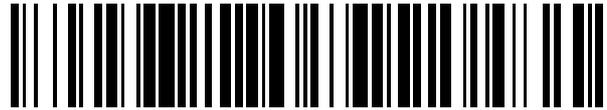


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 360**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008 E 08380288 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2012 EP 2174654**

54 Título: **Composición micronizada de un derivado de fenol 2,4-di sustituido**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2013

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL FARMACEUTICA CANTABRIA, S.A.
(100.0%)
Arequipa, No. 1
28043 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MATJI TUDURI, JOSÉ ANTONIO y
LÓPEZ BELMONTE PASCUAL, JUAN**

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 396 360 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

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende un derivado de fenol 2,4-di sustituido en su forma micronizada y su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por leucotrienos, enfermedades inflamatorias gastrointestinales o fibrosis pulmonar. En particular la invención presente se refiere al derivado de fenol 2,4-di sustituido para su uso en el tratamiento de la fibrosis pulmonar. De forma más particular la invención presente se refiere al uso del 2,4,6-triyodofenol para el tratamiento de la fibrosis pulmonar y la artritis.

10 **Estado de la Técnica**

Ciertos derivados de fenoles 2,4-di sustituidos han sido utilizados para la preparación de drogas dirigidas al tratamiento de enfermedades mediadas por leucotrienos, tal como la artritis reumatoide, colitis ulcerosa, asma, psoriasis y herpes, debido a la potente actividad de dichos derivados como inhibidores de la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (iNOS) y como inhibidor de la expresión de la molécula de adhesión L-Selectina en la superficie de la membrana plasmática de los leucocitos, tal y como se describe en la PCT publicada con el número de solicitud WO 95/21610.

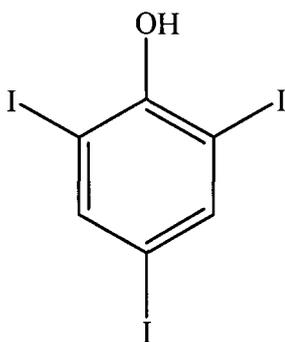
20 No obstante, estos derivados presentan ciertas desventajas farmacocinéticas, terapéuticas y de tolerabilidad cuando se administran en un régimen de administración múltiple debido a la dificultad para mantener un rango de concentraciones dentro del índice terapéutico.

Descripción de la invención

25 La presente invención se refiere a una composición micronizada que comprende el 2,4,6-triyodofenol y su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por leucotrienos, entre las que se incluyen enfermedades inflamatorias gastrointestinales, artritis y fibrosis pulmonar.

30 El compuesto de la presente invención presenta claras ventajas tanto farmacocinéticas como de eficacia y tolerabilidad sobre el compuesto no micronizado. Para demostrar este hecho se llevó a cabo un estudio en fase I en voluntarios sanos donde se administró por vía oral a las dosis de 240, 350 y 500 mg en un régimen de administración múltiple el compuesto no micronizado (ver ejemplo 4). De este estudio se concluye que existe un mayor acumulo de compuesto que el correspondiente a una farmacocinética lineal (ver fig. 9). Esto último, impide proponer un diseño que permita, tras un régimen de administración múltiple, mantener las concentraciones plasmáticas del compuesto dentro de un rango determinado. Sin embargo la composición de la presente invención resuelve este problema.

35 Por lo tanto, una primera característica de esta invención se refiere a una composición que comprende el 2,4,6-triyodofenol con la fórmula:



40 caracterizada en que el 2,4,6-triyodofenol de la composición se halla en su forma micronizada.

La micronización del 2,4,6-triyodofenol se llevó a cabo por métodos estandarizados que forman parte del conocimiento común general. Según la invención el método resulta en un tamaño de partícula inferior a 20 micras y un contenido de agua inferior al 1%. Preferentemente el método resulta en un tamaño de partícula inferior a 15 micras, y en una representación aún más preferida el tamaño medio está entre 2 y 5 micras y el contenido de agua es inferior al 0,5%.

45 Una segunda característica de esta invención se refiere a la composición descrita arriba para su uso como un medicamento. Preferentemente para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por leucotrienos entre las que se incluyen enfermedades inflamatorias gastrointestinales y fibrosis pulmonar.

50 Donde la enfermedad mediada por leucotrienos se selecciona de la lista que incluye artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, colitis ulcerosa, y fibrosis pulmonar. La composición de la presente invención puede opcionalmente incluir cualquier ingrediente convencional para mejorar las propiedades físicas, la apariencia visual o el olor de una composición farmacéutica.

La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser químicamente y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes que forman una formulación, y/o el mamífero objeto del tratamiento.

5

Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1.** Muestra la comparación de la actividad inhibitoria, sobre la enzima 5-lipoxigenasa ex vivo en sangre de rata entera, de una muestra micronizada de 2, 4, 6 triiodophenol con la de otra muestra de la misma sustancia sin micronizar.

Figura 2. Muestra el recuento diferencial de macrófagos en lavado broncoalveolar. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=1-9) \pm el error estándar de la media del % de macrófagos del número total de células.

15 **Figura 3** Muestra el recuento diferencial de linfocitos en lavado broncoalveolar. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=1-9) \pm el error estándar de la media del % de linfocitos del número total de células.

Figura 4 Muestra el recuento diferencial de neutrófilos en lavado broncoalveolar. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=1-9) \pm el error estándar de la media del % de neutrófilos del número total de células.

20 **Figura 5** Muestra la concentración de CCL5 en el lavado broncoalveolar. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=1-9) \pm el error estándar de la media.

Figura 6 Muestra la concentración de TGF β 1 en el lavado broncoalveolar. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=1-9) \pm el error estándar de la media.

Figura 7 Muestra la variación en el volumen total de las patas traseras de los grupos experimentales D, E y F (administración B.I.D.) a lo largo del periodo de experimentación. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=10) \pm el error estándar de la media.

30 **Figura 8** Muestra el edema (diferencia de volumen respecto a los valores basales del día 20) de la suma de las patas traseras de los grupos experimentales D, E y F (administración B.I.D.) a lo largo del periodo de experimentación. Los resultados se muestran como la media aritmética (n=10) \pm el error estándar de la media.

35 **Figura 9** Muestra perfiles de concentración media observada y predicciones típicas poblacionales obtenidas a partir de un modelo farmacocinética lineal (líneas) frente al tiempo; 240 mg (puntos, línea continua), 350 mg (círculos, línea punteada), 500 mg (triángulos, línea trazos).

40 Ejemplos representativos de la invención

Ejemplo 1: Determinación de actividad inhibitoria sobre la 5-lipoxigenasa ex-vivo en sangre de rata entera.

45 En este ejemplo se demuestra la actividad inhibitoria de 1 muestra micronizada de 2,4,6-triyodophenol sobre el enzima de la 5-lipoxigenasa ex-vivo en sangre de rata entera, y comparar su actividad con la de otra muestra de la misma sustancia sin micronizar.

En el ejemplo se utilizaron 3 grupos de animales (ratas), con 6 ratas en cada grupo. Los grupos fueron:

- 50
- 1 grupo 1: control (vehículo)
 - 2 grupo 2: tratado con sustancia de ensayo micronizado (10mg/Kg)
 - 3 grupo 3: tratado con sustancia de ensayo no micronizado (10mg/Kg)

La distribución de animales a cada grupo se realizó de manera aleatoria al comienzo del estudio.

