

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 581**

51 Int. Cl.:

A61K 31/48 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2007 E 07846885 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2091537**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la arteriopatía capilar**

30 Prioridad:

23.11.2006 EP 06024308

06.12.2006 EP 06025263

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

16.10.2013

73 Titular/es:

SINOXA PHARMA GMBH (100.0%)

Königin Luise Strasse 27

14195 Berlin, DE

72 Inventor/es:

REITER, RUDOLF;

TACK, JOHANNES y

HOROWSKI, REINHARD

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 425 581 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

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la arteriopatía capilar.

5 La presente invención se refiere a la utilización de derivados de cornezuelo del centeno específicos o ergolinas. En particular de lisurida y tergurida para la profilaxis y el tratamiento de la arteriopatía capilar constrictiva. Con arteriopatía capilar constrictiva se denominan las enfermedades hipertensión arterial pulmonar, glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena así como el fenómeno o síndrome de Raynaud secundario.

10 La arteriopatía capilar constrictiva es un rasgo distintivo patológico en la medicina humana para lesiones arteriales constrictivas difusas que comprenden una transformación de la pared vascular, que conduce a desde estrechamientos hasta obturaciones irreversibles de las arteriolas. Como consecuencias funcionales pueden observarse un aumento de la presión vascular y una resistencia vascular aumentada.

15 La arteriopatía capilar constrictiva de diferente etiología se manifiesta en la vasculatura de muchos tipos de tejidos. La presente invención se centra en el contexto de la arteriopatía capilar en variaciones específicas de los órganos, que conducen al aumento de la presión a largo plazo de las arteriolas y se caracterizan por el aumento de la resistencia vascular, un agravamiento del vasoespasmo y el desencadenamiento de obstrucción estructural. Por consiguiente el término "arteriopatía capilar" y en particular "arteriopatía capilar constrictiva" representa tal como se utiliza en la presente memoria las indicaciones hipertensión arterial pulmonar, glomeruloesclerosis y síndrome y/o fenómeno de Raynaud secundario.

25 El objetivo de la presente invención es proporcionar utilidades adicionales de la lisurida y la tergurida.

El objetivo se soluciona mediante las indicaciones descritas en la reivindicación 1. Las configuraciones ventajosas adicionales resultan de las reivindicaciones dependientes, de los ejemplos y de la descripción.

30 Sorprendentemente, se determinó que los derivados de cornezuelo del centeno y las ergolinas reivindicados, y en particular la lisurida y la tergurida, son adecuados tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la arteriopatía capilar (constrictiva).

35 La presente invención se refiere por consiguiente a la utilización de lisurida y tergurida así como de sales, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros, mezclas de diastereómeros, hidratos, solvatos y racematos de los compuestos mencionados anteriormente para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento y la profilaxis de la arteriopatía capilar constrictiva, es decir de la hipertensión arterial pulmonar, de glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena así como del síndrome de Raynaud secundario.

40 La lisurida y la tergurida son básicas y mediante la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos pueden obtenerse sales de adición de ácido. Como ácidos que forman una sal de adición de ácido con la lisurida o la tergurida pueden mencionarse los siguientes: ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido perclórico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido glucónico (ácido glicogénico, ácido dextrónico), ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido tartrónico (ácido hidroximalónico, ácido hidroxipropanodioico), ácido fumárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido malónico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido (o-, m-, p-)toluico, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido naftilaminosulfónico, ácido sulfanílico, ácido canforsulfónico, ácido quínico (ácido quinínico), ácido o-metil-mandélico, ácido hidrogenobencenosulfónico, ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), ácido adípico, ácido d-o-toliltartárico, aminoácidos tales como metionina, triptófano, arginina y en particular aminoácidos ácido tales como ácido glutámico o ácido aspártico.

55 En caso de existir grupos ácidos, también pueden formarse sales de adición de base, por ejemplo sales de metales alcalinos así como sales con aminas. Así pueden formarse sales de metales alcalinos tales como la sal de sodio, la sal de potasio, la sal de litio o la sal de magnesio, la sal de calcio, sales de alquilamino o sales de aminoácido, por ejemplo con aminoácidos básicos tal como lisina.

60 Los derivados de cornezuelo del centeno reivindicados comprenden también estereoisómeros, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros y mezclas de diastereómeros, prefiriéndose por ejemplo compuestos quirales.

65 En particular se prefieren la lisurida (n.º CAS: 18016-80-3, 3-(9,10-didehidro-6-metilergolin-8-alfa-il)-1,1-dietilurea) y la tergurida ((+)-1,1-dietil-3-(6-metil-8- α -ergolinil)-urea). En especial se prefiere la utilización de tergurida (trans-dihidrolisurida) y lisurida.

Las sustancias mencionadas anteriormente son adecuadas en particular para la profilaxis y el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena así como el síndrome de Raynaud o fenómeno de Raynaud secundario.

5 El hecho de que los compuestos reivindicados sean adecuados para la profilaxis y el tratamiento de la arteriopatía capilar constrictiva fue sorprendente, dado que un experto no hubiese tenido en cuenta compuestos de este tipo debido al estado de la técnica, dado que precisamente esta indicación se menciona como efectos secundarios en el caso de las 8- α -ergolinas. Así, la empresa Schering AG describe en su prospecto del fármaco Teluron[®], que como 8- α -ergolina contiene tergurida, que podría aparecer por ejemplo el fenómeno de Raynaud o síndrome de Raynaud.
10 Además, se conoce en la bibliografía que los alcaloides del cornezuelo del centeno, que comprenden también las 8- α -ergolinas, pueden tener como consecuencia modificaciones fibróticas. El experto conoce explícitamente como efectos secundarios el fenómeno de Raynaud, vasoespasmo, diplopía, fibrosis retroperitoneal, derrames pleurales y fibrosis de las válvulas cardíacas. Estos diagnósticos negativos han evitado que un experto utilizase los compuestos de fórmula (I) para la profilaxis y el tratamiento de las indicaciones mencionadas anteriormente.

