

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 743**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4406** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

**A61P 1/18** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007 E 07830074 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2087890**

54 Título: **Preparación de liberación sostenida para terapia de regeneración tisular**

30 Prioridad:

**19.10.2006 JP 2006285357**

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

**12.05.2014**

73 Titular/es:

**ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
1-5, DOSHOMACHI 2-CHOME CHUO-KU  
OSAKA-SHI, OSAKA 541-8526, JP**

72 Inventor/es:

**SAKAI, YOSHIKI y  
UCHIDA, TAKAHIRO**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 459 743 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

Preparación de liberación sostenida para terapia de regeneración tisular

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a microesferas que comprenden ácido (5-[2-((1E)-fenil(piridin-3-il)metilen]amino)oxi)etil]-7,8-dihidronaftalen-1-il)oxi)acético y un copolímero de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico.

**Antecedentes de la técnica**

10 Hasta ahora se ha investigado el desarrollo de inyecciones de liberación lenta, a largo plazo, que pueden liberar de manera continua un fármaco con el objetivo de minimizar el número de veces que se administra un medicamento y por tanto mejorar el cumplimiento con el fármaco. En particular, se han realizado numerosos estudios sobre métodos de liberación controlada que implican el uso de microesferas de fármacos (algunas veces abreviadas como "ME") que usan un polímero que tiene una escasa solubilidad en agua. Se emplea un polímero biodegradable como este polímero de modo que, tras la liberación del fármaco, la base no queda en el sitio de administración. En particular, se usan polímeros de poli(ácido láctico) (algunas veces abreviados como "PLA") o copolímeros de ácido láctico/ácido glicólico (algunas veces abreviados como "PLGA"), que tienen un registro establecido de uso, por ejemplo, en hilos para suturas quirúrgicas y pernos para anclajes óseos. Estos polímeros se emplean en inyecciones del derivado de LH-RH Leuplin (nombre comercial), que se venden comercialmente como inyecciones de liberación lenta, y en el derivado de somatostatina de acción prolongada Sandostatin (nombre comercial) LAR.

20 Los fármacos comúnmente encapsulados dentro de microesferas incluyen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, tales como péptidos fisiológicamente activos, diversos tipos de hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, genes y diversos factores de crecimiento/diferenciación celular. En la fabricación de microesferas, en general se sabe que cuando el fármaco que va a encapsularse tiene un peso molecular superior, puede fabricarse más fácilmente microesferas que tienen una ráfaga inicial baja y cuya liberación se controla fácilmente.

25 En cambio, por varios motivos, incluyendo la gran ráfaga inicial, la dificultad de liberación controlada y el bajo contenido de fármaco (razón de encapsulación), se ha encontrado una gran dificultad en los esfuerzos por preparar microesferas que contienen fármacos de bajo peso molecular; llevar a cabo la liberación estable de tales fármacos *in vivo* y controlar la tasa de liberación ha demostrado ser extremadamente difícil. Como resultado, aunque hay casos en los que se han encapsulado compuestos de bajo peso molecular (véase el documento de patente 1), ninguno está comercialmente disponible como preparaciones farmacéuticas.

30 Mientras tanto, el compuesto ácido (5-[2-((1E)-fenil(piridin-3-il)metilen]amino)oxi)etil]-7,8-dihidronaftalen-1-il)oxi)acético (abreviado a continuación como "el presente fármaco") es un compuesto de bajo peso molecular que tiene un esqueleto químicamente estable distinto de prostaglandina (PG), una acción agonista de receptores de PGI<sub>2</sub> (IP) y una actividad de inhibición de tromboxano (TX) A<sub>2</sub> sintetasa. El presente fármaco, debido a que tiene una acción agonista de PGI<sub>2</sub>, se conoce para usarse en la prevención y/o el tratamiento, por ejemplo, de trombosis, arteriosclerosis, cardiopatía isquémica, úlcera gástricas e hipertensión (documento de patente 2).

35 Sin embargo, las preocupaciones cuando se administra el presente fármaco por vía oral incluyen efectos secundarios tales como dolor en la parte superior del abdomen y diarrea. Cuando se administra por vía intravenosa, efectos secundarios tales como una acción hipotensiva asociada con vasodilatación, sofocos y cefaleas, etc. son una preocupación. En particular, cuando se emplea el presente fármaco, de las enfermedades mencionadas anteriormente, para enfermedades cardiovasculares tales como arteriosclerosis y cardiopatía isquémica, etc. desde el punto de vista de los efectos secundarios y del sistema terapéutico, para prevenir la exposición a una alta concentración del fármaco en el tracto digestivo y un repentino aumento de la concentración en sangre del fármaco, para minimizar la carga sobre el paciente y para maximizar los efectos del fármaco, existe un gran deseo de preparaciones que puedan mantener de manera continua la concentración de fármaco con el menor número posible de administraciones, incluyendo formas farmacéuticas de un tipo que mantenga de manera continua la concentración del fármaco en el tejido en el sitio de enfermedad o formas farmacéuticas de tipo de mantenimiento de la concentración en sangre tales como infusiones intravenosas por goteo.

40 Se ha investigado la administración local de microesferas que contienen el presente fármaco como método para resolver los problemas anteriores, incluyendo la aparición de efectos secundarios y un repentino aumento de la concentración en sangre del fármaco. Por ejemplo, el documento de patente 3 da a conocer una preparación de acción prolongada que contiene el presente fármaco y PLGA, y menciona que esta preparación fue eficaz cuando se administró localmente en un modelo de arteriosclerosis obliterante (ASO) en rata. Sin embargo, dado que las microesferas descritas en el documento de patente 3 tenían un bajo contenido de fármaco, la dosis a las que se administran las propias microesferas aumenta, dando lugar a un problema de acidez. Además, el periodo de liberación para el presente fármaco es corto y la tasa de liberación no es constante, como resultado de lo cual estas microesferas de la técnica anterior no han logrado mantener la concentración en sangre óptima para que surjan los efectos del fármaco a lo largo de un periodo de tiempo fijado.

Documento de patente 1: JP-9-263545 A

Documento de patente 2: JP-6-87811 A

Documento de patente 3: WO 2004/032965

### Descripción de la invención

#### 5 Problemas que resuelve la invención

El objeto de la invención es proporcionar microesferas seguras, fáciles de usar, que liberen de manera continua el presente fármaco a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, puedan incluir un alto contenido del fármaco, liberen el fármaco a una tasa fijada y, durante el periodo de liberación, mantengan el fármaco en un intervalo de concentración en sangre óptimo para que se manifiesten los efectos del fármaco.

#### 10 Medios para resolver los problemas

Los inventores han realizado investigaciones con el objetivo de resolver los problemas anteriores. Como resultado, han encontrado que, en microesferas que comprenden el presente fármaco y PLGA (microesferas que también se denominan a continuación "las microesferas de la invención"), una combinación específica de características tales como el peso molecular promedio en peso del PLGA, la razón de ácido láctico/ácido glicólico en el PLGA, el tamaño de partícula promedio de las microesferas, la razón en peso del presente fármaco y el PLGA, o similares, tiene los efectos imprevistos de conferir la capacidad de liberar de manera continua el fármaco a lo largo de un periodo prolongado de una semana o más y permitir incluir el fármaco dentro de las microesferas en un contenido superior, permitiendo por tanto fijar la dosis de microesferas dentro de un intervalo óptimo al que no surge un problema de acidez. Además, los inventores han descubierto que las microesferas del presente fármaco pueden suprimir una ráfaga inicial (es decir, el porcentaje del fármaco que queda en una prueba de liberación puede mantenerse a, o por encima de, un valor fijado) y, durante el periodo de liberación, pueden mantener la concentración en sangre del fármaco en el intervalo óptimo para que se manifiesten los efectos del fármaco.

Por consiguiente, los problemas de la invención se resuelven mediante:

25 Una microesfera de acción prolongada de dos a cuatro semanas, que comprende ácido  $\{5-[2-((1E)\text{-fenil(piridin-3-il)metil}en]amino)oxi]etil\}-7,8\text{-dihidronaftalen-1-il}oxi\}$ acético como fármaco y un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico, en la que

(i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 3 hasta 10 partes en peso,

(ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 20 hasta 50  $\mu\text{m}$ , y

30 (iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 10.000 hasta 50.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de desde 75/25 hasta 50/50,

y que satisface al menos una de las siguientes condiciones (1) a (2):

(1) una razón restante del fármaco tras una hora en una prueba de liberación es de al menos el 90%;

(2) una razón restante del fármaco tras un día en una prueba de liberación es de al menos el 82%.

35 Las siguientes realizaciones describen la presente invención:

La microesfera según la presente invención, en la que el contenido de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta 8 partes en peso.

La microesfera según la presente invención, en la que la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ .

40 La microesfera según la presente invención, en la que la razón de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico es de 50/50.

La microesfera según la presente invención, en la que la concentración en sangre del fármaco es de desde 0,01 ng/ml hasta 150 ng/ml.

Una microesfera de acción prolongada de dos semanas,

45 que comprende ácido  $\{5-[2-((1E)\text{-fenil(piridin-3-il)metil}en]amino)oxi]etil\}-7,8\text{-dihidronaftalen-1-il}oxi\}$ acético como fármaco y un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico, en la que

(i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta

8 partes en peso,

(ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ , y

(iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 10.000 hasta 30.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de 50/50,

5 y que satisface la siguiente condición (1):

(1) una razón restante del fármaco tras una hora en una prueba de liberación es de al menos el 90%.

Una microesfera de acción prolongada de cuatro semanas, que comprende ácido ({5-[2-(((1E)-fenil(piridin-3-il)metilen]amino)oxi)etil]-7,8-dihidronaftalen-1-il}oxi)acético como fármaco y un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico, en la que

10 (i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta 8 partes en peso,

(ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ , y

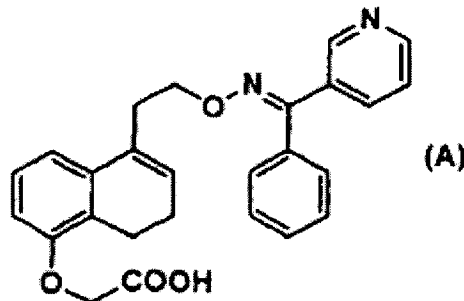
(iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 30.000 hasta 50.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de 50/50,

15 y que satisface la siguiente condición (1):

(1) una razón restante del fármaco tras un día en una prueba de liberación es de al menos el 82%.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

El fármaco usado en la presente invención es ácido ({5-[2-(((1E)-fenil(piridin-3-il)metilen]amino)oxi)etil]-7,8-dihidronaftalen-1-il}oxi)acético (n.º de registro CAS 176391-41-6) de fórmula (A).



20 El presente fármaco se menciona en el ejemplo 2(g) del documento JP-6-87811 A, y puede prepararse según un método descrito en la misma publicación. Alternativamente, puede usarse una sal del presente fármaco, tal como una sal de sodio o una sal de clorhidrato, en lugar del presente fármaco.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "microesferas" se refiere a microesferas que comprenden el presente fármaco y PLGA.

30 El PLGA usado en la presente invención es un polímero biodegradable. Cuando se administran *in vivo* microesferas compuestas por PLGA, en primer lugar, las moléculas de agua penetran rápidamente en el polímero e hidratan el PLGA, haciendo que se hinche y provocando que la hidrólisis avance por su totalidad, como resultado de lo cual el peso molecular del PLGA disminuye gradualmente. Los fluidos corporales (humedad) infiltran las microesferas en el plazo de aproximadamente 24 horas, conduciendo a un hinchamiento suficiente. A medida que avanza la disminución en el peso molecular del PLGA, la estructura dominante se rompe y se debilita, y el fármaco presente en la misma se difunde hacia el exterior entre los enlaces de PLGA debilitados y se libera mediante disolución. La hidrólisis de PLGA se produce de manera tanto enzimática como no enzimática, comenzando con la infiltración de fluidos corporales (humedad), liberándose gradualmente el fármaco a medida que avanza la hidrólisis.

35 El PLGA usado en la presente invención puede producirse mediante un método bien conocido en sí mismo, o puede adquirirse como producto comercial. Los ejemplos ilustrativos del PLGA usado en la presente invención incluyen PLGA-7510 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso, 10.000), PLGA-7515 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso, 15.000), PLGA-7520 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso, 20.000), PLGA-

5010 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 10.000), PLGA-5015 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 15.000), PLGA-5020 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 20.000), PLGA5-50 (también denominado PLGA5-1; producido por Mitsui Chemicals, Inc.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 50.000), PLGA75-50 (producido por Mitsui Chemicals, Inc.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 75/25; peso molecular promedio en peso, 50.000), H1702-2 (producido por Mitsui Chemicals, Inc.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 18.000), H1702-3 (producido por Mitsui Chemicals, Inc.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 35.000) y H1702-4 (producido por Mitsui Chemicals, Inc.; ácido DL-láctico/ácido glicólico = 50/50; peso molecular promedio en peso, 46.000), etc. Algunos de estos PLGA tienen un bajo punto de corte de peso molecular (peso molecular promedio en peso de desde 1 hasta 3.000) o similar.

En la presente memoria descriptiva, el peso molecular promedio en peso de PLGA se refiere al peso molecular promedio equivalente de poliestireno medido mediante cromatografía de permeación en gel (CPG).

15 Pueden usarse ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido DL-láctico como ácido láctico en el PLGA. Se prefiere ácido DL-láctico.

20 Cuando se usan las microesferas de la invención para prevenir y/o tratar, de las indicaciones mencionadas a continuación, arteriosclerosis obliterante, ictus, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, asma, diabetes y complicaciones de la misma, angina, infarto de miocardio, insuficiencia renal, osteoartritis, artritis reumatoide u osteoporosis, el periodo de liberación lenta es preferiblemente de desde dos hasta cuatro semanas.

25 En las microesferas de la invención, el peso molecular promedio en peso del PLGA puede seleccionarse de la siguiente manera según el periodo de liberación lenta seleccionado como diana. Por ejemplo, en el caso de un periodo de liberación lenta de dos a cuatro semanas, se prefiere un peso molecular promedio de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 50.000. De este intervalo, cuando se selecciona como diana un periodo de liberación lenta de dos semanas, el peso molecular promedio en peso del PLGA es preferiblemente de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 30.000, más preferiblemente desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 20.000 y lo más preferiblemente desde aproximadamente 20.000. Cuando se selecciona como diana un periodo de liberación lenta de cuatro semanas, el PLGA peso molecular promedio en peso es preferiblemente de desde aproximadamente 30.000 hasta aproximadamente 50.000, más preferiblemente desde aproximadamente 40.000 hasta aproximadamente 50.000 y lo más preferiblemente de aproximadamente 50.000.

35 La razón de ácido láctico/ácido glicólico en el PLGA puede seleccionarse de la siguiente manera según el periodo de liberación lenta seleccionado como diana. Por ejemplo, cuando se selecciona como diana un periodo de liberación de dos a cuatro semanas, la razón es preferiblemente de desde 75/25 hasta 25/75 (p/p), más preferiblemente desde 75/25 hasta 50/50 (p/p) y lo más preferiblemente de 50/50 (p/p).

40 En microesferas preparadas usando PLGA, la tasa de liberación se ralentiza a un tamaño de partícula promedio mayor. Sin embargo, en casos en los que las microesferas se administran por vía subcutánea, intramuscular o local dentro del órgano enfermo, a un tamaño de partícula promedio de 10  $\mu\text{m}$  o menos, cuando las microesferas fluyen hacia fuera al interior del sistema vascular, pueden circular a través de todo el organismo, detenerse en sitios no diana tales como los pulmones, el hígado o los riñones, y liberar el fármaco en esos sitios, como resultado de lo cual puede que no logren aparecer los efectos del fármaco. Por otro lado, a un tamaño de partícula de 70  $\mu\text{m}$  o más, el paso a través de la jeringa (que tiene un calibre de 25G a 27G) usada durante la administración empeora, además de eso, cuando tales microesferas fluyen al interior del sistema vascular, pueden obstruir los capilares, desencadenando un estado isquémico.