55 Las sustancias de ensayo y de referencia se administraron en forma de suspensión en carboximetilcelulosa sódica al 0.25% en agua bidestilada y oralmente por cánula en un volumen de 4ml kg⁻¹ mediante el uso de una jeringa.

60 La administración se realizó una vez cada 24 horas (09h 00min) durante 5 días consecutivos. En el 5º día se obtuvo una muestra de sangre de cada animal (1mL) 1 hora después de la administración de las sustancias de ensayo y referencia. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena cava posterior en jeringas estériles conteniendo citrato sódico (4%) como anticoagulante. Cada muestra de sangre se dividió en dos alícuotas de 0.5ml (duplicados). Se utilizó un periodo de tiempo de 1hora tras la administración del fármaco para la obtención de sangre ya que se ha determinado en estudios preliminares que es cuando existe una mayor inhibición de la síntesis de leucotrienos inducida por la sustancia de ensayo.

65 Inmediatamente tras la obtención de las muestras de sangre, las alícuotas en duplicado se incubaron a 37°C durante 10min. Transcurrido este tiempo se estimularon con ionoforo cálcico (30 μ M, concentración final) durante 30min a 37°C. Una vez finalizado el periodo de incubación se centrifugaron las alícuotas a 12,000g durante 2min. El plasma resultante se separó y se guardó a -20°C para su posterior análisis. En estas muestras se determinó la concentración de

leucotrieno B₄ mediante inmunoensayo enzimático (kit EIA; Amersham).

Control		Micronizado		No- Micronizado	
Código muestra	LTB4 (ng/ml)	Código muestra	LTB4 (ng/ml)	Código muestra	LTB4 (ng/ml)
C1	10,102	MI-1	4,583	R-1	4,355
C2	6,466	MI-2	6,118	R-2	4,905
C3	N/A	MI-3	4,602	R-3	8,818
C4	9,319	MI-4	6,067	R-4	9,682
C5	7,599	MI-5	6,549	R-5	6,862
C6	7,535	MI-6	5,032	R-6	4,355

MEDIA GRUPO	LTB4 (ng/ml) (+/-)eem		Desv. estándar.
	Control	8,204	
Micron	5,492	0,350	0,857
No-Micro	6,496	0,955	2,340

5

TABLA I

Micronizado		No-Micronizado.	
Código muestra	LTB4 %inhib.	Código muestra	LTB4 %inhib.
MI-1	44,140	R-1	46,917
MI-2	25,423	R-2	40,210
MI-3	43,902	R-3	-7,480
MI-4	26,054	R-4	-18,013
MI-5	20,176	R-5	16,356
MI-6	38,665	R-6	46,917

MEDIA GRUPO	LTB4 %Inhib. (+/-)eem		Desv. estándar.
	Micron	33,060	
No-Micro	20,818	11,643	28,520

10

TABLA II

Los resultados obtenidos demuestran (Tabla I, II y FIG. 1) que el producto micronizado, en una dosis de 10mg/Kg, inhibe de manera estadísticamente significativa (*P<0,05, ANOVA+ Test de Dunnett) la formación de leucotrieno B₄ (LTB4) por el enzima de la 5-lipoxigenasa ex-vivo en sangre de rata estimulada con ionoforo cálcico tras 5 días de tratamiento oral. Adicionalmente, el grado de inhibición es superior al obtenido con la misma sustancia no micronizada, y la dispersión de los resultados es también inferior (menor variabilidad).

20

Ejemplo 2: Estudio preliminar de actividad en un modelo de fibrosis pulmonar inducida mediante bleomicina en ratones.

En este ejemplo se demuestra la capacidad de la muestra micronizada de 2,4,6-triyodophenol para paliar la infiltración celular observada en los pulmones característica de la fibrosis pulmonar en un modelo animal inducido mediante una administración única intratraqueal de bleomicina en ratones.

La administración de bleomicina resultó en un incremento en la celularidad observada en el lavado broncoalveolar a los 21 días. Se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos y neutrófilos en las células obtenidas en dicho lavado, y una reducción en el porcentaje de macrófagos.

Igualmente, la administración de bleomicina también resultó en un incremento significativo en la concentración de la quimioquina proinflamatoria CCL5 y el factor TGFβ en el lavado broncoalveolar a los 21 días.

Estas son características típicas de la fibrosis pulmonar en este modelo experimental, e indicativas de la severidad de la respuesta inflamatoria en los pulmones.

El tratamiento el 2,4,6-triyodophenol micronizado, a una dosis de 10mg/kg (2 veces al día) por vía oral, comenzado a los 7 días de la administración de bleomicina (tratamiento terapéutico, cuando ya existe una inflamación pulmonar establecida) resultó en una reducción en el incremento en el porcentaje de linfocitos y neutrófilos del lavado broncoalveolar, y un incremento en el porcentaje de macrófagos hacia los niveles observados en animales sanos.

Igualmente, el tratamiento con dicho compuesto también resultó en una inhibición muy significativa en el incremento en las concentraciones de CCL5 y TGFβ en el lavado broncoalveolar.

Estos resultados demuestran una actividad antiinflamatoria del compuesto micronizado en un modelo de fibrosis pulmonar en ratón.

Para la elaboración del ensayo se utilizaron ratones hembra de tipo C57/BL6 sanos y jóvenes, de aproximadamente 9-10

semanas de edad al comienzo de la fase experimental. La elección de los ratones tipo C57/BL6 se realizó al ser la cepa más utilizada en este modelo de fibrosis pulmonar.

En el estudio se utilizaron 3 grupos experimentales:

- 5 Grupo A (control positivo): Bleomicina + Vehículo (PBS) n=10
 Grupo B: Bleomicina + 2,4,6-triyodophenol micronizado 10mg/kg en régimen q.d.(cada 12 horas) n=10
 Grupo C: Sin tratamiento (animales sanos) n=1
 Siendo n el número de ratones por grupo.
- 10 Las sustancias de ensayo y vehículo se administraron en forma de suspensión en metilcelulosa al 0,25% (vehículo). El grupo control positivo (A) recibió el vehículo (PBS).
 Las sustancias de ensayo y vehículo se administraron por vía oral en un volumen de 5 ml/kg dos veces al día (q.d.) cada 12 horas.
- 15 El día 0 se indujo la fibrosis pulmonar mediante instilación de 0,075 unidades de bleomicina en 50 µl de solución salina estéril en los pulmones de cada ratón, mediante vía intratraqueal. Inmediatamente después, se le introdujeron por el mismo medio 150 µl de aire para mejorar la distribución de la bleomicina en la cavidad pulmonar.
 El día 7 tras la inducción comenzó la administración de la sustancia de ensayo y vehículo mediante dosificación oral. La administración fue de dos veces cada día (cada 12 horas) y tuvo una duración de 15 días.
- 20 En el día 21 tras la inducción se realizó un lavado broncoalveolar a todos los animales. A este efecto se anestesiaron los ratones con pentobarbital sódico y se procedió a la canulación de la tráquea de cada animal. Seguidamente se instiló y re-aspiró intratraquealmente 1 ml de PBS previamente atemperado a 37°C. Este paso se repitió 5 veces, recogiendo cada vez el aspirado en un vial y combinando los aspirados de las 5 instilaciones. El volumen recuperado del lavado broncoalveolar se ajustó para todos los animales a 5 ml.
- 25 Una vez obtenido el lavado broncoalveolar se tomó una muestra y se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de tinción con Trypan blue. Adicionalmente se guardó una muestra congelada (-20°C) del lavado broncoalveolar para posteriores determinaciones de citoquinas CCL5 y TGF-β mediante ELISA.
 Con el resto del lavado broncoalveolar se realizó un recuento diferencial de células, mediante centrifugado en citocentrífuga y tinción (Diff-Quick).
- 30 Los animales se pesaron a su llegada al laboratorio y cada día, durante la administración de las sustancias de ensayo y referencia y hasta finalizar el ensayo.
- 35 Se determinó para cada animal en el lavado broncoalveolar la viabilidad celular mediante la técnica de la exclusión de Trypan Blue y el tipo celular mediante citocentrifugación y posterior tinción con Diff-Quick (recuento de aproximadamente 200 células). Además se realizaron determinaciones cuantitativas de las citoquinas CCL5 y TGF-β mediante kits ELISA comerciales específicos para ratón suministrados por R&D Systems en el lavado broncoalveolar.