15 Por consiguiente un experto no utilizaría los compuestos reivindicados, en particular la lisurida y la tergurida, para la profilaxis y el tratamiento de una arteriopatía capilar constrictiva caracterizada por las enfermedades hipertensión arterial pulmonar, glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena así como síndrome de Raynaud secundario. En particular, un experto no consideraría las indicaciones de fenómeno de Raynaud o síndrome de Raynaud e hipertensión pulmonar, dado que éstas se mencionan explícitamente como efectos secundarios para los principios activos de 8- α -ergolina. Precisamente la mención de efectos secundarios de este tipo en un prospecto para un producto farmacéutico de la clase de principios activos de las 8- α -ergolinas indica a un experto concretamente que se ha producido una investigación clínica intensiva del principio activo. Por consiguiente no existe ninguna razón para que un experto dude de las indicaciones y las afirmaciones en un
20 prospecto de un producto farmacéutico.
25

La hipertensión ortostática se conoce como un efecto secundario de los derivados del cornezuelo del centeno dopaminérgicos, incluyendo la lisurida y la tergurida. Dado que la administración de ergolinas y derivados del cornezuelo del centeno está asociada con efectos secundarios gastrointestinales más fuertes tales como por ejemplo náuseas e indisposición, en parte se descartó básicamente una utilización terapéutica de los mismos.
30

Tanto más sorprendente fue cuando se determinó que la tergurida y la lisurida muestran, precisamente en las enfermedades hipertensión arterial pulmonar (PAH), glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena así como síndrome o fenómeno de Raynaud secundario, que se denominan en la presente memoria conjuntamente como arteriopatía capilar constrictiva, un efecto terapéutico y que como era de esperar no presentaban precisamente contraindicaciones.
35

Hipertensión es el término técnico médico para la tensión arterial elevada. El término "tensión arterial" designa la presión que se genera cuando circula sangre a lo largo de la pared vascular interna de las arterias. La tensión arterial es indicada por regla general por dos valores, concretamente la tensión arterial cuando el corazón se contrae entre los latidos cardíacos individuales y se relaja de nuevo (es decir la presión sistólica y la diastólica).
40

La tensión arterial varía normalmente a lo largo del día y normalmente aumenta a medida que aumenta la edad. Además, las actividades corporales influyen en la tensión arterial. La tensión arterial aumenta como reacción al estrés y una sobrecarga corporal. Los pacientes con hipertensión presentan una tensión arterial elevada (en la mayoría de los casos por encima de 140/90 mm Hg) también en estado de reposo. La hipertensión sin tratar conduce a que el corazón y también las arterias estén expuestos a una carga más fuerte, lo que puede conducir a un daño del tejido. Esto es a su vez un factor de riesgo y puede conducir a cardiopatías, infarto cardíaco (infarto de miocardio) y accidente cerebrovascular.
45
50

A diferencia de esto, por ejemplo la hipertensión pulmonar o las glomeruloesclerosis conducen a una modificación local de la vasoreactividad, lo que conduce a un aumento local de la tensión arterial, sin provocar un aumento detectable de la tensión arterial sistémica.

55 Por ejemplo en el caso de la hipertensión pulmonar, la tensión arterial elevada sólo se manifiesta en la circulación pulmonar. Por el contrario, la tensión arterial por ejemplo en los brazos o en el resto del cuerpo es normal y menor. Por tanto, la hipertensión pulmonar es claramente diferente de la hipertensión (general). La hipertensión pulmonar es por regla general la consecuencia de una enfermedad del corazón y/o de los pulmones. Existe hipertensión pulmonar cuando la tensión arterial en las arterias pulmonares supera la tensión arterial sistémica normal, lo que se debe a modificaciones locales de la vasoreactividad y la estructura de las arterias pequeñas, las denominadas arteriolas. Esto conduce a una sobrecarga del lado derecho del corazón. La hipertensión pulmonar es un problema serio. Se manifiesta en síntomas tales como disnea tras un esfuerzo ligero, sensación de cansancio, desmayos y dolores de pecho. Estos síntomas se limitan habitualmente a actividades y sobrecargas corporales.
60

La diferencia en la etiología así como los diferentes planteamientos de tratamiento para la hipertensión (también denominada hipertensión esencial o general) y la hipertensión pulmonar permiten reconocer la clara diferencia entre estas dos enfermedades. Mientras que para el tratamiento de la hipertensión se utilizan inhibidores de ECA tales como por ejemplo captopril, diuréticos tales como por ejemplo furosemida, bloqueantes del receptor de angiotensina 2 tales como por ejemplo losartán, alfa y betabloqueantes tales como por ejemplo prazosina y propranolol, vasodilatadores directos tales como por ejemplo minoxidil o agentes de acción central tales como por ejemplo clonidina, ninguno de estos principios activos es adecuado para el tratamiento específico de la hipertensión pulmonar y tampoco se utilizan para ello.

Por consiguiente, a partir de un efecto positivo en particular de la tergurida y la lisurida en la hipertensión arterial pulmonar no puede deducirse también al mismo tiempo un efecto positivo en la hipertensión o viceversa.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, que se produjeron utilizando al menos uno de los compuestos reivindicados o una sal de los mismos y en particular utilizando lisurida o tergurida.

Estas composiciones farmacéuticas contienen al menos un compuesto según la reivindicación 1 y en particular lisurida o tergurida en una concentración activa de principio activo de 0,1 - 10 mg por dosis unitaria junto con al menos un vehículo, excipiente o disolvente farmacológicamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, pastillas, cápsulas, microcápsulas, agentes orales de acción retardada (Retard-Oralia), sistemas transdérmicos, supositorios, microformulaciones, nanoformulaciones, formulaciones liposómicas, gotas, gotas nasales, pulverizaciones nasales, aerosoles, ampollas, disoluciones, emulsiones, dispersiones, polvos, polvos para inhalación, formulaciones microcristalinas o pulverizaciones para inhalación y son adecuadas en particular para la administración oral, sublingual, parenteral, cutánea, bucal, percutánea, inhalatoria o nasal.

Como vehículos farmacológicamente aceptables pueden utilizarse por ejemplo lactosa, almidón, sorbitol, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico y similares. Los polvos finos así como los comprimidos pueden estar compuestos por del 5 al 95% de un vehículo de este tipo.

