

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 808**

51 Int. Cl.:
A61K 31/352 (2006.01)
C07D 311/86 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04799962 .8**
96 Fecha de presentación: **30.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1693060**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Agentes terapéuticos o preventivos para la neuropatía isquémica**

30 Prioridad:
05.12.2003 JP 2003406804

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
DAINIPPON SUMITOMO PHARMA CO., LTD.
6-8, DOSHO-MACHI 2-CHOME CHUO-KU OSAKA-
SHI
OSAKA 541-8524, JP

72 Inventor/es:
IKEDA, Kazuhito y
KIMURA, Toru

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 382 808 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

Agentes terapéuticos o preventivos para la neuropatía isquémica.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a agentes terapéuticos o preventivos para las lesiones nerviosas isquémicas, que contienen como ingrediente activo un compuesto obtenido cultivando *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Técnica anterior

- 10 Se ha publicado que la isquemia está implicada en algunas enfermedades citopáticas del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico. Se considera también que el trastorno isquémico está implicado en enfermedades de los nervios retinianos tales como glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular y retinopatía del prematuro.

(1) Glaucoma

- 15 El glaucoma es una enfermedad de la retina que tiene una incidencia del 3,5 % entre las personas mayores de 40 años, y se estima que tienen glaucoma 1,92 millones de pacientes en Japón y 105 millones de pacientes en el mundo. El síntoma principal es el aumento de la presión intraocular, y se producen atrofia retiniana y retracción de la papila óptica. El glaucoma tiene un mal pronóstico y puede llevar a la ceguera en el peor de los casos, y es la cuarta causa de ceguera en Japón, y en Estados Unidos se describen tantos como 120.000 pacientes al año.

- 20 Puesto que el aumento de la presión intraocular es un síntoma principal del glaucoma, se han desarrollado un gran número de fármacos que se dirigen a reducir la presión intraocular. Estos fármacos se pueden clasificar en cinco tipos: agentes parasimpaticomiméticos, agentes simpaticomiméticos, agentes β -simpaticolíticos, inhibidores de la anhidrasa carbónica y agentes hiperosmóticos de acuerdo con la diferencia en el sitio de acción, pero todos estos agentes presentan una eficacia farmacológica por reducción de la presión intraocular. El pronóstico sigue siendo malo y el nervio óptico se daña en algunos casos, incluso cuando se reduce la presión intraocular. En adición, se han descrito muchos casos de glaucoma sin aumento de la presión intraocular, concretamente glaucoma de baja tensión, y se estima que el número de pacientes con glaucoma de baja tensión es de un millón, mientras que el de glaucoma asociado con aumento de la presión intraocular se estima que es de 2 a 3 millones en los Estados Unidos. Por consiguiente, se esperan fármacos que no se dirijan a reducir la presión intraocular sino que tengan directamente un efecto protector para las células del nervio óptico.

(2) Oclusión de la arteria retiniana central

- 30 La oclusión de la arteria retiniana central es una enfermedad desarrollada cuando se aloja un trombo en un punto de paso en la lámina cribosa de la arteria retiniana central. Como un síntoma, se presenta una caída repentina y unilateral de la agudeza visual y se produce una atrofia del nervio óptico. A diferencia de la isquemia crónica, no se observa después angiogénesis. Debido a que la arteria retiniana central es la arteria terminal, la isquemia aguda que dura de 30 a 40 minutos produce un cambio irreversible y lleva a la necrosis de la retina. Por lo tanto, el pronóstico de visión es malo en el caso de la oclusión completa.

El tratamiento consiste en realizar un masaje del ojo inmediatamente después de darse cuenta del síntoma y en intentar la reanudación del flujo sanguíneo. Como terapia farmacológica, se utilizan uroquinasa + dextrano para la trombolisis y prostaglandina E₁ (alprostadil) para la vasodilatación y/o para la prevención de la trombogénesis.

(3) Oclusión de la arteria retiniana ramificada

La oclusión de la arteria retiniana ramificada es una enfermedad en la que se aloja un trombo en una parte de la ramificación intraocular y se desarrolla un trastorno solamente en el área controlada por ella. Se realiza el tratamiento de modo similar al de la oclusión de la arteria retiniana central.

(4) Oclusión de la vena retiniana central / Oclusión de la vena retiniana ramificada

- 45 Tanto la oclusión de la vena retiniana central, que se clasifica en retinopatía hemorrágica y retinopatía de estasis venosa según la presencia o ausencia de hemorragia, como la oclusión de la vena retiniana ramificada son causadas por un trombo que se forma en la lámina cribosa.

- 50 La retinopatía hemorrágica es común entre las personas ancianas, y es causada por esclerosis arterial en más de la mitad de los casos. Como síntoma, la hemorragia tipo llama se extiende a lo largo de las fibras nerviosas desde la papila óptica en la corteza de la retina, y se produce una reducción notable de la visión.

Como tratamiento, se utilizan uroquinasa + dextrano de forma similar a la de la oclusión de la arteria retiniana central y se utiliza sulfonato sódico de carbazocromo o mesilato de guanilhidrazona de adrenocromo para reforzar los vasos sanguíneos. Se realiza también la fotocoagulación por láser para prevenir el edema retiniano de la mácula o la angiogénesis.

5 En cuanto a la retinopatía por estasis venosa, se conoce una causada por inflamación y una causada por esclerosis arterial, y la primera es común entre las personas jóvenes mientras que la última es común entre las personas ancianas. Como un síntoma, aparece una fuerte dilatación y sinuosidad de las venas y además, aparece *flare* (acumulación de proteínas) de la papila óptica, pero la reducción de la agudeza visual es ligera en comparación con el tipo hemorrágico.

10 Como tratamiento, se realiza una terapia seca igual que para el tipo hemorrágico, pero no se utiliza la fotocoagulación por láser.

(5) Neuropatía óptica isquémica

15 La neuropatía óptica isquémica es una enfermedad en la que tiene lugar la necrosis de los nervios ópticos por oclusión de los vasos sanguíneos nutrientes y aparece la disfunción de la actividad visual, y se llama también neuropatía óptica isquémica anterior.

Se divide, según las causas, en neuropatía por arteritis temporal y neuropatía óptica isquémica idiopática desarrollada por enfermedades sistémicas tales como esclerosis arterial, hipertensión y diabetes mellitus.

20 Solamente se utiliza terapia farmacológica. Se utiliza un esteroide (prednisolona) para mejorar el flujo sanguíneo alrededor de la lámina cribosa, se utiliza un depresor de la presión intraocular (inhibidor de la anhidrasa carbónica, acetazolamida) para reducir el edema, y se utilizan las vitaminas B₁ y B₁₂ para estimular el nervio.

