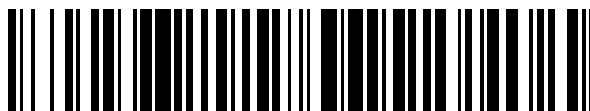


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 930**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00	(2006.01)	A61K 31/42	(2006.01)
A61K 9/10	(2006.01)	A61K 31/423	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)	A61K 31/44	(2006.01)
A61K 9/19	(2006.01)	A61K 31/4409	(2006.01)
A61K 31/27	(2006.01)	A61K 31/4418	(2006.01)
A61K 31/277	(2006.01)	A61K 31/4425	(2006.01)
A61K 31/343	(2006.01)	A61K 31/4453	(2006.01)
A61K 31/381	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)
A61K 31/40	(2006.01)		
A61K 31/4166	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2002 E 02771771 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1389467**

54 Título: **Composición terapéutica para el tratamiento regenerativo de enfermedades de los cartílagos**

30 Prioridad:

23.05.2001 JP 2001154048

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

04.11.2013

73 Titular/es:

**MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION
(100.0%)
2-6-18, Kitahama, Chuo-ku, Osaka-shi
Osaka 541-8505, JP**

72 Inventor/es:

**TAKIGAWA, MASAHARU;
SAKURAI, NAOKI;
TAKAGI, TOSHIKI;
YANAKA, NORIYUKI;
HORIKIRI, YUJI y
TAMURA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 427 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición terapéutica para el tratamiento regenerativo de enfermedades de los cartílagos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, específicamente, a una composición farmacéutica para el tratamiento regenerativo de las enfermedades de los cartílagos que incluyen osteoartritis (artropatía degenerativa), condrodistrofia, discopatía degenerativa o lesión de menisco.

Técnica anterior

10 El cartílago es considerablemente elástico y desempeña un papel en la construcción del esqueleto junto con el hueso y en la protección de órganos internos. El tejido cartilaginoso consiste en condrocitos y matriz de cartílago que rodea a los mismos.

15 El cartílago está formado por condroblastos originados en el mesénquima cuyas células producen una matriz en la circunferencia en los procesos de división y crecimiento celular. La matriz de cartílago consiste en una matriz amorfa y componentes fibrosos, y se clasifica en los siguientes grupos según la razón de componentes: (1) cartílago hialino (cartílago articular, cartílago costal, cartílago tiroideos, etc.); (2) fibrocartílago (discos intervertebrales, sínfisis púbica, etc.); y (3) cartílago elástico (faringe, epiglotis, cartílago del conducto auditivo, cartílago auricular, etc.) IGAKU-DAIJITEN, 18ª edición, publicado por Nanzando, pág. 1542. El documento "Journal of Bone and Joint surgery" vol. 75(2), 532-553, 1993 describe el papel de los osteoblastos en la regeneración de cartílago.

20 Los componentes principales de la matriz de cartílago son proteoglicano y colágeno (tipo II, tipo IX y similares). Se sabe que el proteoglicano participa en la naturaleza de imbibición (hinchazón) peculiar del tejido cartilaginoso, y el colágeno en la rigidez del cartílago frente a la fuerza de tensión y de cizalladura.

25 En el proteoglicano de la matriz de cartílago, se considera que glucosaminoglicanos tales como sulfato de condroitina, sulfato de queratano se conectan con una proteína de núcleo con un peso molecular de aproximadamente 220.000 para formar macromoléculas, en las que los glucosaminoglicanos hidratan a muchas moléculas de agua, lo que contribuye a la naturaleza de imbibición del cartílago. The Bone, vol. 4, pág. 8 (1994).

30 El cartílago articular tiene una capa de calcificación en la región de transmigración con tejido óseo, y, tras completarse el crecimiento, se suministran nutrientes a condrocitos a partir del líquido sinovial y apenas se suministran directamente a partir de la sangre. Además, el cartílago articular está formado a partir de cartílago hialino con un alto grado de diferenciación celular, y por tanto es un órgano sensible con una capacidad regenerativa extremadamente baja.

La superficie del cartílago articular está cubierta por líquido sinovial altamente viscoso, y gracias a un mecanismo de lubricación de lubricante que comprende como componente principal un complejo de ácido hialurónico-proteína, se mantiene la cinemática de articulación suave. Sin embargo, se considera que hay una denominada duración en el cartílago articular, y la alteración de las articulaciones con el envejecimiento es un fenómeno fisiológico inevitable.

35 Los ejemplos de enfermedades conocidas provocadas por trastorno del cartílago incluyen osteoartritis, condrodistrofia, discopatía degenerativa o lesión de menisco.

40 Entre ellas, la osteoartritis es una enfermedad en la que se produce un cambio proliferativo del hueso y del cartílago articular basándose en un cambio regresivo del tejido que constituye una articulación, principalmente, cartílago articular, conduciendo finalmente a un cambio morfológico notable de la articulación, enfermedad que ha aumentado notablemente con el envejecimiento de la población. En particular, la artropatía de la articulación de la rodilla puede evitar que los pacientes mantengan la posición en pie o que anden normalmente a medida que progresa la patología, y conduce a una disminución significativa de su ADL (capacidad de la vida diaria) lo que posiblemente da como resultado un estado confinado en cama.

45 El tratamiento de osteoartritis puede clasificarse principalmente en tratamiento conservativo y terapia quirúrgica. El tratamiento conservativo se lleva a cabo mediante los siguientes métodos, por ejemplo, (1) administración de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos; (2) termoterapia; (3) control del peso; (4) terapia con dispositivos ortopédicos; (5) infusión intraarticular de analgésicos antiinflamatorios esteroideos; (6) infusión intraarticular de formulación de hialuronato. En casos en los que el tratamiento conservativo no es eficaz, o la enfermedad está en una fase progresada o terminal, se realiza terapia quirúrgica mediante (a) cirugía de irrigación artroscópica; (b) osteotomía tibial alta o (c) artroplastia artificial, y similares. Senility and Disorder, vol. 10, 2ª edición, págs. 61-69, (1997) y 6ª edición, págs. 66-77 (1997).

50 Hay diversos compuestos que tienen actividad inhibidora de PDE4, que pueden suprimir la liberación de mediador inflamatorio inhibiendo la actividad de PDE4. J. Mol. Cell. Cardiol., 12 (Sup. II), S61 (1989).

Se describe que un compuesto que tiene actividad inhibidora de PDE4 suprime la producción de TNF- α que es una

citocina liberada a partir de fagocitos mononucleares en respuesta a inmunostimulantes, y es útil en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias provocadas por TNF- α . Documentos JP 2000-503678A, JP 2000-502724A, JP 2000-510105A, JP 2000-514804A, 2000-502350A, JP 2000-501741A y similares.

5 Sin embargo, no se ha sabido que el inhibidor de PDE4 sea eficaz para el tratamiento reparativo de enfermedades de los cartílagos tal como se expone en las presentes reivindicaciones.

Descripción de la invención

10 Tal como se mencionó anteriormente, se sabe que el cartílago tiene una capacidad regenerativa extremadamente baja, y se consideraba que, una vez dañado, la regeneración del mismo es casi imposible. La farmacoterapia convencional sólo era un tratamiento conservativo que limita la progresión del trastorno. Por consiguiente, desde hace mucho tiempo se ha requerido el desarrollo de farmacoterapia y/o agentes farmacéuticos que permitan realizar un tratamiento regenerativo de enfermedades de los cartílagos.

15 Los presentes inventores han encontrado en primer lugar que los condrocitos producen PDE4 y después que compuestos que tienen actividad inhibidora de PDE4 muestran actividad sobre enfermedades de los cartílagos. Los inventores han estudiado intensamente y han encontrado que dichos inhibidores de PDE4 son útiles en el tratamiento regenerativo de enfermedades de los cartílagos, y han establecido la presente invención.

20 La presente invención proporciona una composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, que comprende un inhibidor de PDE4 según las reivindicaciones como principio activo. En particular, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica adecuada para administrarse localmente al sitio de la enfermedad de los cartílagos, específicamente, una composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos en forma de preparación de microesferas.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 es una gráfica que muestra la actividad de hidrólisis de cAMP en cada fracción obtenida mediante fraccionamiento de extracto de condrocitos articulares de conejo mediante cromatografía en columna de Mono Q Sepharose, en presencia de compuesto (44) (○) y ausencia de compuesto (44) (●).

La figura 2 es una copia de una microfotografía que muestra los resultados de observación con microscopio de la regeneración de cartílago articular de conejo anciano en presencia de microesferas que contienen compuesto (1) o libres de compuesto (1).

30 La figura 3 es una gráfica que muestra la actividad de hidrólisis de cAMP o cGMP en cada fracción obtenida mediante fraccionamiento de extracto de condrocitos articulares humanos mediante cromatografía en columna de Mono Q Sepharose.

La figura 4 es una gráfica que muestra la actividad inhibidora (CI₅₀) de inhibidor de PDE4 frente a las fracciones 28-30 que mostraron una potente actividad de hidrólisis de cAMP tal como se demuestra en la figura 3.

La figura 5 es una gráfica que muestra las características de elución de fármaco *in vitro* de microesferas obtenidas en los ejemplos 1, 2 y 3.

35 La figura 6 es una gráfica que muestra el transcurso en el tiempo de la concentración en plasma del compuesto (1) administrado a una rata por vía intravenosa. Se muestran datos mediante media \pm desviación estándar (n = 3).

La figura 7 es una gráfica que muestra el transcurso en el tiempo de la concentración en plasma de un principio activo tras la inyección subcutánea de dispersión de microesferas obtenida en el ejemplo 1-(5), 2-(2) o 3-(2) en una rata. Se muestran datos mediante media \pm desviación estándar (n = 5).

40 La figura 8 es una gráfica que muestra el transcurso en el tiempo del compuesto (1) que queda en la preparación tras la inyección subcutánea de dispersión de microesferas obtenida en el ejemplo 2-(2) en una rata. Se muestran datos mediante media \pm desviación estándar (n = 5).

45 La figura 9 es una gráfica que muestra el transcurso en el tiempo del compuesto (2) que queda en la preparación tras la inyección subcutánea de dispersión de microesferas obtenida en el ejemplo 6-(5) o 7-(2) en una rata. Se muestran datos mediante media \pm desviación estándar (n = 4).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

50 La composición de la presente invención para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos según las reivindicaciones puede potenciar la expresión de gen que codifica para proteína de matriz de cartílago y así mostrar un efecto promotor de producción de matriz superior en el cartílago especialmente en cartílago articular que tiene una actividad regenerativa extremadamente baja, y curar enfermedades de los cartílagos mediante la regeneración de cartílago.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos" se refiere al tratamiento de los trastornos según las reivindicaciones no sólo para detener el progreso de la enfermedad de los cartílagos sino también para restaurar un cartílago que ha experimentado deformación y/o detrición debido a enfermedad, lesión, al estado original.

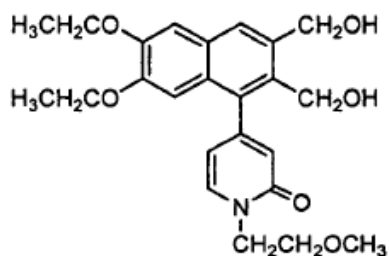
5 La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse combinando un inhibidor de PDE4 según las reivindicaciones como principio activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable convencional o un agente diluyente para el mismo. La composición farmacéutica preferida es una composición de liberación sostenida para la administración local, que contiene un(os) inhibidor(es) de PDE4 según las reivindicaciones y un(os) polímero(s) biocompatible(s) y biodegradable(s). La composición para la administración local está preferiblemente en forma de formulación de depósito, y más preferiblemente en forma de microesferas, microesferas que pueden formularse como una preparación inyectable.

10 En las reivindicaciones se indican ejemplos de inhibidor de PDE4 utilizable como principio activo de las composiciones farmacéuticas según la presente invención.

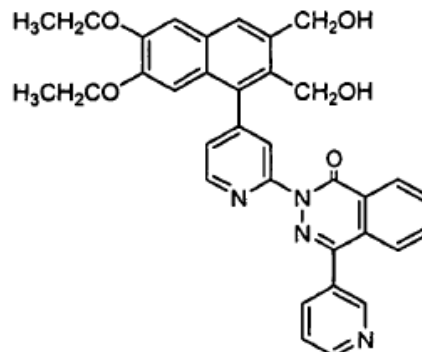
15 La PDE puede clasificarse en PDE1-5 según las enseñanzas de "Trends in Pharmacological Sciences, vol. 11, págs. 150-155", y los inhibidores de PDE4 adecuados para la presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos según las reivindicaciones son preferiblemente selectivos para PDE4 con una actividad inhibidora superior frente a PDE4 en comparación con las otras (PDE1-3, 5), más preferiblemente tienen 10 veces o más actividad inhibidora sobre PDE4 que sobre las otras PDE. La actividad inhibidora de tal inhibidor de PDE4 sobre PDE4 es de manera particularmente preferible 50 veces o más, y aún más preferiblemente 100 veces o más que aquella sobre las otras PDE.

20 Inhibidores de PDE4 preferibles según las reivindicaciones son compuestos cuya Cl_{50} de actividad inhibidora de PDE4 es de 0,1-1000 nM, preferiblemente de 0,1-100 nM, más preferiblemente inferior a 100 nM, cuando se determina mediante un método descrito en "Advances in Cyclic Nucleotide Research", vol. 10, págs. 69-92, 1979, Raven Press.

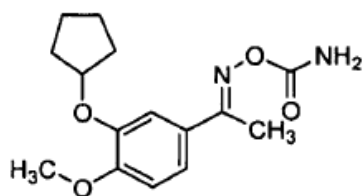
25 Los inhibidores de PDE4 selectivos incluyen los compuestos (1) a (57) representados por las siguientes fórmulas o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



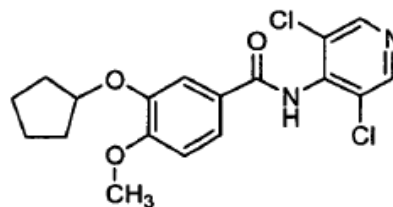
Compuesto (1)



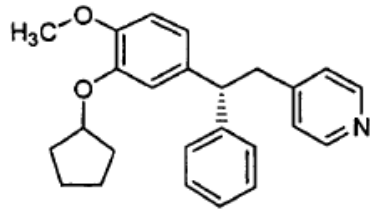
Compuesto (2)



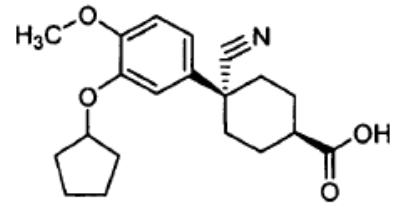
Compuesto (9)



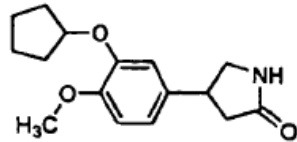
Compuesto (11)



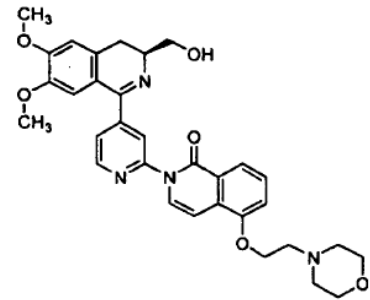
Compuesto (21)



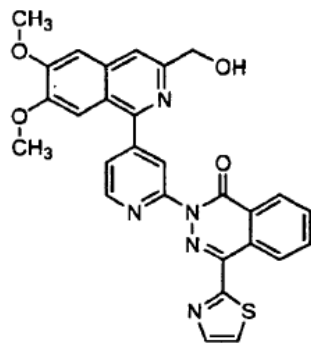
Compuesto (27)



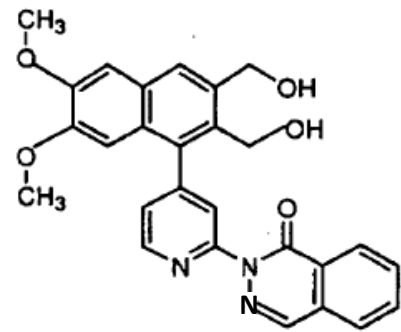
Compuesto (44)



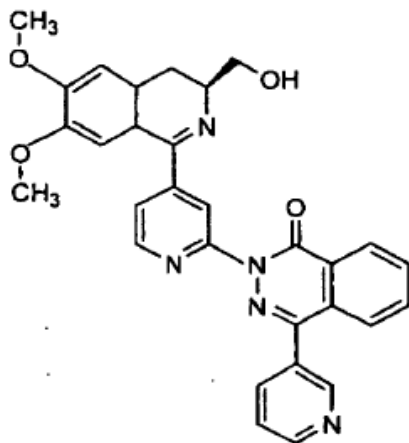
Compuesto (52)



Compuesto (53)



Compuesto (56)



Compuesto (57)

Los compuestos que tienen actividad inhibitora de PDE4 dados a conocer ahora pueden clasificarse en de (A) a (D) a continuación según la estructura química; sin embargo, los compuestos según las reivindicaciones pertenecen a (A) y (B), en particular, a (A).