Como aglutinante pueden utilizarse además almidón, gelatina, azúcar natural, gomas tanto naturales como sintéticas tales como por ejemplo goma arábica o goma guar, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Como lubricantes pueden servir ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

Además, a las composiciones farmacéuticas se les pueden añadir también disgregantes, colorantes, aromatizantes y/o aglutinantes.

Las formulaciones líquidas comprenden disoluciones, suspensiones, pulverizaciones y emulsiones. Por ejemplo disoluciones para inyección a base de agua o a base de agua-propilenglicol para inyecciones parenterales.

Para la preparación de supositorios se utilizan preferiblemente glicéridos, ésteres de ácidos grasos y ceras de bajo punto de fusión.

Las cápsulas se producen por ejemplo a partir de metilcelulosa, poli(alcoholes vinílicos) o gelatina o almidón desnaturalizados.

Como disgregantes pueden utilizarse almidón, carboximetilalmidón sódico, gomas naturales y sintéticas tales como por ejemplo harina de semillas de algarrobo, goma karaya, goma guar, tragacanto y agar así como derivados de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina así como alginatos, tierras arcillosas y bentonitas. Estos componentes pueden utilizarse en cantidades de desde el 2 hasta el 30% en peso.

Como aglutinantes pueden añadirse azúcar, almidón de maíz, arroz o patatas, gomas naturales tales como goma arábica, gelatina, tragacanto, ácido algínico, alginato de sodio, alginato de amonio-calcio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona así como compuestos inorgánicos tales como silicatos de aluminio-magnesio. Los aglutinantes pueden añadirse en cantidades de desde el 1 hasta el 30% en peso.

Como lubricantes pueden utilizarse estearatos tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de potasio, ácido esteárico, ceras de alto punto de fusión así como lubricantes solubles en agua tales como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicol y aminoácidos tales como leucina. Los lubricantes de este tipo pueden utilizarse en cantidades de desde el 0,05 hasta el 15% en peso.

Como formulaciones preferidas adicionales deben mencionarse las formulaciones subcutáneas y los sistemas transdérmicos. Estas formulaciones subcutáneas y estos sistemas transdérmicos están compuestos preferiblemente por una matriz, en particular una matriz polimérica biodegradable, en la que está almacenado el al menos un

compuesto según la fórmula (I), preferiblemente lisurida o tergurida. Para generar esta matriz se utilizan preferiblemente polímeros degradables biológicamente.

5 Como ejemplos de polímeros biodegradables pueden mencionarse: polivalerolactonas, poli-ε-decalactonas, polilactidas, poliglicolidas, copolímeros de las polilactidas y poliglicolidas, poli-ε-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, polihidroxibutiratos, polihidrovaleratos, polihidroxibutiratos-co-valeratos, poli(1,4-dioxan-2,3-dionas), poli(1,3-dioxan-2-onas), poli-para-dioxanonas, polianhídridos tales como poli(anhídridos del ácido maleico), polihidroxiacetatos, fibrina, policianoacrilatos, policaprolactona-acrilatos de dimetilo, poli(ácido-b-maleico), policaprolactona-acrilatos de butilo, polímeros de múltiples bloques tales como por ejemplo de oligocaprolactonadióles y oligodioxanadióles, polímeros de múltiples bloques de poliéter-ésteres tales como por ejemplo PEG y poli(tereftalato de butileno), polipivotolactonas, poli(ácido glicólico-carbonatos de trimetilo), policaprolactona-glicolidas, poli(glutamato de g-etilo), poli(iminocarbonato de DTH), poli(carbonato de DTE-co-DT), poli(bisfenol A-iminocarbonato), polioctoéster, poli(ácido glicólico-carbonatos de trimetilo), poli(carbonatos de trimetilo), poliiminocarbonatos, poli(N-vinil)-pirrolidona, poli(alcoholes vinílicos), poliésteramidas, poliésteres glicolados, polifosfoésteres, polifosfacenos, poli[p-carboxifenoxi]propano], poli(ácido hidroxipentanoico), polianhídridos, poli(óxido de etileno-óxido de propileno), poliuretanos blandos, poliuretanos con restos de aminoácidos en la estructura principal, poliéter-ésteres tales como el poli(óxido de etileno), poli(oxalatos de alqueno), polioctoésteres así como sus copolímeros, carragenanos, fibrinógeno, almidón, colágeno, polímeros a base de proteínas, poliaminoácidos, poliaminoácidos sintéticos, ceína, ceína modificada, polihidroxiacanoatos, ácido pectínico, ácido actínico, caseína y fibrina modificada y no modificada, sulfato de carboximetilo, albúmina, por lo demás ácido hialurónico, sulfato de heparán, heparina, sulfato de condroitina, dextrano, b-ciclodextrinas, y copolímeros con PEG y polipropilenglicol, goma arábica, goma guar, gelatina, colágeno, colágeno-N-hidroxisuccinimida, modificaciones y copolímeros y/o mezclas de las sustancias mencionadas anteriormente.

25 Se prefieren polímeros biológicos tales como por ejemplo almidón y almidón desnaturalizado, celulosa, glicosaminoglicanos y colágeno así como polímeros semisintéticos y sintéticos tales como por ejemplo siliconas, elastómeros de silicona, polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano que contiene dióxido de silicio, polidimetilsiloxano que contiene poli(óxido de alqueno) (Gelest®), politetrafluoretileno (Teflon®), polilactidas, poliglicolidas, polietilenglicol, copolímeros de polilactida-poliglicolida, polianhídridos, polímeros de acetato de etilenvinilo, poli(metacrilato de metilo), etil éter de celulosa, poli(acrilato de etilo), poli(metilmecacrilatos de trimetilamonio), polidimetilsiloxanos, poli(metacrilatos de hidroxietilo), poliuretanos y copolímeros de poliestireno-butadieno.

Además, los sistemas transdérmicos de este tipo pueden estar compuestos también por partículas microesféricas o nanopartículas o microcristales, que contienen al menos un compuesto según la fórmula general (I). Tales partículas pueden estar incluidas además en un gel y aplicarse en esta forma.