(6) Retinopatía diabética

25 La retinopatía diabética se desarrolla después de una hiperglucemia persistente durante varios años o más, la cual produce oclusión de los vasos capilares por degeneración de las células endoteliales de los vasos capilares, necrosis, trombogénesis, y aumento de la capacidad de coagulación sanguínea y lleva a un estado isquémico. Esta enfermedad aparece en el 39 % de los pacientes con enfermedad insulino-dependiente y en el 47 % de los pacientes con enfermedad insulino-independiente, y se estima que el número de pacientes en Japón es de aproximadamente 600.000.

30 Como tratamiento, se controla sistémicamente el nivel de glucosa en la etapa simple, se utiliza un agente que mejora los vasos sanguíneos y una estreptoquinasa-estreptodornasa (Varidasa) en el caso asociado con hemorragia, y se realiza la fotocoagulación panretiniana en la etapa preproliferativa. Además, se realiza una operación en el cuerpo vítreo cuando tiene lugar un desprendimiento de retina por tracción en la etapa proliferativa. No hay disponibles fármacos que se dirijan a la protección del nervio retiniano, y se utilizan sólo de forma secundaria el succinato cálcico de tocoferol (vitamina E), y el acetato de tocoferol (Juvela). Por lo tanto, se espera el desarrollo de un nuevo fármaco que alivie el trastorno isquémico.

35 (7) Degeneración macular

40 El área macular es la parte de la retina en la que pasa el eje óptico y es un área importante que lleva el centro del campo visual y que determina la agudeza visual. Degeneración macular es una denominación genérica de síntomas que causan anomalías en esta parte, y se conocen principalmente cinco enfermedades. Esto es, se clasifica en coriorretinitis central grave, coriorretinopatía central exudativa, degeneración macular disciforme senil, degeneración macular atrófica senil y maculopatía de interfase vitreoretiniana idiopática.

La coriorretinitis central grave y la coriorretinopatía central exudativa son enfermedades en las que el fluido seroso o hemorragia (exudado) pasa a través de las células epiteliales pigmentarias retinianas degeneradas y se queda debajo de la retina.

45 La degeneración macular disciforme senil es una enfermedad que causa alteración exudativa y hemorragia en el área macular y angiogénesis de la coroides mientras que la degeneración macular atrófica senil no causa una alteración exudativa observable y se caracteriza por la atrofia de las células epiteliales pigmentarias retinianas.

En la maculopatía de interfase vitreoretiniana idiopática, se forma una membrana prerretiniana transparente u opaca en el área macular, y los vasos sanguíneos que van al área macular se hacen serpiginosos.

50 Puesto que cada una de las enfermedades es causada por un trastorno vascular, excepto la degeneración macular atrófica senil, todas ellas se pueden atribuir a lesiones isquémicas.

5 Como tratamiento, se realiza la fotocoagulación básicamente cuando aparece la angiogénesis, y como terapia farmacológica, se utiliza un agente altamente penetrante (isosorbilo y glicerina) para la absorción del fluido seroso de debajo de la retina, se utiliza calidínogenasa para mejorar la circulación en la retina y la coroides, se utiliza estreptoquinasa-estreptodornasa (Varidasa) para la vasodilatación, y además, se utilizan vitaminas y esteroides, pero no hay ningún fármaco que actúe sobre las células nerviosas retinianas, y se espera el desarrollo de un nuevo fármaco.

(8) Retinopatía del prematuro

10 La retinopatía del prematuro es causada por la oxigenación en alta concentración a un niño prematuro, que produce la alteración obliterativa en la región periférica de los vasos retinianos inmaduros y lleva a la anoxia una vez que ha terminado la oxigenación. No hay ningún tratamiento más que el tratamiento sintomático tal como la criocoagulación, y no hay ningún fármaco como remedio radical, y por lo tanto, se espera el desarrollo de un nuevo fármaco que reduzca el trastorno en tiempo de isquemia.

15 En adición, las lesiones por isquemia están implicadas también en las enfermedades de los nervios craneales o trastornos cerebrovasculares tales como embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos e isquemia postoperatoria de la médula espinal, y se espera el desarrollo de un nuevo fármaco que reduzca las lesiones en el tiempo de isquemia en estas enfermedades.

20 Mientras tanto, la semaforina es una proteína endógena identificada como un factor que colapsa el cono de crecimiento del nervio y suprime la elongación del axón, y hasta ahora, se han identificado aproximadamente 20 especies moleculares y la más estudiada es el grupo génico de una subfamilia denominada clase tipo III. Se sabe que las proteínas codificadas por estos genes tienen una actividad intensa de supresión del brote de neuritas y una actividad de colapso del cono de crecimiento *in vitro*. Entre ellas, la semaforina 3A (Sema3A) es la más estudiada (Véase Cell 75, p217, 1993, Cell 75, p1389, 1993) y se sabe que induce el colapso del cono de crecimiento de las células nerviosas cultivadas a una concentración tan baja como 10 pM en un corto periodo de tiempo. Se sabe también que el anticuerpo anti-semaforina 3A suprime la muerte celular (apoptosis) de los gangliocitos retinianos en un modelo de axotomía del nervio óptico de la rata, (Véase The Journal of Biological Chemistry, 277, p49799 (2002)). El modelo anterior es un modelo de trastorno de lesiones en el que solamente están cortados los axones (una fibra nerviosa), y la vasculatura nerviosa o el suministro de sangre al nervio óptico no están dañados. Además, se sabe que la expresión de la semaforina es elevada en la retina del modelo de glaucoma congénito que utiliza un conejo (Véase Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 241, p673 (2003)). Mientras tanto, es conocido que el mRNA de la semaforina 3A se expresa en el modelo de rata de oclusión de la arteria cerebral media (Véase Brain Research, 914, p1 (2001)).

35 Es conocido que una serie de compuestos de xantona tienen actividad inhibitoria de la semaforina y tienen un efecto de aceleración de la regeneración del nervio (Véase los documentos WO02/09756, WO03/062243 y WO03/062440). No era conocido, sin embargo, que estos compuestos que tienen actividad inhibitoria de la semaforina suprimen la muerte celular (apoptosis) en el tiempo de isquemia, por ejemplo, la muerte celular de los nervios retinianos y la muerte de las células nerviosas del cerebro, y presentan un efecto excelente como un agente terapéutico o preventivo eficaz para las lesiones isquémicas.