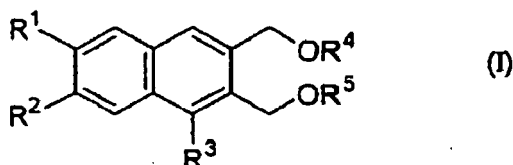
(A) compuestos que tienen un esqueleto de naftaleno [por ejemplo, los compuestos (1), (2) y (52), (57), (53) (56)];

(B) Compuestos que tienen una estructura de 3-ciclopentiloxi-4-metoxifenilo [por ejemplo, los compuestos (9), (11), (21), (27), (44)];

(C) Compuestos que tienen un esqueleto de xantina o una estructura parcial análoga a la misma [por ejemplo, los compuestos (5), (7), (28), (29), (30), (31), (32), (36), (37), (41), (43) y (46)]; y

5 (D) Compuestos que tienen una estructura diferente de las descritas en de (A) a (C) anteriormente [por ejemplo, los compuestos (3), (4), (8), (10), (13), (15), (16), (18), (22), (23), (42), (45) y (48)].

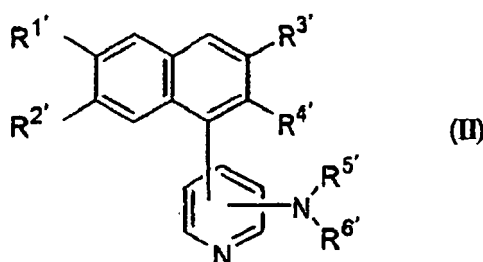
Los ejemplos de compuestos de grupo (A) descritos ahora incluyen los mostrados por las siguientes fórmulas (I) a (III) y sales farmacológicamente aceptables de los mismos.



10 en la que R¹ y R² son iguales o diferentes y son cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo cicloalquilo inferior, o un grupo alcoilo inferior opcionalmente sustituido, o están unidos entre sí en los extremos para formar un grupo alquilendioxi inferior;

R³ es un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno de 6 miembros opcionalmente sustituido; y

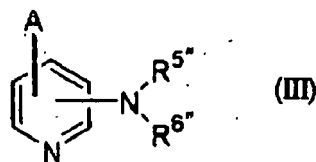
15 -OR⁴ y -OR⁵ son iguales o diferentes y son cada uno un grupo hidroxilo opcionalmente protegido. Documento JP 05-229987A, (1993).



En la que R^{1'} y R^{2'} son iguales o diferentes y son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo opcionalmente protegido;

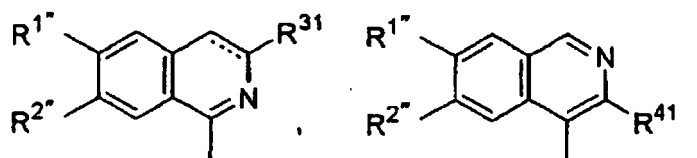
20 cualquiera de R^{3'} y R^{4'} es un grupo metilo sustituido con hidroxilo opcionalmente protegido y el otro es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo metilo sustituido con hidroxilo opcionalmente protegido; y

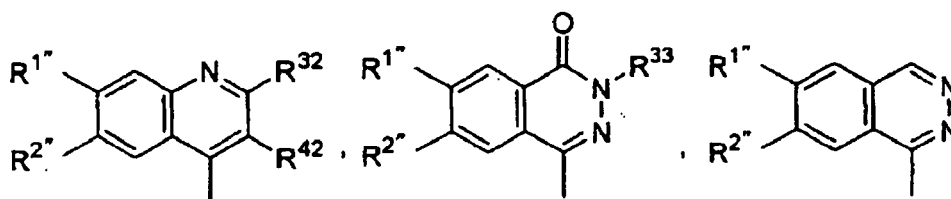
R^{5'} y R^{6'} son iguales o diferentes y son cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido, un grupo fenilo opcionalmente sustituido o un grupo amino opcionalmente protegido, o están unidos entre sí en los extremos y forman en asociación con el átomo de nitrógeno adyacente un grupo heterocíclico opcionalmente sustituido. Documento JP-09-59255A, (1993).



25

En la que A es un grupo seleccionado de los mostrados por las fórmulas





en las que $R^{1''}$ y $R^{2''}$ son iguales o diferentes y son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo opcionalmente protegido;

5 R^{31} es un grupo hidroximetilo opcionalmente protegido; R^{32} es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo hidroximetilo opcionalmente protegido; R^{33} es un grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido; R^{41} es un grupo hidroximetilo opcionalmente protegido; R^{42} es un grupo hidroximetilo opcionalmente protegido; la línea discontinua representa la presencia o ausencia de un doble enlace; y

10 $R^{5''}$ y $R^{6''}$ son iguales o diferentes y son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo amino opcionalmente protegido, o están unidos entre sí en los extremos y forman en asociación con el átomo de nitrógeno adyacente un grupo heterocíclico opcionalmente sustituido. Documento JP- 10-226685A (1998).

Como inhibidor de PDE4 según las reivindicaciones que es un principio activo de la presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, entre el grupo (A), se prefieren más los compuestos que tienen un esqueleto de naftaleno o isoquinolina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y se prefieren todavía más los compuestos (1) y (2) y sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 Dado que los inhibidores de PDE4 pueden provocar vómitos o secreción de ácido gástrico dependiendo de la dosificación cuando actúan sistémicamente (Cellular Signaling, 9 (3-4), págs. 227-236 (1997)), la presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos se aplica preferiblemente de manera local en la proximidad de una región afectada (especialmente, en la proximidad del cartílago articular), de modo que la concentración de fármaco en la sangre sistémica no aumenta pero se mantiene aquella en la región de cartílago afectada. Para establecer este propósito, se prefiere formular la composición en una forma de liberación sostenida que puede reducir ventajosamente la frecuencia de administración y también disminuir la carga para los pacientes.

20 Los ejemplos de realizaciones preferidas de la presente composición incluyen preparaciones de depósito que liberan gradualmente un fármaco cuando se administran localmente (por ejemplo, preparación de aglomerados, preparación de gel, preparación de matriz, preparación de microesferas, una preparación de liberación sostenida obtenida mediante adición de un fármaco en una disolución acuosa de un polímero biocompatible y biodegradable, una preparación que está diseñada para ser un líquido en el momento de la administración y para formar un gel en un organismo vivo tras la administración, una preparación incrustada en diversas bases que se notifica que se usan generalmente en el campo de la ortopedia, y similares).

30 Los ejemplos de preparaciones de aglomerados incluyen una preparación de liberación sostenida a largo plazo que puede obtenerse comprimiendo un fármaco y partículas finas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico cuyo grupo carboxilo terminal está esterificado mediante un alcohol, y similares. (Documento JP2001-187749A).

Los ejemplos de preparaciones de gel incluyen las obtenidas disolviendo en un tampón fosfato un fármaco y ácido hialurónico que está químicamente unido a polietilenglicol (Journal of Controlled Release, 59 (1999) págs. 77-86), y similares.

35 Los ejemplos de preparaciones de matriz que comprende un fármaco incluyen las obtenidas impregnando un fármaco en material granular de colágeno o preparación de membrana fibrosa, o añadiendo un fármaco a un material granular de colágeno o a una mezcla de reacción para preparar una preparación de membrana fibrosa, y similares (documentos JP10-182499A (1998), JP06-305983 (1994)).

40 Los ejemplos de una preparación de liberación sostenida obtenida añadiendo un fármaco en una disolución acuosa de un polímero biocompatible y biodegradable incluyen las obtenidas añadiendo un fármaco en una disolución acuosa de hialuronato de sodio, y similares.

45 Los ejemplos de una preparación diseñada para ser un líquido en el momento de la administración y para formar un gel en un organismo vivo tras la administración incluyen aquellas en las que se disuelven un fármaco y un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico en N-metil-2-pirrolidona (Journal of Controlled Release, 33 (1995) págs. 237-243), o una preparación que comprende un fármaco y un polímero que existe como disolución a baja temperatura pero que forma un gel a la temperatura corporal, tal como un copolímero en bloque de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y polietilenglicol y similares (citado anteriormente, 27(1993), 139-147).

50 Los ejemplos de una preparación incrustada en diversas bases que se notifica que se usan generalmente en el campo de la ortopedia incluyen las preparadas mezclando un fármaco y una base (por ejemplo, polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua, poli(metacrilato de metilo), hidroxiapatita, fosfato de tricalcio o

similares). *Biomaterials*, vol. 21, págs. 2405-2412 (2000); e *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 206, págs. 1-12 (2000).

Se prefieren preparaciones para administración local que liberan una cantidad eficaz de inhibidor de PDE4 gradualmente a la proximidad de una región de cartílago con una(s) lesión/lesiones (especialmente, la proximidad de cartílago articular) en el sentido de que puede reducirse la frecuencia de administración durante el periodo requerido para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos.

Entre las preparaciones de depósito, en el caso de microesferas viables para la administración local mediante inyección, el tamaño de partícula de tales microesferas está preferiblemente en el intervalo adecuado para pasar por una aguja, más preferiblemente de 0,01-150 μm , de manera particularmente preferible de 0,1-100 μm en el sentido de que puede reducirse la irritación en el sitio afectado.

Dado que la presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, que comprende un inhibidor de PDE4 como principio activo, se administra localmente a la proximidad de una región de cartílago con una(s) lesión/lesiones (especialmente, la proximidad de cartílago articular), sería preferible realizar la dosificación pequeña. Por consiguiente, el contenido de inhibidor de PDE4 en la composición tal como la preparación de microesferas puede ser preferiblemente del 0,0001-80% en peso, más preferiblemente del 0,001-50% en peso, y además más preferiblemente del 0,01-50% en peso. La dosis de un inhibidor de PDE4 como principio activo puede variar dependiendo de la clase de inhibidor de PDE4 que va a usarse, el peso, la edad, los estados del sujeto o el sitio en el que va a aplicarse y se determina generalmente por un médico; sin embargo, para la administración local, la dosis puede estar habitualmente en el intervalo de desde 1 g hasta 1 g por región afectada.

La composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos de la presente invención puede prepararse de una manera convencional usando un inhibidor de PDE4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable o un portador para el mismo. La composición preferida puede prepararse combinando un inhibidor de PDE4 y un polímero biocompatible y biodegradable.

Entre ellos, el polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua es un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua que requiere al menos 1000 ml de agua para disolver 1 g del polímero a 25°C, y los ejemplos específicos incluyen poliésteres de hidroxiácido graso y derivados de los mismos (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido cítrico), poli(ácido málico), poli(ácido β -hidroxibutírico), ϵ -caprolactonas polimerizadas con apertura de anillo, copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, copolímero de ácido 2-hidroxibutírico-ácido glicólico, copolímero en bloque de poli(ácido láctico) y polietilenglicol, copolímero en bloque de poli(ácido glicólico) y polietilenglicol, y copolímero en bloque de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y polietilenglicol, etc.), polímeros de α -cianoacrilatos de alquilo (por ejemplo, poli(2-cianoacrilato de butilo), etc.), poli(oxalato de alquilenos) (por ejemplo, poli(oxalato de trimetileno), poli(oxalato de tetrametileno), etc.), poliortocarbonatos, policarbonatos (por ejemplo, poli(carbonato de etileno), poli(carbonato de etilpropileno), etc.), poliortocarbonatos, poliaminoácidos (por ejemplo, poli- γ -L-alanina, poli(ácido γ -bencil-L-glutámico), poli-(ácido γ -metil-L-glutámico), etc.), ésteres de ácido hialurónico. Puede usarse uno o más de estos polímeros. Otros polímeros biocompatibles y biodegradables incluyen hialuronato de sodio, sulfato de condroitina, colágeno, gelatina, fibrina, y similares.

Entre los polímeros biocompatibles y biodegradables insolubles en agua anteriores, se prefieren particularmente poliésteres de hidroxiácido graso. Por encima de todo, se prefieren más aquellos cuyo peso molecular promedio oscila entre 2000 y aproximadamente 800000, se prefieren especialmente aquellos que oscilan entre 2000 y aproximadamente 200000 y los más preferidos son aquellos que oscilan entre 5000 y 50000.

Además, entre los poliésteres de hidroxiácido graso anteriores, se prefieren más poli(ácido láctico), copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y copolímero de ácido 2-hidroxibutírico-ácido glicólico. La razón molar de ácido láctico y ácido glicólico en un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico es preferiblemente de 90:10 a 30:70, más preferiblemente de 80:20 a 40:60, y la razón molar de ácido 2-hidroxibutírico y ácido glicólico en un copolímero de ácido 2-hidroxibutírico-ácido glicólico es preferiblemente de 90:10 a 30:70, más preferiblemente de 80:20 a 40:60.

Cuando se formula un inhibidor de PDE4 anterior en una preparación de depósito, puede llevarse a cabo apropiadamente dependiendo de la realización prevista, opcionalmente tras pulverizar un inhibidor de PDE4 si es necesario.

La pulverización de inhibidor de PDE4 puede llevarse a cabo usando uno cualquiera de los métodos convencionales para producir partículas finas incluyendo métodos de pulverización mecánica tales como pulverizaciones con molino de chorro, molino triturador, molino de bolas de convolución, molino de bolas de botella, molino de perlas, molino agitador, molino de cilindros y molino de tubos, o el denominado método de cristalización en el que en primer lugar se disuelve un fármaco en un disolvente y después se recristaliza ajustando el pH, cambiando la temperatura o alterando la constitución de disolvente, y recuperando las partículas mediante centrifugación, filtración, o similares.

Cuando se preparan los diversos tipos mencionados anteriormente de formulaciones de la presente composición farmacéutica, puede usarse cualquier procedimiento apropiado dependiendo del inhibidor de PDE4 seleccionado.

Por ejemplo, la preparación de microesferas puede prepararse mediante los siguientes métodos. En el caso de que una sal de un inhibidor de PDE4 muestre una baja tasa de incorporación en una microesfera, puede convertirse en la forma libre correspondiente usando un ácido o una base antes de la preparación de microesferas.

(1) Método de secado en agua

5 En este método, se añade un fármaco a una disolución de polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua en un disolvente orgánico no miscible con agua cuyo punto de ebullición es inferior al del agua (disolución de polímero insoluble en agua), y se dispersa la fase orgánica resultante en una fase acuosa para dar una emulsión O/W, lo que va seguido por la retirada del disolvente orgánico. Este método puede realizarse de una manera similar a los descritos, por ejemplo, en los documentos JP 56-19324B (1981), JP 63-91325A (1988), JP 08-151321A (1996),
10 Kajeev Jain *et al.*, "Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poli (Ester) Devices: Different Preparative Approaches", Drug Development and Industrial Pharmacy, vol. 24(8), págs. 703-727, 1998, documentos JP 60-100516A (1985), JP 62-201816A (1987), JP 09-221417A (1997) y JP 06-211648A (1994).

(2) Método de separación de fases

15 En este método, en una disolución de polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua en un disolvente orgánico se disuelve o se dispersa un fármaco, o se dispersa una disolución acuosa del fármaco. Entonces se añade gradualmente un agente de endurecimiento con agitación para obtener precipitaciones sólidas. Este método puede realizarse de una manera similar a los descritos, por ejemplo, en los documentos JP 60-67417A (1985), USP 5503851, USP 5000886, Eur. J. Pharm. Biopharm. vol. 42 (1), págs. 16-24 (1996) y el mencionado anteriormente Jain *et al.* (citado anteriormente).

20 (3) Método de secado por pulverización

En este método, en una disolución de polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua en un disolvente orgánico se disuelve o se dispersa un fármaco, o se dispersa una disolución acuosa del fármaco. Entonces se pulveriza la disolución o dispersión resultante mediante una boquilla en una cámara de secado de un secador por pulverización para volatilizar el disolvente orgánico en gotitas finas en un tiempo muy corto. Este método puede
25 realizarse de una manera similar a los descritos, por ejemplo, en los documentos JP 01-155942A (1989), JP 05-194200A (1993), JP 05-70363A (1993), JP 08-151321A (1996), JP 09-221417A (1997), USP 5,922,253, "Spray Drying Handbook" (John Wiley & Sons, Nueva York 1984), Partick B. Deasy, "Microcapsulation and Related Drug Processes" (Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1984) y el mencionado anteriormente Jain *et al.* (citado anteriormente), y similares.

30 (4) Método de difusión de disolvente

En este método, se añade una disolución de un fármaco y un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua en un disolvente orgánico miscible con agua a una disolución acuosa de coloide protector, seguido por emulsificación con agitación para proporcionar partículas finas. Este método puede realizarse de una manera similar a los descritos, por ejemplo, en los documentos JP 05-58882A (1993), JP 09-110678A (1997) e International Journal
35 of Pharmaceutics, vol. 187, págs. 143-152 (1999).