Además, también es posible la utilización de micropartículas de componentes cerámicos biocompatibles tal como por ejemplo hidroxiapatita, en y/o dentro de los cuales se almacenan los compuestos según la fórmula (I).

40 Descripción de las figuras

La figura 1 muestra que en presencia de concentraciones elevadas de serotonina, la serotonina como factor de crecimiento conduce a una proliferación de las células de músculo liso. En presencia de un compuesto según la fórmula general (I) tal como por ejemplo lisurida o tergurida se reduce claramente esta proliferación celular mediante el efecto antagonista de las sustancias (en receptores de serotonina 5-HT₂). A partir de este modelo *in vitro* puede deducirse que en circunstancias que conducen de manera local o sistémica a una liberación elevada de serotonina, dichas sustancias pueden inhibir una proliferación excesiva de células de músculo liso en vasos sanguíneos durante el proceso de curación.

La figura 2 muestra la estructura química de la lisurida.

La figura 3 muestra la estructura química de la tergurida.

La figura 4 muestra la influencia de la serotonina y la tergurida sobre la expresión de Col1A2 en células de músculo liso de arterias pulmonares.

Ejemplos

60 Ejemplo 1: Efecto antiproliferativo

Se cultivaron células de músculo liso pulmonares humanas (PromoCell) en medio de cultivo PromoCell según las instrucciones del fabricante hasta confluencia en placas de seis pocillos. Después se sembraron las células de músculo liso pulmonares en medio de cultivo PromoCell en placas de 24 pocillos en una densidad celular de $5 \cdot 10^4$ células por pocillo. Tras la adhesión de las células se cambió el medio de cultivo y se provocó la detención del crecimiento mediante cultivo en un medio con el 0,2% de suero de ternero fetal a lo largo de 48 horas.

Para someter a prueba el efecto antiproliferativo de las sustancias, en primer lugar se incubaron previamente las células con 10 $\mu\text{mol/l}$ de principios activos. Después de esto se estimuló el comportamiento de crecimiento de las células con serotonina (10^{-8} mol/l). Para la medición de la proliferación celular, se añadió [3H]-timidina (Amersham) a los cultivos y se incubó durante 24 horas. Después se incubaron las células en primer lugar dos veces en solución salina tamponada con fosfato helada y a continuación en ácido tricloroacético al 10% helado durante 30 minutos a 4°C. Entonces se disolvieron las células en hidróxido de sodio 0,1 molar (0,5 ml/pocillo). Tras la neutralización con ácido acético se determinó la incorporación de [3H]-timidina mediante mediciones de centelleo líquido. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En la figura 1 se representa en cada caso el valor medio.

Ejemplo 2: Producción de una formulación para su utilización oral con tergurida.

Se mezclan 25,0 g de tergurida, micronizada, con 4035,0 g de lactosa, 1800,0 g de celulosa microcristalina y 120,0 g de croscarmelosa Na tras tamización previa de los excipientes durante 5 min en una mezcladora de caída libre a, por ejemplo, 162 rpm. A continuación se pasa esta premezcla a través de un tamiz con 0,8 mm de abertura de malla. Se añaden 20,0 g de estearato de magnesio y se mezcla de nuevo durante 1 min. Se comprime el polvo para prensado así obtenido en una prensa para comprimidos adecuada (por ejemplo prensa rotatoria) para proporcionar 50.000 comprimidos (rendimiento teórico) con 7 mm de diámetro y un peso de comprimido de 120 mg que corresponde a una dosificación de 0,5 mg de tergurida/comprimido. Los comprimidos así producidos liberan el principio activo rápidamente y casi completamente tras como máximo 60 min tras su introducción en agua.

Ejemplo 3: Producción de una formulación para la utilización oral de lisurida con liberación retardada.

Se mezclan 2,0 g de hidrogenomaleato de lisurida, micronizado, con 750,0 g de hidroxietilcelulosa (tilosa H) y 243,0 g de celulosa microcristalina tras tamización previa de los excipientes durante 5 min en una mezcladora de caída libre a, por ejemplo, 180 rpm. A continuación se pasa esta premezcla a través de un tamiz con 0,8 mm de abertura de malla. Se añaden 5,0 g de estearato de magnesio y se mezcla de nuevo durante 1 min. Se comprime el polvo para prensado así obtenido en una prensa para comprimidos adecuada (por ejemplo prensa rotatoria) para proporcionar 10.000 comprimidos (rendimiento teórico) con 6 mm de diámetro y un peso de comprimido de 100 mg que corresponde a una dosificación de 0,2 mg de hidrogenomaleato de lisurida/comprimido. Los comprimidos así producidos liberan de manera retardada el principio activo tras su introducción en agua, de modo que tras aproximadamente 2 h se ha descargado aproximadamente el 60 - 70% de la dosis a partir de la formulación.

Ejemplo 4: Producción de un liofilizado estéril con hidrogenomaleato de lisurida para inyección tras disolución.

Se disuelven 2,0 g de hidrogenomaleato de lisurida junto con 20,0 g de lactosa monohidratada, 0,4 g de ácido cítrico monohidratado y 1,0 g de citrato de sodio dihidratado en 976,6 g de agua para fines de inyección. La disolución de incolora a ligeramente amarillenta obtenida presenta un valor de pH de entre 4,5 y 5,4. Se filtra previamente esta disolución a través de un filtro de membrana y después se filtra de manera estéril a través de un filtro de membrana adicional (0,2 μm) en condiciones asépticas. Se cargan en cada caso 1,0 g de la disolución estéril así obtenida en viales esterilizados con un volumen de carga de 6 ml dotados de un tapón de goma adecuado para la liofilización posterior y se congelan en un liofilizador a de -40 a -50°C. A continuación se seca a vacío o se realiza un secado final obteniendo una torta de sustancia seca. Se cierran los viales en condiciones asépticas y se aprietan. De esta manera se producen 1000 viales (rendimiento teórico) con en cada caso 2 mg de hidrogenomaleato de lisurida liofilizado. Se reconstituye el liofilizado mediante disolución con solución salina fisiológica estéril y da como resultado una disolución estéril lista para utilizar para inyección o infusión para su utilización inmediata.