40 Descripción de la invención

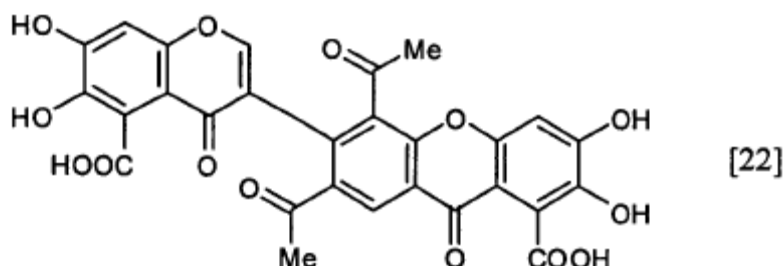
Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico o preventivo para las lesiones nerviosas asociadas con las lesiones isquémicas.

45 Los autores de la presente invención han encontrado que un compuesto que tiene actividad inhibitoria de la semaforina suprime la muerte de las células nerviosas implicada con las lesiones isquémicas y es útil como un agente terapéutico o preventivo para las lesiones nerviosas isquémicas.

50 Esto es, se aumentó la presión intraocular cargando una presión de aproximadamente 150 mm de Hg en la cámara anterior de una rata con un dispositivo de esfigmomanometría para preparar un modelo animal en el que se produjo una lesión isquémica. Cuando se administró al modelo animal un compuesto que tiene actividad inhibitoria de la semaforina obtenido mediante cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059, se obtuvo un excelente efecto terapéutico. Por consiguiente, se ha encontrado que el compuesto que tiene actividad inhibitoria de la semaforina es eficaz como agente terapéutico o preventivo para las lesiones isquémicas, preferiblemente como un agente terapéutico o preventivo para las lesiones isquémicas de la retina.

Esto es, la presente invención se refiere a

[1] El uso de un compuesto que tiene actividad inhibitora de la semaforina, que se obtiene mediante cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 y que se representa por la fórmula [22]:



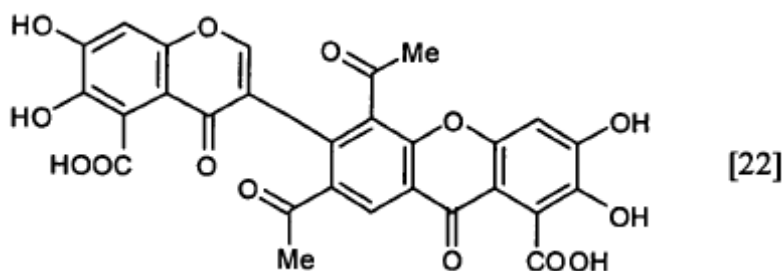
5 o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en la fabricación de un medicamento para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo para suprimir la muerte de las células nerviosas en una lesión isquémica del nervio por un trastorno isquémico.

10 [2] El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según el punto [1], en el que el trastorno isquémico es embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia postoperatoria de la médula espinal.

15 [3] El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según el punto [1], en el que el trastorno isquémico es glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular o retinopatía del prematuro.

[4] El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según el punto [1], en el que el trastorno isquémico es retinopatía diabética.

[5] Un compuesto que tiene actividad inhibitora de la semaforina, que se obtiene mediante cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 y que se representa por la fórmula [22]:



20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo para suprimir la muerte de las células nerviosas en una lesión isquémica del nervio por un trastorno isquémico.

25 [6] El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según el punto [5], en el que el trastorno isquémico es embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia postoperatoria de la médula espinal.

30 [7] El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según el punto [5], en el que el trastorno isquémico es glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular o retinopatía del prematuro.

[8] El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según el punto [5], en el que el trastorno isquémico es retinopatía diabética.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 muestra el resultado de medir el espesor de la capa nuclear externa (ONL) [prueba t de Student, en comparación con el Grupo de (carga de aumento de la IOP + PBS administrada),*: <0,05]. Los significados de los números del eje de abscisas son como sigue. Esto es, 1: presión intraocular normal; 2: carga de aumento de la presión intraocular (IOP) + administración de PBS; 3: carga de aumento de la IOP + tratamiento de pre-administración de SPF-3059-5; 4: carga de aumento de la IOP + + tratamiento de post-administración de SPF-3059-5. Se puede entender de la Fig. 1 que el aumento de carga de la presión intraocular o la administración de SPF-3059-5 no tiene influencia en la capa nuclear externa;

10 La Fig. 2 muestra el resultado de medir el espesor de la capa nuclear interna (INL) [prueba t de Student, en comparación con el Grupo de (carga de aumento de la IOP + PBS administrada),*: <0,05]. Los significados de los números 1 a 4 del eje de abscisas son los mismos que en la Fig. 1. Se puede entender de la Fig. 2 que el espesor de la INL que se hace más delgado por aumento de la carga de la presión intraocular se suprime por la administración de un fármaco;

15 La Fig. 3 muestra el resultado de medir el espesor de la capa del plexo interno (IPL) [prueba t de Student, en comparación con el Grupo de (carga de aumento de la IOP + PBS administrada),*: <0,05]. Los significados de los números 1 a 4 del eje de abscisas son los mismos que en la Fig. 5. Se puede entender de la Fig. 3 que el espesor de la IPL que se hace más delgado por aumento de la carga de la presión intraocular se suprime por la administración de un fármaco; y

20 La Fig. 4 es una fotografía de la sección retiniana teñida con violeta de cresilo al 0,5 %;

(1) Presión intraocular normal;

(2) Aumento de la carga de la presión intraocular (IOP) + administración de PBS;

(3) Aumento de la carga de la IOP + tratamiento de pre-administración de SPF-3059-5;

25 (4) Aumento de la carga de la IOP + tratamiento de post-administración de SPF-3059-5.

Mejor modo de realizar la invención

El compuesto de la fórmula [22] se denomina también aquí SPF-3059-5.

30 El compuesto SPF-3059-5 se puede obtener a partir de un cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 utilizando la actividad inhibidora de la semaforina como un indicador. En adición, se puede identificar utilizando la actividad inhibidora de semaforina como un indicador a partir de los compuestos producidos por un método de conversión conocido o por un método de síntesis conocido a partir del cual se obtienen los compuestos que tienen actividad inhibidora de semaforina.