En el "método de secado en agua" mencionado anteriormente, pueden emplearse diferentes procedimientos de preparación dependiendo del tipo de fase orgánica, aunque todos ellos pueden realizarse de una manera convencional. Los ejemplos de fase orgánica incluyen los siguientes.

40 (a) Una fase orgánica en la que un fármaco se disuelve directamente o se dispersa en una disolución de un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua. Esto, cuando se dispersa en una fase acuosa, proporciona una emulsión O/W (documentos JP 56-19324B (1981), JP 63-91325A (1988), JP 06-32732A (1994), JP 08-151321A (1996), JP 06-32732A (1994), y el mencionado anteriormente Jain, etc.)

45 (b) Una fase orgánica que es una emulsión W/O en la que una disolución acuosa de un fármaco se dispersa en una disolución de un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua. La emulsión W/O, cuando se dispersa en una fase acuosa, proporciona una emulsión (W/O)/W (documentos JP 60-100516A (1985), JP 62-201816A (1987), JP 09-221417A (1997), y el mencionado anteriormente Jain, etc.)

50 (c) Una fase orgánica que es una emulsión O/O, que usa dos o más polímeros biocompatibles y biodegradables insolubles en agua, en la que un fármaco se disuelve o se dispersa en una disolución de polímero que se dispersa en el/los otro(s). La emulsión O/O, cuando se dispersa en una fase acuosa, proporciona una emulsión (O/O)/W (documento JP 06-211648A (1994)).

Usando cualquiera de las fases orgánicas anteriores, puede obtenerse la emulsificación mediante un método convencional, por ejemplo, el método de agitación intermitente, el método usando una mezcladora tal como una agitadora con hélices o una agitadora de turbina, el método de molino coloidal, el método de homogeneizador y el método por ultrasonidos.

Los ejemplos de disolvente orgánico utilizable en estos métodos incluyen hidrocarburos halogenados (cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, cloroetano, dicloroetano, tricloroetano, etc.), ésteres alifáticos (acetato de etilo, acetato de butilo, etc.), hidrocarburos aromáticos (benceno, etc.), hidrocarburos alifáticos (n-hexano, n-pentano, ciclohexano, etc.), cetonas (metil etil cetona, etc.), éteres (dietil éter, diisopropil éter, metil isobutil éter, etc.).

En la preparación de emulsión anterior, puede añadirse un emulsionante a una fase acuosa para estabilizar la emulsión, emulsionante que incluye, por ejemplo, tensioactivos aniónicos (oleato de sodio, estearato de sodio, laurilsulfato de sodio, etc.), tensioactivos no iónicos (éster de ácido graso de polioxietilensorbitano [Tween 80, Tween 60 (Nikko Chemicals, Co., Ltd.)], derivados de aceite de ricino de polietileno [HCO-60, HCO-50 (Nikko Chemicals, Co., Ltd.)], polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa, metilcelulosa, lecitina, gelatina, etc.

Además, cuando se incorporan uno o más de otros componentes además del inhibidor de PDE4, el primero puede añadirse preferiblemente a la fase orgánica en el momento de la preparación de la emulsión O/W. Para obtener una preparación de microesferas con una concentración elevada de agente medicinal, es necesario preparar una fase orgánica que contiene un principio activo a una alta concentración. Con este fin, puede incluirse un agente de osmorregulación en una fase acuosa para evitar el flujo de salida de un principio activo a una fase acuosa (documento JP 2608245).

Entonces se somete la emulsión O/W obtenida de la manera mencionada anteriormente a secado en agua para eliminar el disolvente orgánico presente en la emulsión para dar microesferas.

El disolvente orgánico puede eliminarse de la emulsión de una manera convencional tal como calentando, colocando a presión reducida, soplando aire, o similares, y por ejemplo, puede emplearse un método en el que se elimina por destilación un disolvente en un sistema abierto (documentos JP 56-19324B (1981), JP 63-91325A (1988), JP 08-151321A (1996), JP 06-211648A (1994)) o en un sistema cerrado (documento JP 09-221418A (1997)). Además, también puede usarse un método en el que se extrae un disolvente y se elimina por medio de una gran cantidad de fase acuosa exterior (documento JP-2582186).

Además, los siguientes métodos pueden usarse de manera apropiada dependiendo del inhibidor de PDE4.

Un método en el que una disolución que contiene un fármaco, un polímero biodegradable y un disolvente bueno miscible con agua (disolvente A: acetona, tetrahidrofurano, etc.) para dicho polímero se añade en primer lugar a una disolución mezclada homogénea que comprende un disolvente malo (disolvente B: agua, etanol, etc.) para dicho polímero, que es miscible con el disolvente A, y un disolvente malo (disolvente C: glicerina, etc.) para dicho polímero, que no es miscible con el disolvente A. La mezcla, tras la emulsificación, proporciona una emulsión en la que la disolución de polímero constituye la fase dispersada y la disolución mezclada homogénea constituye la fase continua. Entonces se retira el disolvente A de la fase dispersada (documento WO/01/80835).

Un método para preparar microesferas a partir de una emulsión mediante el método de secado en agua, en el que la emulsión de una fase orgánica que contiene un disolvente orgánico con un punto de ebullición inferior al del agua (cloruro de metileno, acetato de etilo, etc.) y un polímero insoluble en agua se emulsiona en una fase acuosa, que comprende (1) emplear un dispositivo equipado con una membrana de separación de gas (membrana de evaporación permeable, membrana porosa, etc.), (2) proporcionar una emulsión que va a someterse al secado en agua en un lado de la membrana de separación de gas, y (3) eliminar por destilación el disolvente orgánico en la emulsión en el otro lado de la membrana de separación de gas (documento WO/01/83594).

Además, el disolvente orgánico que queda en las microesferas puede retirarse calentando las microesferas en una fase acuosa a temperatura superior al punto de ebullición del disolvente orgánico (documento JP 2000-239152A) o calentando las microesferas para secar tras el recubrimiento con un aditivo de alto punto de fusión (documento JP 09-221417A (1997)).

Las microesferas resultantes se recuperan mediante centrifugación, filtración o tamizado, se lavan para eliminar sustancias unidas a las superficie tales como aditivos en la fase acuosa, y se someten a liofilización opcionalmente tras combinarse con un inhibidor de la agregación para impedir la aglomeración de microesferas, por ejemplo, azúcar, alcohol de azúcar o sal inorgánica, preferiblemente lactosa, manitol o sorbitol. Se prefiere usar un tamiz para obtener microesferas de un tamaño de partícula previsto, y se prefiere más usar un tamiz que permita pasar partículas de, por ejemplo, 150 μm o menos, para mejorar la capacidad de inyección cuando se usa la preparación de microesferas como disolución inyectable.

Para preparar microesferas mediante el "método de separación de fases", pueden usarse disolventes anfífilos tales como acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano y dioxano además de los disolventes orgánicos usados en el "método de secado en agua" anterior. Se disuelven o se dispersan un inhibidor de PDE4 y opcionalmente uno o más componentes adicionales, o una disolución de los mismos, en una disolución orgánica de polímero insoluble en agua en uno cualquiera de esos disolventes orgánicos para formar una fase orgánica. Se añade la fase orgánica gradualmente a un disolvente (medio de dispersión) no miscible con el disolvente orgánico anterior, por ejemplo, aceite de silicio, parafina líquida, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de lino, con agitación para formar una emulsión O/O. Si se desea, puede añadirse un

- 5 tensioactivo al medio de dispersión. El polímero insoluble en agua puede solidificarse enfriando la emulsión o evaporando el disolvente en la fase orgánica mediante calentamiento. Alternativamente, puede añadirse suavemente un agente de endurecimiento tal como hexano, ciclohexano, metil etil cetona, octametilciclotetrasiloxano o similares a la emulsión con agitación, o viceversa, para separar el polímero insoluble en agua de la emulsión formando así microesferas.
- Las microesferas resultantes se recuperan mediante centrifugación, filtración o tamizado, se lavan con hexano o agua purificada para eliminar disolventes, aditivos, etc. unidos a su superficie, y opcionalmente se someten a secado con aire, secado a vacío o liofilización. Alternativamente, pueden liofilizarse tras añadir un inhibidor de la agregación de una manera similar a la usada en el método de secado en agua mencionado anteriormente.
- 10 Los ejemplos de fase orgánica interna en el método de separación de fases incluyen las siguientes realizaciones.
- (a) Una fase orgánica en la que un fármaco se disuelve directamente o se dispersa en una disolución de un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua.
- (b) Una fase orgánica que es una emulsión W/O en la que una disolución acuosa de un fármaco se dispersa en una disolución de un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua.
- 15 (c) Una fase orgánica que es una emulsión O/O, que usa dos o más polímeros biocompatibles y biodegradables insolubles en agua, en la que un fármaco o una disolución del mismo se disuelve o se dispersa en una disolución de polímero que se dispersa en el/los otro(s).
- Además, la preparación de microesferas mediante el "método de secado por pulverización" se realiza usando el mismo disolvente orgánico que en el método de separación de fases mencionado anteriormente. En un disolvente orgánico se disuelve un polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua, y se disuelve o se dispersa un inhibidor de PDE4 y opcionalmente uno o más componentes adicionales, o una disolución de los mismos, en la disolución, y se pulveriza mediante una boquilla en una cámara de secado de un secador por pulverización para volatilizar el disolvente orgánico para formar microesferas.
- 20 Para la presente invención, puede usarse cualquier secador por pulverización disponible comercialmente, por ejemplo, tal como Pulvis Mini Spray GS31 (YAMATO Scientific Co., Ltd.), Mini Spray Dryer (Shibata Scientific Technology Ltd.).
- Entonces se someten las microesferas resultantes a un tratamiento final de una manera similar a la usada en el método de secado en agua para proporcionar la preparación de microesferas deseada.
- 30 Los ejemplos de disolventes orgánicos miscibles con agua que pueden usarse en el "método de difusión de disolvente" incluyen acetona, metanol, etanol o una mezcla de los mismos, que puede contener además un disolvente volátil (cloruro de metileno, cloroformo) en el que puede disolverse un fármaco, si es necesario. Los ejemplos de agente protector coloidal incluyen poli(alcohol vinílico).
- Cuando la preparación de microesferas de la presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, que comprende un inhibidor de PDE4 como principio activo, se administra a la proximidad de una región afectada (especialmente, en el cartílago articular), preferiblemente puede aplicarse localmente, más preferiblemente, en el cartílago articular como inyección o implante.
- 35 Una preparación de microesferas inyectable puede prepararse dispersando/suspendiendo microesferas obtenidas mediante la presente invención a una concentración de 0,0001-1000 mg/ml, preferiblemente de 0,0005-800 mg/ml, más preferiblemente de 0,001-500 mg/ml en una disolución acuosa que contiene un dispersante.
- 40 Los ejemplos de dispersante incluyen tensioactivos no iónicos tales como éster de ácido graso de polioxietilensorbitano (Tween 80, Tween 60, Nikko Chemicals Co., Ltd.), aceite de ricino de polietileno (HCO-60, HCO-50, Nikko Chemicals Co., Ltd.), dispersantes derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica, alginato de sodio, dextrano, hialuronato de sodio, y similares. Estos dispersantes pueden servir para mejorar la dispersibilidad de las microesferas y estabilizar la elución de un principio activo. Un dispersante puede añadirse generalmente a una composición a una concentración del 0,01-2% en peso, preferiblemente del 0,05-1% en peso.
- 45 La preparación inyectable anterior puede contener opcionalmente un conservante (metilparabeno, propilparabeno, alcohol bencílico, clorobutanol, ácido sórbico, ácido bórico, aminoácido, polietilenglicol, etc.), un agente isotónico (cloruro de sodio, glicerina, sorbitol, glucosa, manitol, etc.), un modificador del pH (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido carbónico, ácido acético, arginina, lisina, etc.), un tampón (hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, etc.) o similares.
- 50 Si es necesario, puede disolverse o dispersarse un analgésico antiinflamatorio esteroideo o un analgésico antiinflamatorio no esteroideo en la preparación inyectable. Los ejemplos de analgésico antiinflamatorio esteroideo incluyen dexametasona, triamcinolona, triamcinolona acetónido, halopredona, parametasona, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, y similares. Los ejemplos de analgésico antiinflamatorio no

esteroideo incluyen ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, naproxeno, piroxicam y similares.

Además de la suspensión mencionada anteriormente, la inyección de microesferas que contiene inhibidor de PDE4 puede estar en forma de un kit para preparar una preparación inyectable en el momento de su uso, kit que comprende una preparación sólida de un inhibidor de la agregación y microesferas, un dispersante y agua destilada inyectable.

La preparación sólida usada en un kit puede prepararse suspendiendo microesferas en una disolución acuosa que contiene un inhibidor de la agregación, y sometiendo la suspensión a liofilización, secado a vacío, secado por pulverización y/o similares. Se prefiere especialmente la liofilización.

Cuando se prepara una preparación sólida, puede añadirse un dispersante a una disolución acuosa que contiene inhibidor de la agregación (manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, xilitol, maltosa, galactosa, sacarosa, etc.) con el fin de mejorar la redispersibilidad en agua destilada inyectable, proporcionando así una preparación sólida con buena dispersibilidad. Si es necesario, puede formularse en un kit para preparar una preparación inyectable, en la que se combinan un analgésico antiinflamatorio esteroideo y/o un analgésico antiinflamatorio no esteroideo así como un dispersante.

La presente composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos, que comprende un inhibidor de PDE4 como principio activo, puede usarse en el tratamiento de diversos mamíferos de sangre caliente tales como ser humano, un animal doméstico (un caballo, un toro, una oveja, un cerdo), una mascota (un perro, un gato) y similares. La composición para el tratamiento regenerativo de enfermedad de los cartílagos puede usarse en el tratamiento regenerativo de las enfermedades de los cartílagos incluyendo osteoartritis, condrodistrofia, discopatía degenerativa, lesión de menisco, y usarse preferiblemente en el tratamiento regenerativo de osteoartritis.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos experimentales, ejemplos y ejemplos de prueba se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención. A lo largo de los siguientes ejemplos, un compuesto con un número dado es el mismo compuesto indicado con el mismo número en la lista anterior que muestra ejemplos específicos de compuestos preferidos con estructura química.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Aumento de la producción de matriz de condrocitos articulares

Compuestos de prueba	
Compuesto (1)	(10^{-5} M o 10^{-4} M);
Compuesto (2)	(10^{-6} M o 10^{-5} M);
Compuesto (9)	(10^{-6} M o 10^{-5} M);
Compuesto (11)	(10^{-6} M);
Compuesto (21)	(10^{-6} M o 10^{-5} M);
Compuesto (27)	(10^{-6} M o 10^{-5} M);
Compuesto (44)	(10^{-5} M o 10^{-4} M);

(Aislamiento y mantenimiento de condrocitos articulares)

Se sacrificaron cuatro conejos de la línea NZW (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 4 semanas de edad) mediante sangrado con anestesia con éter y se extirparon asépticamente articulaciones de rodilla de fémur. Se almacenaron las articulaciones de rodilla extirpadas en tampón fosfato (pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2% y sólo se raspó la capa cortical de la articulación de rodilla con un bisturí en un tubo de 50 ml que contenía tampón fosfato (pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2%. Se cortó la capa cortical de articulación de rodilla extirpada en secciones lo más pequeñas posibles en una placa con una cuchilla y se agitó a 37°C durante 15 minutos en tampón fosfato que contenía glucosa al 0,2%, suministrado con 10 x tripsina – sal de ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA)-4 Na (GIBCO; n.º de cat. 15400-054) (50 ml, con 100 mg de tripsina y 40 mg de EDTA-4Na; pH 7,2). Tras agitar, se centrifugó la muestra (1.400 rpm) para recoger los precipitados, y se lavaron los precipitados dos veces con 40 ml de tampón fosfato que contenía glucosa al 0,2%. Se combinaron los precipitados lavados con 40 ml de medio esencial mínimo α libre de suero (MEM: GIBCO; n.º de cat. 12571-063) que contenía 60 mg de colagenasa para la difusión celular (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 034-10533) y se transfirieron a un vaso de precipitados de 100 ml que contenía una barra de agitación esterilizada. Con agitación con la barra de agitación, se llevó a cabo la digestión con colagenasa durante aproximadamente 1 hora en una incubadora de CO₂ a 37°C. Se retiraron fragmentos de cartílago de las células tratadas con colagenasa usando un tamiz celular de 40 μ M ([FALCON; n.º de cat. 2340]). A las células tratadas residuales se les añadieron 10 ml de medio α -MEM que contenía suero de ternero fetal al 10% (FCS), y se centrifugaron (1.400 rpm). Se lavaron los precipitados con medio α MEM con FCS al 10% dos veces, se suspendieron en un volumen apropiado del mismo medio y se sembró la suspensión resultante en placas (48 pocillos) recubiertas con colágeno tipo II (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 033-13901) a 20.000 células/pocillo. Al día siguiente, se substituyó el medio por medio α MEM con FCS al 10%.