Ejemplo 5: Producción de un apósito de matriz con tergurida para su utilización transdérmica

Se combinan 2,5 g de tergurida con 2,13 g de acetona y 51,54 g de una disolución básica de copolímero de metacrilato de butilo (disolución de Eudragit 100). A la disolución se le añaden 5,0 g de polivinilpirrolidona (povidona 25), 2,5 g de propilenglicol, 5,0 g de N,N-dimetilaminoacetato de dodecilo (alternativamente, 5,0 g de 1-dodecanol), 1,0 g de Foral E 105 y 0,65 g de un antioxidante (por ejemplo butilhidroxianisol). Se aplica la disolución de recubrimiento así obtenida de manera continua en condiciones de procesamiento adecuadas en una máquina de recubrimiento sobre una lámina polimérica de polietileno y a continuación se seca hasta un peso por unidad de superficie de 50 mg/10 cm^2 (\pm 5%) de la superficie recubierta. Se lamina la matriz adherida así obtenida con una lámina polimérica silicizada por una cara y en una segunda etapa se corta para dar apósitos en un tamaño adecuado (por ejemplo 20 cm^2) para su utilización terapéutica y se envasan en sobres de aluminio. El apósito de tergurida así producido libera el principio activo tras la aplicación sobre la piel intacta sin pelo de manera continua a lo largo de varios días con una velocidad de entre 0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ en la circulación sistémica.

Ejemplo 6: Producción de un apósito de membrana con lisurida para su utilización transdérmica.

Por medio de una máquina de recubrimiento de laboratorio se recubre y se seca una membrana de polietileno microporoso (Solupor® 10P05A) como membrana de control (o alternativamente de copolímero de acetato de

etilenvinilo (EVA, Cotran® 3M 9728)) con un adhesivo de silicona compatible con la piel (BioPSA®7- 4202) (alternativamente adhesivo de poliisobutileno, Oppanol®), con un peso por unidad de superficie de aproximadamente 10 a 25 mg/cm² y a continuación se lamina con una capa antiadherente siliconizada por una cara (polietileno).

- 5 Se sella el material laminado así obtenido en una máquina de sellado adecuada con polietileno termosellable con forma circular excepto una pequeña abertura y se estampa. En la cavidad generada se introducen a través de la abertura restante por medio de un dispositivo de inyección adecuado aproximadamente 0,5 ml de una disolución al 1% de lisurida en 2-propanol, hidroxipropilcelulosa (Klucel® LF) y tocoferol y después se sella completamente.
- 10 Tras el nivelado y la retirada de la capa antiadherente puede pegarse el apósito de membrana sobre la piel intacta sin pelo y libera de manera continua y con velocidad constante lisurida. La dosificación puede ajustarse mediante los diferentes tamaños de apósito.

Ejemplo 7: Producción de una formulación estéril para aplicación subcutánea, con tergurida

- 15 Se mezclan de manera homogénea 50 g de tergurida, micronizada, con 50 g de polidimetilsiloxano y se conforman con procedimientos convencionales, preferiblemente mediante extrusión, para proporcionar una matriz de núcleo con forma de barra. Se corta la barra en pedazos de 30 mm. Tras el mismo procedimiento se produjo un producto extruido de núcleo sin principio activo con idénticas dimensiones. A partir de polidimetilsiloxano que contiene dióxido de silicio disponible comercialmente o a partir de por ejemplo polidimetilsiloxano que contiene óxido de polialquileño reticulado catalizado por Pt (Gelest®) se producen en una segunda etapa mediante extrusión membranas con forma de tubo con un grosor de pared de por ejemplo 0,2 mm de grosor de pared. Se cortan las membranas a una longitud de 60 mm y se deja que se hinchen en ciclohexano. A continuación se introduce la matriz de núcleo que contiene principio activo y se introduce por ambos lados de la membrana de tubo el producto extruido sin principio activo, por ejemplo de manera que se genere a ambos lados un espacio lleno de aire de aproximadamente 1-3 mm entre el núcleo que contiene principio activo y el núcleo sin principio activo. A continuación se elimina el ciclohexano mediante evaporación, se corta la formulación a una longitud total de 50 mm, de modo que a ambos lados de la formulación se genere un cierre mediante el material de núcleo sin principio activo. Se esteriliza con gas la formulación mediante procedimientos convencionales (óxido de etileno, H₂O₂). Mediante las inclusiones de aire puede detectarse siempre mediante detección por ultrasonidos la situación de la formulación en el lugar de aplicación.
- 20
- 25
- 30

Ejemplo 8: Hipertensión pulmonar:

Descripción del ensayo:

- 35 En el día de ensayo 1 se administró monocrotalina (60 mg/kg; Sigma) a ratas. Para ello se disolvió la sustancia en ácido clorhídrico 0,5 molar y a continuación se ajustó el pH con hidróxido de sodio 0,5 molar a 7,4. Se administró la disolución como inyección subcutánea única en una dosis de 60 mg/kg a ratas Sprague Dawley macho. A los animales control se les administró el mismo volumen de solución salina isotónica.
- 40

- A grupos de en cada caso 6 animales, que se trataron en el día 1 con monocrotalina, se les administró en los días de ensayo 14-28 diariamente o bien 0,25 mg/kg de lisurida o bien 2,5 mg/kg de tergurida por sonda esofágica. Los datos de dosis se refieren a este respecto a la base libre de las sustancias. Las sustancias se utilizaron como sal de hidrogenomaleato o base libre. Se llevaron en presencia de trazas de ácido ascórbico a agua destilada y se administraron en un volumen de 2 ml por sonda esofágica por la mañana y por la tarde. A los animales control se les administró la misma cantidad de agua.
- 45

- El día de ensayo 28, 2 horas tras la última administración de sustancia, se anestesiaron los animales con pentobarbital. A continuación se realizó un traqueostomía a los animales y se insufló a los animales con 10 ml/kg de aire a una frecuencia de 60 s⁻¹ (SAR830A/P; IITC). Se mantuvo la anestesia mediante la inhalación de isoflurano.
- 50