45 Por tanto, el tamaño de partícula promedio de las microesferas de la invención puede ajustarse de manera adecuada para evitar los problemas anteriores y según el periodo de liberación lenta seleccionado como diana. Por ejemplo, en casos en los que el periodo de liberación lenta es de desde dos hasta cuatro semanas, el tamaño de partícula promedio es preferiblemente de desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ .

50 En la presente invención, el tamaño de partícula promedio de las microesferas puede ajustarse en combinación adecuada con el tipo de homogeneizador de emulsión usado durante la producción de PLGA (por ejemplo, Phycotron (producido por Nichion Irika Kikai Seisakusho), Homo Mixer (producido por Primix Corporation), Uni Mixer (Primix Corporation), TK Robomix (Primix Corporation) etc.) y la velocidad de rotación durante la agitación.

55 Tal como se usa en el presente documento, "tamaño de partícula promedio de las microesferas de la invención" se refiere al tamaño de partícula promedio (diámetro medio ponderado) de partículas principales de las mismas, y puede medirse, por ejemplo, con un analizador de la distribución de tamaño de partícula de tipo por difracción de láser comúnmente usado (por ejemplo, SALD-2100 (fabricado por Shimadzu Corporation) o un contador Coulter (Multisizer3, fabricado por Beckman Coulter, Inc.). Los tamaños de partícula promedios de microesferas

mencionados en esta memoria descriptiva son valores medidos mediante el método del contador Coulter.

En la presente invención, la razón en peso del presente fármaco y el PLGA en las microesferas, expresada como el número de partes en peso de PLGA por partes en peso del fármaco, es preferiblemente de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10, más preferiblemente desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 9 y lo más preferiblemente desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8.

Cuando la razón de encapsulación del presente fármaco incluido en el PLGA (la "razón de encapsulación" puede convertirse en el contenido correspondiente del presente fármaco) es baja, la dosis de PLGA aumenta. Con respecto a la seguridad del propio PLGA, en desarrollo para su uso, por ejemplo, en inyecciones Leuplin e inyecciones intramusculares Sandostatin LAR, se ha confirmado que PLGA está libre de toxicidad. Se sabe que cuando se administra una gran cantidad, las concentraciones de ácido láctico y/o ácido glicólico hidrolizados aumentan en el sitio de administración, provocando un problema de acidez. Por tanto, es deseable reducir lo más posible la cantidad de PLGA en el momento de la administración; para ello, existe la necesidad de aumentar la razón de encapsulación del presente fármaco. Por otro lado, cuando se aumenta la razón de encapsulación del presente fármaco, la estructura de superficie de las partículas de microesferas se tensa, como resultado de lo cual aumenta la ráfaga inicial. Por tanto, la razón de encapsulación es preferiblemente de desde aproximadamente el 9% hasta aproximadamente el 25% (lo que corresponde a un contenido de fármaco en el que la cantidad de PLGA en partes en peso del fármaco es de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 partes en peso), más preferiblemente desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 22% (lo que corresponde a un contenido de fármaco en el que la cantidad de PLGA en partes en peso del fármaco es de desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 9 partes en peso) y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 11% hasta aproximadamente el 20% (lo que corresponde a un contenido de fármaco en el que la cantidad de PLGA en partes en peso del fármaco es de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso).

En las microesferas de la invención, el contenido, o la razón de encapsulación, del presente fármaco incluido en el PLGA se expresa mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Razón de encapsulación (\%)} = (\text{contenido medido de fármaco/cantidad de microesferas}) \times 100$$

La razón de encapsulación puede medirse mediante el método descrito a continuación en los ejemplos de realización.

En la presente invención, microesferas "de acción prolongada de dos a cuatro semanas" se refiere a microesferas que tienen la capacidad de liberar de manera continua el fármaco encapsulado en las microesferas de la invención durante un periodo de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas tras la administración. Microesferas "de acción prolongada de dos semanas" o "de acción prolongada de cuatro semanas" se refieren a la capacidad de liberar de manera continua una dosis eficaz del fármaco encapsulado en las microesferas de la invención durante un periodo de aproximadamente dos semanas o de aproximadamente cuatro semanas tras la administración. Además, en la presente memoria descriptiva, tanto la expresión "acción prolongada de dos semanas" como la expresión "que tiene un periodo de liberación lenta de dos semanas" tienen el mismo significado, y tanto la expresión "acción prolongada de cuatro semanas" como la expresión "que tiene un periodo de liberación lenta de cuatro semanas" tienen el mismo significado.

En la presente invención, la expresión "liberar el fármaco a una tasa fijada durante aproximadamente cuatro semanas tras la administración" significa que el presente fármaco encapsulado dentro de las microesferas de la invención se libera de manera continua y a una tasa fijada, es decir, de manera constante, durante aproximadamente cuatro semanas tras la administración. En este caso, el método de confirmar que el presente fármaco se libera a una tasa fijada, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica, implica confirmar que, en la prueba de liberación *in vitro* descrita a continuación, la razón restante del presente fármaco cambia linealmente con el tiempo; es decir, experimenta una liberación de orden cero. Mediante esta capacidad, la concentración eficaz del presente fármaco en la sangre o la concentración eficaz del presente fármaco en el sitio de enfermedad pueden mantenerse de manera continua y constante dentro del periodo de liberación indicado anteriormente. Tal como se indicó anteriormente, el periodo de liberación preferido es de dos semanas o de cuatro semanas.

Las concentraciones en sangre del fármaco en ratas que se obtuvieron en los ejemplos de realización descritos a continuación son concentraciones adecuadas para evitar efectos secundarios (por ejemplo, pérdida de peso, diarrea, efectos hipotensivos) en la rata o similar y para manifestar los efectos del fármaco. Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica, esta concentración en sangre puede extrapolarse a la concentración en sangre del fármaco en seres humanos.

Cuando la concentración en sangre del presente fármaco en seres humanos supera aproximadamente 150 ng/ml, además de un efecto de inhibición de la agregación plaquetaria, existe una preocupación de que aparecerán sofocos faciales, pesadez de cabeza y un efecto hipotensivo transitorio. Por otro lado, cuando la concentración en sangre y/o la concentración local en tejido con enfermedad del presente fármaco está por debajo de aproximadamente 0,01 ng/ml, existe la posibilidad de que los efectos del fármaco no aparecerán completamente.

Dado que los resultados de concentración en sangre obtenidos de ratas generalmente se extrapolan a seres humanos usando valores numéricos que oscilan entre aproximadamente 1/100 y aproximadamente 100 veces la concentración en sangre obtenida en ratas, se conjetura que la concentración en sangre del fármaco adecuada para manifestar efectos del fármaco en seres humanos es de desde aproximadamente 0,01 ng/ml hasta aproximadamente 150 ng/ml.

En la presente invención, la expresión "mantener la concentración en sangre del fármaco" significa, cuando se administran sistémicamente las microesferas de la invención, mantener la concentración en sangre del presente fármaco en un intervalo adecuado para evitar efectos secundarios y manifestar los efectos del fármaco en seres humanos. Tal intervalo es preferiblemente de desde aproximadamente 0,01 ng/ml hasta aproximadamente 150 ng/ml y más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 ng/ml hasta aproximadamente 60 ng/ml. En casos en los que las microesferas del presente fármaco se administran al sitio de enfermedad con el fin de mantener la concentración local de manera continua a una alta concentración, la concentración en sangre del presente fármaco que fluye hacia fuera a la sangre, aunque también depende del sitio del órgano, etc. al que se administran las microesferas, es normalmente de desde aproximadamente 1/10 hasta aproximadamente 1/100 del intervalo de desde aproximadamente 0,01 ng/ml hasta aproximadamente 150 ng/ml.

La forma de administración de las microesferas de la invención se muestra a modo de ejemplo mediante inyecciones subcutáneas, intradérmicas, intramusculares e intravasculares, inyecciones al órgano local de enfermedad, tal como inyecciones en el sistema nervioso central o el miocardio, etc.; agentes de inclusión mezclados con cemento óseo, un material de prótesis ósea artificial ( $\beta$ -TCP; fosfato de tricalcio) o un hidrogel de gelatina, etc.; endoprótesis de elución de fármaco (DES); agentes que se administran por vía transmucosa, tales como en el recto, la cavidad uterina o bucal, etc.; agentes orales, supositorios, gotas nasales, inhalantes, colirios; y administración a las cavidades de las articulaciones o al sitio focal, etc. tales como un tumor, etc. o similares.

Manteniendo la razón restante del presente fármaco tras una hora a al menos aproximadamente el 90% en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de dos semanas, o manteniendo la razón restante del presente fármaco tras un día a al menos aproximadamente el 82% en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de cuatro semanas, puede suprimirse una ráfaga inicial. En otras palabras, es posible suprimir la cantidad del presente fármaco inicialmente liberada, suprimir un aumento transitorio de la concentración en sangre del fármaco y suprimir un efecto hipotensivo, etc. que acompaña a un aumento transitorio de la concentración en sangre del fármaco.

En la presente invención, el método de evaluar el grado de ráfaga inicial no está sujeto a ninguna limitación particular. Un ejemplo de un método de este tipo es la prueba de liberación *in vitro* descrita en los siguientes ejemplos de realización. En la presente invención, en una prueba de liberación *in vitro*, se determinó que la ráfaga inicial se suprimía en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de dos semanas manteniendo la razón restante del presente fármaco tras una hora a al menos aproximadamente el 90%, y en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de cuatro semanas manteniendo la razón restante del presente fármaco tras un día a al menos aproximadamente el 82%.

En la presente invención, pueden incluirse aditivos con el fin de aumentar el efecto de supresión de la ráfaga inicial. Los ejemplos preferidos incluyen sustancias que aumentan la viscosidad de la fase acuosa interna o se endurecen bajo los efectos de la temperatura o la adición de iones, sustancias que tienen residuos básicos que llevan una carga eléctrica positiva, y sustancias que interactúan con polímeros macromoleculares y aumentan la viscosidad de emulsiones o/w o w/o/w. Los ejemplos ilustrativos incluyen gelatina, agar, ácido alginico, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol (PEG) o ácido alginico, un aminoácido básico tal como lisina, etc., polipéptidos que contienen un aminoácido básico, bases orgánicas tales como N-metilglucamina, etc., o macromoléculas básicas naturales o sintéticas (incluyendo quitosanos tales como un hidroxipropiltrimonio-quitosano, etc.) o similares (a concentraciones en la fase acuosa interna de desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 80%).

Además, en la presente invención, para aumentar el efecto supresor de la ráfaga inicial, pueden excluirse PLGA que tienen un bajo peso molecular de aproximadamente 3.000 o menos presentes en el momento de la producción de microesferas.

Los métodos para producir las microesferas de la invención se muestran a modo de ejemplo mediante métodos de secado en agua (por ejemplo, métodos de o/w, métodos de w/o, métodos de w/o/w, etc.), métodos de separación de fases, métodos de secado por pulverización, métodos de granulación usando fluidos supercríticos, métodos en general según cualquiera de los anteriores y métodos descritos en los ejemplos de realización en el presente documento o similares.

A continuación se describen en detalle métodos de producción para un método de secado en agua (método de o/w) y un método de secado por pulverización.

(1) Método de secado en agua (método de o/w)

En este método, en primer lugar se prepara una disolución en disolvente orgánico de PLGA o una disolución mixta en disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol de PLGA. El disolvente orgánico tiene preferiblemente un punto de

ebullición de 120°C o menos. Los ejemplos ilustrativos del disolvente orgánico incluyen hidrocarburos halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo, etc.), ésteres alifáticos (por ejemplo, acetato de etilo, etc.), éteres, hidrocarburos aromáticos, cetonas (por ejemplo, acetona, etc.), alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, etc.), ácidos carboxílicos alifáticos (por ejemplo, ácido acético, etc.), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF), etc. Alternativamente, pueden mezclarse dos o más de estos en razones adecuadas y usarse juntos. El disolvente orgánico es preferiblemente diclorometano o acetona. Los ejemplos del disolvente de tipo alcohol incluyen metanol, etanol y propanol, etc. Se prefiere metanol o etanol. La razón volumétrica (v/v) del disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol es preferiblemente de desde aproximadamente 1/1 hasta aproximadamente 20/1 y más preferiblemente desde aproximadamente 2/1 hasta aproximadamente 10/1.

La concentración de PLGA en la disolución en disolvente orgánico o en la disolución mixta en disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol varía según el peso molecular promedio en peso de PLGA, la clase del disolvente orgánico y el disolvente de tipo alcohol, o similares, pero se selecciona generalmente de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 80% (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 40% (p/v) y más preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 20% (p/v).

El presente fármaco se añade y se disuelve en la disolución en disolvente orgánico o la disolución mixta en disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol de PLGA así obtenida. La cantidad de este fármaco que se añade varía con factores tales como periodo de liberación objetivo, etc. pero la concentración de PLGA en la disolución en disolvente orgánico o la disolución mixta en disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol es generalmente de desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 90% (p/v), preferiblemente desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 50% (p/v) y más preferiblemente desde aproximadamente el 0,3% hasta aproximadamente el 30% (p/v). Cuando sea necesario, pueden disolverse antioxidantes y/o aditivos, junto con el fármaco, en la disolución en disolvente orgánico o la disolución mixta en disolvente orgánico/disolvente de tipo alcohol de PLGA.

A continuación, se añade la disolución preparada tal como se describió anteriormente a una fase acuosa y se forma una emulsión de aceite en agua usando un agitador, emulsificador o similar. El volumen de la fase acuosa en este momento es generalmente de desde aproximadamente 1 vez hasta aproximadamente 10.000 veces, preferiblemente desde aproximadamente 2 veces hasta aproximadamente 5.000 veces y más preferiblemente desde aproximadamente 10 veces hasta aproximadamente 1.000 veces el volumen de la fase de aceite. Puede añadirse un agente emulsionante a la fase acuosa. El agente emulsionante puede ser generalmente cualquiera que pueda formar una emulsión de aceite en agua estable. Los ejemplos ilustrativos del agente emulsionante incluyen tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, derivados de polioxietileno-aceite de ricino, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa, lecitina y gelatina, etc. Estos pueden combinarse y usarse de manera adecuada. Un ejemplo preferido del agente emulsionante es poli(alcohol vinílico) (PVA). La concentración del agente emulsionante en la fase acuosa externa es de preferiblemente desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 20% (p/v), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 10% (p/v) y lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,05% hasta aproximadamente el 5% (p/v).

Ajustando adecuadamente la velocidad de agitación durante la formación de la emulsión de aceite en agua, es posible ajustar el tamaño de partícula de las microesferas resultantes. Por ejemplo, a una velocidad de rotación rápida, el tamaño de partícula de las microesferas obtenidas será menor; a la inversa, a una velocidad de rotación más lenta, el tamaño de partícula será mayor.

Se emplea un método comúnmente usado para eliminar por evaporación el disolvente de la fase de aceite. La evaporación del disolvente puede llevarse a cabo a presión normal o con reducción gradual de la presión mientras se agita, por ejemplo, con un agitador o un agitador magnético, etc., o puede llevarse a cabo usando un evaporador rotatorio, etc. mientras se ajusta el grado de vacío. Las microesferas así obtenidas se recogen mediante separación por centrifugación o filtración, entonces se separan principio activo libre, agente emulsionante y similares que se adhieren a las superficies de las microesferas mediante lavado varias veces times con, por ejemplo, una disolución de tensioactivo o alcohol, tras lo cual se dispersan de nuevo las microesferas en agua destilada (agua purificada) y se liofilizan. En el método de aceite en agua descrito anteriormente, las microesferas pueden producirse, en vez de eso, mediante dispersión del fármaco en una disolución en disolvente orgánico de PLGA; es decir, mediante un método de s/o/w. Además, para potenciar la dispersibilidad de las microesferas producidas en una disolución inyectable, suprimir la aglomeración y así obtener una inyección de microesferas de liberación lenta, estable, la liofilización puede llevarse a cabo después de añadir en primer lugar dispersantes, conservantes, agentes de tonicidad, excipientes y antioxidantes. Añadir estos aditivos suprime la tendencia de las microesferas a aglomerarse mutuamente y potencia la capacidad de suspensión, haciendo así posible mejorar la capacidad para pasar a través de una aguja de jeringa.