(Aumento de la producción de matriz)

5 Cuando las células alcanzaron la confluencia tras el procedimiento de cambio de medio anterior, se sustituyó el medio para el grupo de prueba por medio que contenía compuesto de prueba (incluyendo dimetilsulfóxido al 0,1% como vehículo). Como medio al que se le añadió un compuesto de prueba, se usó medio α MEM con FCS al 10% que contenía ácido ascórbico 0,2 mM. El día en el que se añadió el medio que contenía compuesto de prueba por primera vez se definió como "día 1". Se realizó de nuevo el cambio de medio por el mismo medio en el día 3 y se continuó el cultivo hasta el día 5. En cuanto al grupo control, se cambió el medio en el mismo momento usando el mismo medio que el grupo de prueba excepto porque estaba libre de compuesto de prueba (sólo contenía vehículo), y se llevó a cabo el cultivo de la siguiente manera. Tras completarse el cultivo, se retiró el sobrenadante del medio de cultivo. Se fijaron las células mediante adición de 0,25 ml de tampón neutro que contenía paraformaldehído al 4% e incubación durante 2 horas. Se lavaron las células tres veces con 1 ml de tampón fosfato (pH 7,2) y después se tiñeron durante 4 horas con azul Alcian 8GX al 0,1% (Sigma; A3157) disuelto en ácido clorhídrico 0,1 M, azul Alcian que tiñe selectivamente proteoglicano de matriz de cartilago. Tras la tinción, se lavaron las células 3 veces con 1 ml de tampón fosfato (pH 7,2). Se disolvió azul Alcian que había teñido la matriz de cartilago con 0,25 ml de disolución acuosa de clorhidrato de guanidina 6 M y se usó una porción de la disolución para determinar la absorbancia a 620 nm. Se calcularon las cantidades de azul Alcian usado para teñir a partir de la absorbancia, lo que a su vez se usó para la estimación de la cantidad de matriz (proteoglicano). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Compuesto de prueba	Concentración (M)	Producción de proteoglicano (%)
Vehículo	-	100
Compuesto (1)	1×10^{-5}	133
	1×10^{-4}	144
Compuesto (2)	1×10^{-6}	125
	1×10^{-5}	128
Compuesto (9)	1×10^{-6}	128
	1×10^{-5}	138
Compuesto (11)	1×10^{-6}	112
	1×10^{-5}	115
Compuesto (21)	1×10^{-6}	120
	1×10^{-5}	129
Compuesto (27)	1×10^{-6}	131
	1×10^{-5}	125
Compuesto (44)	1×10^{-5}	125
	1×10^{-4}	116

20 Tal como se muestra en la tabla 1 anterior, se demostró que todos los compuestos de prueba (compuestos (1), (2), (9), (11), (21), (27) y (44)) que tenían actividad inhibitoria de PDE4 ejercían una actividad promotora de la producción de matriz.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Fraccionamiento de PDE que hidroliza cAMP expresado en cartilago articular

25 Se sacrificaron cuatro conejos de la línea NZW (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 4 semanas de edad) mediante sangrado con anestesia con éter y se extirparon asépticamente articulaciones de rodilla de fémur. Se almacenaron las articulaciones de rodilla extirpadas en tampón fosfato (pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2% y sólo se raspó la capa cortical de la porción de articulación de rodilla con un bisturí en un tubo de 50 ml que contenía tampón fosfato (pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2%. Se cortó la capa cortical de articulación de rodilla extirpada en secciones lo más pequeñas posible en una placa con una cuchilla, se lavaron con tampón fosfato enfriado con hielo y se homogeneizaron con un homogeneizador (Polytron: Kinematica A.G.) en tampón de homogenización (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM, cloruro de calcio 0,3 mM, ditioneitol 1 mM, leupeptina 40 μ M, benzamidina 1,3 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM y azida de sodio 1 mM). Se centrifugó el homogeneizado resultante (100.000 x g, 60 minutos) para separar el sobrenadante.

30 Se sometió el sobrenadante a columna de alto rendimiento de Mono Q Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con un tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, cloruro de calcio 1 mM, ditioneitol 1 mM, leupeptina 2 μ M, benzamidina 5 mM). Tras lavar la columna con 20 ml de tampón de elución, se eluyeron las proteínas en fracciones de 1 ml mediante un gradiente de cloruro de sodio con enfriamiento con hielo. Se sometió cada fracción a la determinación de la actividad de hidrólisis de cAMP (actividad de PDE) sobre un sustrato.

35 Se realizó la determinación de la actividad de PDE mediante un ensayo de ácido nucleico radiomarcado. Es decir, se inició la reacción añadiendo desde 10 hasta 30 μ l de fracción de elución a 500 μ l de tampón de ensayo [Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, cloruro de magnesio 5 mM, 2-mercaptoetanol 4 mM, albúmina bovina fetal 0,33 mg/ml (libre de ácidos grasos, Sigma), ácido etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético 1 mM] que contenía 1 μ M de cAMP no marcado y 22 μ M de [3 H]-cAMP (Amersham Pharmacia Biotech). Para el grupo control no se añadió ningún fármaco mientras que para el grupo de prueba se añadió compuesto (44) a una concentración final de 1×10^{-5} M. Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos, se extinguió la reacción mediante ebullición durante

1,5 minutos. Después se añadieron 100 µl de veneno de serpiente *Crotalus atrox* 1 mg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la adición de 500 µl de metanol, se sometió la mezcla de reacción a una columna Dowex (1 x 8 - 400). A cada eluato se le añadió un cóctel de centelleo líquido y se midió la radiactividad. Los resultados se muestran en la figura 1.

5 La figura 1 muestra que hay cuatro picos que muestran una fuerte actividad de hidrólisis de cAMP. Estos cuatro picos cumplen con las características de: (1) tener actividad hidrolítica selectiva para cAMP; (2) estar dicha actividad de hidrólisis de cAMP libre de la influencia de cGMP; y (3) inhibirse fuertemente dicha actividad por el compuesto (44) que es un inhibidor de PDE4 selectivo, y por tanto se considera que son picos relacionados con PDE4. Se notificó que PDE4 incluía cuatro subtipos, es decir, PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D (Saldou *et al.*, Cellular Signaling, vol. 10, 427-440, 1998), y se supuso que esos cuatro picos eran tales subtipos o variantes de corte y empalme originadas a partir de los mismos.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Expresión de un gen que codifica para proteína de matriz de cartílago

15 Se extrajo ARN total con ISOGEN (Nippon Gene Co., Ltd.) a partir de condrocitos articulares de rodilla de conejo cultivados durante 4 días según la misma manera que en el ejemplo experimental 1 en presencia de compuesto (1) a una concentración final de 1×10^{-4} M o 1×10^{-5} M, y se disolvieron 15 µg del ARN total en 4,5 µl de agua esterilizada. Se combinó esta disolución con 2 µl de 5 x tampón MOPS, 3,5 µl de formaldehído y 10 µl de formamida, y se desnaturalizó a 90°C durante 15 minutos. Entonces se sometió la mezcla a electroforesis sobre gel de agarosa al 1% en presencia de formaldehído. Tras completarse la electroforesis, se transfirió ARN a una membrana de nailon (Amersham Pharmacia Biotech) durante la noche mediante un método capilar. Se fijó el ARN a la membrana de nailon mediante reticulación por UV y se sometió a hibridación previa a 60°C durante 2 horas en 50 ml de disolución de hibridación (6 x SSC, 5 x disolución de Denhart, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor 100 µg/ml, libre de formamida al 50%).

20 Después se radiomarcaron respectivamente sondas de ADN de gen de colágeno tipo II de ratón y gen de agregano humano (proteína típica que consiste en proteoglicano) con α -[³²P]dCTP usando el kit de marcaje de cebadores al azar ver.2 (Amersham Pharmacia Biotech). Se añadieron cada sonda (1×10^8 dpm) y 5 ml de disolución de hibridación a una membrana de nailon previamente hibridada y se selló, y se dejó hibridar a 60°C durante la noche. Se lavó la membrana de nailon con una disolución que contenía 0,2 x SSC y dodecilsulfato de sodio al 0,2% a 60°C durante 40 minutos tres veces. Se sometió la membrana de nailon a una autorradiografía y se expuso a película de rayos X usando un instrumento LAS-1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd.). Se midió una cantidad relativa de cada ARN usando Image Gause (Fuji Photo Film Co., Ltd.) y se corrigió con ARN 28S (ARN interno: control interno). Se calculó la tasa de expresión génica en el grupo de prueba suponiendo que en el grupo control era del 100%. Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

	Expresión de gen de colágeno tipo II (%)	Expresión de gen de agregano (%)
Control	100	100
Compuesto (1) 10^{-5} M	278	2693
Compuesto (1) 10^{-4} M	406	4262

35 Tal como se muestra en la tabla 2 anterior, en el grupo de prueba en el que se añadió un inhibidor de PDE4 (compuesto (1)), la expresión de los genes de colágeno tipo II y agregano aumentó de una manera dependiente de la dosis, lo que indicó que un inhibidor de PDE4 afecta a los condrocitos articulares de modo que se aumenta la expresión génica de colágeno tipo II y agregano, que son componentes principales de la matriz de cartílago articular, y promueven así la producción de matriz de cartílago.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: Aumento de la matriz de cartílago articular de rodilla en conejo anciano

40 (Aclimatación)

Se alojaron conejos ancianos de la línea JW (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 37 semanas de edad) a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y al $50 \pm 20\%$ de humedad. Durante el periodo de alojamiento, se proporcionó a los conejos libre acceso a alimento disponible comercialmente (Oriental Bio; CE-2).

(Aumento de la producción de matriz de cartílago articular)

45 Se anestesiaron los conejos mediante una inyección intravenosa de Nembutal (Dainabot Co., Ltd.; 50 mg/kg/ml) en una vena de la oreja. Se afeitó la porción de cartílago articular de la rodilla izquierda y se esterilizó con etanol acuoso al 70%. Para los grupos de prueba, se inyectaron por vía intraarticular 250 µl de la dispersión de microesferas que contenía compuesto de prueba (contenido en fármaco: 2,5 mg) preparada en el ejemplo 2-(3) con una aguja de calibre 18 (Terumo Corporation). Para el grupo control, se inyectaron por vía intraarticular 250 µl de dispersión de microesferas libre de compuesto de prueba preparada en el ejemplo de control 1-(2). A los 14 días tras la administración, se sacrificaron los conejos mediante hemorragia con anestesia con Nembutal. Se aislaron las

articulaciones de rodilla, se fijaron en tampón neutro que contenía formaldehído al 10% y se descalcificaron con disolución acuosa de EDTA-4Na 0,5 M para obtener secciones. Se tiñeron las secciones con ácido clorhídrico 0,1 M que contenía azul Alcian 8GX al 0,10% (Sigma; A3157) que tiñe selectivamente matriz de cartílago (proteoglicano) y se comparó mediante microscopio la capacidad de tinción entre los grupos de prueba y control. Como resultado, el grosor de la capa de matriz (proteoglicano) que se tiñó con azul Alcian fue más de tres veces en los grupos de prueba en comparación con los grupos control.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 5: Regeneración de matriz de cartílago articular de rodilla en conejo anciano

(Aclimatación)

Se alojaron conejos ancianos de la línea JW (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 37 semanas de edad) a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y al $50 \pm 20\%$ de humedad en una jaula para conejos (tipo C: W370 x D520 x H330). Durante el periodo de alojamiento, se proporcionó a los conejos libre acceso a alimento disponible comercialmente (Oriental Bio; CE-2).

(Regeneración de cartílago articular)

Se anestesiaron los conejos mediante una inyección intravenosa de Nembutal (Abbott Laboratories; 50 mg/kg/ml) en una vena de la oreja. Se afeitó la porción de cartílago articular de rodilla izquierda y se esterilizó con etanol acuoso al 70%. Se realizó una incisión en el ligamento mediano de la rodilla izquierda para exponer el menisco y la cabeza del fémur, y se detuvo la hemorragia del tejido circundante con algodón esterilizado. Se perforó un orificio (2 mm de diámetro y 3 mm de profundidad) en el hueco en el centro de la cabeza femoral (porción sin carga) con un taladro (TOYO Associates LTD.: Mr. Meister). Se lavó el orificio con solución salina esterilizada para retirar desechos de hueso etc. generados durante la perforación. Se cosieron la cápsula articular y el ligamento mediano con hilo de seda y se realizaron hemostasia y desinfección con algodón esterilizado. Nueve días después, para los grupos de prueba, se inyectaron por vía intraarticular 250 μl de la dispersión de microesferas que contenía compuesto de prueba (contenido en fármaco: 2,5 mg) preparada en el ejemplo 2-(3) con una aguja de calibre 18 (Terumo Corporation). Para el grupo control, se inyectaron por vía intraarticular 250 μl de dispersión de microesferas libre de compuesto de prueba preparada en el ejemplo de control 1-(2). Se sacrificaron los conejos 14 días tras la administración mediante hemorragia con anestesia con Nembutal. Se aislaron las articulaciones de rodilla, se fijaron en tampón neutro que contenía formaldehído al 10% y se descalcificaron con disolución acuosa EDTA-4Na 0,5 M para obtener secciones. Se observó mediante microscopio el grado de regeneración en el orificio. Los resultados se muestran en la figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, se confirmó claramente una regeneración avanzada del orificio en los grupos de prueba en comparación con el grupo control.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 6: Efectos de cura regenerativa sobre gonartrosis inducida por papaína

(Aclimatación)

Se alojaron conejos blancos japoneses (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 13 semanas de edad) durante 8 días a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y al $50 \pm 20\%$ de humedad. Durante el periodo de alojamiento, se alimentaron los conejos con alimento disponible comercialmente (RC4, Oriental Yeast, Co., Ltd.) a una tasa de aproximadamente 140 g/día.

(Efecto de cura regenerativa)

Se anestesiaron los conejos mediante una inyección intravenosa de Nembutal (Abbott Laboratories; lote 791102) en una vena de la oreja. Se afeitaron ambas porciones de rodilla y se esterilizaron con etanol acuoso al 70%. Los conejos recibieron inyecciones de 0,5 ml de solución salina acuosa que contenía papaína al 0,8% (Merck EC 3.4.22.2 lote 587644 019) dos veces en ambas articulaciones de rodilla a un intervalo de cinco días. Una semana tras la segunda inyección, para el grupo de prueba, se inyectó por vía intraarticular la dispersión de microesferas preparada en el ejemplo 2-(3) (que contenía 0,2 ó 2 mg de compuesto (1)) (rodilla izquierda; 4-6 conejos/ grupo). Para el grupo control, se inyectó por vía intraarticular dispersión de microesferas libre de compuesto preparada en el ejemplo de control 1-(2) (rodilla derecha; 4-6 conejos/grupo) en la misma cantidad que la dispersión usada en el grupo de prueba. Además, para el grupo tratado con Artz, se inyectaron por vía intraarticular 0,3 ml de disolución acuosa de sal de sodio de ácido hialurónico al 1% (Artz, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) (rodilla izquierda; 2 conejos por grupo). Para el grupo no tratado con Artz, se inyectaron por vía intraarticular 0,3 ml de solución salina (rodilla derecha; 2 conejos por grupo). Tanto al grupo tratado con Artz como no tratado con Artz, se realizó la misma inyección intraarticular que anteriormente de manera semanal cuatro veces en total. Cuatro semanas tras la última inyección, se sacrificaron los conejos mediante hemorragia con anestesia con éter, se aislaron las articulaciones de rodilla y se fijaron en tampón neutro que contenía formaldehído al 10%. Como resultado, se observó que el tratamiento con papaína provocó una degeneración de cartílago articular caracterizada por la irregularidad de la superficie de cartílago articular, reducción de la capacidad de tinción de hematoxilina y eosina, fibrosis de matriz de cartílago y desaparición de condrocitos articulares. Aunque se observó una ligera inhibición de la disminución de capacidad de tinción de hematoxilina y eosina en el grupo tratado con Artz, no pudieron confirmarse efectos regeneradores notables. Por otro lado, en el grupo de prueba, en el que se administraron microesferas que contenían compuesto (1), se mostró una gran mejora de los síntomas patológicos mencionados anteriormente. En el

grupo control o el grupo no tratado con Artz, no se observaron efectos de recuperación en absoluto.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 7: Fraccionamiento de PDE de hidrólisis de cAMP expresado en cartílago articular humano

5 A partir de rodilla humana, se aisló cartílago articular mediante cirugía de pacientes con osteoartritis. Se raspó la porción de cartílago con un bisturí, se lavó con tampón fosfato enfriado con hielo y se almacenó a -80°C. Se molieron los tejidos de cartílago a 80°C y después se dispersaron en fragmentos con un homogeneizador (Kinematica A.G., Polytron) en tampón de homogenización enfriado con hielo (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ácido etilenglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético 1 mM, ditioneitol 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, benzamidina 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM, azida de sodio 1 mM y mercaptoetanol 5 mM). Se centrifugó el
10 homogeneizado resultante (100.000 x g; 30 minutos) para separar el sobrenadante.