Recuento Diferencial Celular en lavado Broncoalveolar (%)									
GRUPOS	Macrófagos			Linfocitos			Neutrófilos		
	Media	Desv. Est.	EEM	Media	Desv. Est.	EEM	Media	Desv. Est.	EEM
A	39,21	22,30	8,43	52,35	18,43	6,97	8,44	4,35	1,64
B	60,33	20,53	7,76	34,35	18,36	6,94	5,32	3,58	1,35
CONTROL	86,12			13,43			0,45		

Tabla III.

- 40 En la Tabla III se muestra el recuento diferencial de células presentes en el lavado broncoalveolar de cada animal como porcentaje de cada tipo de células. Los datos se representan como la media aritmética, desviación estándar de la media y error estándar de la media para cada grupo experimental. Estos datos se representan en la FIG. 2.
- 45 Se determinó la concentración de CCL5 en una muestra de lavado broncoalveolar en todos los animales supervivientes al día 21 de cada grupo experimental. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV y se muestran en la FIG. 5:

VALORES CCL5 EN BALF				
GRUPO A		GRUPO B		CONTROL
Ratón	C (pg/ml)	Ratón	C (pg/ml)	C (pg/ml)
A1	55,892	B1	24,658	1,579
A2	13,734	B2	3,426	
A3	52,507	B5	2,272	
A4	58,353	B7	1,887	
A5	41,506	B8	3,041	
A7	27,351	B9	6,426	
A8	48,506			
A9	16,196			
MEDIA	39,256	MEDIA	6,952	
DESV. EST.	17,859	DESV. EST.	8,821	
E.E.M.	6,314	E.E.M.	3,334	

Tabla IV. Concentración de CCL5 en BALF. Los resultados se expresan como pg/ml de BALF.

- 5 Se determinó la concentración de TGFβ1 en una muestra de lavado broncoalveolar en todos los animales supervivientes al día 21 de cada grupo experimental. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla V y se muestran en la FIG. 6:

VALORES TGFβ EN BALF				
GRUPO A		GRUPO B		CONTROL
Ratón	C (pg/ml)	Ratón	C (pg/ml)	C (pg/ml)
A1	140,912	B1	121,586	3,558
A2	91,906	B2	9,770	
A3	146,434	B4	74,651	
A4	124,347	B5	6,319	
A5	136,771	B7	8,389	
A7	142,983	B8	26,335	
A8	190,608	B9	38,069	
A9	85,694			
MEDIA	132,457	MEDIA	40,731	
DESV. EST.	33,112	DESV. EST.	42,995	
E.E.M.	11,707	E.E.M.	16,250	

- 10 **Tabla V.** Concentración de TGFβ1 en BALF. Los resultados se expresan como pg/ml de BALF.

- 15 La significatividad estadística de los resultados se ha evaluado mediante el programa informático Graphpad Instat 3. Para la valoración de diferencias en valores de celularidad y concentración de quimioquinas en lavado broncoalveolar se han realizado todas las comparaciones mediante el test de t de Student (two-way, datos no parejos). Todas las comparaciones realizadas mediante test de t de Student (one-tailed, unpaired data). Valores de P≤0,05 se toman como significativos. *P<0,05.

- 20 **Ejemplo 3: Estudio de la actividad antiinflamatoria en un modelo de artritis inducida mediante colágeno en ratones.**

- 25 El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de la sustancia de ensayo para inhibir la respuesta inflamatoria en un modelo de artritis inducida mediante colágeno (CIA) en ratones y comparar la actividad de dos formulaciones distintas: micronizado y no-micronizado.

La inducción de la artritis se produjo con la exposición inicial a colágeno bovino tipo II mediante inyección subcutánea en la base de la cola (exposición de inducción). Tras un período de descanso de 21 días, los animales se sometieron a una

- inyección subcutánea de recuerdo y entre las 4 y 5 semanas después de la primera inyección se produjo una respuesta inmunitaria de los ratones, surgiendo una artritis de las extremidades en la mayoría de los casos.
- 5 El tratamiento de los animales con la sustancia de referencia Indometacina (1mg/kg Q.D) resultó en un efecto antiinflamatorio significativo sobre el edema (la inflamación en las patas resultante de las inyecciones) en determinados días a lo largo del desarrollo del estudio.
- El tratamiento de los animales con las sustancias de ensayo tanto en régimen de posología BID (administración cada 12 horas), resultó en un efecto sobre la inflamación significativo, obteniendo la posología BID los mejores resultados sobre la inflamación (diferencia de volumen frente al basal).
- 10 Con el tratamiento de los animales con una muestra micronizada de 2,4,6-triyodophenol 10mg/kg en posología BID, se observaron resultados significativos ($P < 0.05$) en la diferencia de volumen (edema) en los días 48, 50, 56, 58 y 65 (con unos porcentajes de inhibición respecto al basal iguales a 68.72 ± 8.98 , 70.56 ± 9.88 , 71.49 ± 7.19 , 66.29 ± 5.13 y 64.95 ± 7.58 respectivamente), así como también se observó un valor muy significativo el día 51 (cuyo porcentaje de inhibición fue de 77.59 ± 9.08).
- 15 En comparación, con el tratamiento de la muestra no micronizada de 2,4,6-triyodophenol 10mg/kg en posología BID no se observaron resultados significativos en inhibición del edema de las patas traseras en ningún día.
- Como conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la sustancia de ensayo varía su efecto antiinflamatorio dependiendo de la formulación farmacéutica utilizada (micronizado (Micro) y no micronizado (Referencia)), obteniéndose un efecto mas pronunciado con la formulación Micro.
- 20 En el estudio se utilizaron 4 grupos experimentales con 10 animales cada uno:
 Grupo D: Control Positivo: FCA + vehículo B.I.D.
 Grupo E: Micronizado (Micro) 10 mg/kg B.I.D.
 Grupo F: Sin micronizar 10 mg/kg B.I.D.
 Grupo G: Sustancia de referencia: Indometacina 1 mg/kg Q.D.
- 25 La dosis para los grupos experimentales D,E,F fue de 10 mg/kg.
 La dosis para el grupo G fue de 1 mg/kg.
 Las dosis de las sustancias a ensayar se expresaron como mg/Kg de sustancia administrada por cada animal.
 Las sustancias de ensayo y referencia se administraron en una solución de metilcelulosa 0,25% (vehículo).
- 30 El grupo control positivo recibió el vehículo (metilcelulosa 0,25%).
 El grupo de referencia recibió Indometacina en forma de suspensión en una solución de metilcelulosa 0.25% (vehículo).
 Las sustancias de ensayo, referencia y vehículo se administraron por vía oral en un volumen de 5 ml/kg.
 La vía de administración utilizada en la dosificación de las suspensiones fue la oral mediante cánula intragástrica.
- 35 Previamente a la administración y a la inducción de artritis, se midieron los volúmenes de ambas patas traseras de cada animal, con el fin de obtener los volúmenes basales de las patas.
 En el día del comienzo del estudio, se inyectó a cada ratón la primera dosis de 0,1 ml de una emulsión de colágeno tipo II bovino (1mg/mL) en adyuvante completo de Freund. Posteriormente, en el día 21 desde el comienzo del estudio, se administró una segunda inyección (de recuerdo, o "booster") de colágeno (0,1mL) a todos los animales. En este caso la suspensión del colágeno (1mg/mL) se realizó en adyuvante incompleto de Freund.
- 40 Coincidente con la segunda inyección de adyuvante, en el día 21 se comenzó el tratamiento de los animales con las sustancias de ensayo o referencia, vía oral, en un volumen de 5 ml/kg.
 El tratamiento de los diferentes grupos experimentales con las sustancias de ensayo o referencia se realizó durante 31 días consecutivos. Adicionalmente se incluyó un periodo de recuperación tras la finalización de la administración de las sustancias de ensayo y referencia desde el día 52 al día 65 para determinar la duración de cualquier efecto antiinflamatorio observado una vez que se suspende la administración.
- 45 El volumen de las patas traseras se midió un día antes de la 1ª inyección de colágeno para la inducción de artritis, un día antes de la 2ª inyección (recordatorio o "booster") para la inducción de artritis (niveles basales) y diariamente tras la administración de las sustancias de ensayo o referencia, hasta la finalización del estudio. Tras cesar la administración, las dos últimas semanas de estudio, se realizó un seguimiento (periodo de recuperación) midiendo el volumen de las patas 3 veces por semana.
- 50 Los datos obtenidos en las mediciones se recogieron en forma de tablas. Adicionalmente se elaboraron gráficas en las cuales se representa tanto el volumen total de las patas como del edema (diferencias de los valores basales del día 21).
- 55