(2) En casos en los que las microesferas de la invención se producen mediante un procedimiento de secado por pulverización, se pulveriza un disolvente orgánico o emulsión en el que están disueltos el PLGA y los principios activos en la cámara de secado de un secador por pulverización usando una boquilla, haciendo que el disolvente orgánico o el agua dentro de las gotitas de líquido finamente divididas se evapore en un tiempo muy corto, produciendo así microesferas. La boquilla puede ser cualquiera de diversos tipos, incluyendo boquillas de dos



líquidos, boquillas de cuatro líquidos, boquillas presurizadas y boquillas de disco giratorio, etc. En este momento, si se desea, para prevenir la aglomeración de las microesferas de manera simultánea con la pulverización de la emulsión de aceite en agua, es eficaz pulverizar un disolvente orgánico o una disolución acuosa de un antifloculante (por ejemplo, manitol, lactosa, gelatina, etc.) desde otra boquilla. Si es necesario, para las microesferas así

5 obtenidas, la eliminación de humedad y disolvente dentro de las microesferas se lleva a cabo de manera más completa con calentamiento y a una presión reducida.

Los ejemplos de dispersantes incluyen manitol, lactosa, glucosa, Tween 80 (nombre comercial), HCO-60 (nombre comercial), CMC-Na (nombre comercial), alginato de sodio, almidones (por ejemplo, almidón de maíz, etc.), glicina, fibrina y colágeno, etc.

10 Los ejemplos de conservantes incluyen metilparabeno y propilparabeno, etc.

Los ejemplos de agentes de tonicidad incluyen cloruro de sodio, manitol, sorbitol y glucosa, etc.

Los ejemplos de excipientes incluyen manitol, sorbitol, lactosa y glucosa, etc.

15 Los ejemplos de antioxidantes incluyen parabenos (por ejemplo, metilparabeno, etc.), ácido sórbico y sales del mismo, butilhidroxianisol (BHA), dibutilhidroxitolueno (BHT),  $\alpha$ -tocoferol, palmitato de ácido ascórbico, ácido nordihidroxi-guaiarético, ésteres de guaiacol, 1,3-butilenglicol, deshidroacetato de sodio, galato de propilo, etc., sales que producen iones de metales trivalentes (por ejemplo, cloruro de aluminio, alumbre, alantoinato de aluminio).

20 Dado que las microesferas que contienen el presente fármaco y PLGA, descritas en el ejemplo de preparación 2 del documento de la publicación de patente internacional WO 2004/032965 tienen un contenido de fármaco muy bajo de aproximadamente el 5%, debe administrarse una gran cantidad para obtener efectos del fármaco suficientes. Como resultado, la cantidad del propio PLGA administrado también aumenta, lo que puede dar lugar, tal como se mencionó anteriormente a problemas de acidez tras la administración. En la presente invención, se aumentó el contenido de fármaco (razón de encapsulación) con el fin de superar el problema anterior. Sin embargo, aumentar simplemente el contenido de fármaco conduce, tal como se indica en los siguientes ejemplos, a la aparición de una

25 ráfaga inicial del fármaco. Por este motivo, ajustando también adecuadamente y combinando el peso molecular promedio en peso del PLGA, la razón de ácido láctico/ácido glicólico en el PLGA, el tamaño de partícula promedio de las microesferas y la razón en peso del fármaco y el PLGA, se descubrieron microesferas que suprimen una ráfaga inicial del fármaco y pueden lograr la liberación del fármaco a una tasa fijada (liberación de orden cero) a lo largo de un periodo de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas tras la administración. También se descubrió que las microesferas de la invención pueden, durante el periodo de liberación

30 lenta, evitar efectos secundarios y mantener la concentración en sangre del fármaco dentro de un intervalo que es óptimo para que se manifiesten los efectos del fármaco.

35 En la presente invención, para producir microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas y que tienen las características descritas anteriormente, es preferible (1) fijar el tamaño de partícula promedio de las microesferas a desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , (2) fijar la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco a desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 10 partes en peso, y (3) fijar el peso molecular promedio en peso del copolímero de ácido láctico/ácido glicólico a desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 50.000 y fijar la razón de ácido láctico/ácido glicólico a desde aproximadamente 75/25 hasta aproximadamente 50/50; y es incluso más preferible (1) fijar el tamaño de partícula promedio de las microesferas a

40 desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ , (2) fijar la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco a desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso, y (3) fijar el peso molecular promedio en peso del copolímero de ácido láctico/ácido glicólico a desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 50.000 y fijar la razón de ácido láctico/ácido glicólico a aproximadamente 50/50.

45 De lo anterior, para producir microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de dos semanas, (1) el tamaño de partícula promedio de las microesferas se fija a desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ , (2) la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco se fija a desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso, y (3) el peso molecular promedio en peso del copolímero de ácido láctico/ácido glicólico se fija a desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 20.000 y la razón de ácido láctico/ácido glicólico se fija a aproximadamente 50/50. Para producir microesferas que tienen un

50 periodo de liberación lenta de cuatro semanas, (1) el tamaño de partícula promedio de las microesferas se fija a desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ , (2) la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco se fija a desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso, y (3) el peso molecular promedio en peso del copolímero de ácido láctico/ácido glicólico se fija a desde aproximadamente 50.000 y la razón de ácido láctico/ácido glicólico se fija a aproximadamente 50/50.

55 Tal como se mencionó anteriormente con respecto a las microesferas de la invención en las que cada una de las condiciones constituyentes se han fijado dentro de los intervalos preferidos, en las pruebas de liberación *in vitro* descritas en los siguientes ejemplos, dado que las microesferas con un periodo de liberación lenta de dos semanas tienen una razón restante del fármaco tras una hora desde la administración de al menos aproximadamente el 90% y

las microesferas con un periodo de liberación lenta de cuatro semanas tienen una razón restante del fármaco tras un día desde la administración de al menos aproximadamente el 82%, ambas suprimen una ráfaga inicial. Además, tal como se muestra en los siguientes ejemplos, las microesferas anteriores también tienen la capacidad de mantener una concentración eficaz en sangre durante los periodos de liberación lenta respectivos.

5 [Aplicaciones como preparaciones farmacéuticas]

El presente fármaco tiene una acción agonista de receptores de PGI<sub>2</sub>, una acción de inhibición de la TXA<sub>2</sub> sintetasa, una acción de promoción de la producción de factor de reparación endógeno, una acción de inducción de la diferenciación de células madre y una acción de aceleración de la angiogénesis, etc., y por tanto, este fármaco y estas microesferas que contienen este fármaco son útiles como agentes preventivos y/o terapéuticos para diversos tipos de trastornos de órganos, incluyendo enfermedades de los vasos sanguíneos y linfáticos (por ejemplo, arteriosclerosis obliterante (ASO), enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, arteriosclerosis, linfedema, etc.), cardiopatía (por ejemplo, infarto de miocardio, angina, taquiarritmia ventricular, insuficiencia cardiaca congestiva, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada, fibrilación auricular, miocarditis, etc.), enfermedades de degeneración de los nervios (por ejemplo, encefalopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, ictus (infarto cerebral, hemorragia cerebral, etc.), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, neuropatía diabética, estenosis del conducto vertebral, demencia, enfermedad de moyamoya, lesiones de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aneurisma cerebral, etc.), enfermedades pulmonares (por ejemplo, neumonía aguda, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), sarcoidosis, neumonía intersticial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, etc.), enfermedad de los huesos/cartílagos (por ejemplo, osteoartritis (OA) de las vertebrae o la rodilla, etc., artritis reumatoide (AR), osteoporosis, fractura ósea, osteonecrosis, lesión perióstica, terapia de regeneración del esternón asociada con cirugía cardiopulmonar, etc.), enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatitis fulminante, hepatitis aguda, cirrosis, hepatitis crónica, hígado graso, etc.), enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal aguda, trastorno renal isquémico, síndrome de aplastamiento, insuficiencia renal necrótica, enfermedad glomerular, glomerulonefritis, nefroesclerosis, glomerulonefritis proliferativa, enfermedad tubulointersticial, trastornos renovasculares, enfermedad renal quística, nefropatía tóxica, anomalías en el transporte tubular, trastornos renales en pacientes sometidos a diálisis, nefropatía, etc.), enfermedades pancreáticas (por ejemplo, diabetes, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda, etc.), enfermedades del tracto digestivo (por ejemplo, esofagitis, gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, etc.), trasplantes de órganos/tejidos (trasplante de corazón, trasplante de hígado, trasplante de riñón, trasplante de pulmón, trasplante de páncreas, trasplante de colgajo miocutáneo, trasplante de esófago, trasplante de piel, trasplante de vasos sanguíneos/linfáticos, trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante de huesos/cartílagos, etc.), complicaciones diabéticas (por ejemplo, trastornos de los nervios, úlceras cutáneas, nefropatía, etc.), trastornos de células endoteliales vasculares (por ejemplo, prevención de reestenosis tras ACTP (angioplastia coronaria transluminal percutánea, etc.), enfermedades dentales (por ejemplo, enfermedad periodontal, heridas por extracción de dientes, heridas de la cavidad bucal, trastornos de tejido óseo periodontal, periodontitis, etc.), enfermedades de la piel (por ejemplo, úlceras de decúbito, enfermedad de alopecia, alopecia areata, úlceras cutáneas, etc.), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, glaucoma, etc.), enfermedades de los oídos y de la nariz (por ejemplo, sordera, sordera neurosensorial, etc.), fallo multiorgánico (FMO), enfermedades alérgicas y enfermedad del colágeno, o similares. El presente fármaco y las microesferas que lo contienen son especialmente prometedores como agente para prevenir y/o tratar las siguientes enfermedades de los vasos sanguíneos/linfáticos: ASO, enfermedad de Buerger, linfedema y úlceras diabéticas; las siguientes cardiopatías: infarto de miocardio, angina e insuficiencia cardiaca; las siguientes enfermedades pulmonares: fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, asma y EPOC; las siguientes enfermedades renales: insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica y nefropatía diabética; las siguientes enfermedades de los huesos/cartílagos: OA, AR, osteoporosis, fracturas óseas; las siguientes enfermedades de degeneración de los nervios: ictus, enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal y trastornos diabéticos de los nervios; y las siguientes enfermedades hepáticas: hepatitis aguda, hepatitis fulminante, cirrosis y reestenosis tras ACTP.

50 El factor de reparación endógeno cuya producción induce, promueve o amplifica el presente fármaco varía dependiendo de las células de producción, y se sabe que incluye, por ejemplo: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos factores de crecimiento de fibroblastos (a/b FGF), factor de crecimiento de transformación  $\alpha/\beta$  (TGF- $\alpha/\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoyetina, factor de inducción de hipoxia (HIF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF), factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófago (GM-CSF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de condrocitos (GDF) y familias relacionadas de factores de crecimiento. En el transcurso de las presentes investigaciones, se ha descubierto una nueva acción de inducción de la producción de factor derivado de células del estroma (SDF-1). Se ha encontrado que SDF-1 es una citocina que no está limitada sólo a la hemopoyesis, sino que sirve como clave para la regulación de la cinética de células madre y células precursoras en el transcurso del desarrollo. Por ejemplo,

el presente fármaco induce la producción de VEGF-A, HGF, EGF y SDF-1 a partir de fibroblastos. Otros fármacos que producen los factores de reparación endógenos mencionados anteriormente incluyen otros agonistas de receptores de prostaglandina (PG)<sub>2</sub> (por ejemplo, beraprost, iloprost, NS-304, etc.), agonistas de receptor EP2 y EP4 (ambos de los cuales son receptores de PGE<sub>2</sub>) y mezclas de estos agonistas (por ejemplo, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y derivados de los mismos, etc.). Para lograr los objetos de la presente invención, pueden usarse los fármacos mencionados anteriormente en lugar del presente fármaco.

Las microesferas de la invención, cuando se administran por vía subcutánea, intramuscular y/o mediante implantación tisular, se liberan lentamente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, manteniendo así la concentración en tejido local y/o concentración en sangre del fármaco. El fármaco cuya concentración se mantiene de ese modo aumenta el flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos restantes, por ejemplo, mediante efectos vasodilatadores y actividad de inhibición de la agregación plaquetaria, etc., debido a la inherente actividad agonista de receptores de PGI<sub>2</sub> actividad de inhibición de la TEA<sub>2</sub> sintetasa, etc. Además, dado que el presente fármaco promueve la producción de diversos factores de reparación endógenos, tiene un efecto de promoción de la regeneración tisular debido, por ejemplo, a una actividad de promoción de la vascularización/regeneración y una actividad de inducción de la diferenciación de células madre, y por tanto tiene efectos selectivos sobre una variedad de enfermedades.

El periodo de liberación y el método de administración se seleccionan de manera adecuada según la enfermedad y el método de tratamiento de la misma al tiempo que se tienen en cuenta consideraciones tales como seguridad, conveniencia, baja invasividad, la carga sobre el paciente y el cumplimiento o similares.

Dado que las microesferas de la invención tienen un periodo de liberación lenta de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas, de las enfermedades mencionadas anteriormente, son particularmente útiles para prevenir y/o tratar enfermedades de los vasos sanguíneos/linfáticos (por ejemplo, ASO, enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, linfedema, prevención de reestenosis tras ACTP, etc.), cardiopatía (por ejemplo, infarto de miocardio, angina, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada, etc.), enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, nefropatía diabética, etc.), enfermedades de degeneración de los nervios (por ejemplo, ictus, enfermedad de Parkinson, neuropatía diabética, lesiones de la médula espinal, etc.), enfermedades pulmonares (por ejemplo, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar, asma, EPOC, etc.) y enfermedades de los huesos/cartílagos (por ejemplo, osteoporosis, artritis reumatoide, osteoartritis, fractura óseas, enfermedad periodontal, etc.).

Los métodos de administración preferidos para el uso de las microesferas de la invención sobre estas enfermedades incluyen la administración directa al sitio de enfermedad mediante técnicas que conllevan la inclusión en una inyección administrada por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravascular o local en el tejido en el sitio de enfermedad, tal como el sistema nervioso central o el músculo cardíaco; en un agente de inclusión mezclado con cemento óseo, material de prótesis ósea artificial ( $\beta$ -TCP; fosfato de tricalcio), hidrogeles de gelatina o similares; y en hilos para suturas, pernos, películas o láminas; y métodos que implican recubrir sobre una endoprótesis o similares. Además, la administración puede llevarse a cabo en forma de un agente administrado por vía transmucosa en el recto, útero, cavidad bucal, etc.; como un agente oral, supositorio, gotas nasales, inhalante, colirio; a una cavidad de las articulaciones; por vía percutánea, como pomada o como parches cutáneos adhesivos; o al sitio de enfermedad tal como un tumor.

[Toxicidad]

El presente fármaco y las microesferas de la invención tienen una baja toxicidad y son suficientemente seguros para su uso como medicamentos.