Se cargó el sobrenadante anterior en una columna de alto rendimiento de Mono Q Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con tampón de elución (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ácido etilenglicol-bis(β-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético 1 mM, ditioneitol 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, benzamidina 5 mM). Tras lavar la columna con 20 ml de tampón de elución, se eluyeron las proteínas en fracciones de 1 ml mediante disolución acuosa de cloruro de sodio (gradiente de concentración: de 0 a 1000 mM, 70 ml) con enfriamiento con hielo. Se sometió cada fracción a la determinación de la actividad hidrolítica (actividad de PDE) frente a cAMP y cGMP como sustrato.
15

Se realizó la determinación de la actividad de PDE mediante un ensayo de ácido nucleico radiomarcado. Es decir, se inició la reacción añadiendo desde 10 hasta 50 µl de fracción de elución a 500 µl de tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, cloruro de magnesio 5 mM, 2-mercaptoetanol 4 mM) que contenía 1 µM de cAMP sin marcar y 22 nM de [³H]-cAMP (Amersham Pharmacia Biotech).
20

Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos, se extinguió la reacción mediante ebullición durante 1,5 minutos. Después se añadieron 100 µl de veneno de serpiente *Crotalus atrox* 1 mg/ml y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la adición de 500 µl de metanol, se sometió la disolución de reacción a columna Dowex (1 x 8 - 400). A cada eluato se le añadió un cóctel de centelleo líquido y se midió la radioactividad. Los resultados se muestran en la figura 3.
25

Tal como se muestra en la figura 3, se reveló que, en una disolución de muestra preparada tratando cartílago humano derivado de un paciente con osteoartritis, no existía ninguna fracción que tuviera actividad de hidrólisis de cGMP, mientras que sí existían fracciones con potente actividad de hidrólisis de cAMP.

30 Se midió la actividad inhibitoria de inhibidor de PDE4 en las fracciones n.ºs 28-30 que contenían potente actividad de hidrólisis de cAMP según el ensayo de ácido nucleico radiomarcado mencionado anteriormente. Los compuestos de prueba son compuesto (1), compuesto (2), compuesto (11), compuesto (44) y compuesto (27).

Como resultado de los experimentos, se confirmó que el compuesto (1) y el compuesto (2), en particular el compuesto (2), inhiben fuertemente la actividad hidrolítica de la fracción. Además, la CI₅₀ del compuesto (1) y del compuesto (2) para la(s) fracción(es) que se midió según un método descrito en Journal of Medicinal Chemistry, vol. 42, 1088-1099 (1999), coincidió con la CI₅₀ de la actividad de inhibición de PDE4 descrita en la misma bibliografía. Los resultados se muestran en la figura 4.
35

EJEMPLO EXPERIMENTAL 8: Aumento de cAMP intracelular en condrocitos articulares humanos

(Aislamiento de condrocitos articulares)

40 Se empapó cartílago articular humano (cartílago articular de paciente con coxalgia degenerativa) en tampón fosfato (pH 7,2) y sólo se raspó la capa cortical de la porción de articulación con un bisturí en un tubo de 50 ml que contenía el mismo tampón. Se cortó la capa cortical de articulación de rodilla extirpada en secciones lo más pequeñas posible en una placa con una cuchilla y se transfirieron a un tubo de centrifuga.

45 Al tubo de centrifuga se le añadió tampón fosfato (pH 7,2) que contenía 1 mg/ml de hialuronidasa (SIGMA; n.º de cat. H-3506) y se agitó a 37°C durante 15 minutos. Se separaron los precipitados mediante centrifugación (2.000 rpm, 5 minutos) y se añadieron a solución salina equilibrada de Hank (GIBCO; n.º de cat. 15050-065) que contenía tripsina al 0,25% y se agitaron a 37°C durante 30 minutos.

Tras la separación de precipitados mediante centrifugación (2.000 rpm, 5 minutos), se añadieron medio esencial mínimo α (GIBCO; n.º de cat. 12571-063) que contenía colagenasa al 0,25% para la difusión celular (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 034-10533) y suero de ternero fetal al 10% (GIBCO; n.º de cat. 10099-141) a los precipitados y se agitaron a 37°C durante la noche.
50

Se retiraron fragmentos de cartílago usando un tamiz celular de 40 µm (FALCON; n.º de cat. 2340), y se añadió medio esencial mínimo α que contenía suero de ternero fetal al 10% a las células tratadas con colagenasa y se centrifugaron (1.400 rpm, 10 minutos).

5 Se lavaron los precipitados tres veces con medio esencial mínimo α que contenía suero de ternero fetal al 10% y se suspendieron en el mismo medio hasta un volumen apropiado y se sembraron en placas de 48 pocillos (50.000 células/pocillo). Al día siguiente, se sustituyó el medio por medio esencial mínimo α que contenía suero de ternero fetal al 10%. El medio esencial mínimo α usado contenía antibióticos (penicilina G 100 U/ml y sulfato de estreptomicina 100 mg/ml) y un agente antifúngico (anfotericina B 0,25 μ g/ml) (GIBCO; n.º de cat. 15240-062).

(Aumento de la concentración de cAMP intracelular)

10 Cuando las células alcanzaron la confluencia tras el procedimiento de cambio de medio anterior, se sustituyó el medio para el grupo de prueba por medio esencial mínimo α que contenía suero de ternero fetal al 10% (que incluía dimetilsulfóxido al 0,1%) suministrado con PGE₂ 1 μ M (SIGMA, n.º de cat. P-0409) y compuesto de prueba 10⁻⁶ M o 10⁻⁵ M. En cuanto al grupo control, se sustituyó el medio por medio esencial mínimo α (que incluía dimetilsulfóxido al 0,1%) que contenía suero de ternero fetal al 10% suministrado con PGE₂ 1 μ M (SIGMA, n.º de cat. P-0409).

15 Tras 30 minutos de cultivo, se descartó el medio. Se lavó el cultivo resultante con tampón fosfato (pH 7,2) y se trató con etanol al 50% durante 30 minutos. Se recogió el etanol y se evaporó el extracto de etanol hasta sequedad. Se disolvió el residuo en un tampón de ensayo adjunto a un sistema EIA de cAMP (Amersham Pharmacia Biotech; n.º de cat. RPN225) y se midió la concentración de cAMP con dicho sistema. Los resultados se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

Compuesto de prueba	Concentración	PGE ₂ (1 μ M)	Producción de cAMP (picomol/pocillo)
Vehículo	0	+	0,4
Compuesto (2)	1 x 10 ⁻⁶	+	13,8
	1 x 10 ⁻⁵	+	23,2
Compuesto (11)	1 x 10 ⁻⁵	+	10,6

EJEMPLO EXPERIMENTAL 9: Producción de matriz de condrocitos articulares de conejo en presencia de IL-1

20 Se sacrificaron cuatro conejos de la línea NZW (Kitayama Labes., Co Ltd.; machos; 4 semanas de edad) mediante hemorragia con anestesia con éter y se extirparon asépticamente articulaciones de rodilla del lado del fémur. Sólo se raspó la capa cortical con un bisturí en tampón fosfato (pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2% y después se colocó en un tubo de 50 ml que contenía solución salina tamponada con fosfato que contenía glucosa al 0,2%. Se cortó la capa cortical de articulación de rodilla extirpada en secciones lo más pequeñas posible en una placa con una cuchilla, se combinó con 50 ml de tampón fosfato (100 mg de tripsina, 40 mg de EDTA-4 Na; pH 7,2) que contenía glucosa al 0,2%, suministrado con 10 x tripsina-sal de tetrasodio de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA-4Na; GIBCO; n.º de cat. 15400-054) y se agitó a 37°C durante 15 minutos.

25 Tras la agitación, se recogieron los precipitados mediante centrifugación (1.400 rpm) y se lavaron dos veces con 40 ml de tampón fosfato (pH 7,2) con glucosa al 0,2%.

30 A los precipitados lavados se les añadieron 40 ml de medio esencial mínimo α (MEM: GIBCO; n.º de cat. 12571-063) que contenía 60 mg de colagenasa para la difusión celular (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 034-10533) y antibióticos (penicilina G 200 U/ml y sulfato de estreptomicina 200 μ g/ml) (GIBCO; n.º de cat. 15140-122), y se transfirió la mezcla a un vaso de precipitados de 100 ml que contenía una barra de agitación esterilizada.

35 Se realizó la incubación en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 30 minutos con agitación con una barra de agitación. Entonces se añadió desoxirribonucleasa I (Takara Shuzo Co., LTD.; n.º de cat. 2210A) a una concentración de 70 U/ml. Se realizó el cultivo en las mismas condiciones durante otros 30 minutos. Se recogió el sobrenadante del cultivo en otro recipiente y entonces se cultivaron de nuevo fragmentos de cartílago restantes durante aproximadamente 30 minutos en medio esencial mínimo α recién preparado que contenía 60 mg de colagenasa y desoxirribonucleasa I 70 U/ml.

40 Al sobrenadante de cultivo anteriormente recogido y al último cultivo, del que se habían retirado fragmentos de cartílago usando un tamiz celular de 40 μ m (FALCON; n.º de cat. 2340), se les añadieron 10 ml de medio esencial mínimo α (MEM: GIBCO; n.º de cat. 12571-063) que contenía suero de ternero fetal al 10% (GIBCO n.º de cat. 10099-141) y antibióticos (penicilina G 200 U/ml y sulfato de estreptomicina 200 μ g/ml) (GIBCO; n.º de cat. 15140-122) y se centrifugaron (1.400 rpm, 10 minutos).

45 Se lavaron los precipitados dos veces con medio esencial mínimo α que contenía suero de ternero fetal al 10% y antibióticos, se suspendieron con un volumen apropiado del mismo medio, y se sembraron en placas de 48 pocillos (20.000 células/pocillo). Al día siguiente, se sustituyó el medio por el mismo medio.

(Aumento de la producción de matriz)

Tras los procedimientos de cambio de medio anteriores, cuando las células alcanzaron la confluencia, se sustituyó el medio del grupo de prueba por un medio (que incluía dimetilsulfóxido al 0,1%) suministrado con IL-1 β humana

recombinante 1 ng/ml (PEPRO TECH; n.º de cat. 200-01B) y un compuesto de prueba. Como medio, se usó medio esencial mínimo α que contenía suero bovino fetal y antibióticos (citado anteriormente), y también ácido ascórbico 0,2 mM. Por otro lado, en el grupo control, se sustituyó el medio por el mismo medio que el grupo de prueba excepto porque no se añadió un compuesto de prueba.

5 El día en el que se añadió el medio que contenía IL-1 β se definió como "día 1" y se continuó el cultivo hasta el día 3.

Tras el cultivo, se retiró el sobrenadante del cultivo y se fijaron las células mediante adición de 0,25 ml de disolución de formalina con tampón neutro al 10% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., n.º de cat. 060-01667).

10 Se lavaron las células fijadas tres veces con 1 ml de tampón fosfato (pH 7,2) y se tiñeron durante 4 horas con azul Alcian 8GX al 0,1% (Sigma; A3157) disuelto en ácido clorhídrico 0,1 M, azul Alcian que tiñe selectivamente la matriz (proteoglicano).

15 Tras la tinción, se lavaron las células 3 veces con 1 ml de tampón fosfato (pH 7,2). Se disolvió azul Alcian que había teñido la matriz de cartílago con 0,25 ml de disolución acuosa de clorhidrato de guanidina 6 M y se usó una porción para determinar la absorbancia 620 nm. Se calculó la cantidad de azul Alcian usada para la tinción a partir de la absorbancia, que a su vez se usó para la estimación de la cantidad de matriz (proteoglicano). Se calculó el porcentaje relativo suponiendo que la producción de proteoglicano en el grupo control, en el que no se añadió un compuesto de prueba, era del 100%. Los resultados se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Compuesto de prueba	Concentración (M)	IL-1 β (1 ng/ml)	Producción de proteoglicano (%)
Vehículo	0	+	100
Compuesto (2)	1 x 10 ⁻⁶	+	143
Compuesto n.º 53	1 x 10 ⁻⁶	+	211
Compuesto n.º 56	1 x 10 ⁻⁶	+	168
Compuesto n.º 52	1 x 10 ⁻⁶	+	209
Compuesto n.º 57	1 x 10 ⁻⁶	+	169
Compuesto (11)	1 x 10 ⁻⁶	+	121

20 Tal como se muestra en la tabla 4 anterior, en presencia de IL-1, el compuesto de prueba que tiene actividad inhibidora de PDE4 aumentó la producción de matriz. Se piensa que IL-1 desempeña un papel importante en la degradación de la matriz de cartílago, dado que IL-1 se expresa en líquido sinovial y células de cartílago de pacientes con osteoartritis, e induce la producción y la síntesis de metaloproteinasa de matriz (MMP), que es una enzima catabólica de la matriz (tal como matriz de cartílago, proteoglicano) (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 277, págs. 1672-1675, 1966; Journal of Biochemistry, vol. 123, págs. 431-439, 1998; Arthritis & Rheumatism, vol. 44, págs. 585-594, 2001). Por tanto, los resultados descritos anteriormente sugirieron que un inhibidor de PDE4, que es un principio activo de la presente invención, tiene actividad inhibidora frente a degradación de la matriz de cartílago relacionada con IL-1.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 10: Efectos de curación regenerativa sobre gonartrosis inducida por escisión parcial del menisco medio / abscisión de ligamentos colaterales bilaterales

(Aclimatación)

30 Se alojaron conejos blancos japoneses (machos; 10 semanas de edad; 7 conejos/grupo) durante 16 días a temperatura ambiente (23 \pm 2°C) y al 55 \pm 15% de humedad. Durante el periodo de alojamiento, se proporcionó a los conejos libre acceso a alimento disponible comercialmente (Oriental Bio Service; LRC4).

(Curación de la gonartrosis)

35 Con anestesia con éter, se escindió la articulación de rodilla derecha de cada conejo y se aisló media porción de menisco medio con tijeras rectas pequeñas con doble hoja. También se cortaron los ligamentos colaterales bilaterales. Tras la operación, se cosieron y se esterilizaron los tejidos musculares y epidérmicos. Dos semanas tras la operación, con anestesia con éter, se administraron por vía intraarticular a cada conejo del grupo de prueba (7 conejos/grupo) las microesferas que contenían fármaco preparadas en el ejemplo 7-(1), que contenían 1 μ g de compuesto (2). Los conejos del grupo control (7 conejos/grupo) recibieron la misma cantidad de microesferas libres de fármaco preparadas en el ejemplo de control 2. Seis semanas tras la operación, se administraron de nuevo las microesferas que contenían fármaco o libres de fármaco mencionadas anteriormente. Diez semanas tras la operación, con anestesia con éter, se sacrificaron los conejos mediante laparotomía mediante hemorragia y se aisló el extremo proximal de la tibia. Se trató el extremo proximal de la tibia aislado con tinta china y después se empapó en disolución de formalina con tampón neutro al 10% para la fijación.

45 (Resultados experimentales)

Tras limpiar el exceso de tinta china, se importó la imagen de superficie superior del extremo proximal de la tibia

5 fijado con formalina a un analizador, Image Analyzer (IMAGING RESEARCH, analizador de imágenes MICD), con un estereomicroscopio (OLYMPUS OPTICAL Co., Ltd. modelo SZX12-2111). Se usó este analizador para medir el área de la porción media en la que permanece tinta china (el área degenerada). También se midió el área media basta y se calculó el porcentaje (%) (la tasa de área degenerada) del área media degenerada en el área media basta. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Fármaco	Cantidad de fármaco	Tasa de área degenerada (%)
Control	0 µg	18,86 ± 2,03
Compuesto (2)	1 µg	10,16 ± 1,35

EJEMPLO 1

10 (1) A 0,1 g de compuesto (1) y 1,9 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 50:50; peso molecular promedio de 20.000; PLGA5020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se le añadieron 4,0 g de cloruro de metileno, y se agitó exhaustivamente la mezcla durante 30 minutos para formar una fase oleosa (O).

(2) Se añadió la fase oleosa a 8 ml de disolución acuosa al 0,5% de poli(alcohol vinílico) (POVAL PVA-220C: Kuraray Co., Ltd.) y se emulsionó a 25°C durante 5 minutos con homogeneizador (Polytron, Kinematica A.G.) para formar una emulsión (O/W), en la que la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa.

15 (3) Se añadió la emulsión a 1000 ml de agua destilada, se agitó a 400 rpm con un motor tres uno (Shinto Scientific Co., Ltd.) y se sometió a un método de secado en agua a 25°C durante 3 horas para eliminar el cloruro de metileno.