- Se determinaron la presión arterial media así como la tensión arterial sistólica del ventrículo derecho. Se midió la presión arterial sistémica mediante un catéter Millar en la arteria carótida izquierda. A través de la vena yugular derecha se introdujo un catéter Millar con un sensor de presión (Millar Instruments, modelo SPR-534) y se deslizó hasta el ventrículo derecho del corazón y se utilizó para realizar mediciones de la presión del ventrículo derecho (RVSP). Se potenció la señal por medio de un instrumento HSE Coupler serie 500 y se suministró a una unidad de registro para su evaluación.
- 55

- Tras realizar las mediciones de presión se perfundió a las ratas solución salina fisiológica. Se extirpó el lóbulo pulmonar derecho, se ultracongeló y se preparó para la determinación del contenido de colágeno. Para ello en primer lugar se homogeneizó el tejido y se determinó siguiendo el procedimiento de Berg (Meths Enzymol. 82, 372 (1982)). En primer lugar se realizó una hidrólisis de la muestra en ácido clorhídrico 6 molar durante 16 horas a 116°C. A continuación se llevó a cabo una oxidación de hidroxiprolina para dar pirrol, seguida por una formación de complejo con p-dimetilaminobenzaldehído. Se midió fotométricamente el complejo de color generado a 560 nm y por
- 60
- 65

medio de una curva de calibración se calculó el contenido en hidroxiprolina de las muestras. Los resultados se facilitan como $\mu\text{g/g}$ de proteína en el tejido pulmonar.

Resultados:

- 5 a) Influencia del tratamiento con lisurida o tergurida en los días de ensayo 15-28 sobre la presión sistólica en el ventrículo derecho (RVPSys) y la presión arterial sistémica (SAP)

	RVPSys [mm Hg]	SAP [mm Hg]
Control	23 \pm 4	118 \pm 5
Monocrotalina	55 \pm 5	114 \pm 7
Monocrotalina + 0,25 mg/kg de lisurida dos veces al día	43 \pm 7	109 \pm 9
Monocrotalina + 2,5 mg/kg de tergurida dos veces al día	39 \pm 3	111 \pm 7

- 10 Los resultados son valores medios \pm EEM (N=6)

- b) Influencia del tratamiento con lisurida o tergurida en los días de ensayo 15-28 sobre el contenido en hidroxiprolina del pulmón

	Hidroxiprolina [$\mu\text{g/g}$ de proteína]
Control	1,2 \pm 0,2
Monocrotalina	4,2 \pm 1,1
Monocrotalina + 0,25 mg/kg de lisurida dos veces al día	3,3 \pm 0,8
Monocrotalina + 2,5 mg/kg de tergurida dos veces al día	2,7 \pm 1,2

- 15 Los resultados son valores medios \pm EEM (N=6)

Evaluación de los resultados:

- 20 Tras la administración de monocrotalina se produce en las ratas un daño del endotelio del pulmón, que está asociado con una producción excesiva de tejido conjuntivo y el desarrollo de hipertensión pulmonar. La acumulación de colágeno, medida como contenido en hidroxiprolina en el tejido pulmonar así como el aumento de la presión sistólica en el ventrículo derecho reflejan estas modificaciones estructurales y funcionales. En este modelo de hipertensión pulmonar se sometieron a prueba los posibles efectos terapéuticos de un tratamiento con lisurida o tergurida. La terapia no comenzó, en condiciones experimentales, en el momento del tratamiento con monocrotalina, es decir no en el momento del daño, sino por primera vez tras 14 días. Hasta ese momento se han manifestado según los datos bibliográficos cambios extensos en los vasos y un aumento de la presión. La terapia con lisurida o tergurida reduce el aumento de presión en el ventrículo derecho como una medida indirecta de la hipertensión pulmonar en el sentido de un efecto deseado desde el punto de vista terapéutico.

- 30 Como correlación estructural, con la terapia con ambas sustancias se ha observado una reducción del contenido en hidroxiprolina aumentado por monocrotalina en el sentido de una "remodelación inversa". La lisurida y la tergurida presentan en este modelo animal establecido cualidades de efecto, que hacen que una utilización terapéutica en pacientes con hipertensión pulmonar sea satisfactoria.

- 35 El ejemplo de ensayo descrito demuestra la utilización satisfactoria de las ergolinas en el ejemplo de lisurida y tergurida para el tratamiento de hipertensión pulmonar.

Ejemplo 9: Hipertensión pulmonar:

- 40 Descripción del ensayo:

- 45 En el día de ensayo 1 se les administró monocrotalina (60 mg/kg; Sigma) a ratas. Para ello se disolvió la sustancia en ácido clorhídrico 0,5 molar y a continuación se ajustó el pH con hidróxido de sodio 0,5 molar a 7,4. Se administró la disolución como inyección subcutánea única en una dosis de 60 mg/kg a ratas Sprague Dawley macho. A los animales control se les administró el mismo volumen de solución salina isotónica.

Inducción de la hipertensión arterial pulmonar

- 50 A grupos de en cada caso 4 animales, que se trataron en el día 1 con monocrotalina, se les administró en los días de ensayo 1-28 dos veces al día 1,2 mg/kg de tergurida intraperitoneal. Se dispuso la tergurida en presencia de trazas de ácido ascórbico en agua destilada y se administró en un volumen de 2 ml por sonda esofágica por la mañana y por la tarde. A los animales control se les administró la misma cantidad de solución salina fisiológica.

En el día de ensayo 28, 2 horas tras la última administración de sustancia, se anestesiaron los animales con pentobarbital. A continuación se realizó una traqueostomía a los animales y se insuflaron 10 ml/kg de aire a los animales a una frecuencia de 60 s⁻¹ (SAR830A/P; IITC). Se mantuvo la anestesia mediante la inhalación de isoflurano.

5

Determinación de la presión sistólica del ventrículo derecho (RVSP) y SAP (presión arterial sistólica)

Se determinaron la presión arterial media así como la tensión arterial sistólica del ventrículo derecho. Se midió la presión arterial sistémica mediante un catéter Millar en la arteria carótida izquierda. A través de la vena yugular derecha se introdujo un catéter Millar con un sensor de presión (Millar Instruments, modelo SPR-534) y se deslizó hasta el ventrículo derecho del corazón y se utilizó para realizar mediciones de la presión del ventrículo derecho (RVSP). Se potenció la señal por medio de un instrumento HSE Coupler serie 500 y se suministró a una unidad de registro para su evaluación.

