |
| | Aceite de soja | 400 mg |
| | Lecitina | 20 mg |
| | Gelatina | 200 mg |

25 [0076] Se preparó una cápsula blanda a partir de la mezcla de los ingredientes según un procedimiento típico.

5. Preparación de una inyección

[0077]

| | | |
|----|---|------------------|
| 30 | Compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 | 10 µg/ml |
| | Ácido clorhídrico BP diluido | hasta pH 3,5 |
| | Cloruro sódico BP inyectable | 1 ml como máximo |

35 [0078] Se ajustó a pH 3,5 una solución de compuesto de benzamidina de Fórmula Química 1 en un volumen adecuado de cloruro sódico con ácido clorhídrico BP diluido y su volumen se ajustó con cloruro sódico BP inyectable. Después de mezclarse suficientemente, la solución llenó una ampolla de tipo I de 5 ml de vidrio transparente, que a continuación se fundió, de manera que la solución se envasó bajo la rejilla superior de aire. Se obtuvo una inyección mediante autoclave a 120°C durante 15 min o más.

40 Aplicabilidad industrial

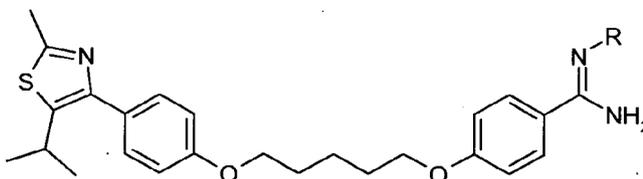
45 [0079] La composición de la presente invención puede reducir significativamente el volumen del callo óseo, incrementar la densidad ósea y la fuerza del callo óseo, y disminuir el contenido de tejido conectivo y tejido cartilaginoso en el callo óseo, y, de este modo, inducir la pérdida y osificación del callo óseo formado durante el proceso de curación de la fractura. Por lo tanto, la composición de la presente invención es útil para el tratamiento de la fractura ósea.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento de fracturas óseas, que comprende un compuesto de benzamidina, representado por la siguiente fórmula química 1, o su sal farmacéuticamente aceptable:

5

10



Fórmula Química 1

15

en la que R es hidrógeno o hidroxilo.

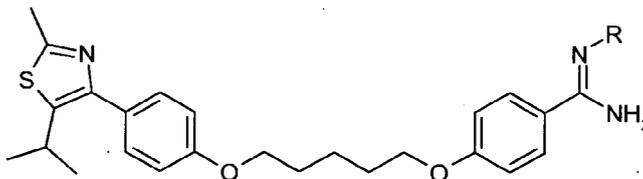
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la sal es una sal de ácido metano sulfónico o una sal de clorhidrato.

20

3. Compuesto de fórmula química 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la utilización en el tratamiento de fracturas óseas:

25

30



35

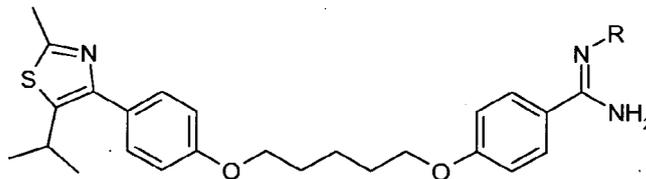
Fórmula Química 1

en la que R es hidrógeno o hidroxilo.

4. Utilización de un compuesto de fórmula química 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de fracturas óseas:

40

45



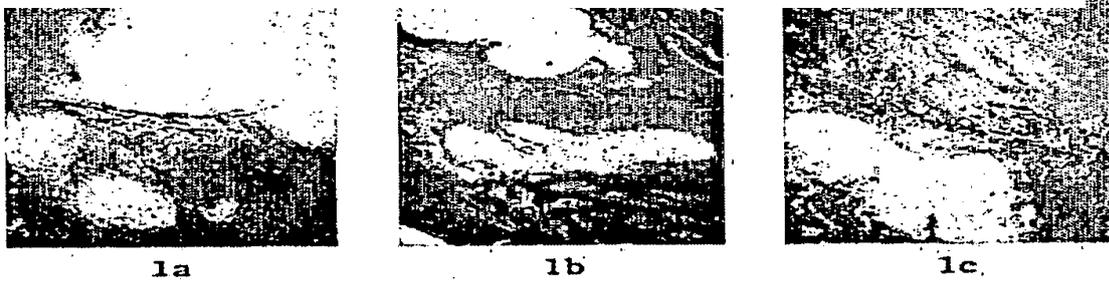
50

Fórmula Química 1

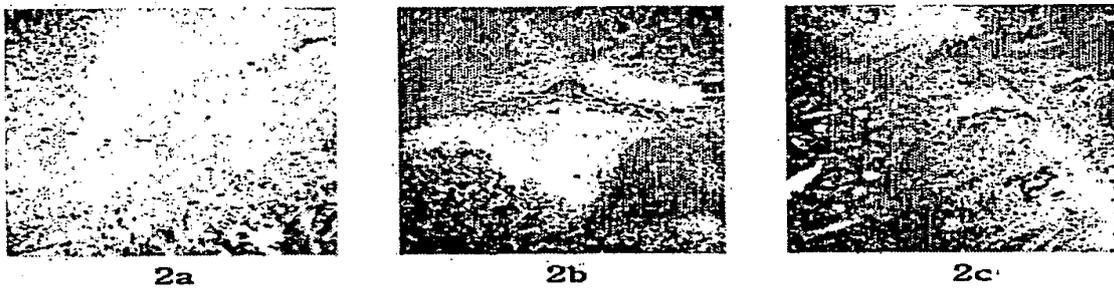
en la que R es hidrógeno o hidroxilo.

FIGURA 1

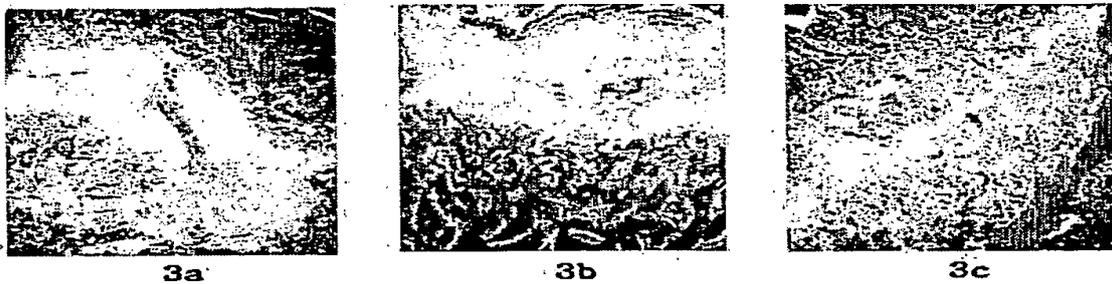
1. 7 días después de la inducción de la fractura y la administración del fármaco



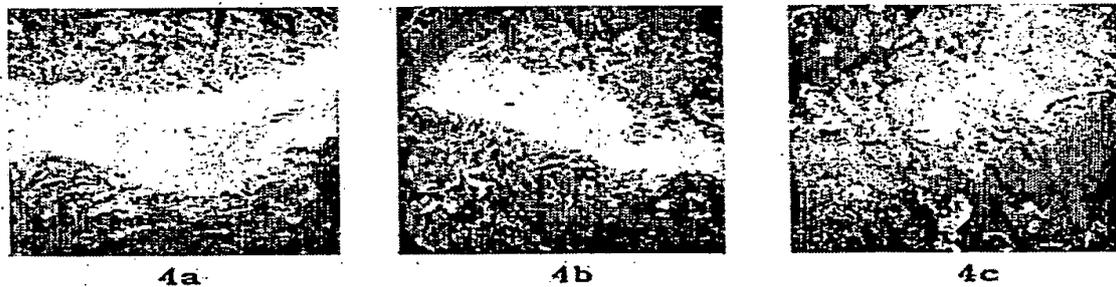
2. 14 días después de la inducción de la fractura y la administración del fármaco



3. 21 días después de la inducción de la fractura y la administración del fármaco



4. 28 días después de la inducción de la fractura y la administración del fármaco



- a. Grupo de control
- b. Grupo administrado con el compuesto de fórmula 1 (10 mg/kg)
- c. Grupo administrado con el compuesto de fórmula 1 (50 mg/kg)