(4) Se filtró la suspensión de microesferas resultante a través de un filtro de 150 µm para eliminar los agregados y se filtró a presión reducida a través de un filtro de 20 µm para eliminar la fase acuosa. Se combinaron las microesferas resultantes con una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizaron para dar 1,6 g de microesferas.

20 Se disolvieron diez mg de las microesferas resultantes en 3 ml de acetonitrilo. Se combinó la disolución con 7 ml de disolución acuosa de cloruro de sodio 0,5 M, se agitó con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) y después se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante. Se cargó una porción de sobrenadante en FL-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de excitación: 315 nm, longitud de onda de fluorescencia: 465 nm) y se determinó la concentración de fármaco en el sobrenadante mediante comparación con una curva patrón preparada por separado con una disolución de fármaco. Basándose en la concentración resultante y el volumen de sobrenadante, se estimó que el contenido en fármaco en las microesferas era del 4,21%.

25 Se dispersó una cantidad adecuada de las microesferas resultantes en una disolución diluida de éster de ácido graso de polioxietilensorbitano (Tween 80: Nikko Chemicals Co., Ltd.). Se midió la distribución de partículas con un analizador de tamaño de partícula SALD-1100 (Shimadzu Corporation), y se calculó el tamaño de partícula promedio. El tamaño de partícula promedio fue de 57 µm.

30 (5) Se añadieron las microesferas obtenidas en (4) anteriormente a solución salina fisiológica (medio de dispersión) que contenía carboximetilcelulosa sódica al 0,5% (Nichirin Chemical Industries) y éster de ácido graso de polioxietilensorbitano al 0,1% (Tween 80: Nikko Chemicals Co., Ltd.) a una concentración de fármaco final de 2,5 mg/ml, y se agitó exhaustivamente la mezcla con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) para proporcionar una dispersión de microesferas.

EJEMPLO 2

40 (1) Se prepararon microesferas (1,6 g) de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(1) a (4) excepto porque se usó una mezcla de 0,57 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 50:50; peso molecular promedio de 20.000; PLGA5020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1,33 g de polímero de ácido láctico (peso molecular promedio de 20.000; PLA0020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Se midieron el contenido en fármaco y el tamaño de partícula promedio de las microesferas de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(4) y se demostró que eran del 3,70% y de 47,7 µm, respectivamente.

(2) Se trataron las microesferas obtenidas en (1) anteriormente de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(5) para dar una dispersión de microesferas (tasa de fármaco: 2,5 mg/ml).

45 (3) Se trataron las microesferas obtenidas en (1) anteriormente de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(5) para dar una dispersión de microesferas (tasa de fármaco: 10,0 mg/ml).

EJEMPLO 3

(1) Se prepararon microesferas (1,5 g) de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(1) a (4) excepto porque

se usó polímero de ácido láctico (peso molecular promedio de 20.000; PLA0020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Se midieron el contenido en fármaco y el tamaño de partícula promedio de las microesferas de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(4) y se demostró que eran del 3,73% y de 52,2 μm , respectivamente.

- 5 (2) Se trataron las microesferas obtenidas en (1) anteriormente de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(5) para dar una dispersión de microesferas (tasa de fármaco: 2,5 mg/ml).

EJEMPLO 4

- 10 (1) A 0,2 g de compuesto (1) y 0,3 g de polímero de ácido láctico (peso molecular promedio de 20.000; PLA0020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se le añadieron 1,0 g de cloruro de metileno y se agitó exhaustivamente la mezcla con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) para formar una fase oleosa (O).

(2) Se añadió la fase oleosa a 4 ml de disolución acuosa al 0,25% de metilcelulosa (METOLOSE: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) y se emulsionó a 25°C durante 5 minutos con un homogeneizador (Polytron, Kinematica A.G.) para formar una emulsión (O/W), en la que la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa.

- 15 (3) Se añadió la emulsión a 400 ml de agua destilada, se agitó a 400 rpm con un motor tres-uno (Shinto Scientific Co., Ltd.) y se sometió a un método de secado en agua a 25°C durante 3 horas para eliminar el cloruro de metileno.

- 20 (4) Se filtró la suspensión de microesferas resultante a través de un filtro de 150 μm para eliminar los agregados y se filtró a presión reducida a través de un filtro de 20 μm para eliminar la fase acuosa. Se combinaron las microesferas resultantes con una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizaron para dar microesferas. Se midieron el contenido en fármaco y el tamaño de partícula promedio de las microesferas de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(4) y se demostró que eran del 39,6% y de 33,4 μm , respectivamente.

EJEMPLO 5

- 25 (1) A 0,05 g de compuesto (1) y 0,45 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 50:50; peso molecular promedio de 20.000; R202H: Boehringer Ingelheim Co., Ltd.) se le añadió 1,0 g de cloruro de metileno y se agitó exhaustivamente la mezcla con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) para formar una fase oleosa (O).

(2) Se añadió la fase oleosa a 40 ml de disolución acuosa al 0,5% de poli(alcohol vinílico) (GOHSENOL EG-40: The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.) y se emulsionó a 25°C durante 4 minutos con un homogeneizador (Polytron, Kinematica A.G.) para formar una emulsión (O/W), en la que la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa.

- 30 (3) Se vertió la emulsión en un recipiente hermético cilíndrico (diámetro interno: 110 mm; volumen 1.000 ml) que contenía 400 ml de agua purificada y se eliminó el cloruro de metileno del recipiente mediante agitación a 25°C y 400 rpm usando una hélice de 4 palas (diámetro: 50 mm, hélice de tipo R: HEIDON) equipada con un motor tres-uno (BL-600; HEIDON) mientras que se suministraba gas nitrógeno a las fibras huecas del módulo de membrana de fibras huecas de tipo cilindro compuesto por caucho de silicona (NAGAYANAGI Co., Ltd.) insertado en el recipiente (la velocidad de flujo de gas es de 2 l/minuto). Se realizó este procedimiento durante 1 hora.

35 El módulo de membrana de fibras huecas cilíndricas compuesto por caucho de silicona usado en este procedimiento es NAGASEP M60-1800 de tipo cilindro de la siguiente especificación.

Diámetro del cilindro	: 100 mm
Longitud del cilindro	: 120 mm x 120 mm
Grosor de membrana de la membrana de fibras huecas	: 60 μm
Diámetro interno de la membrana de fibras huecas	: 200 μm
Diámetro externo de la membrana de fibras huecas	: 320 μm
Número de fibras huecas	: 1800
Área de membrana eficaz de la membrana de fibras huecas	: 0,15 m ²

- 40 (4) Se filtró la suspensión de microesferas resultante a través de un filtro de 150 μm para eliminar los agregados y se filtró a presión reducida a través de un filtro de 20 μm para eliminar la fase acuosa. Se combinaron las microesferas resultantes con una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizaron para dar 0,26 g de microesferas. Se midieron el contenido en fármaco y el tamaño de partícula promedio de las microesferas de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(4) y se demostró que eran del 3,07% y de 71,7 μm , respectivamente.

EJEMPLO 6

- 45 (1) A 0,05 g de compuesto (2) y 0,45 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 50:50; peso molecular promedio de 20.000; RG502H: Boehringer Ingelheim Co., Ltd.) se le añadieron 2,5 g de

cloruro de metileno y se agitó exhaustivamente con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) para formar una fase oleosa (O).

5 (2) Se añadió la fase oleosa a 3 ml de disolución acuosa al 0,5% de poli(alcohol vinílico) (POVAL PVA-220C: Kuraray Co., Ltd.) y se emulsionó a 22°C durante 5 minutos con un homogeneizador (Polytron: Kinematica A.G.) para formar una emulsión (O/W), en la que la fase oleosa se dispersa en la fase acuosa.

(3) Se repitieron cinco veces los procedimientos anteriores (1) y (2). Se combinaron las emulsiones resultantes (de 5 ensayos), se añadieron a 1000 ml de agua destilada y se agitaron a 400 rpm con un motor tres-uno (Shinto Scientific Co., Ltd.) para eliminar el cloruro de metileno realizando un secado en agua a 25°C durante 1,5 horas, a 40°C durante 1 hora y a 25°C durante 0,5 horas.

10 (4) Se filtró la suspensión de microesferas resultante a través de un filtro de 150 µm para eliminar los agregados y se filtró a presión reducida a través de un filtro de 20 µm para eliminar la fase acuosa. Se combinaron las microesferas resultantes con una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizaron para dar 2,3 g de microesferas.

15 Se disolvieron diez mg de las microesferas resultantes en 3 ml de acetonitrilo. Se combinó la disolución con 6 ml de disolución acuosa de cloruro de sodio 0,5 M, se agitó con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) y entonces se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante. Se cargó una porción de sobrenadante en UV-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de detección: 240 nm) y se determinó la concentración de fármaco en el sobrenadante mediante comparación con una curva patrón preparada por separado con una disolución de fármaco. Basándose en la concentración resultante y el volumen de sobrenadante, se estimó el contenido en fármaco en las microesferas. Además, se midió el tamaño de partícula promedio de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(4). Como resultado, el contenido en fármaco era del 9,9% y el tamaño de partícula promedio era de 26,4 µm.

20 (5) Se trataron las microesferas obtenidas en (4) anteriormente de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1-(5) para dar una dispersión de microesferas (tasa de fármaco: 0,1 mg/ml).

EJEMPLO 7

25 (1) Se prepararon microesferas (2,2 g) de una manera similar a la descrita en el ejemplo 6-(1) a (4) excepto porque se usó copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 75:25; peso molecular promedio de 20.000; PLGA7520: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y porque se añadieron 2,0 g de cloruro de metileno.

Se midieron el contenido en fármaco y el tamaño de partícula promedio de las microesferas de una manera similar a la descrita en el ejemplo 6-(4) y se demostró que eran del 10,1% y de 27,0 µm, respectivamente.

30 (2) Se trataron las microesferas obtenidas en (1) anteriormente de una manera similar a la descrita en el ejemplo 6-(5) para dar una dispersión de microesferas (tasa de fármaco: 0,1 mg/ml).

EJEMPLO CONTROL 1: Control de ejemplo 2

35 (1) A 0,6 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 50:50; peso molecular promedio de 20.000; PLGA5020: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1,4 g de polímero de ácido láctico (peso molecular promedio de 20.000) se le añadieron 4,0 g de cloruro de metileno, y se agitó exhaustivamente la mezcla durante 30 minutos para formar una fase oleosa (O). Según los procedimientos descritos en el ejemplo 1-(1) a (4), se obtuvieron 1,7 g de microesferas libres de fármaco.

40 (2) Se trataron las microesferas obtenidas en (1) anteriormente en un procedimiento similar descrito en el ejemplo 1-(5) para preparar una dispersión de microesferas, en la que la concentración de microesferas dispersadas es la misma que la del ejemplo 2-(3).

EJEMPLO CONTROL 2 (Control de ejemplo 7)

45 A 0,45 g de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico = 75:25; peso molecular promedio de 20.000; PLGA7520: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se le añadieron 2,0 g de cloruro de metileno y se agitó la mezcla exhaustivamente con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) para formar una fase oleosa. Según los procedimientos descritos en el ejemplo 6-(2) a (4), se obtuvieron 2,2 g de microesferas libres de fármaco.

EJEMPLO DE PRUEBA 1

50 A 10 mg de microesferas en un tubo de ensayo se le añadieron 10 ml de tampón fosfato (pH 7,4) que contenía Tween 80 al 0,05%, y se agitó con un cultivador rotatorio a 25 rpm en una cabina de aire-temperatura controlados a 37°C. Cuando pasó un periodo de tiempo definido desde el inicio de la agitación, se centrifugó el tubo de ensayo (2000 rpm, 5 min.) y se tomaron muestras de 9 ml de sobrenadante y se cargaron en FL-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de excitación: 315 nm, longitud de onda de fluorescencia: 465 nm) y se determinó el contenido en fármaco mediante comparación con una curva patrón

preparada por separado con una disolución de fármaco. Basándose en el resultado y el volumen de toma de muestra, se estimó la cantidad de elución de fármaco.

5 Además, se repitió regularmente la estimación de la cantidad de elución de fármaco añadiendo 9 ml de tampón fosfato (pH 7,4) al tubo de ensayo tras la toma de muestra, y realizando los mismos procedimientos en las mismas condiciones, lo que comprende agitación, toma de muestra y estimación.

Tras la toma de muestra final, se eliminó el eluato restante del tubo de ensayo y se determinó el contenido en fármaco en las microesferas residuales según el método descrito en el ejemplo 1-(4).

Se llevaron a cabo los procedimientos anteriores en las microesferas obtenidas en los ejemplos 1 a 3. Se muestran los resultados en la figura 5.

10 Se calculó la tasa de elución basándose en la suposición de que la suma de fármaco eluido de y que quedada en las microesferas era el 100%.

EJEMPLO DE PRUEBA 2

15 Se condicionaron ratas SD macho (7 semanas de edad, 3 ratas/grupo, Japan SLC) durante una semana alojándolas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas mientras se alimentaban con pienso y agua a voluntad. Cada rata recibió entonces una inyección rápida de compuesto (1) (1 mg/ml) disuelto en solución salina fisiológica que contenía polietilenglicol 400 al 10% ((Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a partir de la vena femoral a 0,5 ml/animal (dosificación de fármaco total: 0,5 mg/rata).

20 Tras la administración del fármaco, bajo anestesia con éter, se recogieron muestras de sangre a intervalos de tiempo regulares a partir de la vena yugular con una jeringuilla que contenía heparina y se centrifugaron para obtener muestras de plasma. A 0,1 ml de plasma se le añadieron 0,2 ml de disolución de patrón interno y fosfato de potasio dibásico 1 M y luego 7,0 ml de cloroformo. Se agitó la mezcla durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos para separar 5 ml de fase orgánica. Se evaporó la fase orgánica resultante hasta sequedad a 40°C bajo atmósfera de nitrógeno, volvió a disolverse en 0,5 ml de fase móvil y entonces se cargó en FL-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de excitación: 315 nm, longitud de onda de fluorescencia: 465 nm) para determinar la concentración en plasma. Se muestran los resultados en la figura 6.

EJEMPLO DE PRUEBA 3

30 Se condicionaron ratas SD macho (7 semanas de edad, 5 ratas/grupo, Japan SLC) durante una semana alojándolas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas mientras se alimentaban con pienso y agua a voluntad. Cada rata recibió entonces por vía subcutánea la dispersión de microesferas obtenida en los ejemplos 1-(5), 2-(2) o 3-(2) a partir del lomo a 2 ml por rata (dosificación de fármaco total: 5 mg/rata). Tras la administración del fármaco, bajo anestesia con éter, se recogieron muestras de sangre a intervalos de tiempo regulares a partir de la vena yugular con una jeringuilla que contenía heparina y se centrifugaron para obtener muestras de plasma. Se determinó la concentración del compuesto en plasma de una manera similar a la descrita en el ejemplo de prueba 2. Como resultado de formular inhibidor de PDE4 en microesferas, la concentración en plasma máxima de inhibidor de PDE4 pudo reducirse hasta de 1/25 a 1/100, incluso cuando se comparaba con la lograda mediante inyección intravenosa de solución salina que contenía sólo un décimo de la cantidad de inhibidor de PDE4 (ejemplo de prueba 2). Se muestran los resultados en la figura 7.

EJEMPLO DE PRUEBA 4

40 Se condicionaron ratas SD macho (7 semanas de edad, 5 ratas por grupo, Japan SLC) durante una semana alojándolas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas mientras se alimentaban con pienso y agua a voluntad. Cada rata recibió entonces por vía subcutánea la dispersión de microesferas obtenida en el ejemplo 2-(2) a partir del lomo a 2 ml por rata (dosificación de fármaco total: 5 mg/rata).

45 En los días 3, 7, 10, 14, 21 y 35 tras la administración del fármaco, se recogieron microesferas de los sitios de administración. A las microesferas recogidas, se le añadieron 5 ml de acetonitrilo que contenía sustancia de control interno y se disolvieron con un homogeneizador (Polytron: Kinematica A.G.). Tras la centrifugación a 3.000 rpm, 5 minutos, se recogieron 3 ml de sobrenadante, se combinaron con 7 ml de disolución acuosa de cloruro de sodio 0,5 M, se agitaron con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) y entonces se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante. Se filtró una porción de sobrenadante a través de KC prep-omni 13 (Katayama Chemistry Inc.) y se cargó en FL-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de excitación: 315 nm, longitud de onda de fluorescencia: 465 nm). Se determinó la concentración de fármaco mediante comparación con una curva patrón preparada por separado con una disolución de fármaco. Basándose en la concentración resultante y el volumen de sobrenadante, se calculó la tasa residual de fármaco que quedaba en las microesferas. Se muestran los resultados en la figura 8.