15 Determinación de la hipertrofia cardiaca derecha

Tras realizar las mediciones de presión se perfundió a las ratas solución salina fisiológica. Se extirpó el corazón y se prepararon mediante disección el ventrículo derecho, el septo así como el ventrículo izquierdo de cada corazón. Se liofilizaron las preparaciones tisulares y a continuación se determinaron los pesos secos mediante pesaje. De estos animales se determinó para cada animal individual el cociente: peso del ventrículo derecho/peso del ventrículo izquierdo y del septo (RV/LV+S) como medida de la hipertrofia cardiaca derecha.

20 Determinación de la muscularización de vasos capilares arteriales del pulmón

Se extirparon los pulmones, se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina. Se obtuvieron secciones de parafina de 3 µm y se realizó una tinción doble inmunohistoquímica según protocolos convencionales. Se tiñeron las células de músculo liso de los vasos con un anticuerpo frente a actina y el endotelio por medio de anticuerpos frente al factor de von Willebrand. Para la evaluación se recurrió a ≥ 80 arterias intraacinares con un diámetro > 50 µm. Se dividieron los vasos en 3 categorías: vasos no muscularizados con < 20%, vasos parcialmente muscularizados con >20%, pero < 70%, y vasos completamente muscularizados con >70% de revestimiento de la sección transversal vascular con células de músculo liso.

Resultados:

35 a) Influencia del tratamiento con tergurida en los días de ensayo 1-28 sobre la presión sistólica en el ventrículo cardiaco derecho (RVSP) y la presión arterial sistémica (SAP)

	RVSP [mm Hg]	SAP [mm Hg]
Control	31,0 ± 3,6	104,0 ± 13,3
Monocrotalina	64,4 ± 14,5	93,7 ± 19,4
Monocrotalina + 0,4 mg/kg de tergurida dos veces al día	36,4 ± 3,6	97,5 ± 15,2

Los resultados son valores medios ± DE (N=4)

40 b) Influencia del tratamiento con tergurida en los días de ensayo 1-28 sobre la hipertrofia cardiaca derecha, medida como razón: peso del ventrículo cardiaco derecho frente a peso del ventrículo cardiaco izquierdo y del septo.

	RV/LV+S
Control	0,31 ± 0,06
Monocrotalina	0,74 ± 0,14
Monocrotalina +0,4 mg/kg de tergurida dos veces al día	0,33 ± 0,08

45 Los resultados son valores medios ± DE (N=4)

c) Influencia del tratamiento con tergurida en los días de ensayo 1-28 sobre la muscularización de vasos capilares arteriales (20-50 µm de diámetro) en el pulmón

	Porcentaje de vasos no muscularizados [%]	Porcentaje de vasos parcialmente muscularizados [%]	Porcentaje de vasos completamente muscularizados [%]
Control	57,8 ± 14,6	3,2 ± 2,3	14,8 ± 6,2
Monocrotalina	40,4 ± 16,0	42,3 ± 4,4	64,0 ± 7,7

	Porcentaje de vasos no muscularizados [%]	Porcentaje de vasos parcialmente muscularizados [%]	Porcentaje de vasos completamente muscularizados [%]
Monocrotalina + 0,4 mg/kg de tergurida dos veces al día	1,9 ± 1,6	57,8 ± 14,6	21,3 ± 12,6

Los resultados son valores medios ± DE (N=4)

Evaluación de los resultados:

5

Tras la administración de monocrotalina se produce en las ratas un daño del endotelio del pulmón, que está asociado con una proliferación excesiva de células de músculo liso en vasos capilares arteriales del pulmón y el desarrollo de hipertensión pulmonar. El aumento de presión sistólica en el ventrículo derecho a una tensión arterial sistémica constante así como la hipertrofia cardiaca derecha reflejan estas modificaciones estructurales y funcionales.

10

En este modelo de hipertensión pulmonar se sometieron a prueba los posibles efectos terapéuticos de un tratamiento con tergurida. La terapia comenzó, en condiciones experimentales, directamente tras el momento de la administración de monocrotalina. Con la terapia con tergurida se suprime casi siempre el aumento de presión en el ventrículo derecho como una medida indirecta de la hipertensión pulmonar. La tensión arterial sistémica no varía de manera demostrable en las condiciones de ensayo.

15

Igualmente, con la terapia se produce una supresión completa de la hipertrofia cardiaca derecha inducida por monocrotalina. En el pulmón, con la terapia se observó como efecto terapéutico una reducción de la muscularización inducida por monocrotalina de vasos capilares arteriales. La tergurida presenta en este modelo animal establecido de hipertensión pulmonar cualidades de efecto en todos los parámetros funcionales y estructurales relevantes, que hacen que una utilización terapéutica en pacientes con hipertensión pulmonar sea satisfactoria.

20

Ejemplo 10: Inhibición de la expresión con Col1A2 en células de músculo liso de las arterias pulmonares

25

En el experimento se estudió una posible influencia estimulante de la serotonina sobre la expresión de Col1 A2 así como el efector inhibidor de la tergurida. Los estudios se realizaron en células de músculo liso pulmonares de ser humano (Cambrex). Se cultivaron las células según las instrucciones del fabricante en medio CC-3182 (Cambrex). Se añadió un 5% de un suero bovino fetal (FCS) empobrecido en serotonina pretratado con carbón activo (HyClone).

30

Tras alcanzar una capa celular confluyente se cultivaron las células durante 2 días más en el 5% de FCS. Para el experimento se utilizó un medio con adición del 0,5% de FCS. Tras la adición de serotonina (100 nmol/l) y/o tergurida (100 nmol/l) se siguieron cultivando las células durante 48 horas. Las incubaciones se realizaron por triplicado.

35

Se obtuvo el ARN total con el kit de ARNasa (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa en ADNc tuvo lugar por medio de cebador oligo-dT (Roche). A continuación se cuantificó la expresión génica por medio de PCR en tiempo real SYBR Green en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) según protocolos convencionales. Como par de cebadores específicos para Col1 A2 humano se utilizaron en el análisis por PCR el cebador directo: 5'-GGTCAGCACCA-CCGATGTC-3' y el cebador inverso: 5'-CACGCCTG-CCCTTCCTT-3'.