#### **Efecto de la invención**

El presente fármaco y las microesferas de la invención son útiles para prevenir y/o tratar cardiopatías, enfermedades de los vasos sanguíneos/linfáticos, enfermedades pulmonares, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades pancreáticas, enfermedades de los huesos/cartílagos, alergias y enfermedades de degeneración de los nervios. Dado que las microesferas de la invención liberan el presente fármaco a una tasa fijada a lo largo de un periodo de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas tras la administración, son particularmente útiles para prevenir y/o tratar ASO, infarto de miocardio, angina, ictus, diabetes y complicaciones de la misma, insuficiencia renal, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, asma, OA, AR y osteoporosis. Además, las microesferas de la invención suprimen una ráfaga inicial del presente fármaco y, durante un periodo de desde aproximadamente dos semanas hasta aproximadamente cuatro semanas tras la administración, pueden mantener la concentración en sangre del fármaco en un intervalo que evita efectos secundarios y es adecuado para que se manifiesten los efectos del fármaco.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra, en una prueba de liberación *in vitro*, el cambio a lo largo del tiempo de la razón restante del fármaco en las microesferas preparadas en el ejemplo de preparación 1-4;

La figura 2 muestra, en una prueba de liberación *in vitro*, el cambio a lo largo del tiempo de la razón restante del fármaco en las microesferas preparadas en el ejemplo de preparación 2-3; y

La figura 3 muestra, en un modelo de 4-VO en rata, la cinética en sangre del presente fármaco cuando se administraron las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 una única vez (10 mg/kg) por vía subcutánea.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se ilustra más completamente a continuación en los ejemplos de preparación y ejemplos de realización.

Ejemplo de preparación 1. Preparación de microesferas (método de o/w)

- 10 Se disolvieron el presente fármaco y PLGA en diclorometano o una disolución mixta de diclorometano y metanol (o dimetilsulfóxido, ácido acético). Se añadió la disolución resultante a desde 300 ml hasta 40.000 ml de una disolución acuosa (ajustada a pH 3,0 con ácido clorhídrico 1 N) de poli(alcohol vinílico) al 0,1% (producido por nacalai tesque) con agitación a desde 1.000 hasta 5.000 rpm usando un instrumento Physcotron (NS-60, fabricado por Nichion Irika Kikai Seisakusho), tras lo cual se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante un periodo de desde 30 segundos hasta 3 minutos para formar una emulsión de aceite en agua. Se agitó la emulsión de aceite en agua a temperatura ambiente durante 4 horas para evaporar el diclorometano y solidificar la fase de aceite, que entonces se centrifugó (3.000 rpm, 10 minutos) usando una centrifugadora (HIMAC-CR5B2, fabricada por Hitachi, Ltd.). Se descartó el sobrenadante, se dispersó el residuo en agua purificada (de 30 a 50 ml) y se centrifugó la dispersión (3.000 rpm, 10 minutos). Volvió a descartarse el sobrenadante, se dispersó el residuo en una disolución de Tween al 0,2% (p/v) (de 30 a 50 ml) y se centrifugó la dispersión (3.000 rpm, 10 minutos). Se descartó el sobrenadante una vez más, tras lo cual volvió a dispersarse el residuo con agua purificada (30 ml), se centrifugó la dispersión resultante (3.000 rpm, 10 minutos) y se descartó el sobrenadante. Se congeló el precipitado con nieve carbónica-metanol, después se secó a presión reducida (12 horas), produciendo así microesferas del presente fármaco. En el ejemplo de preparación 1-3, como PLGA se usó como PLGA-5010 del que se habían cortado los componentes de bajo peso molecular (que tenían pesos moleculares promedios en peso de 1 a 3.000) mediante un método conocido.

Se midió el tamaño de partícula promedio de las microesferas resultantes usando un contador Coulter (Multisizer3, fabricado por Beckman Coulter).

Además, se midió el contenido del presente fármaco (razón de encapsulación) en las microesferas resultantes mediante el siguiente método.

- 30 Se añadieron las microesferas (aproximadamente 10 mg) producidas tal como se describió anteriormente a 50 ml de acetonitrilo y se llevó a cabo un tratamiento por ultrasonidos durante 10 minutos, disolviendo así las microesferas. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución A de patrón interno (IS) y 500  $\mu$ l de una fase móvil (pH 3,0) a, y se mezclaron íntimamente con, 400  $\mu$ l de la disolución preparada tal como se describió anteriormente. Se centrifugó la disolución mixta resultante (12.000 rpm, 3 minutos) y se midió el contenido del presente fármaco presente en 10  $\mu$ l del sobrenadante resultante mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), basándose en lo cual se calculó la razón de encapsulación del fármaco en las microesferas.

$$\text{Razón de encapsulación (\%)} = (\text{contenido de fármaco medido/cantidad de microesferas}) \times 100$$

Condiciones de HPLC

- 40 Aparatos: Cromatógrafo (Shimadzu LC-10AT; fabricado por Shimadzu Corporation), detector UV (Shimadzu SPD-10A; Shimadzu Corporation), analizador de datos (Shimadzu C-R7A; Shimadzu Corporation).

Detección: UV - 265 nm

Columna: SHISEIDO CAPCELLPACK C18 UG120 (4,6 mm de d.i. x 150 mm); fabricada por Shiseido Co., Ltd.

Temperatura de columna: temperatura constante próxima a 25°C

- 45 Fase móvil: Acetonitrilo:agua:trietilamina = 1000:900:3 (se ajusta una disolución mixta de agua y trietilamina a pH 3 con ácido fosfórico)

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min.

Patrón interno (IS): n-propilparabeno

Tiempo de elución del fármaco: 7 minutos

Tiempo de elución del IS: 4 minutos

## Método de preparación de la disolución A de IS

En primer lugar, se pesaron 100 mg del patrón interno y se llevaron a 100 ml con etanol. Entonces se llevaron diez mililitros de la disolución resultante a 100 ml con etanol. Se usó la disolución resultante como disolución A de IS.

- 5 Los resultados de las preparaciones anteriores y las medidas se muestran en las siguientes tablas 1 a 4. En las siguientes tablas, "PL/GA" se refiere a la razón de poli(ácido láctico) (PL)/ácido glicólico (GA) en el PLGA. La velocidad de rotación se refiere a la velocidad de rotación cuando se agita la disolución mixta que contiene el presente fármaco y PLGA y la disolución acuosa de poli(alcohol vinílico) al 0,1% usando un instrumento Phycotron para producir una emulsión de aceite en agua. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se refiere a diclorometano, MeOH se refiere a metanol y DMSO se refiere a dimetilsulfóxido.

10 Tabla 1

Ejemplo de preparación comparativo	Cantidades formuladas					Tamaño de partícula promedio (µm)	Razón de encapsulación (%)
	Cantidad del presente fármaco	Tipo de PLGA (cantidad)	Peso molecular promedio en peso del PLGA	PL/GA	Cantidad de disolvente		
1-1	15 mg	PLGA-5020 (50 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3 ml)	13,2	24,3
1-2	20 mg	PLGA-5020 (50 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (4 ml)	--	33,0
1-3	25 mg	PLGA-5020 (50 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml)	--	45,6
1-4	133 mg	PLGA-5020 (200 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	13,4	37,7
1-5	133 mg	PLGA-5020 (200 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	14,2	38,6
1-6	200 mg	PLGA-5020 (200 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	14,5	50,0
1-7	164 mg	PLGA-5020 (200 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	14,5	45,4

Tabla 2

Ejemplo de preparación comparativo	Cantidades formuladas					Tamaño de partícula promedio (µm)	Razón de encapsulación (%)
	Cantidad del presente fármaco	Tipo de PLGA (cantidad)	Peso molecular promedio en peso del PLGA	PL/GA	Cantidad de disolvente		
2-1	20 mg	PLGA5-50 (100 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 ml) MeOH (0,5 ml)	38,2	15,3
2-2	270 mg	PLGA5-50 (500 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7 ml) MeOH (2,5 ml)	19,5	31,5
2-3	200 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	17,4	48,6
2-4	164 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	16,6	42,1
2-5	133 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	16,6	36,3
2-6	200 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	19,0	49,1
2-7	164 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	16,6	41,1
2-8	133 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	16,9	36,8

Tabla 3

Ejemplo de preparación	Cantidades formuladas					Tamaño de partícula promedio ( $\mu\text{m}$ )	Razón de encapsulación (%)
	Cantidad del presente fármaco	Tipo de PLGA (cantidad)	Peso molecular promedio en peso del PLGA	PL/GA	Cantidad de disolvente		
1-1	20 mg	PLGA-5020 (100 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 ml) MeOH (0,2 ml)	30,0	15,9
1-2	110 mg	PLGA-5020 (500 mg)	10.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	28,0	17,3
1-3	110 mg	PLGA-5020 (500 mg)	10.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	30,6	16,4
1-4	110 mg	PLGA-5020 (500 mg)	20.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (5 ml) MeOH (2,5 ml)	27,8	16,5

Tabla 4

Ejemplo de preparación	Cantidades formuladas					Tamaño de partícula promedio ( $\mu\text{m}$ )	Razón de encapsulación (%)
	Cantidad del presente fármaco	Tipo de PLGA (cantidad)	Peso molecular promedio en peso del PLGA	PL/GA	Cantidad de disolvente		
2-1	20 mg	PLGA5-50 (100 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 ml) MeOH (0,5 ml)	31,2	14,8
2-2	250 mg	PLGA5-50 (1000 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10 ml) MeOH (2 ml)	30,3	14,9
2-3	3320 mg	PLGA5-50 (13300 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (132,9 ml) MeOH (53,1 ml)	31,7	16,5
2-4	44 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2 ml) MeOH (1 ml)	35,0	16,4
2-5	35 mg	PLGA5-50 (200 mg)	50.000	50/50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2 ml) MeOH (1 ml)	34,8	12,2

Ejemplo 1 Prueba de liberación *in vitro*

- 5 Se añadieron las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 1 a un tampón fosfato 1/15 M que contenía Tween 80 al 0,2% (p/v) (pH 7) de tal manera que se fijó la concentración del presente fármaco a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , después se dispersaron uniformemente mediante agitación con vórtex (10 segundos) y sonicación (20 segundos). Se dispensó la dispersión en porciones de 1 ml en recipientes y se mantuvo en reposo en una incubadora a 37°C. Se tomaron muestras de cada recipiente a lo largo del tiempo y se centrifugaron (12.000 rpm, 5 min.), se descartó el sobrenadante y se congeló el sedimento resultante con nieve carbónica-metanol y se secó a presión reducida. A
- 10 continuación, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo a estos sedimentos y se disolvieron las microesferas mediante tratamiento por ultrasonidos. A esta disolución se le añadieron y se mezclaron íntimamente 500  $\mu\text{l}$  de disolución B de IS. A continuación, se pesaron 500  $\mu\text{l}$  de esta disolución mixta, se diluyeron con 500  $\mu\text{l}$  de fase móvil (pH 3) y se centrifugaron (12.000 rpm, 3 min.), tras lo cual se midió mediante HPLC la cantidad restante del fármaco presente dentro de las microesferas en 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante resultante.
- 15 Se calculó la razón restante (%) del presente fármaco tomando que la concentración de fármaco cuando todo el fármaco había eluido (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) era del 100%.

- 20 Tal como se mencionó anteriormente, en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de dos semanas, se considera que se ha suprimido una ráfaga inicial si la razón restante del fármaco tras una hora es de al menos el 90%. De manera similar, en microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de cuatro semanas, se considera que se ha suprimido una ráfaga inicial si la razón restante del fármaco tras un día es de al menos el 82%.

## Condiciones de HPLC

Aparatos: Cromatógrafo (Shimadzu LC-10AT; fabricado por Shimadzu Corporation), detector UV (Shimadzu SPD-10A; Shimadzu Corporation), analizador de datos (Shimadzu C-R7A; Shimadzu Corporation).

Detección: UV - 265 nm

- 25 Columna: SHISEIDO CAPCELLPACK C18 UG120 (4,6 mm de d.i. x 150 mm); fabricada por Shiseido Co., Ltd.

Temperatura de columna: temperatura constante próxima a 25°C

Fase móvil: Acetonitrilo:agua:trietilamina = 1000:900:3 (se ajusta una disolución mixta de agua/trietilamina (900:3) a pH 3 con ácido fosfórico)

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min.

5 Patrón interno (IS): n-propilparabeno

Método de preparación de la disolución B de IS

10 En primer lugar, se pesaron 100 mg del patrón interno y se llevaron a 100 ml con etanol. Entonces se llevaron diez mililitros de la disolución resultante a 100 ml con etanol. Volvieron a llevarse diez mililitros de la última disolución a 100 ml con etanol. Se usó la disolución resultante como disolución B de IS. A continuación en las tablas 5 a 8 se muestran los resultados calculados.

Tabla 5

Ejemplo de preparación comparativo	Razón restante (%)							
	1 hora	6 horas	1 día	4 días	7 días	10 días	14 días	17 días
1-1	73,5	58,1	38,0	18,1	16,1	14,1	7,9	2,6
1-2	36,2	30,7	11,6	1,7	1,1	1,3	1,0	--
1-3	8,9	2,0	1,4	0,9	--	--	--	--
1-4	45,2	41,7	47,8	--	--	--	--	--
1-5	52,8	40,5	46,9	--	--	--	--	--
1-6	54,0	46,9	50,5	--	--	--	--	--
1-7	50,3	44,7	46,8	--	--	--	--	--

Tabla 6

Ejemplo de preparación	Razón restante (%)							
	1 hora	6 horas	1 día	4 días	7 días	10 días	14 días	17 días
1-1	91,9	88,6	83,5	85,4	79,5	58,9	36,6	--
1-2	90,5	85,4	87,3	83,1	78,5	--	75,1	--
1-3	94,3	88,8	88,8	83,6	76,2	--	71,7	--
1-4	90,2	87,9	84,3	79,6	78,9	--	62,5	--

15 A partir de los resultados en la tabla 5, dado que las microesferas obtenidas en los Ejemplos de preparación comparativos 1-1 a 1-7 tenían un pequeño tamaño de partícula promedio y/o una alta razón de encapsulación, en cada caso, la razón restante del fármaco tras una hora fue inferior al 90%, lo que indica que se había producido una ráfaga inicial. En cambio, a partir de los resultados de la tabla 6, las microesferas obtenidas en los ejemplos de preparación 1-1 a 1-4 tenían una razón restante del presente fármaco tras una hora de al menos el 90%, lo que indica que se había suprimido una ráfaga inicial. Además, las microesferas obtenidas en los ejemplos de preparación 1-1 a 1-4 alcanzaron una liberación sostenida del presente fármaco durante aproximadamente dos semanas. Además, tal como puede observarse en la figura 1, que muestra el transcurso a lo largo del tiempo de la razón restante del fármaco en el ejemplo de preparación 1-4, la razón restante del presente fármaco disminuye linealmente a lo largo del tiempo, lo que significa que se logra una liberación de orden cero.

Tabla 7

Ejemplo de preparación comparativo	Razón restante (%)							
	1 hora	6 horas	1 día	7 días	14 días	21 días	28 días	35 días
2-1	--	--	81,5	81,3	83,7	60,4	37,7	5,8
2-2	83,2	82,6	81,5	75,6	70,4	--	43,2	--
2-3	59,2	45,5	46,9	--	--	--	--	--
2-4	53,8	40,6	47,6	--	--	--	--	--
2-5	45,8	35,3	38,8	--	--	--	--	--
2-6	55,1	43,3	54,5	--	--	--	--	--
2-7	54,5	41,3	49,5	--	--	--	--	--
2-8	54,5	41,3	49,5	--	--	--	--	--

Tabla 8

Ejemplo de preparación	Razón restante (%)							
	1 hora	6 horas	1 día	7 días	14 días	21 días	28 días	35 días
2-1	--	--	92,8	85,3	72,1	53,7	22,6	1,3
2-2	--	--	82,0	72,8	40,4	10,9	10,2	--

2-3	90,7	--	84,0	78,2	66,0	50,1	10,1	4,5
2-4	85,4	89,8	85,3	--	--	--	--	--
2-5	86,7	93,5	90,4	--	--	--	--	--

A partir de los resultados en la tabla 7, dado que las microesferas obtenidas en los ejemplos de preparación comparativos 2-1 a 2-8 tenían un pequeño tamaño de partícula promedio y/o una alta razón de encapsulación, la razón restante del presente fármaco tras un día fue inferior al 82% en cada caso, lo que indica que se había producido una ráfaga inicial. En cambio, a partir de los resultados en la tabla 8, las microesferas obtenidas en los ejemplos de preparación 2-1 a 2-5 tenían una razón restante del presente fármaco tras un día de al menos el 82%, lo que indica que se había suprimido una ráfaga inicial. Además, las microesferas obtenidas en los ejemplos de preparación 2-1 a 2-5 alcanzaron una liberación sostenida del presente fármaco durante aproximadamente cuatro semanas. Además, tal como puede observarse en la figura 2, que muestra el transcurso a lo largo del tiempo de la razón restante del fármaco en el ejemplo de preparación 2-3, la razón restante del presente fármaco disminuye linealmente a lo largo del tiempo, lo que significa que se logra una liberación de orden cero.