ES 2 396 360 T3

VOLIMENES TOTALES					
DIA 9		0,183	0,169	0,189	0,175
		0,009	0,019	0,022	0,021
		0,003	0,006	0,007	0,007
DIA 20		0,226	0,238	0,243	0,227
		0,022	0,014	0,025	0,014
		0,007	0,005	0,008	0,005
DIA 22		0,228	0,244	0,240	0,227
		0,023	0,010	0,024	0,017
		0,007	0,003	0,008	0,006
DIA 23		0,235	0,228	0,250	0,227
		0,026	0,023	0,014	0,018
		0,008	0,008	0,004	0,006
DIA 26		0,247	0,252	0,253	0,249
		0,029	0,009	0,014	0,014
		0,009	0,003	0,004	0,004
DIA 27		0,228	0,231	0,242	0,228
		0,016	0,016	0,014	0,014
		0,005	0,005	0,004	0,004
DIA 29		0,238	0,234	0,248	0,237
		0,016	0,017	0,013	0,015
		0,005	0,006	0,004	0,005
DIA 30		0,239	0,237	0,259	0,239
		0,023	0,016	0,015	0,012
		0,007	0,005	0,005	0,004
DIA 33		0,238	0,231	0,250	0,238
		0,024	0,017	0,025	0,011
		0,008	0,006	0,008	0,003
DIA 34		0,242	0,228	0,254	0,240
		0,015	0,019	0,011	0,013
		0,005	0,006	0,004	0,004
DIA 35		0,245	0,250	0,255	0,246
		0,016	0,012	0,017	0,016
		0,005	0,004	0,005	0,005
DIA 36		0,241	0,244	0,254	0,239
		0,012	0,010	0,009	0,014
		0,004	0,003	0,003	0,004
DIA 37		0,223	0,239	0,243	0,222
		0,012	0,014	0,017	0,011
		0,004	0,005	0,005	0,003
DIA 40		0,258	0,263	0,273	0,255
		0,013	0,010	0,014	0,008
		0,004	0,003	0,004	0,003
DIA 41		0,263	0,256	0,271	0,257
		0,012	0,013	0,017	0,014
		0,004	0,004	0,005	0,004
DIA 42		0,247	0,241	0,264	0,247
		0,015	0,019	0,008	0,011
		0,005	0,006	0,003	0,004
DIA 43		0,256	0,244	0,255	0,250
		0,014	0,012	0,016	0,010
		0,004	0,004	0,005	0,003

VOLUMENES TOTALES					
DIA 44		0,243	0,238	0,248	0,238
		0,019	0,018	0,017	0,017
		0,006	0,006	0,005	0,005
DIA 47		0,266	0,254	0,273	0,254
		0,044	0,016	0,019	0,013
		0,014	0,005	0,006	0,004
DIA 48		0,277	0,254	0,277	0,252
		0,044	0,010	0,027	0,007
		0,014	0,003	0,009	0,002
DIA 49		0,270	0,261	0,281	0,256
		0,048	0,007	0,038	0,011
		0,015	0,002	0,012	0,003
DIA 50		0,284	0,255	0,289	0,256
		0,047	0,008	0,046	0,008
		0,015	0,003	0,014	0,002
DIA 51		0,285	0,251	0,288	0,248
		0,042	0,009	0,049	0,013
		0,013	0,003	0,016	0,004
DIA 54		0,295	0,270	0,307	0,266
		0,054	0,013	0,062	0,010
		0,017	0,004	0,020	0,003
DIA 55		0,302	0,259	0,304	0,279
		0,055	0,015	0,051	0,034
		0,017	0,005	0,016	0,011
DIA 56		0,315	0,268	0,312	0,285
		0,056	0,007	0,065	0,043
		0,018	0,002	0,021	0,013
DIA 61		0,30	0,27	0,31	0,28
		0,05	0,01	0,05	0,05
		0,02	0,00	0,02	0,01
DIA 63		0,30	0,26	0,32	0,29
		0,04	0,02	0,05	0,07
		0,01	0,01	0,02	0,02
DIA 65		0,31	0,27	0,31	0,30
		0,05	0,01	0,04	0,05
		0,02	0,00	0,01	0,02

Tabla VI. Volumen total suma de ambas patas traseras todos los grupos.