35 Lo mismo que el compuesto SPF-3059-5, las sales que son farmacéuticamente aceptables están incluidas en el alcance de la presente invención. Aquí las sales incluyen una sal de base inorgánica tal como sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de aluminio y sal de amonio, una sal de base orgánica tal como sal de trietilamonio, sal de trietanolamonio, sal de piridinio y sal de diisopropil-amonio, una sal de un aminoácido básico tal como arginina y lisina.

40 El compuesto SPF-3059-5 mencionado antes, se puede obtener de forma efectiva cultivando un hongo de la cepa SPF-3059 que pertenece al género *Penicillium* separado cada uno del suelo en Osaka [Esta cepa fue depositada el 13 de julio de 2001 ante el Organismo de Depósito de Patentes Internacionales, del Nacional Institute of Advanced Industrial Science and Technology, una institución administrativa independiente del Ministry of Economy, Trade and Industry (Central 6, 1-1 Higashi 1-chome, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón) con el número de acceso FERM BP-7663 como el Número de Depósito Internacional según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con el fin de procedimiento de patente], y se puede obtener según los

45 métodos descritos en los documentos WO02/0975 o WO03/062243.
El compuesto que tiene actividad inhibidora de la semaforina, presentó un efecto inhibitor sobre la muerte de las células nerviosas por el trastorno isquémico, y por lo tanto, se puede utilizar como un agente terapéutico o un agente preventivo para las enfermedades neurológicas isquémicas. La expresión enfermedades neurológicas isquémicas, como se usa aquí, incluye la neuropatía retiniana por isquemia o las enfermedades cerebrovasculares isquémicas.
50 Los ejemplos de la neuropatía retiniana como se usa aquí, incluyen glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana

5 ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular, retinopatía del prematuro, y, ante todo, la retinopatía diabética es preferible. Los ejemplos de las enfermedades cerebrovasculares isquémicas incluyen embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia de la espina dorsal postoperatoria. El compuesto de la presente invención tiene acción protectora del nervio retiniano y es particularmente eficaz para el tratamiento o prevención de la neuropatía retiniana por isquemia.

10 Al agente terapéutico o preventivo para la lesión isquémica del nervio de la presente invención, se pueden añadir diferentes ingredientes de formulación de dispensación tales como vehículos ordinarios farmacéuticamente aceptables, aglutinantes, estabilizantes, excipientes, diluyentes, tampones de pH, agentes disgregantes, solubilizantes, coadyuvantes de la disolución, agentes isotónicos o similares. Además, el agente terapéutico o preventivo se puede administrar oralmente o parenteralmente. En otras palabras, se pueden administrar por los medios usuales de administración, por ejemplo, se pueden administrar oralmente en formas tales como comprimidos, píldoras, polvo, gránulos, cápsulas, jarabe, emulsión, suspensión líquida.

15 Se pueden administrar parenteralmente en formas tales como inyectable intravenoso (gotas), inyectable intramuscular, inyectable subcutáneo, gotas oftálmicas, pomada oftálmica.

20 Las preparaciones sólidas tales como los comprimidos se pueden preparar mezclando un ingrediente activo con un vehículo o excipiente ordinario farmacéuticamente aceptable tal como lactosa, sacarosa, almidón de maíz, un aglutinante tal como hidroxipropilmetil-celulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, un agente disgregante tal como carboximetilcelulosa sódica o carboximetil-almidón sódico, un lubricante tal como, ácido esteárico o estearato de magnesio o un conservante, etc.

25 Para la administración parenteral, el ingrediente activo se disuelve o se suspende en un vehículo fisiológicamente aceptable tal como agua, solución salina fisiológica, aceite, solución acuosa de glucosa, que puede contener como adyuvantes, un emulsionante, un estabilizante, una sal para osmorregulación o un tampón cuando sea necesario. Como un aditivo para las gotas oftálmicas, pueden contener si es necesario, un agente isotonizante tal como glicerina o cloruro de sodio, un tampón tal como ácido fosfórico o ácido cítrico, un regulador de pH tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, un espesante tal como hidroxipropilmetil celulosa o alcohol polivinílico, un conservante tal como cloruro de bencetonio o un solubilizante. Los ejemplos de aditivos para pomadas oftálmicas incluyen vaselina, polietilenglicol, lanolina purificada, y parafina líquida.

30 Aunque la dosis y la frecuencia de administración varían dependiendo del método de administración y la edad, peso, condiciones médicas o similares de un paciente, es preferible la administración local al sitio de la enfermedad. Es preferible administrar una vez, dos veces o más al día. Cuando se administra dos veces o más, es deseable administrar repetidamente al día o a intervalos apropiados.

35 La dosis puede ser de varios cientos de μg hasta 2 g, preferiblemente de 5 a 100 mg, más preferiblemente menos de varias decenas de mg por dosis por paciente adulto como el ingrediente activo, y se puede administrar una vez al día o se puede dividir en varias veces al día. Cuando se administra parenteralmente, la dosis puede ser de 0,1 a 100 mg, más preferiblemente de 0,3 a 50 mg al día por paciente adulto y se puede administrar una vez al día o se puede dividir en varias veces al día. Con el fin de reducir la frecuencia de administración, se puede usar una preparación de liberación sostenida. Cuando se usa como gotas oftálmicas, se puede usar de 0,01 a 10 % p/v, preferiblemente de 0,05 a 5 % p/v por paciente adulto como el ingrediente activo y es deseable administrar una a varias gotas por dosis, 1 a 6 veces al día, dependiendo de la enfermedad. Cuando se usa como una pomada oftálmica, se pueden usar de 0,01 a 10 % p/p, preferiblemente de 0,1 a 5 % p/p como el ingrediente activo y es preferible administrar 1 a 6 veces al día, dependiendo de la enfermedad.

45 En adición, el agente terapéutico o preventivo para la lesión isquémica del nervio de la presente invención se puede usar también como un fármaco veterinario.

Ejemplos

La presente invención se explica ahora en detalle por medio de los ejemplos pero el alcance técnico de la invención no se limita a estos ejemplos.

50 Ejemplo 1

Efecto farmacológico sobre un modelo de aumento de la presión intraocular

Método de ensayo

(1) Animal experimental

Se utilizaron 20 ratas SD (de 7 semanas de edad) y se dividieron en los siguientes grupos.

Operación simulada: 4 ratas

Tratamiento de la IOP (presión intraocular) + PBS (se administraron 5 µl al cuerpo vítreo): 4 ratas

- 5 Tratamiento de la IOP (presión intraocular) + compuesto de ensayo (se pre-administraron 5 µl al cuerpo vítreo): 4 ratas

Tratamiento de la IOP (presión intraocular) + compuesto de ensayo (se post-administraron 5 µl al cuerpo vítreo): 4 ratas

(2) Aumento de la presión intraocular

- 10 Se prepararon modelos animales con aumento de la presión intraocular y se administró a los mismos un fármaco (compuesto de ensayo).