Se encontró que las microesferas que tenían un periodo de liberación de dos semanas, al prepararse de modo que (1) las microesferas tenían un tamaño de partícula promedio de desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ , (2) la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco era de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso y (3) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tenía un peso molecular promedio en peso de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 20.000 y una razón de ácido láctico/ácido glicólico de aproximadamente 50/50, podían liberar el presente fármaco a una tasa constante. Además, se encontró que las microesferas que tenían un periodo de liberación de cuatro semanas, al prepararse de modo que (1) las microesferas tenían un tamaño de partícula promedio de desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ , (2) la cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco era de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 8 partes en peso y (3) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tenía un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 50.000 y una razón de ácido láctico/ácido glicólico de aproximadamente 50/50, podían liberar el presente fármaco a una tasa constante.

#### Ejemplo 2 Prueba de medición de la concentración en sangre

A ratas Cri:CD macho (Sprague-Dawley) (SPF; Charles River Japan; 8 semanas de edad) se les administraron por vía subcutánea las diversas preparaciones (microesferas) mostradas en la tabla 9 a continuación a una dosis de 5 ml/kg en condiciones no en ayunas. Usando tres animales de cada grupo (6 animales de cada uno de los grupos de prueba 5 y 6), se extrajeron aproximadamente 0,5 ml de sangre heparinizada en condiciones sin anestesia de la arteria carótida de la rata en diversos puntos de extracción de muestras de sangre (3 horas, 8 horas, 24 horas (1 día), 3 días, 7 días, 10 días, 14 días, 17 días, 21 días, 24 días, 28 días tras la administración). Se centrifugó la sangre así obtenida a 12.000 rpm durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante como plasma.

Se llevaron a cabo mediciones de la concentración en sangre del presente fármaco en el plasma resultante mediante un método de CL/EM/EM. El pretratamiento del plasma consistió en añadir una disolución de patrón interno al plasma y diluir con agua, después cargar en una columna de cartucho de extracción en fase sólida (ODS-B) y desproteinización aclarando con agua, seguido por elución con metanol, concentración y secado hasta sequedad. Se disolvió el residuo así obtenido añadiendo el 0,1% de ácido acético acuoso/acetonitrilo, y se vertió la disolución resultante en el aparato de CL/EM/EM.

#### Condiciones de HPLC

HPLC: Shimadzu 10A

Columna: CAPCELLPAK C18MG120 (2,0 mm de d.i. X 150 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Shiseido)

Fase móvil: el 0,1% de ácido acético acuoso/acetonitrilo (50:50, % en volumen)

Velocidad de flujo: 0,2 ml/min.

#### Condiciones de EM/EM

EM/EM: API4000

Modo de ionización: ESI

Modo de polaridad de iones: positivo

Iones monitorizados:

Presente fármaco (ión precursor (m/z)\*: 429,2; ión de producto (m/z)\*: 79,2)

Patrón interno (ión precursor (m/z)\*: 445,4; ión de producto (m/z)\*: 168,1)



\*: razón de masa con respecto a carga

Tiempo de retención para el presente fármaco: 8,15 minutos

Grupo de prueba 1: se administraron microesferas de la preparación de prueba 1 por vía subcutánea a una dosis del presente fármaco de 10 mg/kg.

5 Grupo de prueba 2: se administraron microesferas de la preparación de prueba 2 por vía subcutánea a una dosis del presente fármaco de 10 mg/kg.

Grupo de prueba 3: administrado por vía subcutánea a una dosis del presente fármaco de 10 mg/kg.

Grupo de prueba 4: administrado por vía oral a una dosis del presente fármaco de 10 mg/kg.

10 Se formularon las preparaciones de prueba usadas con los grupos de dosis respectivos tal como se muestra en la tabla 9. Se prepararon cada una de las preparaciones de prueba en general según el método descrito en el ejemplo de preparación 1.

Tabla 9

Preparación de prueba	Cantidades formuladas				Tamaño de partícula promedio (µm)	Razón de encapsulación (%)
	Cantidad del presente fármaco	Tipo de PLGA (cantidad)	Peso molecular promedio en peso del PLGA	PL/GA		
1	3320 mg	PLGA5-50 (13300 mg)	50.000	50/50	31,7	16,5
2	110 mg	PLGA5-50 (500 mg)	20.000	50/50	28,6	16,3

En las tablas 10 y 11 a continuación se muestra el cambio a lo largo del tiempo de las concentraciones en sangre del presente fármaco en cada uno de los grupos de prueba.

15 Tabla 10

Grupo de prueba	Concentración en sangre del presente fármaco (ng/ml)					
	3 horas	8 horas	1 día	3 días	7 días	10 días
1	279,27	57,91	6,11	2,80	1,16	1,79
2	274,80	80,49	5,25	3,97	26,87	27,95
	14 días	17 días	21 días	24 días	28 días	
1	11,36	21,83	6,89	2,08	0,73	
2	8,41	2,28	0,26	0,10	0,05	

Tabla 11

Grupo de prueba	Concentración en sangre de presente fármaco (ng/ml)							
	1 hora	2 horas	4 horas	8 horas	12 horas	1 día	2 días	3 días
3	1754,12	1398,18	685,49	870,43	204,29	1,05	0,15	0,05
4	784,72	981,55	1321,64	705,03	--	79,96	0,05	0,04

20 Tal como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, la administración subcutánea (grupo de prueba 3) y la administración oral (grupo de prueba 4) del presente fármaco mostraron altas concentraciones en sangre desde 1 hora hasta 8 horas tras la administración; dos días tras la administración, la concentración en sangre fue inferior a 0,2 ng/ml. En cambio, de las microesferas de la presente invención, en el grupo de prueba 1 que tenía un periodo de liberación lenta de cuatro semanas, la concentración en sangre del fármaco se mantuvo de manera continua durante el periodo de desde 1 día hasta 28 días tras la administración dentro de un intervalo de desde aproximadamente 0,7 ng/ml hasta aproximadamente 22 ng/ml. De manera similar, en el grupo de prueba 2 que tenía un periodo de liberación lenta de dos semanas, la concentración en sangre del fármaco se mantuvo de manera continua durante el periodo de desde 1 día hasta 14 días tras la administración dentro de un intervalo de desde aproximadamente 4 ng/ml hasta aproximadamente 30 ng/ml. Además, durante el periodo de medición, no se observó ningún signo indicativo de efectos secundarios (por ejemplo, diarrea, acción hipotensiva) en ninguno de los grupos de prueba.

25 Por tanto, de las microesferas mostradas en el ejemplo 1 anterior, tanto las microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de dos semanas como las microesferas que tienen un periodo de liberación lenta de cuatro semanas demostraron la capacidad de mantener de manera continua una concentración en sangre suficiente para que se manifieste la acción farmacológica del presente fármaco al tiempo que se evitan efectos secundarios.

30

## Ejemplo 3 Efectos de promoción de la producción de SDF-1 y EGF del presente fármaco

Se obtuvo y se usó un kit de angiogénesis (Kurabo Industries Ltd.) compuesto por células endoteliales de la vena umbilical humanas normales y fibroblastos cutáneos humanos normales.

## Método de crecimiento

- 5 Usando una incubadora de dióxido de carbono (BNA-121D) y usando cultivo de angiogénesis 2 proporcionado con el kit de angiogénesis como cultivo líquido, se llevó a cabo el cultivo en un entorno húmedo a 37°C con el 5% de dióxido de carbono/el 95% de aire.

## Procedimiento de prueba

- 10 Inmediatamente tras recibirse el kit, se cultivaron las células durante 3 horas, tras lo cual se sustituyó el cultivo líquido y se continuó el cultivo. Tres días después de iniciar el cultivo, volvió a sustituirse el cultivo líquido. Seis días después de iniciar el cultivo, se llevó a cabo el tratamiento con el presente fármaco sustituyendo el cultivo líquido. Se fijó la concentración de tratamiento a 100 nmol/l en cada caso. Se llevó a cabo el tratamiento con DMSO como control negativo. Seis, 24, 48 y 72 horas tras el tratamiento con el presente fármaco, se recogió el sobrenadante de cultivo y se proporcionó para la medición de los factores de crecimiento. Los factores de crecimiento medidos fueron EGF y SDF-1.

Se midió el sobrenadante de cultivo con los siguientes kits de ELISA.

Inmunoensayo de EGF humano (R&D Systems Inc., DEG00)

Inmunoensayo de SDF-1 $\alpha$  humano (R&D Systems Inc., DSA00)

- 20 En la tabla 12 a continuación se muestran los resultados de medición 72 horas tras el tratamiento con el presente fármaco.

Tabla 12

Factor de crecimiento	Grupo control de disolvente (pg/ml)	Grupo de fármaco (pg/ml)
EGF	3830 $\pm$ 423	4995 $\pm$ 442*
SDF-1	304 $\pm$ 24,2	383 $\pm$ 36,0*

\*: P < 0,05 (prueba de la t de Student)

Los resultados anteriores muestran que 72 horas tras el tratamiento con el presente fármaco, EGF y SDF-1 habían aumentado significativamente con respecto al grupo control de disolvente.

- 25 Por tanto, el presente fármaco demostró una actividad angiogénica y una actividad de promoción de la regeneración tisular basándose en estos efectos de promoción de la producción de factores de crecimiento.

## Ejemplo 4. Investigación de efectos en un modelo de oclusión-desobliteración de la arteria carótida común (4-VO)

## 1) Preparación de animales para el modelo de oclusión-desobliteración de la arteria carótida común (4-VO) en rata

- 30 A ratas Crj:MI macho de nueve semanas de edad se les administró por vía intraperitoneal pentobarbital sódico y, mientras estaban bajo anestesia, se fijaron en la posición decúbito prono a un instrumento de estereotaxia cerebral. Se realizó una incisión occipital en la piel y la capa muscular de la región del cuello, se expusieron los forámenes pterigoideos izquierdo y derecho de la primera vértebra cervical y se termocoagularon las arterias vertebrales insertando la punta de un soldador en cada foramen pterigoideo, ocluyendo así permanentemente las arterias vertebrales bilaterales. A continuación, se realizó una incisión central en la región anterior del cuello, se expusieron y se desprendieron las arterias carótidas comunes a ambos lados, se hizo pasar un tubo de silicona bajo las arterias y se colocó de manera anular alrededor de las arterias, tras lo cual se cosió la piel de la región del cuello. En el día tras la cauterización de las arterias vertebrales, se anestesiaron los animales con dietil éter, después se inmovilizaron en la posición decúbito supino. Se expusieron ambas arterias carótidas comunes usando el tubo de silicona que se había colocado en las arterias carótidas comunes en la región del cuello y se ocluyeron temporalmente durante 10 minutos con pinzas Sugita, después volvieron a abrirse. Aparte de isquemia y desobliteración, también se llevó a cabo el mismo procedimiento en un grupo normal (grupo de prueba 1).

## 2) Estudio histopatológico

- 45 Tras la isquemia y desobliteración de cuatro puntos de las ratas, se proporcionó un periodo de dosificación específico de 8 días o 42 días + un periodo libre de fármaco (de al menos 2 semanas). Entonces se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico, se sometieron a perfusión y se fijaron, en orden, con solución salina fisiológica, paraformaldehído al 4% y disolución de Bouin, y se extirparon los cerebros. Se cortó tejido cerca del bregma, 3,3 mm, a partir del cerebro fijado en disolución de Bouin. Tras la deshidratación y la eliminación de cera, se incrustó

la muestra en parafina. Se prepararon cuatro secciones de 10 µm de grosor a partir del sitio bregma, aproximadamente 3,3 mm. Se midió el número de neuronas en CA1 en una de las secciones usando tinción de Nissl. Se tiñó otra de las secciones con PCNA (microglía) y se tiñó una tercera sección con GFAP (glía).

Prueba 1. Estudio sobre la administración subcutánea de prostaglandinas

5 Se investigaron los efectos de la administración subcutánea repetida de ornoprostilo, PGE<sub>1</sub>.αCD y el presente fármaco, dos veces al día durante 42 días tras la creación del modelo de 4-VO en rata (10 minutos de oclusión y reperusión), sobre el número de neuronas en la región de CA1 del hipocampo.

10 Los grupos consistieron en un grupo normal (grupo de prueba 1, evaluado tras recibir medio durante 42 días), grupos control (grupo de prueba 2, evaluado tras recibir disolvente durante 8 días; grupo de prueba 3, evaluado tras recibir medio durante 42 días), presente fármaco (grupo de prueba 4, administrado repetidamente por vía subcutánea 10 mg/kg dos veces al día durante 42 días), ornoprostilo (grupo de prueba 5, administrado repetidamente por vía subcutánea 0,1 mg/kg dos veces al día durante 42 días) y grupos de prostaglandina E1 (PGE<sub>1</sub>.αCD) (grupo de prueba 6, administrado repetidamente por vía subcutánea 1,5 mg/kg dos veces al día durante 42 días; grupo de prueba 7, administrado repetidamente por vía subcutánea 3 mg/kg dos veces al día durante 42 días). La dosis de PGE<sub>1</sub>.αCD es la dosis como PGE<sub>1</sub>. El presente fármaco y ornoprostilo se fijaron cada uno a la dosis máxima a la que no se muestra acción hipotensiva.

20 Evaluación: Tras 8 días en el grupo de prueba 2, y tras 42 días en los demás grupos de prueba, se sometieron los cerebros a perfusión y se fijaron, después se tiñeron con Nissl, se tiñeron con H-E o se tiñeron con GFAP, y se contó el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo. (Se contó el número de neuronas en 10 lugares en cada una de las regiones CA1a, CA1b y CA1c, y en 20 lugares en los lados izquierdo y derecho fotografiando cada lugar y contando el número de neuronas maduras con un analizador de imágenes (Win ROOF V3,6; Mitani Corporation)).

A continuación en la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos con la tinción con Nissl.

Tabla 13

Grupo de prueba	Número de neuronas por unidad de longitud (recuento/mm)	
	Izquierda (L)	Derecha (R)
1	92,2 ± 19,1	96,4 ± 16,9
2	43,2### ± 12,8	33,0### ± 13,2
3	58,7### ± 20,4	54,7### ± 29,5
4	134,4** ± 25,7	123,8** ± 30,9
5	134,6** ± 32,7	141,1** ± 17,8
6	105,7 ± 24,0	114,7** ± 22,0
7	146,2** ± 39,6	127,6** ± 38,8

##: P < 0,01 frente al grupo de prueba 1 (prueba de Dunnett)

25 \*, \*\*: P < 0,05, P < 0,01 frente al grupo de prueba 3 (prueba de Dunnett)

Se administraron el medio, el presente fármaco, PGE<sub>1</sub>.αCD y ornoprostilo por vía subcutánea una vez inmediatamente tras la isquemia y reperusión de 4-VO, y dos veces al día desde el día 1 hasta el día 8 de la isquemia o desde el día 1 hasta el día 42 de la isquemia.

30 Tras 8 días o 42 días, se sometió el cerebro a perfusión y se fijó, tras lo cual se midieron los números de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo izquierda y derecha por medio de tinción con Nissl.