DIFERENCIA DE VOLUMEN FRENTE AL BASAL				
DIA 0				
DIA 20 (Basal)				
DIA 22	0,003	0,006	-0,003	0,000
DIA 23	0,029	0,010	0,019	0,008
DIA 24	0,009	0,003	0,006	0,003
DIA 25	0,010	-0,010	0,007	0,000
DIA 26	0,011	0,025	0,027	0,026
DIA 27	0,003	0,008	0,009	0,008
DIA 28	0,022	0,014	0,010	0,022
DIA 29	0,014	0,012	0,029	0,017
DIA 30	0,005	0,004	0,009	0,005
DIA 31	0,003	-0,007	-0,001	0,001
DIA 32	0,022	0,022	0,019	0,018
DIA 33	0,007	0,007	0,006	0,006
DIA 34	0,013	-0,003	0,006	0,011
DIA 35	0,014	0,016	0,026	0,016
DIA 36	0,004	0,005	0,008	0,005
DIA 37	0,014	-0,001	0,016	0,012
DIA 38	0,020	0,012	0,020	0,014
DIA 39	0,006	0,004	0,006	0,004
DIA 40	0,012	-0,007	0,007	0,012
DIA 41	0,020	0,020	0,010	0,018
DIA 42	0,006	0,007	0,003	0,006
DIA 43	0,017	-0,010	0,011	0,013
DIA 44	0,020	0,021	0,020	0,017
DIA 45	0,006	0,007	0,006	0,005
DIA 46	0,020	0,012	0,013	0,020
DIA 47	0,017	0,017	0,018	0,018
DIA 48	0,005	0,006	0,006	0,006
DIA 49	0,015	0,006	0,011	0,012
DIA 50	0,015	0,013	0,021	0,023
DIA 51	0,005	0,004	0,007	0,007
DIA 52	-0,002	0,001	0,000	-0,005
DIA 53	0,023	0,011	0,032	0,022
DIA 54	0,007	0,004	0,010	0,007
DIA 55	0,032	0,026	0,030	0,028
DIA 56	0,015	0,014	0,019	0,015
DIA 57	0,005	0,005	0,006	0,005
DIA 58	0,038	0,018	0,028	0,031
DIA 59	0,020	0,025	0,013	0,020
DIA 60	0,006	0,008	0,004	0,006
DIA 61	0,022	0,003	0,021	0,021
DIA 62	0,020	0,030	0,022	0,016
DIA 63	0,006	0,010	0,007	0,005
DIA 64	0,030	0,006	0,013	0,023
DIA 65	0,022	0,022	0,027	0,009
DIA 66	0,007	0,007	0,009	0,003

5
10
15
20
25
30
35
40

DIFERENCIA DE VOLUMEN FRENTE AL BASAL					
DIA 44		0,017	0,001	0,006	0,011
		0,019	0,022	0,020	0,018
		0,006	0,007	0,006	0,006
DIA 47		0,041	0,016	0,031	0,028
		0,051	0,020	0,027	0,016
		0,016	0,007	0,008	0,005
DIA 48		0,052	0,016	0,034	0,025
		0,052	0,014	0,026	0,018
		0,016	0,005	0,008	0,006
DIA 49		0,044	0,023	0,039	0,030
		0,056	0,013	0,032	0,016
		0,018	0,004	0,010	0,005
DIA 50		0,059	0,017	0,046	0,030
		0,054	0,017	0,044	0,016
		0,017	0,006	0,014	0,005
DIA 51		0,060	0,013	0,046	0,021
		0,050	0,016	0,045	0,008
		0,016	0,005	0,014	0,002
DIA 54		0,070	0,032	0,065	0,040
		0,059	0,021	0,061	0,013
		0,019	0,007	0,019	0,004
DIA 56		0,076	0,022	0,062	0,052
		0,060	0,016	0,044	0,045
		0,019	0,005	0,014	0,014
DIA 58		0,089	0,030	0,070	0,058
		0,060	0,014	0,067	0,052
		0,019	0,005	0,021	0,017
DIA 61		0,073	0,030	0,063	0,058
		0,058	0,016	0,046	0,057
		0,018	0,005	0,015	0,018
DIA 63		0,076	0,026	0,073	0,064
		0,049	0,019	0,058	0,079
		0,015	0,006	0,018	0,025
DIA 65		0,084	0,029	0,072	0,076
		0,054	0,019	0,042	0,058
		0,017	0,006	0,013	0,018

Tabla VII Diferencia de volumen respecto al basal (edema) de ambas patas traseras en todos los grupos.

45 **Ejemplo 4: Análisis farmacocinético poblacional del 2,4,6 triyodofenol en su estado no micronizado en voluntarios sanos tras administración múltiple. (FIG. 9)**

50 El objetivo del estudio fue llevar a cabo un análisis farmacocinético poblacional del 2,4,6-triyodofenol en su forma micronizada en muestras de plasma obtenidas de voluntarios sanos.

55 Hay muchos factores que pueden llevar a la suspensión del desarrollo de una nueva droga. Mientras que aproximadamente el 50% de los fracasos se deben a una falta de eficacia, efectos adversos o toxicidad animal, unas características farmacocinéticas pobres son un tema muy importante durante el desarrollo de una sustancia ya que son responsables de casi el 40% de los fracasos. Un ritmo de absorción lento, baja biodisponibilidad, mala penetración en el tejido, un comportamiento no-lineal, la presencia de metabolitos tóxicos, o una variabilidad alta son ejemplos de propiedades farmacocinéticas limitadas, y averiguar si se pueden solventar con las herramientas disponibles actualmente es un reto. Adicionalmente a la tecnología farmacéutica que se emplea rutinariamente para mejorar las propiedades de absorción y distribución, la modelación de datos ayuda a identificar la(s) causa(s) en el caso de cinéticas no-lineales al discriminar entre hipótesis rivales y el impacto clínico de la no-linealidad.

65 El 2,4,6-triyodofenol es un potente inhibidor de la síntesis de leucotrieno B4 (LTB₄) que está en este momento en desarrollo clínico. El mecanismo exacto de acción del 2,4,6-triyodofenol no está completamente caracterizado pero se conoce que la inhibición de la enzima 5-lipoxigenasa está involucrado. Los resultados obtenidos de la primera fase de un ensayo clínico de Fase I – donde se administró una dosis única por vía oral a voluntarios sanos – demostraron que el 2,4,6-triyodofenol tenía unos perfiles de seguridad y tolerabilidad muy buenos (desde 6mg hasta 1200mg). Adicionalmente, un comportamiento farmacocinético predecible e independiente de la dosis (por lo menos en el rango desde 240 hasta 700mg) se podía describir con un modelo de ritmo de absorción de primer orden y un modelo de

disposición de un compartimiento. También se halló una relación directa y no-lineal (tipo Emax) entre las concentraciones en plasma y la inhibición de la síntesis de LTB₄ con un valor de IC₅₀ (la concentración de sustancia en plasma que resulta en una inhibición de la síntesis de LTB₄ del 50% del máximo) de 16,6µg/ml.

5 En un segundo estudio de Fase I, administrando 2,4,6-triyodofenol en un régimen de administración múltiple, la sustancia mostró un incremento totalmente inesperado en el área bajo la curva de concentración vs. tiempo (AUC), un fenómeno que podrían comprometer el proceso de desarrollo de la sustancia.

10 En el estudio participaron treinta y dos voluntarios. Todos los participantes dieron su consentimiento escrito tras una explicación plena del protocolo del ensayo y previo a su reclutamiento. Se obtuvo la aprobación del comité ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y de la Agencia Española Regulatoria del Medicamento. El estudio se condujo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y Tokyo así como con las Buenas Prácticas Clínicas. Se admitieron en el estudio voluntarios masculinos sanos con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años y un índice de Quetelet dentro del rango de la normalidad.