(3) Preparación de un fármaco y método de administración

Se diluyó el SPF-3059-5 como sustancia de ensayo con PBS a 0,1 mg/ml inmediatamente antes de su uso. Se administraron 5 µl de la solución diluida al cuerpo vítreo del ojo izquierdo de las ratas con una aguja doble 30G.

- 15 (4) Prueba de significancia

Se aumentó la presión intraocular por el método del anterior punto (2) y se realizaron pruebas de significancia mediante el test t de Student y el test de Welch & F sobre el efecto de protección de la retina de la administración de SPF-3059-5 en las ratas a las que se había administrado PBS al cuerpo vítreo.

Evaluación farmacológica

- 20 Se midió cada uno de los espesores de la capa nuclear externa, capa nuclear interna y capa del plexo interno utilizando la retina de las ratas de cada grupo de tratamiento y se evaluó el efecto citoprotector. Los valores medidos se muestran en la Tabla 1 y Fig. 1 (ONL: capa nuclear externa), en la Tabla 2 y Fig. 2 (INL: capa nuclear interna) y en la Tabla 3 y Fig. 3 (IPL: capa del plexo interno). En adición, en la Fig. 4 se muestra una sección retiniana teñida con violeta de cresilo al 0,5 %.

- 25 Tabla 1

	Media (µm)	SD	SE
Operación simulada	61,76	3,40	1,70
Carga para aumento de la IOP + administración de PBS	61,03	4,41	2,21
Carga para aumento de la IOP + pre-administración de la sustancia de ensayo	60,29	3,80	1,90
Carga para aumento de la IOP + post-administración de la sustancia de ensayo	61,76	4,16	2,08

Tabla 2

	Media (µm)	SD	SE
Operación simulada	36,76	5,63	2,82
Carga para aumento de la IOP + administración de PBS	27,21	2,82	1,41
Carga para aumento de la IOP + pre-administración de la sustancia de ensayo	33,09	2,82	1,41
Carga para aumento de la IOP + post-administración de la sustancia de ensayo	36,76	1,70	0,85

Tabla 3

	Media (µm)	SD	SE
Operación simulada	58,09	5,02	2,51
Carga para aumento de la IOP + administración de PBS	38,24	7,20	3,60
Carga para aumento de la IOP + pre-administración de la sustancia de ensayo	55,88	7,20	3,60
Carga para aumento de la IOP + post-administración de la sustancia de ensayo	55,15	6,52	3,26

5 Es sabido que las células granulares externas reciben suministro de sangre desde la capa corooidal y se entiende que las células no sufren el daño isquémico de la arteria oftálmica debido al aumento de la presión intraocular, y según los resultados de la Tabla 1 y la Fig. 1, se demostró que el espesor de la capa nuclear externa no fue afectado por el aumento de la presión intraocular en los presentes ejemplos. Basándose en esto, se puede confirmar que la sección hecha en este experimento está preparada adecuadamente.

10 Es sabido que las células granulares internas reciben suministro de sangre desde la arteria oftálmica y se entiende que las células sufren el daño isquémico de la arteria oftálmica debido al aumento de la presión intraocular, que causa el retraso de la muerte celular. De acuerdo con los resultados de la Tabla 2 y la Fig. 2, se observó que el aumento de la presión intraocular causó la muerte celular de las células granulares internas y la capa celular en la que estaban presentes las células se hizo más delgada en los presentes ejemplos. Además, aunque no se reconoció ninguna diferencia estadísticamente significativa, se observó que la reducción del espesor de la capa celular tiende a ser suprimida por la pre-administración de SPF-3059-5, y se consideró el efecto de la supresión de la muerte celular sobre la muerte de las células granulares internas. En adición, se demostró que el efecto de la supresión de la muerte celular por la post-administración de SPF-3059-5 sobre la muerte de las células granulares internas era estadísticamente significativo.

20 Además, la capa del plexo interno es una capa en la que se realiza la formación de sinapsis entre las células granulares internas y los gangliocitos, y la capa del plexo interno es una capa en la que hay solamente axones que se extienden desde los cuerpos celulares. Puesto que las células granulares internas sufren las lesiones isquémicas de la arteria oftálmica al aumentar la presión intraocular, es conocido que el plexo interno, los filamentos axiales del mismo, experimentan una regresión, y la capa del plexo interno se hace más delgada. De acuerdo con los resultados de la Tabla 3 y la Fig. 3, este fenómeno se reprodujo en este ejemplo, y se observó la reducción del espesor de la capa del plexo interno por aumento de la presión intraocular. Además, se demostró que la reducción del espesor de la capa del plexo interno se suprimió de forma significativa por la pre-administración y post-administración de SPF-3059-5, y se consideró que estas administraciones protegen una función neurológica en la retina.

30 Como resultado de lo anterior, se demostró que el SPF-3059-5 suprimía la muerte celular de las células granulares internas debida al aumento de la presión intraocular. En adición, la capa del plexo interno es un lugar en el que las células granulares internas y los gangliocitos forman una sinapsis y contiene axones de los gangliocitos y por lo tanto se consideró también el efecto de protección sobre los gangliocitos.

35 En adición, se demostró que el tratamiento de pre-administración con SPF-3059-5 presentaba una tendencia a suprimir la capa de células granulares internas y tenía el efecto de suprimir la reducción del espesor de la capa del plexo interno de modo estadísticamente significativo. Además, se encontró que el tratamiento de post-administración con SPF-3059-1 tenía también el efecto de suprimir la reducción del espesor de la capa de células granulares internas y de la capa del plexo interno de modo estadísticamente significativo.

Del resultado descrito antes, se ha encontrado en oftalmopatía que el compuesto SPF-3059-5 es eficaz para la retinopatía diabética en la que se sospechan lesiones isquémicas de las células granulares internas y para el glaucoma en el que se describen lesiones de gangliocitos, etc.

40 Ejemplo 2

Producción del compuesto

El compuesto de la presente invención es un compuesto conocido y está descrito en los documentos WO02/09756 o WO03/062243 y se puede producir a partir de la cepa SPF-3059 que es un hongo que pertenece al género

Penicillium. El procedimiento de producción y las propiedades físico-químicas están descritos en los documentos de publicación internacional anteriores.