55

EJEMPLO DE PRUEBA 5

5 Se condicionaron ratas SD macho (7 semanas de edad, Japan SLC) durante una semana alojándolas a temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas mientras se alimentaban con pienso y agua a voluntad. Cada rata recibió entonces por vía subcutánea dispersiones de microesferas que contenían compuesto (2) obtenidas en los ejemplos 6-(5) y 7-(2) a 1 ml por rata (dosificación de fármaco total: 0,1 mg/rata) a partir del lomo.

10 Se recogieron microesferas a intervalos de tiempo regulares del sitio de administración. A las microesferas recogidas, se le añadieron 10 ml de acetonitrilo y se disolvieron con un homogeneizador (Polytron: Kinematica A.G.). Tras la centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos, se recogieron 3 ml de sobrenadante, se combinaron con 6 ml de cloruro de sodio acuoso 0,5 M, se agitaron con una mezcladora (mezcladora Touch MT-51: YAMATO Scientific Co., Ltd.) y entonces se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante. Se filtró una porción de sobrenadante a través de KC prep-omni 13 (Katayama Chemistry Inc.) y se cargó en UV-HPLC (columna; Hypersil 5-ODS, diámetro: 4 mm, longitud: 300 mm, GL Sciences, Inc., longitud de onda de detección: 240 nm). Se determinó la concentración de fármaco mediante comparación con una curva patrón preparada por separado con una disolución de fármaco. Basándose en la concentración resultante y el volumen de sobrenadante, se calculó la

15 tasa residual de fármaco que quedaba en las microesferas. Se muestran los resultados en la figura 9.

Aplicabilidad industrial

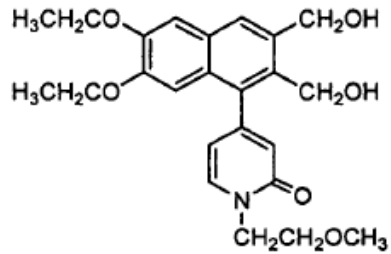
Aunque se ha considerado que sólo el tratamiento conservativo está disponible como tratamiento farmacológico de la enfermedad de los cartílagos, la presente composición para el tratamiento regenerativo de la enfermedad de los cartílagos, que comprende un inhibidor de PDE4 como principio activo, especialmente cuando se administra localmente a la región de cartílago afectada, hace posible regenerar el cartílago sin producir efectos secundarios debidos a la acción sistémica del inhibidor de PDE4, mediante lo cual ejerce efectos terapéuticos regenerativos sobre enfermedades de los cartílagos, especialmente osteoartritis. Puede lograrse un efecto todavía superior formulando una composición que contiene un inhibidor de PDE4 y un polímero biocompatible y biodegradable en una preparación de depósito, especialmente en una preparación de microesferas inyectable, administrando la misma localmente a una región de cartílago afectada permitiendo de ese modo que dure la eficacia.

20

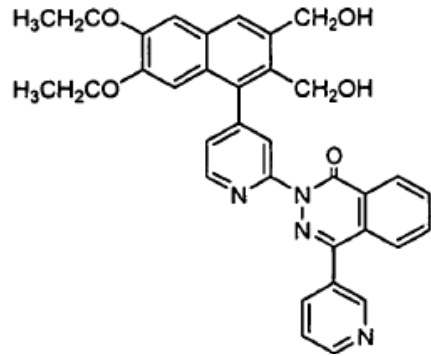
25

REIVINDICACIONES

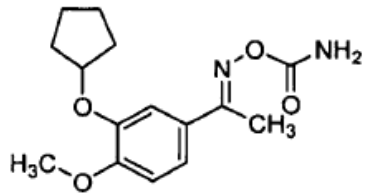
1. 5 Uso de un inhibidor de PDE4 seleccionado del grupo que consiste en los siguientes compuestos n.^{os} (1), (2), (9), (11), (21), (27), (44), (52), (53), (56) y (57) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento regenerativo de osteoartritis, condrodistrofia, discopatía degenerativa y/o lesión de menisco:



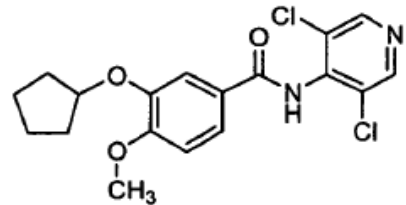
Compuesto (1)



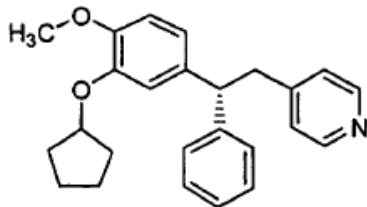
Compuesto (2)



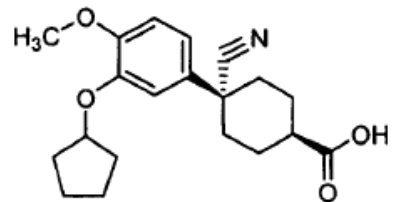
Compuesto (9)



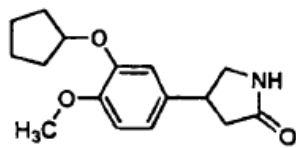
Compuesto (11)



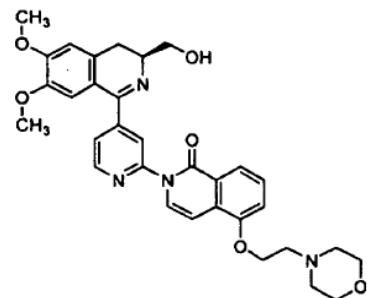
Compuesto (21)



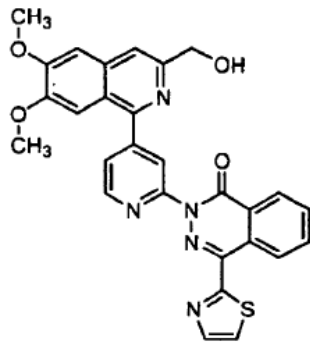
Compuesto (27)



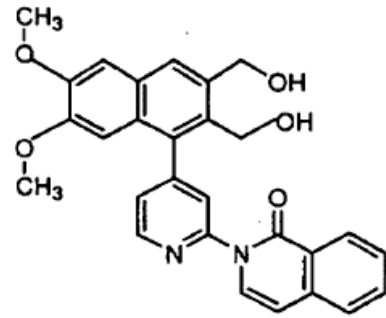
Compuesto (44)



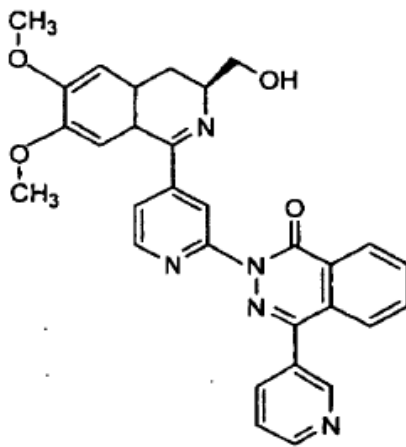
Compuesto (52)



Compuesto (53)

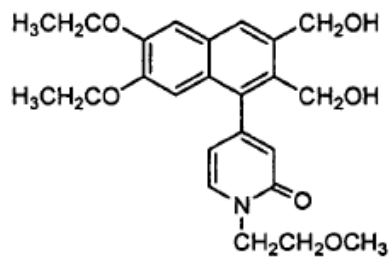


Compuesto (56)

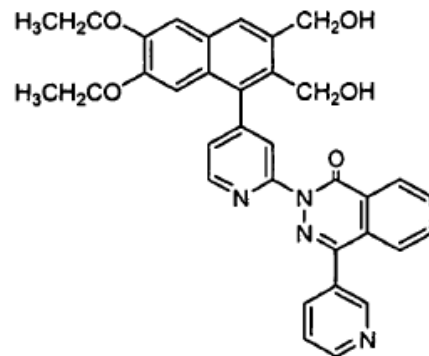


Compuesto (57)

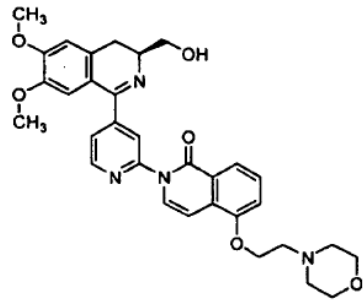
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de PDE4 se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos n.ºs (1), (2), (52), (53), (56) y (57) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:



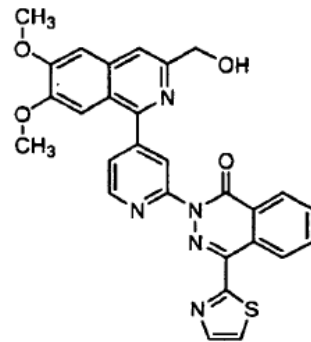
Compuesto (1)



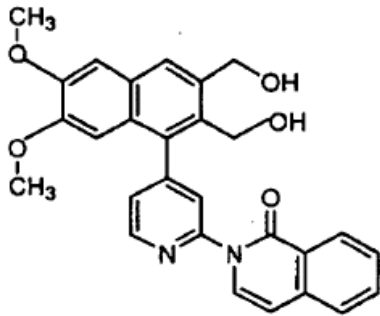
Compuesto (2)



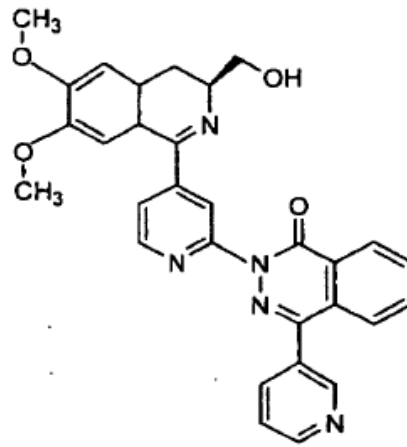
Compuesto (52)



Compuesto (53)

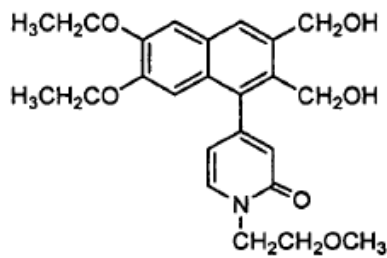


Compuesto (56)

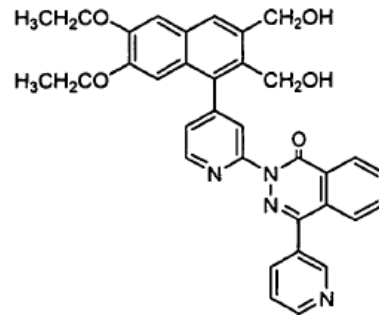


Compuesto (57)

3. Uso según la reivindicación 2, en el que el inhibidor de PDE4 se selecciona del grupo que consiste en los siguientes compuestos n.^{os} (1) y (2) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

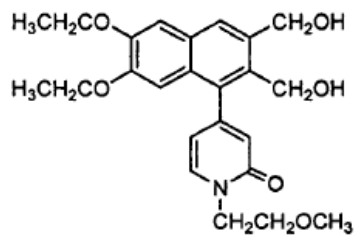


Compuesto (1)



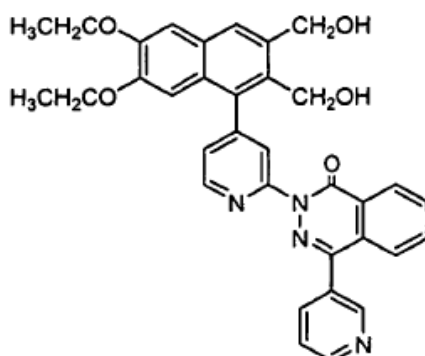
Compuesto (2)

4. Uso según la reivindicación 3, en el que el inhibidor de PDE4 es el compuesto n.º (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



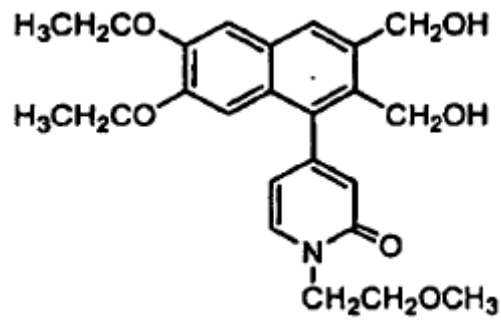
Compuesto (1)

5. Uso según la reivindicación 3, en el que el inhibidor de PDE4 es el compuesto n.º (2) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Compuesto (2)

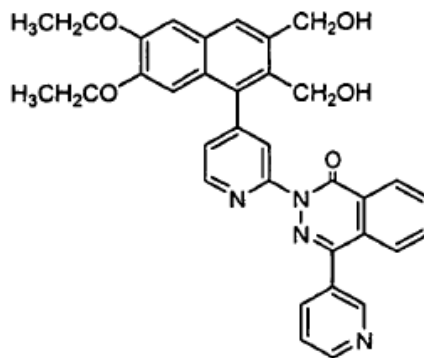
- 5 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medicamento se prepara para liberar el inhibidor de PDE4 gradualmente en la región afectada.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el medicamento comprende además un polímero biocompatible y biodegradable.
- 10 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medicamento es para el tratamiento regenerativo de osteoartritis.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que el polímero biocompatible y biodegradable es insoluble en agua.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el medicamento está en forma de una preparación de microesferas.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que el tamaño de partícula de la microesfera es de 0,1 - 150 µm.
- 15 12. Uso según la reivindicación 10 u 11, en el que el contenido de inhibidor de PDE4 en dicha microesfera es del 0,0001 - 80% en peso.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua es un poliéster de ácido graso.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que el polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua es uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli(ácido láctico), copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y copolímero de ácido 2-hidroxibutírico-ácido glicólico.
- 20 15. Uso según la reivindicación 13 ó 14, en el que el polímero biocompatible y biodegradable insoluble en agua tiene un peso molecular promedio de 2000-80000.
16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el medicamento es una preparación de microesferas inyectable preparada dispersando microesferas a una concentración de 0,0001 - 1000 mg/ml en una disolución acuosa que contiene un dispersante.
- 25 17. Uso según la reivindicación 16, en el que el medicamento comprende un dispersante a una concentración del 0,01-2% en peso.
18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, en el que el dispersante es uno o más seleccionados del grupo que consiste en éster de ácido graso de polioxietilensorbitano, aceite de ricino de polietileno, carboximetilcelulosa sódica, alginato de sodio, dextrano e hialuronato de sodio.
- 30 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que el medicamento es una preparación inyectable, que puede obtenerse suspendiendo microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 10-15 en una disolución acuosa que contiene un inhibidor de la agregación, y liofilizando la suspensión resultante.
- 35 20. Inhibidor de PDE4 que tiene la siguiente estructura química o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento regenerativo de osteoartritis, condrodistrofia, discopatía degenerativa y/o lesión de menisco:



Compuesto (1)

21. Inhibidor de PDE4 que tiene la siguiente estructura química o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento regenerativo de osteoartritis, condrodistrofia, discopatía degenerativa y/o lesión de menisco:

5



Compuesto (2)

Figura 1

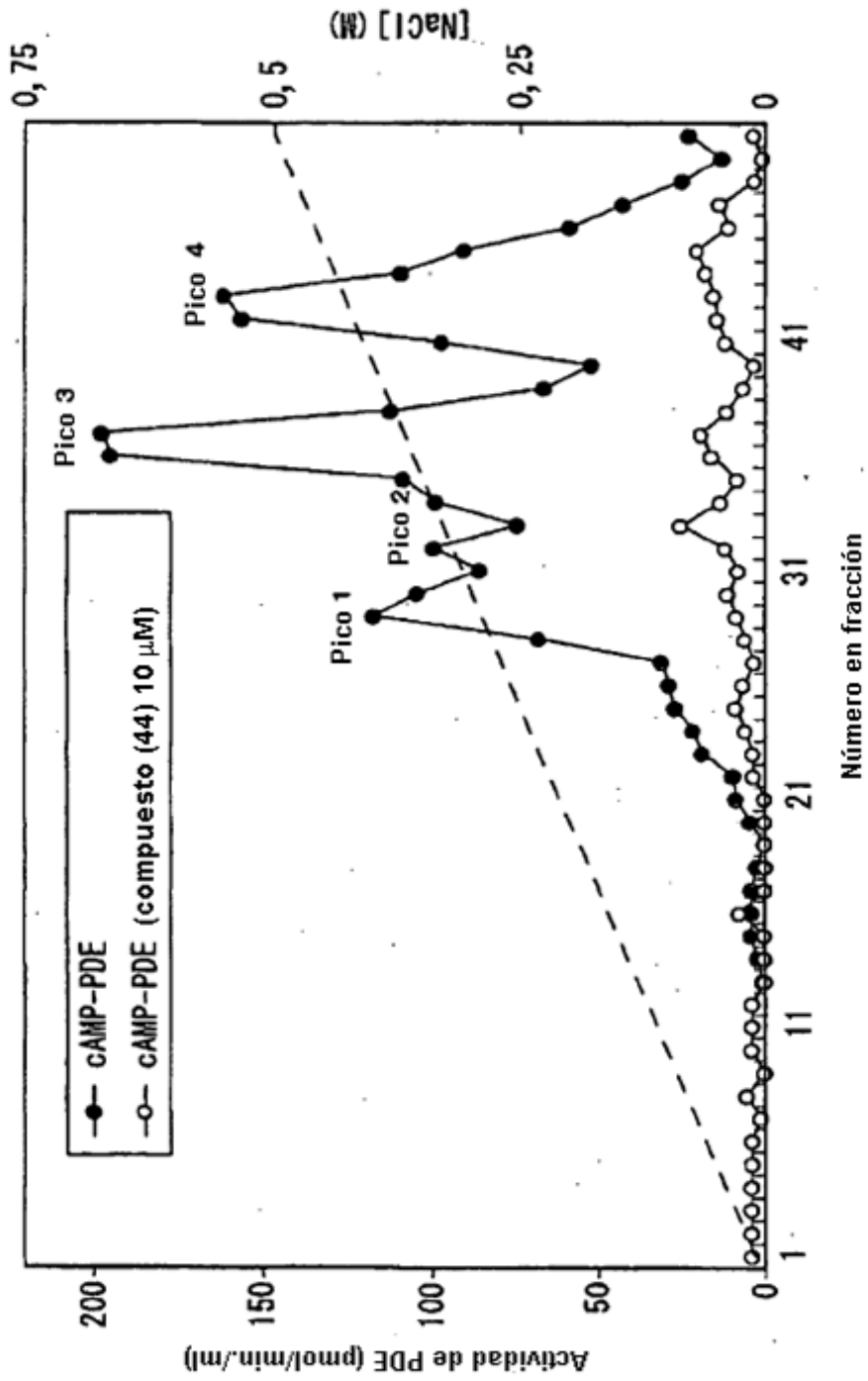


Figura 2



Microesferas que contienen compuesto (1) (ejemplo 2)