15 Los voluntarios no fueron elegibles para el estudio si el examen médico o las pruebas de laboratorio se desviaban de forma significativa de los valores clínicos normales, o en el caso de enfermedades gastrointestinales, hepáticas, renales, respiratorias, cardiovasculares, metabólicas, inmunológicas, hormonales, del sistema nervioso central o desórdenes psiquiátricos conocidos. Se excluyeron los voluntarios con infecciones crónicas o infecciones agudas relevantes, historial de alergias/hipersensibilidad a drogas que incluyen NSAIDs, que fumaran mas de 10 cigarrillos al día, bebiesen mas de 20 45g de alcohol al día, o fueran drogo-dependientes. Por último, los voluntarios que se hubiesen sometido a cirugía en los últimos 6 meses o aquellos que hubiesen participado en otro estudio con una droga bajo investigación en los 2 meses antes del estudio también se excluyeron.

25 *Diseño del Estudio:* El estudio fue un estudio de Fase I con administración única y múltiple, aleatorizado, doble-ciego, controlado con placebo y paralelo. El objetivo era evaluar la farmacocinética y tolerabilidad de tres dosis orales diferentes de 2,4,6-triyodofenol. Tras una fase de exploración de un día de duración realizada durante las cuatro semanas anteriores al estudio, los voluntarios se aleatorizaron en cuatro grupos de ocho sujetos cada uno que recibieron 240, 350 o 500mg de 2,4,6-triyodofenol por vía oral con 125mL de agua tras un ayuno de 10 horas. Cada voluntario recibió siete 30 dosis: una dosis única que se administró en el día 1, luego se administró una vez al día 2,4,6-triyodofenol o placebo desde el día 8 al 13. Los voluntarios llegaron a la Unidad de Investigación Farmacológica a las 7 de la mañana en los días 1 y 13 y permanecieron allí durante 24h. A los participantes se les administraron comidas estándar para el desayuno, comida y cena. Durante los días 2 al 12 los voluntarios llegaron a las 7 de la mañana y se fueron de la clínica tras una obtención de muestra de sangre pre-dosis (días 2 al 12) y administración de la siguiente dosis (días 8 al 12).

35 *Recolección de muestras y determinación analítica:* Se obtuvieron muestras de sangre (3mL) a través de un catéter heparinizado implantado en una vena del antebrazo en los siguientes tiempos: (i) pre-dosis, 2, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144h tras la administración única oral, (ii) pre-dosis en los días 8 al 12, y (iii) pre-dosis, 2, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144h tras la última dosis administrada en el día 13. Estas muestras se recolectaron en viales 40 heparinizados y se centrifugaron (3500 rpm) a temperatura ambiente durante 15 minutos. El plasma se almacenó congelado a -40°C hasta su análisis.

Las concentraciones de 2,4,6-triyodofenol en plasma se analizaron mediante un método de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

45 *Análisis de los datos:* Todos los datos farmacocinéticos se analizaron de forma simultánea bajo el acercamiento de modelación de efectos mixtos no-lineales utilizando el método de Estimación Condicionada de primer Orden con la opción INTERACTION implementada en el software NONMEM versión V (Beal and Sheiner, 1992).

50 Las características de disposición del 2,4,6-triyodofenol en el cuerpo fueron determinadas mediante el ajuste a los datos de modelos mono- y multi- (dos o tres-) compartimentales. Para describir el aporte de la sustancia se ensayaron modelos que asumen ya bien un ritmo de absorción de primer o cero orden, o una mezcla de los dos. También se investigó la presencia de un tiempo de retraso en el proceso de absorción.

55 Se realizó un primer análisis exploratorio mediante la simulación de perfiles farmacocinéticos tras unos regímenes de administración únicos y múltiples de 240, 350 y 500mg basados en el modelo farmacocinético y los parámetros estimados del modelo obtenidos del primer estudio de fase I, donde se administró el 2,4,6-triyodofenol a voluntarios sanos en una sola dosis en el rango de 6 a 1200mg. La Figura 9 muestra los resultados de este ejercicio de simulación. Se aprecia claramente que el modelo establecido previamente se comporta de forma razonablemente buena tras la 60 administración de una dosis única. Sin embargo las observaciones son claramente bajo-predicadas durante un tratamiento de dosis múltiple. Hay dos parámetros que pueden influenciar el AUC: la biodisponibilidad (F) y el aclaramiento de la droga (CL); adicionalmente, el CL afecta a la vida media de la droga. Ambos también pueden ser modificados por un cambio en la actividad enzimática intrínseca (CL_{INT}) entre otros factores.

65

Reivindicaciones

- 5
1. Una composición que comprende el 2,4,6-triyodofenol para su uso como un medicamento en el tratamiento de enfermedades mediadas por leucotrienos seleccionadas a partir del grupo que comprende artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil, colitis ulcerosa y fibrosis pulmonar y en la que el 2,4,6-triyodofenol en la composición está micronizado en un tamaño de partícula inferior a 20 micras y el contenido de agua del 2,4,6-triyodofenol micronizado es inferior al 1%.
 2. La composición para su uso según la reivindicación 1 en la que el tamaño de partícula del 2,4,6-triyodofenol está entre 2 y 5 micras y el contenido de agua del 2,4,6-triyodofenol micronizado es inferior al 0,5%.