35 Como resultado, con respecto al grupo normal (grupo de prueba 1), en la isquemia y desobliteración (4-VO), las neuronas de la región CA1 del hipocampo mostraron una disminución significativa en el día 8 (grupo de prueba 2) y el número de células no aumentó incluso tras 42 días (grupo de prueba 3). En cambio, en el día 42 de la isquemia, las administraciones subcutáneas del presente fármaco, ornoprostilo y PGE<sub>1</sub>.αCD (tanto a 1,5 mg/kg como a 3 mg/kg) mostraron todas un aumento significativo en el número de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo con respecto al grupo al que se le administró el medio (grupo de prueba 3). Se confirmó que la administración de cada una de las sustancias de prueba tenía una acción de prevención de la neuropatía y/o una acción que promovía la regeneración de neuronas.

Prueba 2. Estudio de la administración oral repetida del presente fármaco

40 Se confirmó la acción de promoción de la regeneración de neuronas mediante la administración oral repetida dos veces al día del presente fármaco tras un trastorno, y se investigaron los efectos de tal administración sobre el deterioro en el aprendizaje del laberinto de agua.

Grupos: Cada grupo consistía en n=12 animales

(1) Evaluación del número de neuronas en la región CA1 del hipocampo cortada del cerebro

Grupo de prueba 1: 4-VO + medio, 8 días

Grupo de prueba 2: 4-VO + presente fármaco, 10 mg/kg, dos veces al día, durante 8 días

5 Grupo de prueba 3: 4-VO + presente fármaco, 1 mg/kg, dos veces al día, durante 42 días (sólo evaluación del número de neuronas)

(2) Evaluación del número de neuronas en la región CA1 cortada del cerebro (grupos 4 a 7) tras la medición de la capacidad de aprendizaje del laberinto de agua (grupos 4 a 7)

Grupo de prueba 4: normal (grupo simulado) + medio, 42 días (control normal)

Grupo de prueba 5: 4-VO + medio, 42 días (control de disolvente)

10 Grupo de prueba 6: 4-VO + presente fármaco, 10 mg/kg, dos veces al día durante 42 días

Grupo de prueba 7: 4-VO + disolvente durante 8 días + presente fármaco, 10 mg/kg, dos veces al día, durante 34 días (evaluación de actividad regenerativa)

15 (3) Patología: Se llevó a cabo la perfusión y la fijación del cerebro en el día 8 en los grupos de prueba 1 y 2, y en el día tras la prueba de capacidad de aprendizaje del laberinto de agua en los grupos 4 a 7. Entonces se contó el número de neuronas mediante el mismo método que el descrito anteriormente en la prueba 1. En el grupo de prueba 3, tras detenerse la administración de fármaco, se fijaron los cerebros al mismo tiempo que en los grupos de prueba 4 a 7.

(4) Medición de la capacidad de aprendizaje del laberinto de agua

20 Usando los grupos de prueba 3 a 7, se investigaron las funciones motrices con un laberinto de agua de Morris de tal manera que se evitó el sesgo entre los grupos.

Aparato para someter a prueba la capacidad de aprendizaje del laberinto de agua

25 Se usaron una plataforma acrílica transparente (aproximadamente 12 cm de diámetro y aproximadamente 30 cm de altura) que no puede detectarse visualmente y una piscina circular (aproximadamente 148 cm de diámetro y aproximadamente 44 cm de altura) fabricada de cloruro de vinilo gris y llena de agua (temperatura del agua, de 17 a 18°C) hasta una altura de aproximadamente 32 cm de modo que la plataforma quedaba oculta por el agua.

Se dividió la piscina en cuatro cuadrantes, se colocó la plataforma en el centro del cuarto cuadrante (aproximadamente 36 cm desde el centro de la piscina) y se colocaron bombillas en el perímetro de la piscina para proporcionar una referencia espacial.

Medición de ensayos de adquisición de aprendizaje del laberinto de agua

30 Tras la dosis de fármaco final, se proporcionó un periodo libre de fármaco de al menos 2 semanas, tras lo cual se colocó la rata en la piscina desde uno de varios puntos A a E con su cabeza dirigida a la pared de la piscina circular y se midió el tiempo que tardó en alcanzar la plataforma (latencia de objetivo; segundos) con un cronómetro (el tiempo de medición fue un máximo de 90 segundos). Cuando la rata alcanzó la plataforma en un plazo de 90 segundos y permaneció sobre la plataforma durante 30 segundos, se consideró que era consciente de la ubicación de la plataforma y se terminó la medición. A las ratas que no alcanzaron la plataforma se les asignó una latencia de objetivo de 90 segundos.

40 Se llevaron a cabo mediciones de latencia de objetivo dos veces al día (una vez por la mañana y una vez por la tarde) en los días 1 a 4. Se colocó la rata en la piscina desde los diversos puntos A a E con su cabeza dirigida a la pared de la piscina circular. Se registró el trayecto de nado de la rata con un monitor de TV con una cámara de vídeo instalada sobre la piscina y se analizaron el tiempo de nado, la distancia recorrida y el número de pases con un analizador de movimiento de imágenes de vídeo (SMART, Panlab). Además, se registraron los movimientos de nado usando un grabador de vídeo en DVD. En las tablas 14 a 17 a continuación se presentan los resultados.

1) Número de neuronas en la región CA1 del hipocampo de los grupos de prueba 1 y 2

Tabla 14

Grupo de prueba	Número de neuronas por unidad de longitud (recuento/mm)	
	Izquierda (L)	Derecha (R)
1	11,03 ± 6,01	20,05 ± 39,00
2	90,97** ± 53,70	89,70** ± 51,89

\*\* : P < 0,01 frente al grupo frente al grupo de prueba 1 (prueba de Dunnett)

Tal como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, la administración oral tras la isquemia y reperusión en el grupo de prueba 2 ya mostró en el día 8 una supresión significativa en la disminución del número de neuronas en la región CA1 del hipocampo con respecto al grupo de prueba 1, confirmando por tanto la existencia de una actividad de prevención de neuropatía.

2) Número de neuronas en la región CA1 del hipocampo de los grupos de prueba 3 a 7

Tabla 15

Grupo de prueba	Número de neuronas por unidad de longitud (recuento/mm)	
	Izquierda (L)	Derecha (R)
4	163,13 ± 14,21	162,39 ± 10,13
5	24,08** ± 24,89	19,69** ± 22,45
3	73,65# ± 49,14	63,09# ± 43,97
6	91,22 <sup>aa</sup> ± 49,48	76,44 <sup>aa</sup> ± 47,56
7	48,35 <sup>+</sup> ± 34,39	43,29 <sup>+</sup> ± 32,93

\*\* : P < 0,01 frente al grupo de prueba 4 (prueba de la t de Aspin-Welch o prueba de la t de Student)

# : P < 0,05 frente al grupo de prueba 5 (prueba de la t de Aspin-Welch)

aa : P < 0,01 frente al grupo de prueba 5 (prueba de Dunnett)

+ : P < 0,1 frente al grupo de prueba 5 (prueba de la t de Student)

El grupo al que se le administró el medio (grupo de prueba 5, tras 42 días en un modelo de 4-VO) mostró una disminución significativa del número de neuronas en CA1 del hipocampo con respecto al grupo normal (grupo de prueba 4). En cambio, la administración oral del presente fármaco a un nivel de 1 mg/kg (grupo de prueba 3) y un nivel de 10 mg/kg (grupo de prueba 6) mostraron aumentos significativos del número de neuronas en la región CA1 del hipocampo con respecto al grupo de prueba 4. Además, se sabe que, en este sistema de evaluación, la muerte de neuronas en la región CA1 del hipocampo es completa tras aproximadamente 5 días de isquemia y desobliteración. Incluso cuando se administró medio hasta el día 8 y se administraron repetidamente por vía oral 10 mg/kg del presente fármaco durante 34 días comenzando en el día 9 (grupo de prueba 7), se observó una tendencia de aumento en el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo. Por tanto, además de una actividad de protección de neuronas, se confirmó que el presente fármaco tenía una actividad de promoción de la regeneración de neuronas.

3) Medición de la capacidad de aprendizaje del laberinto de agua

(1) Tiempo hasta que la rata alcanza la plataforma (latencia de objetivo, segundos)

Tabla 16

Grupo de prueba	Número de animales	Latencia de objetivo (segundos)					AUC para los ensayos 1 a 8	AUC para los días 1 a 4 (promedio)
		Ensayos de adquisición						
		Día 1 (promedio)	Día 2 (promedio)	Día 3 (promedio)	Día 4 (promedio)	Ensayos 1 a 8 (promedio)		
4	12	66,9 ± 16,0	47,7 ± 27,5	28,0 ± 20,9	27,6 ± 24,1	42,5 ± 12,3	289,5 ± 88,9	122,9 ± 38,3
5	16	76,6 ± 20,7	65,9 ± 21,1	53,8 ± 24,0	37,6 ± 22,3	58,5 ± 16,2	405,7### ± 115,7	176,8 ± 50,5
6	12	71,8 ± 18,3	58,8 ± 22,1	41,3 ± 28,8	33,9 ± 23,2	51,5 ± 11,9	358,3* ± 89,9	152,9 ± 42,7
7	12	73,8 ± 15,2	55,4 ± 29,6	41,7 ± 26,7	25,8 ± 15,2	49,2 ± 10,1	338,4** ± 80,8	146,9 ± 40,5

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

### : P < 0,01 frente al grupo 4

\*, \*\*: P < 0,1, P < 0,05 frente al grupo 5 (análisis de dos factores de la varianza (8 ensayos))

(2) Distancia recorrida hasta que la rata alcanza la plataforma

Tabla 17

Grupo de prueba	Número de animales	Latencia de objetivo (segundos)					AUC para los ensayos 1 a 8	AUC para los días 1 a 4 (promedio)
		Ensayos de adquisición						
		Día 1 (promedio)	Día 2 (promedio)	Día 3 (promedio)	Día 4 (promedio)	Ensayos 1 a 8 (promedio)		
4	12	1458,1 ± 417,6	1250,5 ± 573,5	846,2 ± 654,6	720,9 ± 463,7	1068,9 ± 280,0	7498,1 ± 2087,8	3186,2 ± 945,0
5	16	1684,7 ± 474,3	1733,2 ± 518,1	1476,4 ± 583,8	1108,8 ± 572,3	1500,8 ± 378,4	10534,0### ± 2710,8	4606,4 ± 1174,6
6	12	1513,2 ± 414,1	1531,8 ± 558,8	1176,1 ± 773,4	936,6 ± 525,6	1289,4 ± 296,7	9190,9** ± 2281,9	3932,8 ± 1115,1
7	12	1571,5 ± 356,1	1492,1 ± 743,7	1164,3 ± 603,5	816,7 ± 409,4	1261,2 ± 214,7	8901,5** ± 1807,4	3850,5 ± 832,5

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

###: P < 0,01 frente al grupo 4

\*\* : P < 0,05 frente al grupo 5 (análisis de dos factores de la varianza (8 ensayos))

- 5 El grupo control de disolvente (grupo de prueba 5) mostró una prolongación significativa en la latencia de objetivo (segundos) y la distancia recorrida con respecto al grupo normal (grupo de prueba 4) en los ensayos de capacidad de aprendizaje del laberinto de agua. Tanto el grupo al que se le administraron por vía oral 10 mg/kg, dos veces al día, del presente fármaco (grupo de prueba 6) como el grupo al que se le administró el medio hasta el día 8 y se le administraron por vía oral 10 mg/kg, dos veces al día, del presente fármaco comenzando en el día 9 (grupo de prueba 7) mostraron una reducción significativa de la latencia de objetivo (segundos) y la distancia recorrida en los ensayos de capacidad de aprendizaje del laberinto de agua con respecto al grupo control de disolvente (grupo de prueba 5) (prueba: análisis de dos factores de la varianza; 8 ensayos).

15 Por tanto, se confirmó que el presente fármaco, al mostrar una actividad de protección de los nervios y una actividad de promoción de la regeneración de neuronas endógenas, no sólo aumenta el número de neuronas, sino que también ayuda en la recuperación de discapacidades en la función del aprendizaje asociadas con la neuropatía.

Prueba 3. Estudio de una única administración subcutánea de microesferas de la presente invención; estudio de la actividad de promoción de la regeneración de neuronas y efectos sobre farmacología del comportamiento

(1) Influencia sobre el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo

20 Este estudio se realizó de la misma manera que en la prueba 1 y se evaluaron los resultados basándose en el número de neuronas en CA1 del hipocampo.

25 En un modelo de 4-VO en rata, tras 10 minutos de oclusión y reperusión, se administraron por vía subcutánea sólo una vez las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 y se evaluó la influencia sobre el número de neuronas en la región CA1 del hipocampo 42 días después. La dosis indica la cantidad del presente fármaco incluida en las microesferas. Las dosis de PLGA.ME en los grupos de prueba 1 y 2 fueron las mismas que en los grupos de prueba 3, 5, 6 y 7.

En la tabla 18 a continuación se muestran los grupos.

Tabla 18

Grupo de prueba	Sustancia administrada	Dosis / método de administración	Número de animales
1	Normal (medio)	0 mg/kg (una única administración subcutánea)	10
2	Control de disolvente	0 mg/kg (una única administración subcutánea)	11
3	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	10 mg/kg (una única administración subcutánea justo después de la isquemia y reperusión)	14
4	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	30 mg/kg (una única administración subcutánea justo después de la isquemia y reperusión)	11
5	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	10 mg/kg (una única administración subcutánea 48 horas tras la isquemia y reperusión)	11
6	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	10 mg/kg (una única administración subcutánea 7 días tras la isquemia y reperusión)	9

7	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 (para medir la cinética en sangre)	10 mg/kg (una única administración subcutánea justo después de la isquemia y reperfusión)	6
---	---	---	---

Grupo de prueba 1: Grupo normal (grupo simulado); a ratas normales en las que se realizó una cirugía simulada se les administró una única administración subcutánea de PLGA.ME solo como control negativo.

Grupo de prueba 2: Grupo control de disolvente; a ratas 4-VO se les administró una única administración subcutánea de PLGA.ME solo como control negativo.

5 Grupo de prueba 3: Las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 se administraron por vía subcutánea una vez (10 mg/kg) justo después de la isquemia y reperfusión 4-VO.

Grupo de prueba 4: Las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 se administraron por vía subcutánea una vez (30 mg/kg) justo después de la isquemia y reperfusión 4-VO.

10 Grupo de prueba 5: Las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 se administraron por vía subcutánea una vez (10 mg/kg) 48 horas tras la isquemia y reperfusión 4-VO.

Grupo de prueba 6: Las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 se administraron por vía subcutánea una vez (10 mg/kg) 7 días tras la isquemia y reperfusión 4-VO.

15 Grupo de prueba 7: (uso para medición de la concentración en sangre) Las microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2 se administraron por vía subcutánea una vez (10 mg/kg) justo después de la isquemia y reperfusión 4-VO (como en el grupo de prueba 3).

20 Tras 42 días, se sometieron los cerebros de rata a perfusión y se fijaron, tras lo cual se tiñeron con Nissl las neuronas piramidales de las regiones CA1 del hipocampo izquierda y derecha y se determinaron los números de neuronas en las regiones CA1 del hipocampo (se contó el número de neuronas en 10 lugares en cada una de las regiones CA1a, CA1b y CA1c y en 20 lugares en los lados izquierdo y derecho usando un analizador de imágenes). Los resultados se muestran en la tabla 19.

25 Como resultado, el grupo control (grupo de prueba 2) mostró una disminución significativa en el número de neuronas piramidales en CA1 del hipocampo con respecto al grupo normal (grupo de prueba 1) y se encontró que todos los grupos a los que se les administraron por vía subcutánea las microesferas de la invención (grupos de prueba 3 a 6) tenían un número significativamente aumentado de neuronas piramidales en CA1 del hipocampo con respecto al grupo control (grupo de prueba 2).