(Compuesto SPF-3059-5)

Aspecto: polvo de color crema

5 Espectro de masas por bombardeo de átomos rápidos de alta resolución (HRFAB-MS) m/z (M + H)⁺:

Valor observado: 577,0615

Valor calculado: 577,0619

Fórmula molecular: C₂₈H₁₆O₁₄

Espectro de absorción en el ultravioleta-visible λ max (en metanol) nm (ε):

10 229 (35.800), 284 (22.600), 322(21.000)

Espectro de absorción en el infrarrojo ν max (KBr) cm⁻¹:

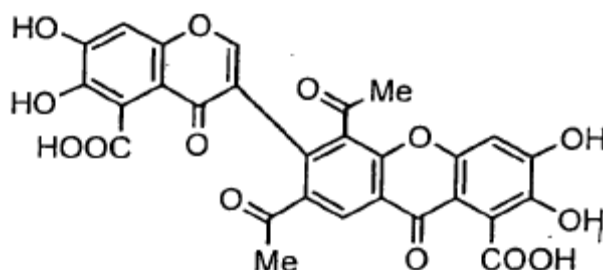
3.260, 1.684, 1.626, 1.567, 1.467, 1.288

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm:

2,53 (3H, s), 2,55 (3H, s), 6,93 (1H, s), 6,96 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,53 (1H, s), 9,5-13,0 (6H)

15 ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ ppm:

29,1, 32,1, 102,26, 102,32, 109,9, 112,4, 119,6, 119,8, 120,3, 120,9, 126,3, 132,5, 133,4, 136,2, 141,2, 141,7, 150,4, 150,8, 152,1, 152,68, 152,73, 154,5, 167,4, 167,5, 172,5, 172,9, 199,1, 201,1



[22]

Ejemplo 3

20 Ejemplo de preparación

Se suspende la siguiente composición en 100 ml de agua purificada esterilizada, y se pueden preparar gotas oftálmicas ajustando el pH a 7,0 en una concentración isotónica con las lágrimas.

SPF-3059-5	50 mg
Dihidrogenofosfato de potasio	cantidad apropiada
Hidrogenofosfato de disodio	cantidad apropiada
Sal común	cantidad apropiada
Cloruro de bencetonio	10 mg
Agua purificada esterilizada	cantidad apropiada

Ejemplo 4

Ejemplo de preparación

Según un método convencional para pomadas oftálmicas, se puede preparar la pomada oftálmica de la siguiente formulación.

SPF-3059-5	50 mg
Parafina líquida	10 g
Vaselina blanca	cantidad apropiada

Ejemplo 5

Ejemplo de ensayo farmacológico en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media en una rata

- 5 Se puede evaluar el daño de las células nerviosas cerebrales como el tamaño de la región infartada que resulta de la oclusión permanente de la arteria cerebral media o de la oclusión de la arteria cerebral media - reperfusión. Se puede cuantificar también por el número de fibras nerviosas y el número de fibras nerviosas reproducidas presentes en la región infartada o por el número de fibras nerviosas que penetran en la región infartada desde una región normal, que se pueden usar como indicadores para conocer el grado de la lesión. El efecto farmacológico de un agente terapéutico o preventivo para las enfermedades cerebrovasculares isquémicas que tiene efecto de supresión se puede confirmar usando estos parámetros como indicadores.

Método de ensayo

(1) Administración del fármaco

- 15 El SPF-3059-5 como sustancia de ensayo se administra directamente a la región del infarto cerebral con una bomba miniosmótica (Alza). La sustancia de ensayo se diluye con PBS hasta 0,1 mg/ml y se carga en el reservorio de una bomba. La PBS se carga como control. Se incuba la bomba en una solución isotónica de cloruro de sodio a 37 °C a partir de 2 días antes de la operación para estabilizar el caudal.

(2) Operación

- 20 La eficacia farmacológica de las sustancias de ensayo se evalúa en un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media utilizando una rata Stroke-Prone espontáneamente hipertensa (rata SHRSP) y en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media - reperfusión utilizando una rata Wistar. Se realiza después una operación de implantación de una cánula en el parénquima de la corteza cerebral para administrar la sustancia de ensayo.

Operación de implantación de una cánula

- (i) Se anestesia una rata con halotano y se fija a un aparato estereotáxico del cerebro.
- 25 (ii) Se hace una incisión en la piel de la cabeza para exponer el cráneo.
- (iii) Se hace un agujero con un taladro en la parte izquierda del cráneo, y se implanta una cánula conectada a una bomba miniosmótica que está cargada con un fármaco en el parénquima de la parte izquierda de la corteza cerebral.
- (iv) Se fija la cánula al cráneo con cemento dental y se inserta una bomba en el tejido celular subcutáneo dorsal. Se sutura el área cortada.

30 Modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media

Se causa una oclusión permanente de la arteria cerebral media en una rata SHRSP por el siguiente método.

- (i) Se separa el músculo del lado izquierdo de la cabeza, se taladra el hueso temporal para exponer la arteria cerebral media.
- (ii) Se cauteriza la arteria cerebral media con un coagulador bipolar para bloquear el flujo sanguíneo.
- 35 (iii) Se sutura el área herida de la rata y se reanima mientras se mantiene la temperatura corporal.

Modelo de oclusión de la arteria cerebral media - reperfusión

Se produce la oclusión de la arteria cerebral media - reperfusión en una rata Wistar por el siguiente método.

- (i) Se hace una incisión en la piel cervical para exponer la arteria carótida.
- (ii) La parte exterior de la arteria carótida se liga con hilo de seda.

(iii) Se cauteriza un vaso sanguíneo delgado que conecta la arteria carótida externa y la arteria carótida interna para aislarlo. Se liga la arteria carótida total.

(iv) Se para temporalmente el flujo sanguíneo de la arteria carótida interna y se abre un agujero en el sitio de ramificación hacia la arteria carótida externa y se inserta un émbolo (hilo de nilón recubierto con silicona).

5 (v) Se inserta el émbolo en profundidad con cuidado de que no entre en la arteria esfenopalatina.

(vi) Se liga el émbolo y se fija al vaso sanguíneo.

(vii) Se sutura el área herida de la rata y se reanima mientras se mantiene la temperatura corporal.

(3) Evaluación histológica

10 Como evaluación farmacológica, se miden el tamaño de la región infartada teñida con TTC (abreviatura de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) y el número de fibras nerviosas inmunoteñidas y de fibras nerviosas reproducidas presentes en la región del infarto.

Evaluación por tinción con TTC

(i) Se perfunde la rata a través del corazón con una solución salina normal bajo anestesia una semana después de la operación.