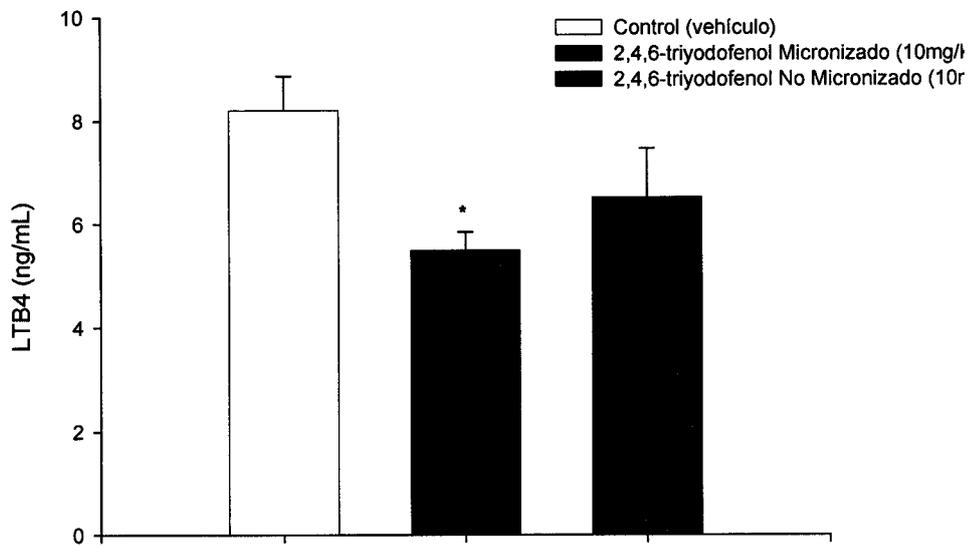


FIG. 1

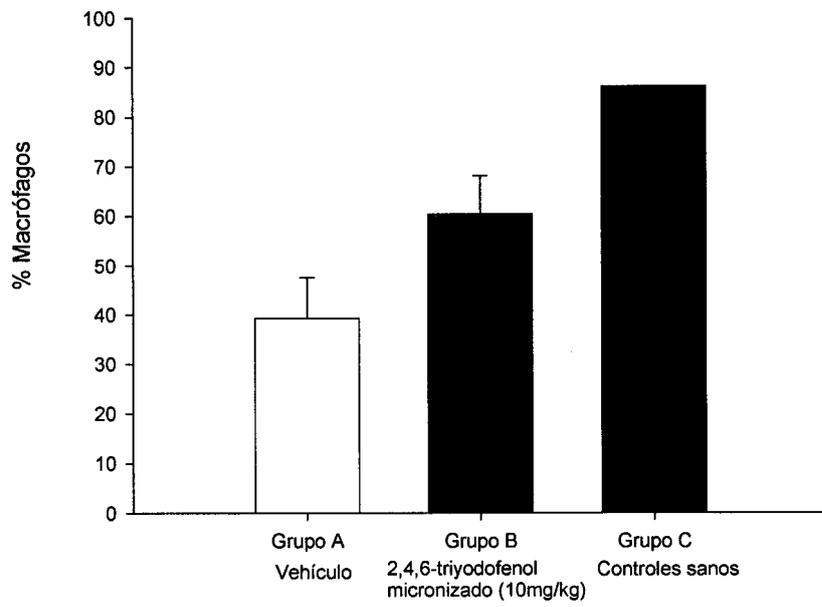


FIG. 2

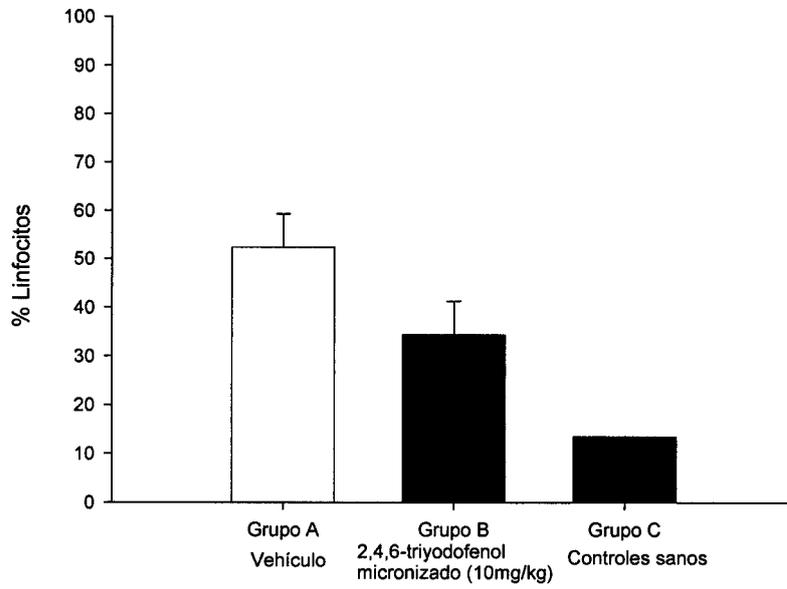


FIG. 3

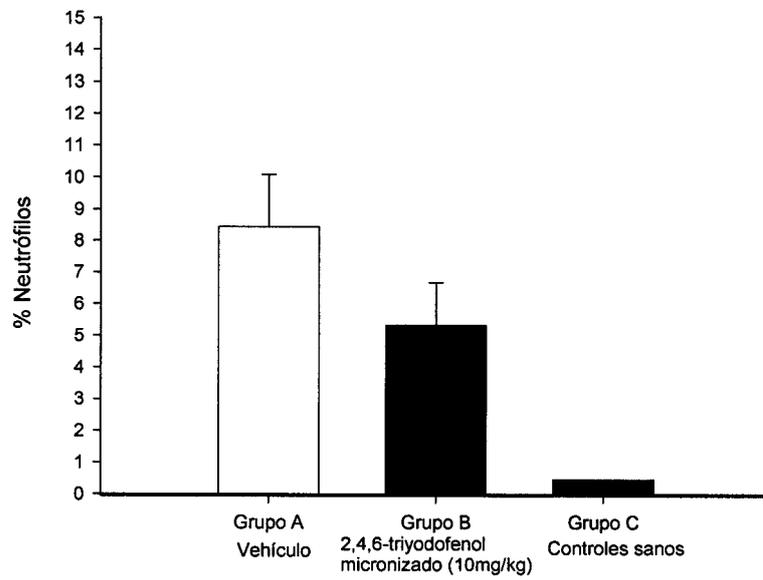


FIG. 4