Tabla 19

Grupo de prueba	Número de neuronas por unidad de longitud (recuento/mm)	
	Izquierda (L)	Derecha (R)
1	175,3 ± 14,0	179,7 ± 11,8
2	9,1 <sup>##</sup> ± 3,2	9,1 <sup>##</sup> ± 2,9
3	25,6 <sup>**</sup> ± 14,0	28,7 <sup>**</sup> ± 15,9
4	34,1 <sup>**</sup> ± 16,7	31,1 <sup>**</sup> ± 24,5
5	47,2 <sup>++</sup> ± 33,2	48,9 <sup>++</sup> ± 38,3
6	47,7 <sup>+</sup> ± 41,6	51,7 <sup>+</sup> ± 41,7

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

<sup>##</sup>: p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Aspin-Welch)

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 2 (prueba de Dunnett)

30 <sup>+</sup>, <sup>++</sup>: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 2 (prueba de la t de Aspin-Welch)

35 A partir de los resultados anteriores, se confirmó que una única administración subcutánea de las microesferas de la invención (grupos de prueba 3 a 6) tenía una excelente actividad de prevención de neuropatía y/o actividad de promoción de la regeneración de neuronas. Además, incluso con una única administración subcutánea tras 7 días en el grupo 6, el número de neuronas aumentó significativamente con respecto al grupo 2, demostrando la presencia de una acción de promoción de la regeneración de neuronas.

## 2) Prueba de respuesta a evitación pasiva

Se usó un aparato de respuesta de evitación pasiva de tipo de paso a través (SHOCK SCRAMBLER, Takei Scientific Instruments Co., Ltd.). El aparato tenía, divididas por una puerta de guillotina central, una sala iluminada (260 (W) x 110 (D) x 290 (H)) y una sala a oscuras (320 (W) x 320 (D) x 340 (H)) que confiere un estímulo eléctrico desde una

rejilla en el suelo. Se colocó una rata en la sala iluminada, se abrió silenciosamente la puerta de guillotina y se midió el tiempo que transcurrió desde que la rata examinó la apertura hasta que entró en la sala a oscuras (latencia de respuesta). En cuanto la rata entró en la sala a oscuras, se cerró la puerta de guillotina y se aplicó un estímulo eléctrico (1 mA, 3 s, método aleatorizado). Esto constituyó un ensayo de adquisición. Se llevó a cabo el ensayo de adquisición dos días antes de la extirpación del cerebro. Se llevó a cabo un ensayo de retención un día después del ensayo de aprendizaje. Como en el ensayo de adquisición, se colocó la rata en una sala iluminada, se abrió silenciosamente la puerta de guillotina y se midió el tiempo que transcurrió desde que la rata examinó la apertura hasta que entró en la sala a oscuras (latencia de respuesta). Se fijó la latencia de respuesta del ensayo de retención a un máximo de 600 segundos. A continuación en la tabla 20 se muestran los resultados.

10 Tabla 20

Grupo de prueba	Latencia de respuesta (s)		Número de animales
	Ensayo de adquisición	Ensayo de retención	
1	66,7 ± 63,1	600,0 ± 0,0	10
2	30,6 ± 12,1	305,0# ± 284,0	11
3	39,3 ± 19,4	432,8 ± 274,3	14
4	33,8 ± 22,3	345,7 ± 280,3	11
5	57,0 ± 68,6	600,0* ± 0,0	11
6	36,8 ± 31,6	434,6 ± 260,5	9

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

#:  $p < 0,05$  frente al grupo 1 (prueba de Wilcoxon)

\*:  $p < 0,05$  frente al grupo 2 (prueba de Wilcoxon)

15 El grupo de prueba 2 tenía, con respecto al grupo de prueba 1, una latencia de respuesta en el ensayo de retención acortada, lo que indica que había surgido una discapacidad de la memoria/aprendizaje. Por otro lado, los grupos de prueba 3 a 6 mostraron, con respecto al grupo de prueba 2, una latencia de respuesta en el ensayo de retención prolongada. En particular, el grupo de prueba 5 mostró una prolongación significativa en la latencia de respuesta.

20 Por tanto, las microesferas de la presente invención demostraron una actividad de prevención de neuropatía y/o una actividad de promoción de la regeneración de neuronas, y por tanto se confirmó que ayudaban en la recuperación funcional de neuropatía.

25 A partir de los resultados anteriores, con respecto a la administración subcutánea repetida del presente fármaco (prueba 1) y a la administración oral repetida del presente fármaco (prueba 2), se encontró que una única administración subcutánea de las microesferas de la invención (grupos de prueba 3 a 6) tenía, en cuanto a eficacia, seguridad, dosificación acumulativa del presente fármaco y cumplimiento con la dosis, excelentes actividades de prevención de neuropatía y de promoción de la regeneración de neuronas, y se confirmó la recuperación funcional de trastornos de la memoria y del aprendizaje.

3) Medición de la concentración en sangre

Usando muestras del grupo de prueba 7, la figura 3 muestra resultados que ilustran la cinética en sangre del presente fármaco. El procedimiento fue el mismo que el usado en el ejemplo 2.

30 A partir de lo anterior se confirmó, en ratas 4-VO, que la concentración en sangre del presente fármaco se mantiene de manera continua en un intervalo de desde 0,1 hasta 10 ng/ml durante un periodo de cuatro semanas comenzando 24 horas tras una única administración subcutánea de las microesferas de la presente invención.

35 Lo anterior sugiere que las microesferas de la invención, dado que tienen una actividad de promoción de la regeneración de neuronas, son útiles para prevenir y/o tratar enfermedades de degeneración de los nervios, y particularmente ictus.

Ejemplo 5 Influencia sobre la velocidad de conducción nerviosa en un modelo de diabetes inducida por STZ

1) Preparación de animales para modelo de diabetes inducida por STZ

40 A ratas Sprague-Dawley hembra (de 8 a 11 semanas de edad; Japan SLC, Inc.) se les administraron por vía intraperitoneal 40 mg/kg de un tampón citrato (pH, aproximadamente 4,5) de estreptozotocina (STZ; Sigma). A un grupo control normal sólo se le administró por vía intraperitoneal el tampón citrato.

2) Medición de la glucemia

Dos semanas tras la administración de STZ, se midieron la glucemia, la velocidad de conducción nerviosa y el peso corporal, se dividieron los animales en grupos de manera uniforme para estas propiedades, y se comenzó la administración de la sustancia de prueba. Para determinar el cambio a lo largo del tiempo en la glucemia, se midió el



nivel de glucemia 4, 8 y 12 semanas tras el inicio de la administración de la disolución de prueba (en el día antes de la medición de la velocidad de conducción nerviosa). Se midió el nivel de glucemia de sangre extraída de la vena caudal usando un analizador de glucemia (Antsense II; Bayer-Sankyo). Tras la medición de la glucemia 12 semanas después, se privaron los animales de alimentos durante al menos 16 horas y se midieron el azúcar y la insulina en sangre en ayunas. Además, se llevó a cabo una prueba de tolerancia a 2 g de glucosa en la que se extrajo sangre de manera similar 30, 60 y 120 minutos tras la carga con azúcar y se midieron los valores de azúcar e insulina en sangre.

3) Medición de la velocidad de conducción nerviosa

Dos semanas tras la administración de STZ, y 4, 8 y 12 semanas tras el inicio de la administración de la disolución de prueba, se anestesiaron los animales mediante la administración intraperitoneal de 30 a 45 mg/kg de pentobarbital. Se retiró pelo de la región dorsolumbar de la rata y se inmovilizó el animal en la posición decúbito prono, tras lo cual se insertó un electrodo de aguja para la estimulación distal (NEC Medical Systems) cerca del nervio ciático, se insertó un electrodo de aguja para la estimulación proximal cerca del tendón de Aquiles en el mismo lado y se insertó un electrodo de aguja de registro (NEC Medical Systems) en el músculo plantar en el mismo lado. Tras comprobar que la temperatura corporal estaba en un intervalo 37 a 38°C, se aplicó una estimulación con ondas cuadradas (0,5 Hz, 0,1 mseg, tensión inferior a la máxima) a los electrodos de estimulación distal y proximal usando un estimulador eléctrico (SEN-3301; Nihon Kohden Corporation). Se condujo hacia fuera el potencial provocado a través de un electrodo de medición, se introdujo a través de un amplificador bioeléctrico (AB-621G, Nihon Kohden Corporation) a un programa de cálculo del promedio de electromiograma provocado (MTS50061C, Medical Try System) y se calculó el promedio diez veces, y se calculó la velocidad de conducción nerviosa a partir de los tiempos de conducción distal y proximal respectivos y las distancias de intervalos entre electrodos. Se llevó a cabo la medición en la pata izquierda (lado tratado) y la pata derecha (lado no tratado) en cada grupo de prueba y se usaron los valores promedio respectivos de las mismas como datos.

4) Método de agrupamiento

En los grupos 2 a 5, se midió el nivel de glucemia con alimentación dos semanas tras la administración de STZ. De las ratas con niveles de glucemia superiores a 300 mg/dl, se excluyeron las ratas con diabetes intensa de las mismas y se usaron las ratas restantes como animales de modelo de diabetes. Se formaron grupos de tal manera que se prepararon los grupos respectivos de manera uniforme con respecto a la velocidad de conducción nerviosa, el nivel de glucemia y el peso corporal.

5) Método de administración

Se llevó a cabo la administración según la vía prevista de administración para su uso clínico. En el grupo de prueba 3, se llevó a cabo la administración forzada por vía oral usando un cilindro de jeringa desechable y una sonda gástrica para ratas. En el grupo de prueba 4, se llevó a cabo la administración intramuscular de manera uniforme en cuatro lugares dentro del músculo a lo largo del nervio ciático en la parte femoral de la pata izquierda. Para la administración subcutánea en el grupo de prueba 5, se anestesiaron los animales con éter y se llevó a cabo la administración subcutánea en la región dorsal usando un cilindro de jeringa desechable y una aguja de jeringa 25G desechable. Se calculó el volumen de disolución administrado basándose en el último peso corporal.

6) Grupos

A continuación en la tabla 21 se muestra la composición de los grupos.

Tabla 21

Grupo de prueba	Sustancia administrada	Dosis/método de administración	Número de animales
1	normal (medio)	0 mg/kg (administración intramuscular intermitente administrada una vez cada 3 semanas)	10
2	Control de disolvente	0 mg/kg (administración intramuscular intermitente administrada una vez cada 3 semanas)	10
3	Presente fármaco	3 mg/kg (administración oral repetida dos veces al día)	10
4	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	10 mg/kg (administración intramuscular intermitente administrada una vez cada 3 semanas)	10
5	Microesferas producidas en el ejemplo de preparación 2-2	10 mg/kg (administración subcutánea intermitente administrada una vez cada 3 semanas)	10

La cantidad de microesferas administrada indica la cantidad del presente fármaco incluida. La cantidad de

microesferas que no contienen el presente fármaco en el grupo de prueba 2 fue la misma que la cantidad de microesferas administradas a los animales en los grupos de prueba 4 y 5.

7) Transcurso en el tiempo del nivel de glucemia

5 A continuación en la tabla 22 se muestra el cambio a lo largo del tiempo del nivel de glucemia en cada grupo de prueba.

Tabla 22

Grupo de prueba	Glucemia (mg/dl)			
	0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
1	116 ± 11	118 ± 8	122 ± 6	108 ± 11
2	578## ± 72	590## ± 47	651## ± 72	566# ± 81
3	567 ± 73	555 ± 39	600 ± 64	510 ± 84
4	560 ± 60	541* ± 30	561* ± 79	479** ± 40
5	576 ± 71	561 ± 66	541** ± 69	474** ± 41

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

#, ##: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Welch)

\*, \*\*: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 2 (prueba de la t de Student)

10 A partir de los resultados en la tabla 22, el grupo de prueba 4 mostró una disminución significativa de la glucemia tras cuatro semanas con respecto al grupo de prueba 2. De manera similar, los grupos de prueba 4 y 5 mostraron disminuciones significativas de la glucemia tras 8 semanas y 12 semanas con respecto al grupo de prueba 2. No se observó una disminución significativa de la glucemia en ninguno de los momentos en el grupo de prueba 3.

8) Velocidad de conducción nerviosa en el lado izquierdo (lado tratado con fármaco)

15 La tabla 23 a continuación muestra el transcurso a lo largo del tiempo para la velocidad de conducción nerviosa en la pata izquierda (lado tratado con fármaco en cuatro grupos) en los grupos de prueba respectivos.

Tabla 23

Grupo de prueba	Velocidad de conducción nerviosa (m/s)			
	0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
1	42,3 ± 5,3	42,4 ± 3,9	42,6 ± 3,7	49,3 ± 2,9
2	37,8 ± 5,1	38,7# ± 3,2	38,6## ± 3,0	41,2# ± 1,8
3	37,5 ± 8,0	37,8 ± 3,8	40,8 ± 3,4	43,1* ± 1,9
4	37,1 ± 5,4	39,8 ± 3,6	43,4** ± 3,6	46,2** ± 2,2
5	35,3 ± 4,5	37,9 ± 2,7	41,7* ± 2,7	44,2** ± 2,1

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

#, ##: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Student)

\*, \*\*: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 2 (prueba de la t de Student)

20 A partir de los resultados en la tabla 23, el grupo de prueba 2 mostró una disminución significativa de la velocidad de conducción nerviosa tras 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas con respecto al grupo de prueba 1, confirmando la aparición de neuropatía diabética. En cambio, los grupos de prueba 4 y 5 mostraron aumentos significativos en la velocidad de conducción nerviosa tras 8 semanas con respecto al grupo de prueba 2, y los grupos de prueba 3, 4 y 5 mostraron aumentos significativos de la velocidad de conducción nerviosa tras 12 semanas con respecto al grupo de prueba 2, aunque este último efecto fue mejor en los grupos de prueba 4 y 5 que en el grupo de prueba 3. Estos resultados demuestran la utilidad del efecto de mantenimiento de la concentración de fármaco en sangre. Tras 8 semanas y 12 semanas, el efecto de aumento de la velocidad de conducción nerviosa en el grupo de prueba 4 fue mejor que en el grupo de prueba 5, confirmando que la administración local en el sitio de enfermedad es más útil que la administración sistémica.

9) Velocidad de conducción nerviosa en el lado derecho (lado no tratado con fármaco)

La tabla 24 a continuación muestra el transcurso a lo largo del tiempo para la velocidad de conducción nerviosa en la pata derecha (lado no tratado con fármaco) en los grupos de prueba respectivos.

Tabla 24

Grupo de prueba	Velocidad de conducción nerviosa (m/s)
-----------------	--

	0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
1	43,2 ± 4,6	46,5 ± 7,8	42,9 ± 2,9	48,0 ± 2,9
2	38,2# ± 4,5	39,4## ± 3,0	37,7## ± 3,0	40,5# ± 3,1
3	38,7 ± 5,0	39,0 ± 2,3	39,9 ± 2,2	41,3 ± 2,1
4	38,6 ± 6,3	39,4 ± 3,7	40,8* ± 3,1	41,7 ± 3,2
5	36,5 ± 3,8	39,3 ± 4,3	41,0* ± 3,1	43,8* ± 1,9

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

#, ##: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Student)

\*: p < 0,05 frente al grupo 2 (prueba de la t de Student)

5 A partir de los resultados en la tabla 24, el grupo de prueba 2 mostró una disminución significativa de la velocidad de conducción nerviosa tras 0 semanas, 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas con respecto al grupo de prueba 1, confirmando la aparición de neuropatía diabética. En cambio, los grupos de prueba 4 y 5 mostraron tendencias de aumento significativas de la velocidad de conducción nerviosa tras 8 semanas y 12 semanas con respecto al grupo de prueba 2, siendo los efectos sustancialmente iguales en ambos (grupos 4 y 5). No se confirmó un efecto de prolongación significativo en ninguno de los momentos en el grupo de prueba 3.