15 (ii) Se separa el cerebro y se prepara una sección que tiene un espesor de 2 mm con un cortador de cerebro y se fija a un cubre con un adhesivo de acción rápida.

(iii) La sección fijada al cubre se sumerge en solución de TTC al 0,8 % /PBS a 37 °C durante 10 minutos y se tiñe.

(iv) Se transfiere a un tampón de formalina al 10 % a 4 °C y se termina la tinción.

20 (v) Se toma una fotografía con un microscopio estereoscópico, se convierte en un archivo digital con un ordenador y se mide el tamaño del infarto cerebral por medio de un programa informático de análisis de imágenes.

Evaluación por inmunotinción

(i) Se perfunde la rata a través del corazón con PBS bajo anestesia una semana después de la operación y después se perfunde y se fija con solución de paraformaldehído al 4 % /PBS.

25 (ii) Se separa el cerebro y se post-fija con un fijador para *post-fix* durante una noche y se conserva en un baño de solución de sacarosa al 30 % /PBS a 4 °C.

(iii) Se prepara una sección que tiene un espesor de 40 µm con un criostato y se recoge como una sección que flota en TBS.

30 (iv) Se inmunotiñe por el método ABC y se prepara un corte. Como anticuerpo, se utiliza un anticuerpo anti-neurofilamento como un indicador de fibras nerviosas y se utiliza un anticuerpo anti-GAP-43 como un indicador de fibras nerviosas en regeneración.

(v) Se toma una fotografía de la región infartada con el microscopio, se convierte en archivo digital con un ordenador y se cuantifican el número de fibras nerviosas y de fibras nerviosas reproducidas y el número de fibras que penetran en la región infartada desde una región normal, por medio de un programa informático de análisis de imágenes

Aplicabilidad industrial

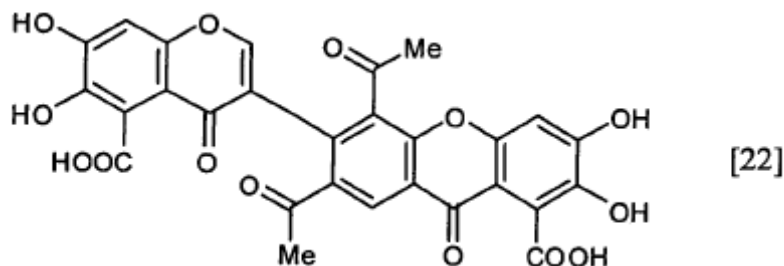
35 El compuesto de la presente invención que tiene una actividad inhibidora de la semaforina que se obtiene cultivando *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 presenta un efecto supresor de la muerte de las células nerviosas implicada en las lesiones isquémicas y por lo tanto se puede usar de forma ventajosa como un agente terapéutico o preventivo para la neuropatía retiniana asociada con lesiones isquémicas tal como glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular y retinopatía del prematuro, y como un agente terapéutico o preventivo para los trastornos cerebrovasculares isquémicos tales como embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia de la espina dorsal postoperatoria.

40

45

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto que tiene actividad inhibitora de la semaforina, que se obtiene mediante cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 y que se representa por la fórmula [22]:



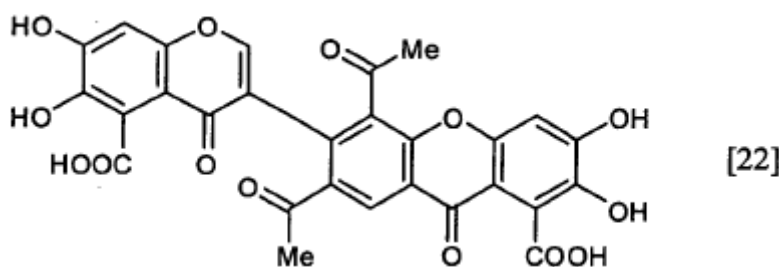
5 o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables; en la fabricación de un medicamento para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo para suprimir la muerte de las células nerviosas en una lesión isquémica del nervio por un trastorno isquémico.

10 2. El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según la reivindicación 1, en el que el trastorno isquémico es embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia postoperatoria de la médula espinal.

15 3. El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según la reivindicación 1, en el que el trastorno isquémico es glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular o retinopatía del prematuro.

4. El uso de un compuesto o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento según la reivindicación 1, en el que el trastorno isquémico es retinopatía diabética.

20 5. Un compuesto que tiene actividad inhibitora de la semaforina, que se obtiene mediante cultivo de *Penicillium sp.* cepa SPF-3059 y que se representa por la fórmula [22]:

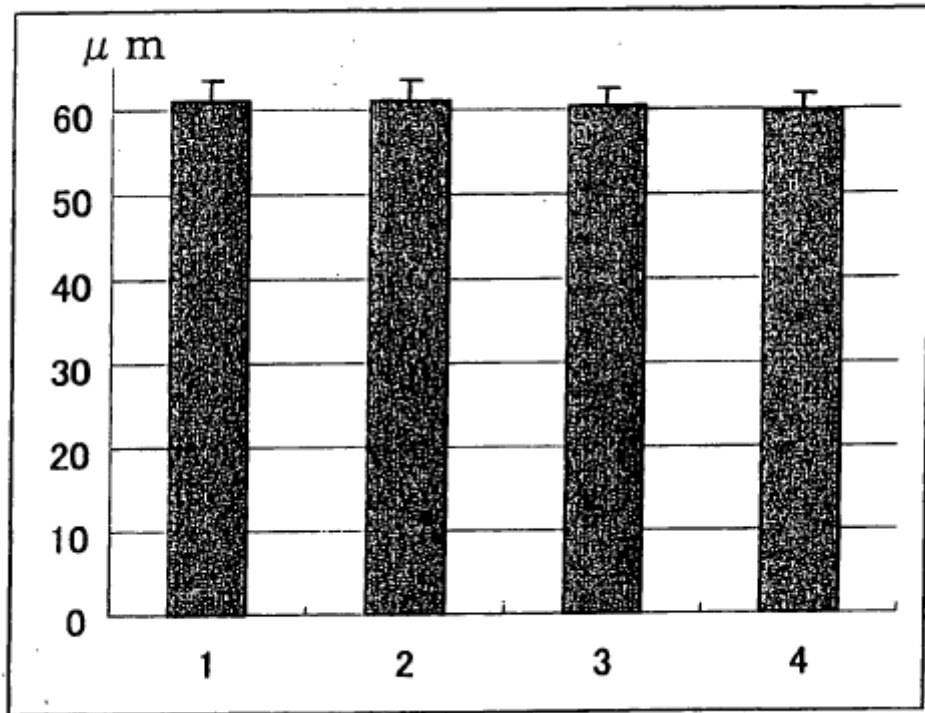


25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo para suprimir la muerte de las células nerviosas en una lesión isquémica del nervio por un trastorno isquémico.