Microesfera de ejemplo control 1

Figura 3

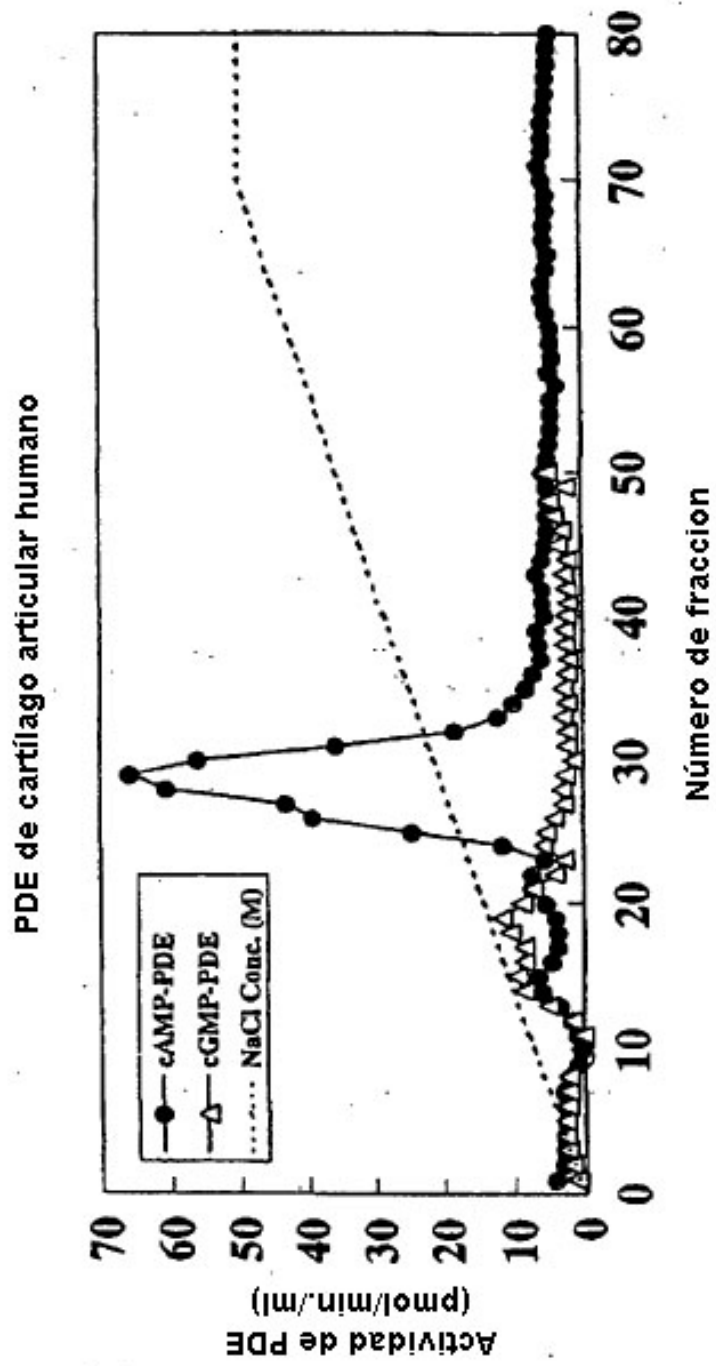


Figura 4

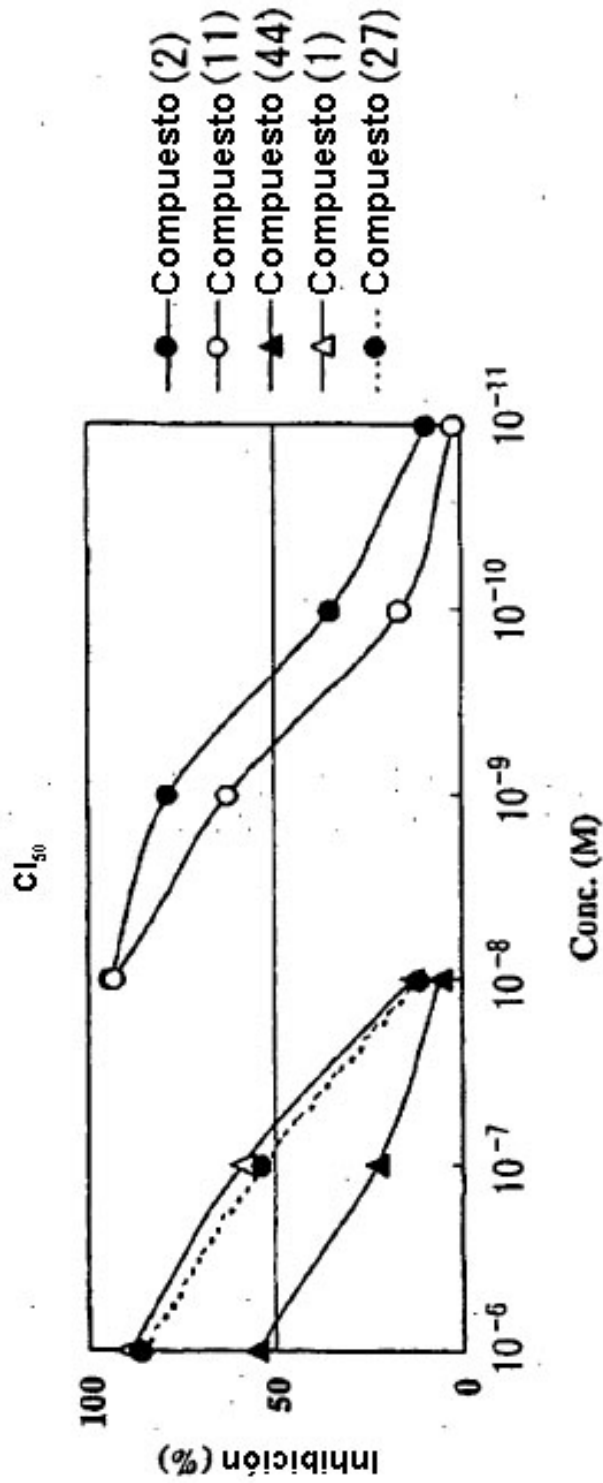


Figura 5

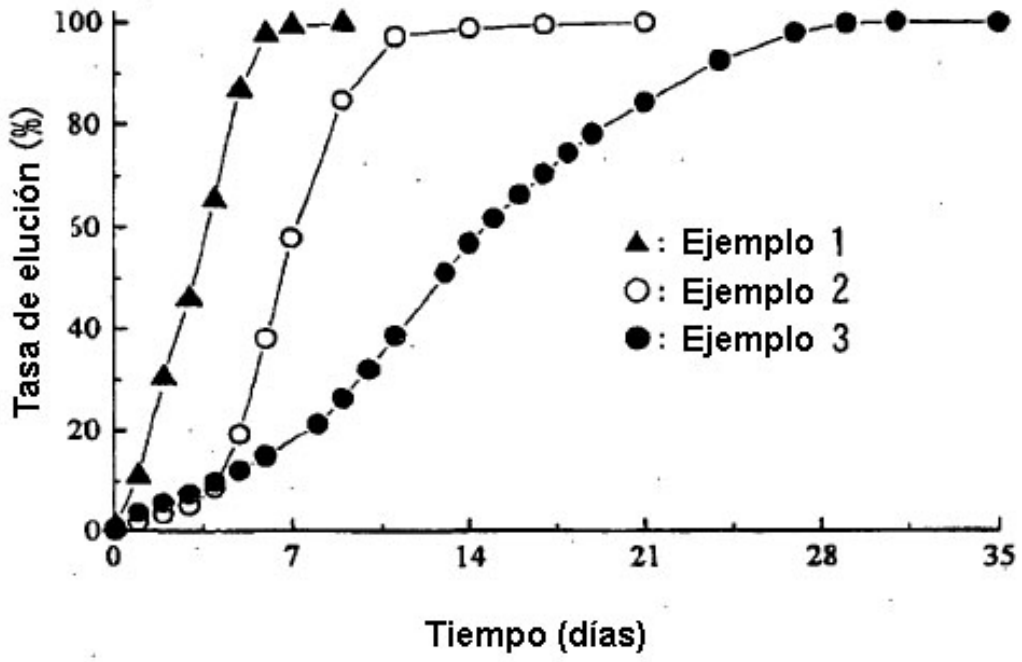


Figura 6

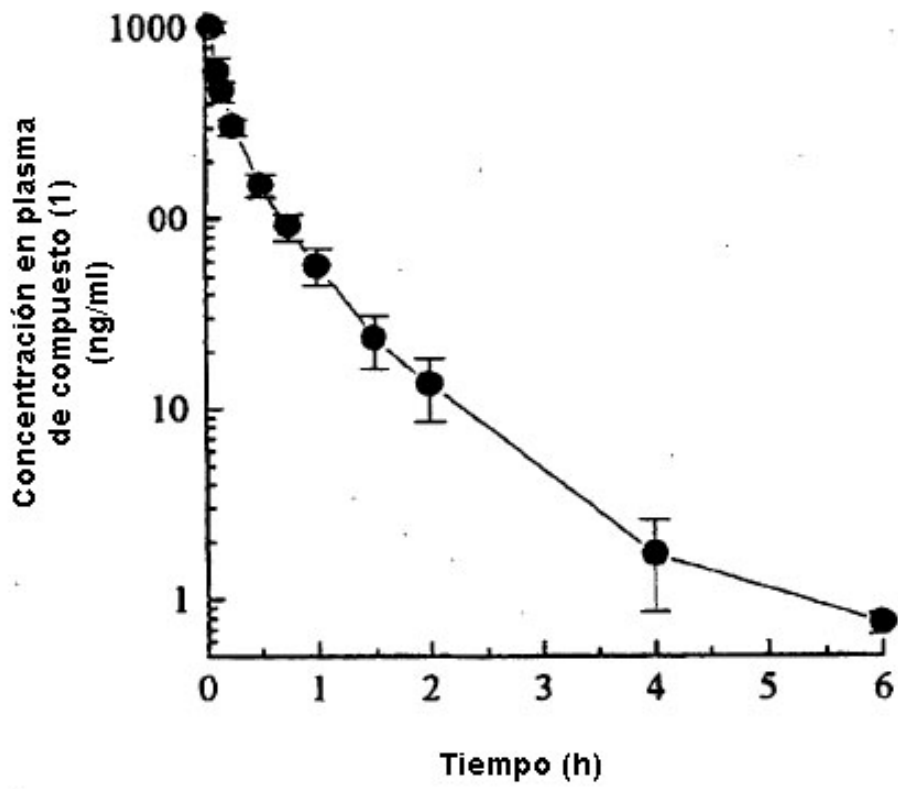


Figura 7

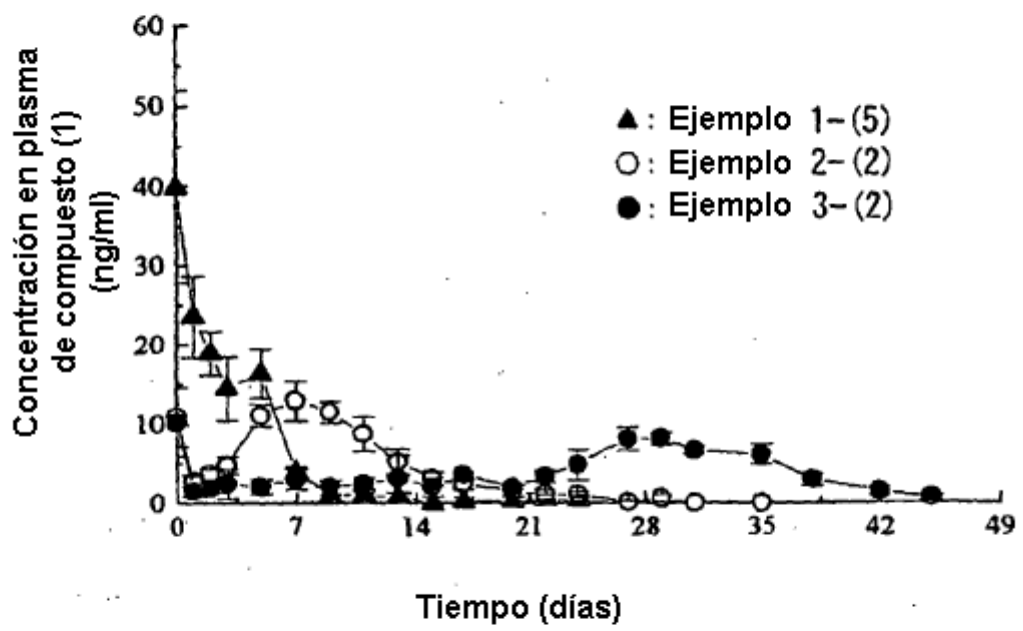


Figura 8

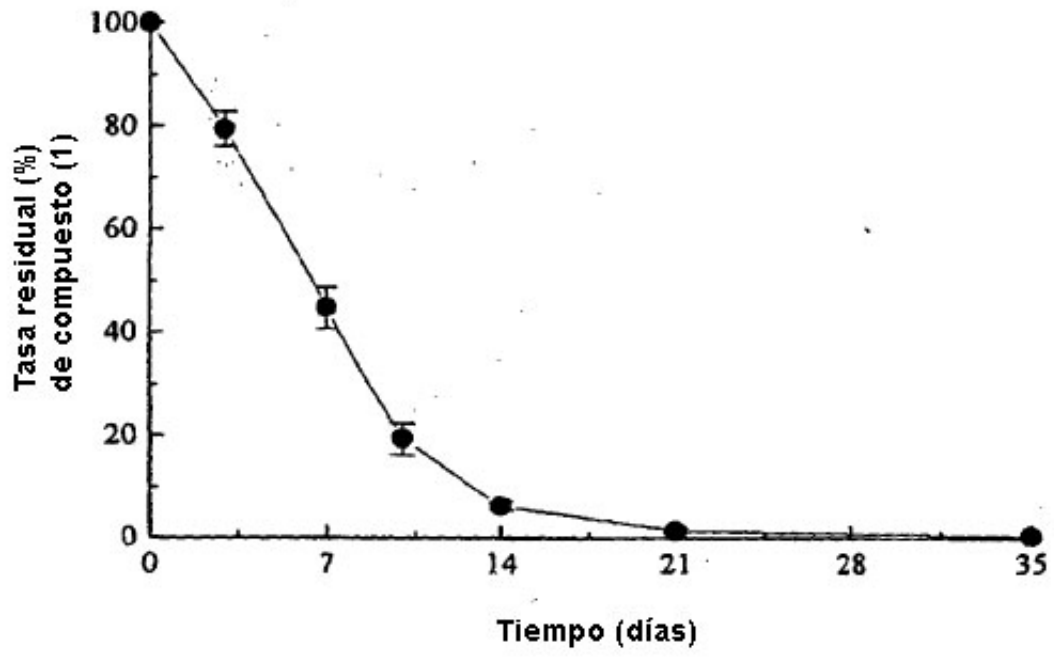


Figura 9