10 A partir de estos resultados, la administración intermitente de las microesferas de la invención proporcionó una cinética en sangre continua con respecto a la administración oral repetida dos veces al día en el grupo de prueba 3, y por tanto se confirmó que era útil en cuanto a eficacia, seguridad, dosificación total y cumplimiento con la dosis. Además, en la administración intermitente de las microesferas de la invención, dado que la inyección intramuscular en el sitio de enfermedad (grupo de prueba 4) era más eficaz que la administración sistémica por vía subcutánea en la región dorsal (grupo de prueba 5), se confirmó la utilidad de mantener una alta concentración del presente fármaco en el sitio de enfermedad.

10) Acción de mejora de la nefropatía

20 En la semana 12 desde el inicio de la administración de la sustancia de prueba, se transfirieron las ratas a una jaula metabólica, se les administró agua a voluntad y se recogió la orina durante 24 horas. Tras la medición de la descarga urinaria, se centrifugó la orina (1500 rpm, 25°C, 10 minutos) con una centrifugadora y se recogió el sobrenadante. Usando el analizador clínico 7170 (Hitachi, Ltd.), se midieron las proteínas urinarias totales (método de rojo de pirogalol), creatinina (método de creatinasa/F-DAOS) y azúcar en orina. La tabla 25 a continuación muestra la descarga urinaria total, la creatinina en orina total, las proteínas totales y la excreción de glucosa calculada a partir de los resultados medidos (concentraciones).

25 Tabla 25

Grupo total	Excreción total (mg/24 h)		
	Glucosa	Creatinina	Proteínas totales
1	32 ± 28	80,31 ± 57,65	26,5 ± 26,7
2	139397## ± 86550	147,05## ± 137,74	216,9# ± 370,6
3	111174 ± 40497	116,76 ± 58,15	245,7 ± 231,9
4	114850 ± 54081	99,26 ± 49,91	104,0 ± 40,7
5	124280 ± 50604	156,92 ± 135,34	169,6 ± 150,2

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

#, ##: p < 0,05, p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Aspin-Welch)

30 A partir de los resultados en la tabla 25, la glucosa en orina, la creatinina y las proteínas totales aumentaron en el grupo de prueba 2 con respecto al grupo de prueba 1, lo que indica la aparición de nefropatía diabética. Por otro lado, en los grupos de prueba 4 y 5, se observaron tendencias de disminución en la creatinina en orina total, azúcar y excreción de proteínas totales con respecto al grupo de prueba 2, lo que indica una tendencia de mejora en la función renal.

11) Prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT)

35 Trece semanas tras el inicio de la administración de la sustancia de prueba, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) con ratas sometidas a ayunas durante 18 horas. Tras extraer sangre de la vena caudal de las ratas en ayunas, se alimentaron a fuerza por vía oral 2 g/kg de glucosa. Se extrajeron de manera similar aproximadamente 500 µl de sangre de la vena caudal 30, 60 y 120 minutos tras la administración de glucosa, de los cuales aproximadamente 400 µl se trataron con EDTA-2Na, después se centrifugaron (3.000 rpm, 4°C, 10 min.) con una centrifugadora. De este modo se recogió el plasma y se midió la glucemia usando un analizador clínico 7170 (Hitachi, Ltd.). Se centrifugaron los aproximadamente 100 µl restantes de sangre (3.000 rpm, 4°C, 10 min.) con una

centrifugadora, se recogió el suero y se midió el nivel de insulina (método de ELISA; kit de insulina de Levis (Shibayagi Co., Ltd)). La tabla 26 a continuación muestra los resultados de la medición de insulina.

Tabla 26

Grupo de prueba	Insulina (ng/ml)			
	Antes de la carga de glucosa	Tras 30 minutos	Tras 60 minutos	Tras 120 minutos
1	1,418 ± 0,908	4,289 ± 2,035	3,167 ± 2,035	2,072 ± 1,415
2	0,946 ± 0,732	0,989### ± 0,804	0,909### ± 0,851	0,935### ± 0,764
3	2,138 ± 1,722	2,197 ± 2,062	1,808 ± 1,521	2,130 ± 2,087
4	2,341 <sup>+</sup> ± 1,907	2,275 <sup>+</sup> ± 1,902	2,125 <sup>+</sup> ± 1,862	2,342 <sup>+</sup> ± 2,093
5	1,706 ± 0,556	1,616 ± 1,440	1,445 ± 1,496	1,370 ± 1,086

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

5 ###: p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Student)

+: p < 0,1 frente al grupo 2 (prueba de la t de Student)

10 A partir de los resultados en la tabla 26, el grupo de prueba 2 mostró una disminución significativa del nivel de insulina con respecto al grupo de prueba 1. Por otro lado, el grupo de prueba 4 mostró una tendencia de aumento significativa en el nivel de insulina con respecto al grupo de prueba 2, lo que confirma un efecto de promoción de la síntesis y secreción de insulina.

12) Influencia sobre el peso corporal

Se midieron los pesos corporales de las ratas antes de la administración de la sustancia de prueba y 14 semanas tras el inicio de la administración de la sustancia de prueba. A continuación en la tabla 27 se muestran los resultados.

15 Tabla 27

Grupo de prueba	Peso corporal (g)	
	0 semanas	14 semanas
1	238,2 ± 15,3	307,3 ± 19,7
2	231,2 ± 14,2	252,1### ± 24,9
3	219,1 ± 12,2	224,7* ± 27,8
4	229,7 ± 9,2	243,5 ± 25,3
5	230,4 ± 11,5	252,8 ± 27,7

Los valores en la tabla indican la media ± desviación estándar.

###: p < 0,01 frente al grupo 1 (prueba de la t de Student)

\*: p < 0,05 frente al grupo 2 (prueba de la t de Student)

20 A partir de los resultados en la tabla 27, en la semana 14 tras el inicio de la administración, el peso corporal en el grupo de prueba 2 mostró una disminución significativa con respecto al grupo de prueba 1. Por otro lado, el grupo de prueba 3 muestra una disminución de peso significativa con respecto al grupo de prueba 2, pero dado que los grupos de prueba 4 y 5 fueron aproximadamente iguales al grupo de prueba 2, se confirmó que las microesferas de la invención no tenían ninguna influencia sobre el peso corporal.

25 Los resultados anteriores demuestran que las microesferas de la presente invención no tienen ninguna influencia sobre el peso corporal y, en la administración intramuscular intermitente y la administración subcutánea en la región dorsal una vez cada tres semanas, muestran una disminución del nivel de glucemia durante la alimentación y un efecto de elevación de la biosíntesis/secreción de insulina, debido a una acción de promoción de la regeneración de células β pancreáticas, durante la carga con glucosa. Además, en la administración subcutánea y por inyección intramuscular de las microesferas de la presente invención, se observó una acción de mejora de la velocidad de conducción nerviosa significativa. Se encontró que la administración intramuscular en el sitio de enfermedad era más eficaz, y se confirmó que era eficaz frente a neuropatía diabética. Además, se mostró que las microesferas de la presente invención eran eficaces frente a nefropatía diabética reduciendo la creatinina en orina y la excreción de proteínas totales. Las disminuciones de los niveles de glucemia observadas en estos resultados fueron efectos de un grado que no muestran acciones de mejora de la nefropatía o mejora de la velocidad de conducción nerviosa significativas.

### Aplicabilidad industrial

Dado que las microesferas de la presente invención tienen un periodo de liberación lenta de aproximadamente dos

- 5 semanas a aproximadamente cuatro semanas tras la administración, permiten que se incluya un contenido del presente fármaco superior, suprimen una ráfaga inicial del presente fármaco y permiten que la concentración en sangre de este fármaco se mantenga en un intervalo adecuado para que se manifiesten los efectos del fármaco, estas microesferas son útiles para la prevención y/o el tratamiento de ASO, infarto de miocardio, angina, ictus, diabetes y complicaciones de la misma, insuficiencia renal, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, asma, OA, AR y osteoporosis, etc.

## REIVINDICACIONES

1. Microesfera de acción prolongada de dos a cuatro semanas, que comprende ácido (5-[2-((1E)-fenil(piridin-3-il)metil)amino]oxi)etil)-7,8-dihidronaftalen-1-il]oxi)acético o su sal como fármaco y un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico, en la que
- 5 (i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 3 hasta 10 partes en peso,
- (ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 20 hasta 50  $\mu\text{m}$ , y
- 10 (iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 10.000 hasta 50.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de desde 75/25 hasta 50/50,
- y que satisface al menos una de las siguientes condiciones (1) a (2):
- (1) una razón restante del fármaco tras una hora en una prueba de liberación es de al menos el 90%;
- (2) una razón restante del fármaco tras un día en una prueba de liberación es de al menos el 82%.
- 15 2. Microesfera según la reivindicación 1, en la que el contenido de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta 8 partes en peso.
3. Microesfera según la reivindicación 1, en la que la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ .
4. Microesfera según la reivindicación 1, en la que la razón de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico es de 50/50.
- 20 5. Microesfera según la reivindicación 1, en la que la concentración en sangre del fármaco es de desde 0,01 ng/ml hasta 150 ng/ml.
6. Microesfera de acción prolongada de dos semanas según la reivindicación 1, en la que
- 25 (i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta 8 partes en peso,
- (ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ , y
- (iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 10.000 hasta 30.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de 50/50,
- y que satisface la siguiente condición (1):
- 30 (1) una razón restante del fármaco tras una hora en una prueba de liberación es de al menos el 90%.
7. Microesfera de acción prolongada de cuatro semanas según la reivindicación 1, en la que
- (i) una cantidad de copolímero de ácido láctico/ácido glicólico en partes en peso del fármaco es de desde 4 hasta 8 partes en peso,
- 35 (ii) la microesfera tiene un tamaño de partícula promedio de desde 25 hasta 35  $\mu\text{m}$ , y
- (iii) el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico tiene un peso molecular promedio en peso de desde 30.000 hasta 50.000 y una razón de composición de ácido láctico/ácido glicólico de 50/50,
- y que satisface la siguiente condición (1):
- (1) una razón restante del fármaco tras un día en una prueba de liberación es de al menos el 82%.
- 40 8. Agente que comprende la microesfera según la reivindicación 1 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de arteriosclerosis obliterante (ASO), enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, arteriosclerosis, linfedema, infarto de miocardio, angina, taquiarritmia ventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada, fibrilación auricular, miocarditis, encefalopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, ictus, infarto cerebral, hemorragia

- 5 cerebral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, neuropatía diabética, estenosis del conducto vertebral, demencia, enfermedad de moyamoya, lesiones de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aneurisma cerebral, neumonía aguda, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS),  
10 lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), sarcoidosis, neumonía intersticial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, osteoartritis (OA) de las vertebrae o la rodilla, artritis reumatoide (AR), osteoporosis, fractura ósea, osteonecrosis, lesión perióstica, terapia de regeneración del esternón asociada con cirugía cardiopulmonar, hepatitis fulminante, hepatitis aguda, cirrosis, hepatitis crónica, hígado graso, insuficiencia renal aguda, trastorno renal isquémico, síndrome de aplastamiento, insuficiencia renal crónica, enfermedad glomerular, glomerulonefritis, nefroesclerosis, glomerulonefritis proliferativa, enfermedad tubulointersticial, trastornos renovasculares, enfermedad renal quística, nefropatía tóxica, anomalías en el transporte tubular, trastornos renales en pacientes sometidos a diálisis, nefropatía, diabetes, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda, esofagitis, gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal,  
15 enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, trasplante de corazón, trasplante de hígado, trasplante de riñón, trasplante de pulmón, trasplante de páncreas, trasplante de colgajo miocutáneo, trasplante de esófago, trasplante de piel, trasplante de vasos sanguíneos/linfáticos, trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante de huesos/cartílagos, trastornos de los nervios, nefropatía, reestenosis tras ACTP (angioplastia coronaria transluminal percutánea), enfermedad periodontal, heridas por extracción de dientes, heridas de la cavidad bucal, trastornos de tejido óseo  
20 periodontal, periodontitis, úlceras de decúbito, enfermedad de alopecia, alopecia areata, úlceras cutáneas, glaucoma, sordera, sordera neurosensorial, fallo multiorgánico (FMO), enfermedades alérgicas o enfermedad del colágeno.
9. Agente según la reivindicación 8, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de infarto de miocardio,  
25 insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía dilatada, miocarditis, hipertensión pulmonar, asma, insuficiencia renal crónica, trasplante de corazón, trasplante de vasos sanguíneos/linfáticos o trasplante de células madre hematopoyéticas.

FIG. 1

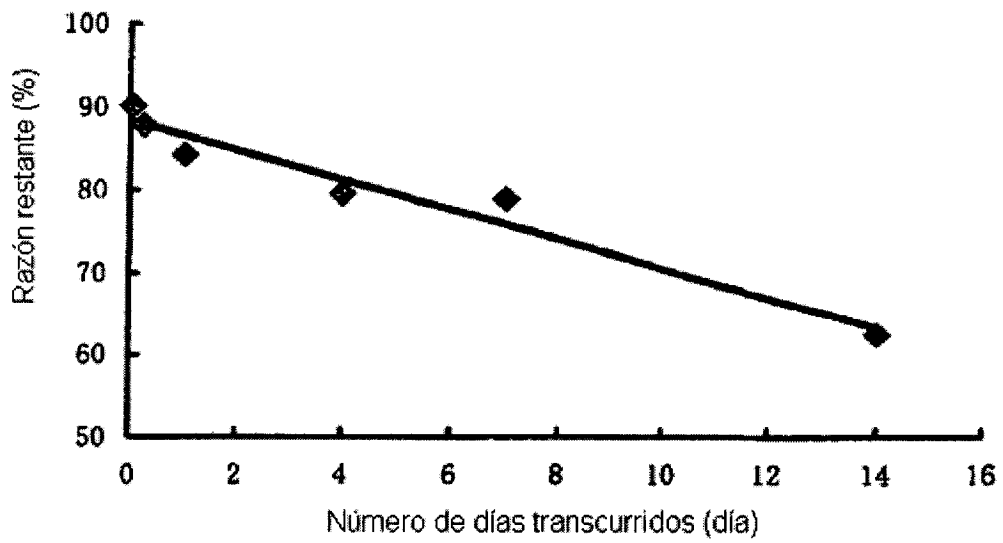


FIG. 2

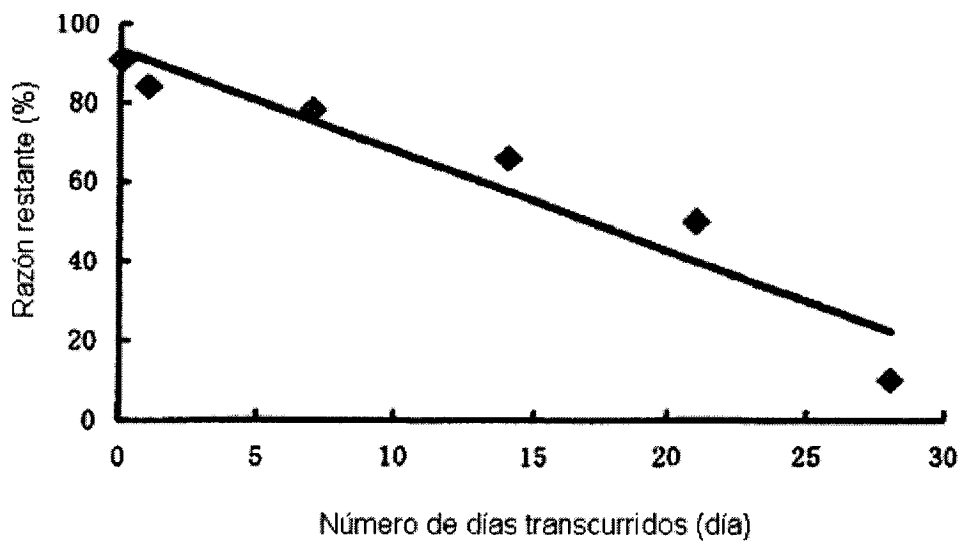




FIG. 3