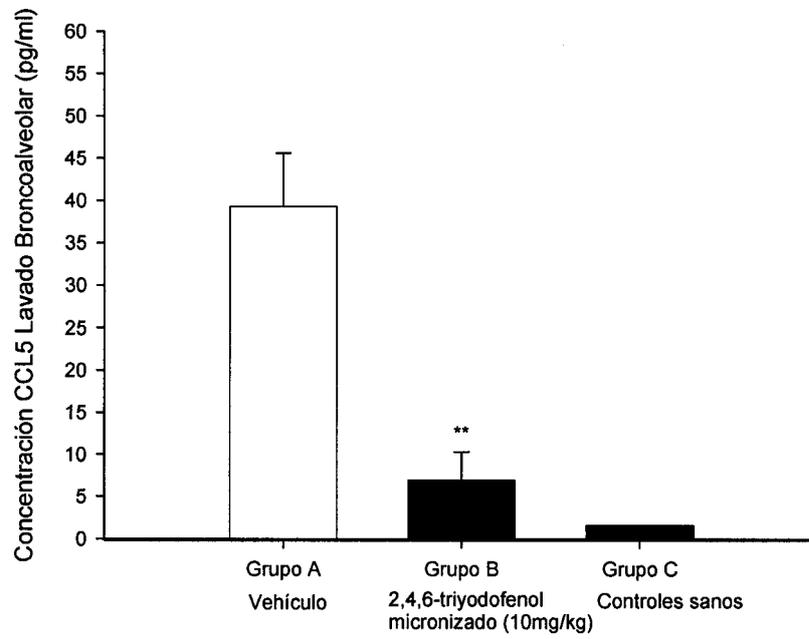


FIG. 5

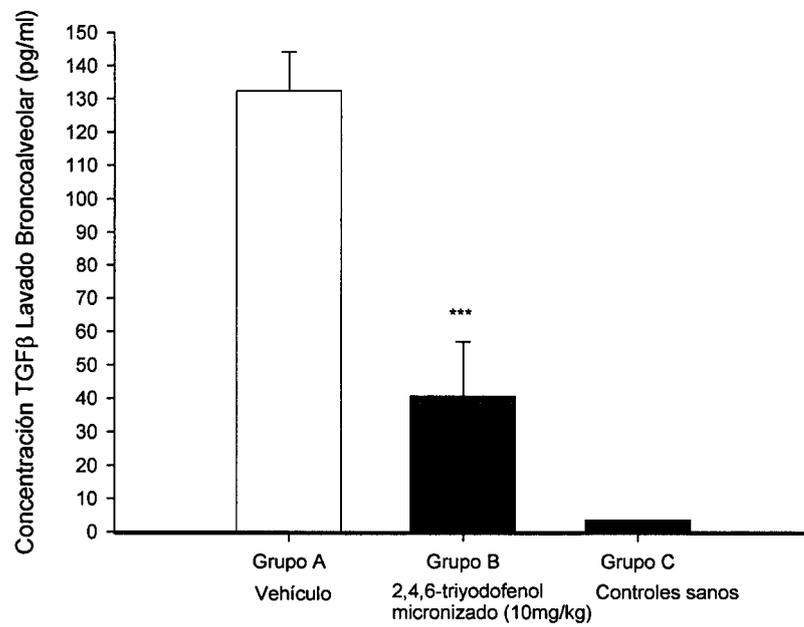
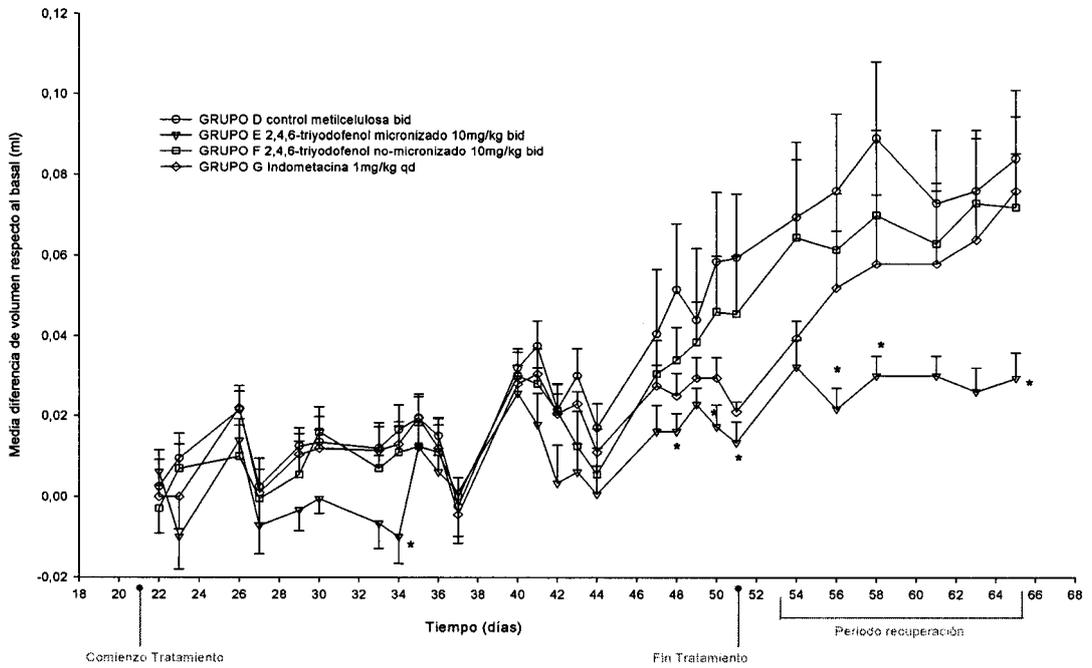
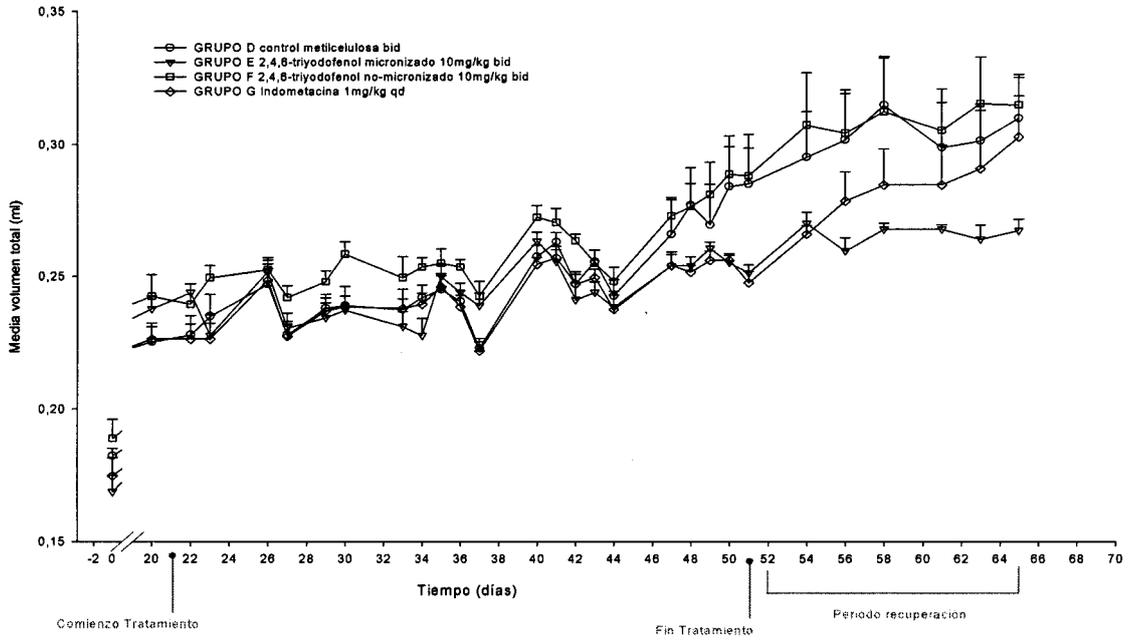


FIG. 6



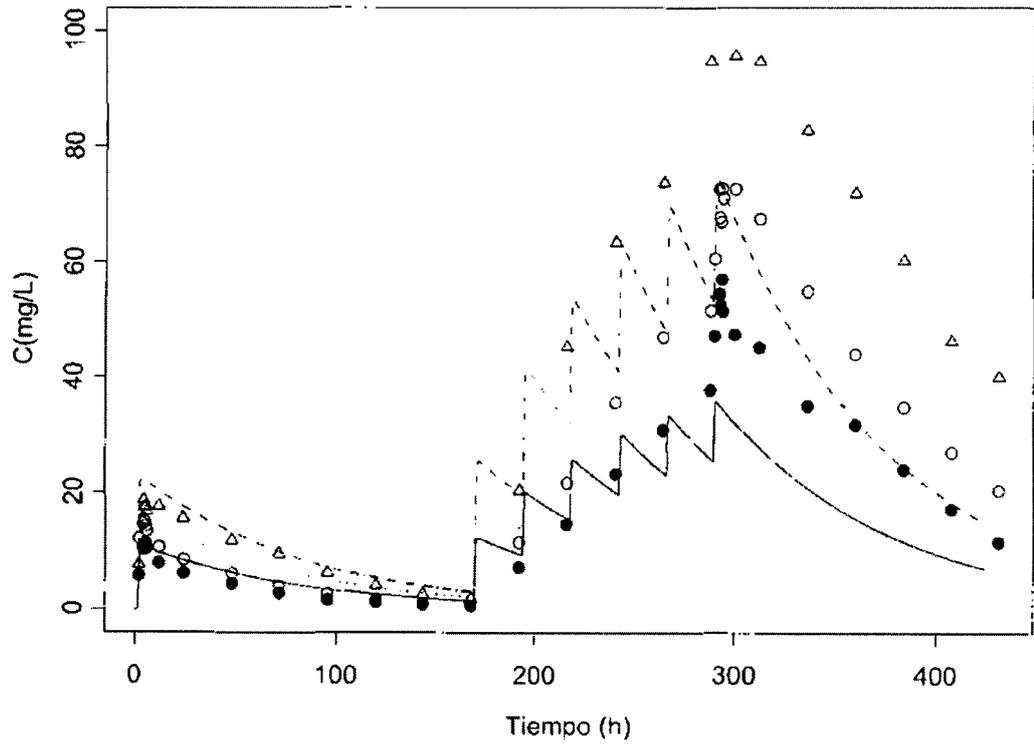


FIG. 9