30 6. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según la reivindicación 5, en el que el trastorno isquémico es embolia cerebral, isquemia cerebral transitoria, síndrome del robo de la subclavia, síndrome de Wallenberg (síndrome medular lateral), trombosis cerebral, infarto lacunar, déficit neurológico isquémico reversible, infarto cerebral, enfermedad de moyamoya (oclusión del círculo de Willis), encefalopatía hipóxica, trombosis de los senos venosos o isquemia postoperatoria de la médula espinal.

- 5 7. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según la reivindicación 5, en el que el trastorno isquémico es glaucoma, oclusión de la arteria retiniana central, oclusión de la arteria retiniana ramificada, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, neuropatía óptica isquémica, retinopatía diabética, degeneración macular o retinopatía del prematuro.
8. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para uso como un ingrediente activo en un agente terapéutico o preventivo según la reivindicación 5, en el que el trastorno isquémico es retinopatía diabética.

FIG. 1



5

FIG. 2

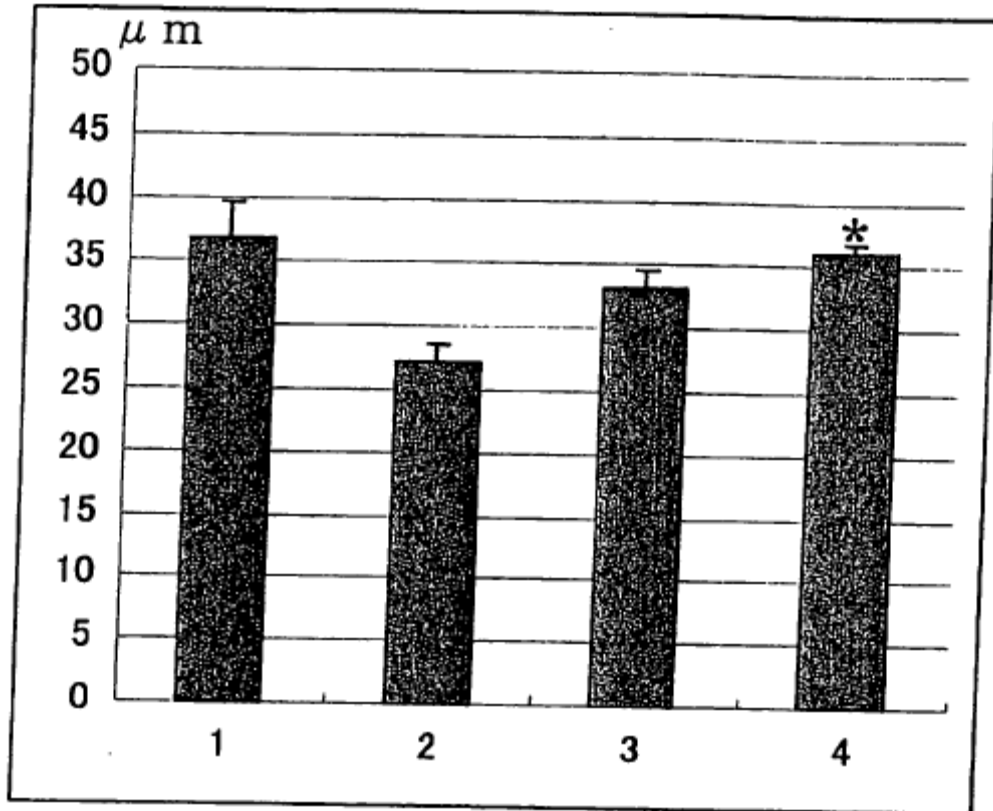


FIG. 3

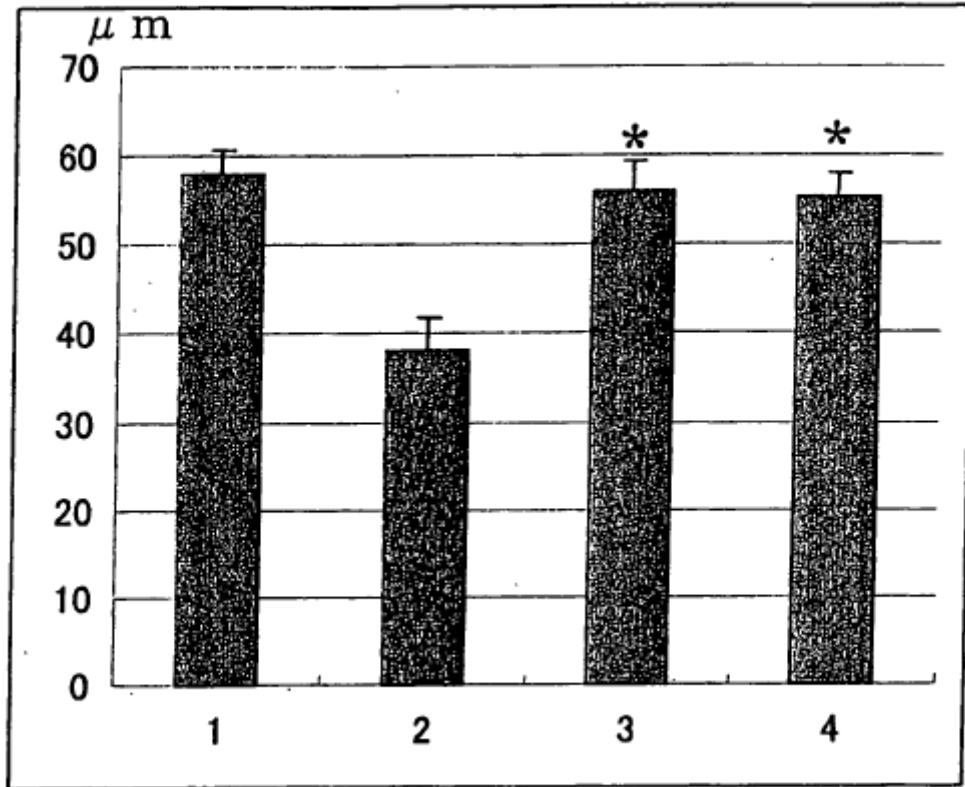


FIG. 4