40

Para estandarizar las diferencias en la cantidad total de ARN en las muestras individuales se normalizó la expresión de Col1 A2 con respecto a la expresión de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se expresa en las células de manera constitutiva. Para ello se utilizaron los siguientes cebadores: cebador directo: 5'-CAATGC-CTCCTGCACCACCAAC-3' y cebador inverso: 5'-AGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'. Se determinó la potencia de expresión de Col1 A2 y GAPDH en muestras individuales con procedimientos de evaluación convencionales y se cuantificó como razones de Col1A2/GAPDH. La representación de los resultados tuvo lugar como diagramas de cajas y bigotes (*box-and whisker*).

45

Tal como puede deducirse de la representación, en las células de músculo liso humanas de arterias pulmonares se estimula claramente la expresión de Col1 A2 en presencia de serotonina 100 nmol/l en comparación con una mezcla básica control. Esto indica un efecto trófico de la serotonina. Una deposición excesiva de colágeno junto con la proliferación de células de músculo liso contribuye a la fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar.

50

En presencia de tergurida se inhibe la expresión de Col1 A2, siendo el efecto inhibidor más marcado en presencia de serotonina. Por tanto, a partir de la calidad efectiva descrita en la presente memoria puede deducirse una posible utilización terapéutica de la tergurida para su aplicación en pacientes con hipertensión pulmonar.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Lisurida o tergurida así como sales, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros, mezclas de diastereómeros, hidratos, solvatos y racematos de las mismas para su utilización en el tratamiento y la profilaxis de la hipertensión arterial pulmonar, de glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena y del síndrome de Raynaud secundario.
- 10 2. Utilización de lisurida o tergurida así como sales, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros, mezclas de diastereómeros, hidratos, solvatos y racematos de las mismas para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y la profilaxis de la hipertensión arterial pulmonar, de glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena y del síndrome de Raynaud secundario.
- 15 3. Composición farmacéutica que contiene al menos uno de los compuestos lisurida o tergurida así como sales, enantiómeros, mezclas de enantiómeros, diastereómeros, mezclas de diastereómeros, hidratos, solvatos y racematos de los mismos en una concentración activa de principio activo de 0,1 - 10 mg por dosis unitaria junto con vehículos, excipientes y/o disolventes farmacológicamente aceptables para su utilización en el tratamiento y la profilaxis de la hipertensión arterial pulmonar, de glomeruloesclerosis inducidas de manera endógena o inducidas de manera exógena y del síndrome de Raynaud secundario.
- 20 4. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 3, siendo la composición farmacéutica adecuada para la administración oral, sublingual, parenteral, cutánea, bucal, percutánea, subcutánea, inhalatoria o nasal.
- 25 5. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 3 o 4, en forma de comprimidos, comprimidos multicapa, cápsulas, agentes orales de acción retardada, supositorios, microformulaciones, nanoformulaciones, formulaciones liposómicas, gotas, gotas nasales, pulverizaciones nasales, aerosoles, ampollas, disoluciones, emulsiones, dispersiones, polvos, polvos para inhalación, formulaciones microcristalinas, pulverizaciones para inhalación, sistemas transdérmicos o formulaciones subcutáneas.

Figura 1

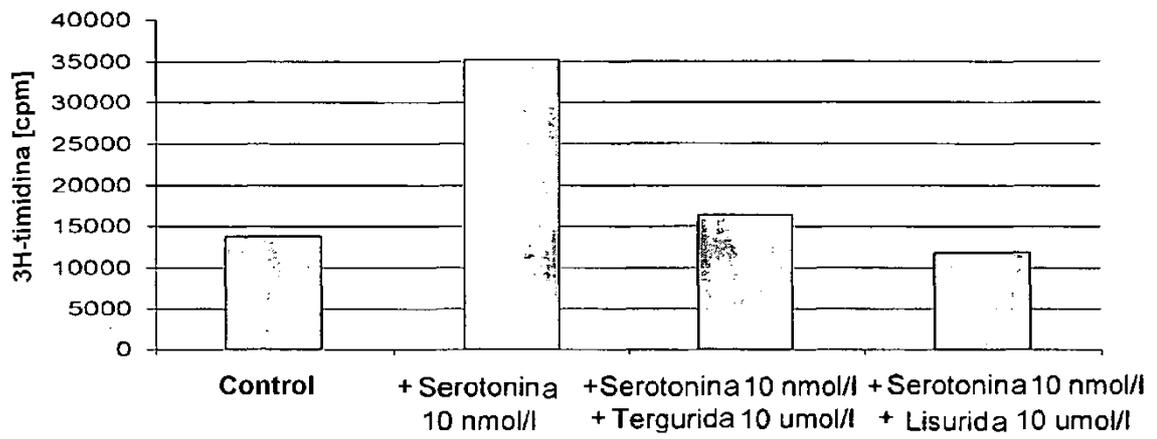


Figura 2

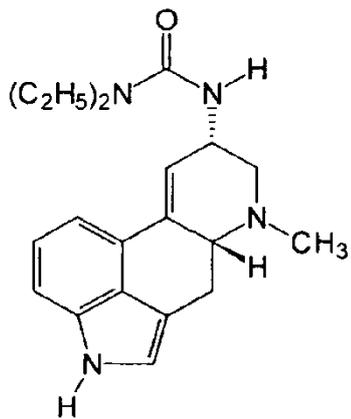


Figura 3

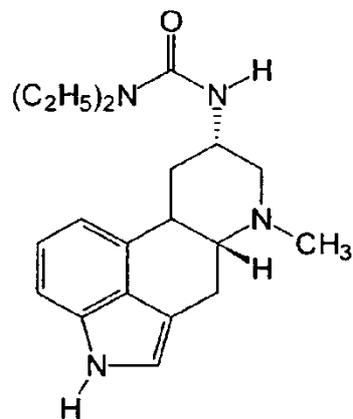


Figura 4

