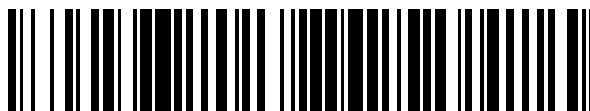


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 534**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2003** **E 03791347 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 1547615**

54 Título: **Remedio**

30 Prioridad:

27.08.2002 JP 2002247871

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2016

73 Titular/es:

TERADA, HIROSHI (100.0%)
37-17-901, SENDAGI 3-CHOME
BUNKYOU-KU, TOKYO 113-0022, JP

72 Inventor/es:

TERADA, HIROSHI;
MAKINO, KIMIKO y
SOMA, GEN-ICHIRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 575 534 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

Remedio

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un medicamento para su uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, en particular un medicamento para normalizar macrófagos con función alterada aprovechando la capacidad fagocítica de los macrófagos, o eficaz para diversos patógenos infecciosos. El medicamento de acuerdo con la invención está dirigido a todas las sustancias administradas sobre una base terapéutica y/o diagnóstica y ensamblajes de las mismas, y una formulación del mismo es una mezcla médica de un medicamento (incluido un vehículo del medicamento en algunos casos) y el vehículo del medicamento.

Técnica anterior

I. Macrófago

En primer lugar, se revisa un macrófago que desempeña una función central en una acción de un medicamento de acuerdo con la invención.

15 La morfología y las funciones de los macrófagos se describen con detalle, por ejemplo, en "Seimei o sasaeru Macrophage (Macrophage Which Supports Life) " de Kiyoshi Takahashi (Bunkodo, 2001), y lo fundamental en relación con la invención es lo siguiente. El macrófago es una célula que configura un sistema de fagocitos mononucleares (SFM). Un monocito en la sangre deriva de una célula madre hematopoyética de la médula ósea, se divide/diferencia en la médula ósea para salir a la sangre y se instala en diversos tejidos para diferenciarse en una célula monocítica conocida por varios nombres. Esta célula se denomina histiocito en el tejido conjuntivo, célula de Kupper en el hígado, macrófago alveolar en el pulmón, macrófago en los ganglios linfáticos y el bazo, macrófago torácico/macrófago peritoneal en una cavidad corporal, osteoclasto en el hueso, célula de Langerhans en la piel, célula de microglía en el tejido nervioso, microglía en el cerebro y una célula de tipo A en la membrana sinovial, y posee naturalezas específicas del tejido.

1. Características generales

25 (1) Es una célula mononuclear con un diámetro de aproximadamente 15 a 20 μm , es abundante en el citoplasma y se adhiere fácilmente a una superficie de vidrio y plástico. Se mueve con pseudópodos y tiene una fuerte fagocitosis de sustancias extrañas.
 (2) Es una célula de defensa del huésped.
 (3) Tiene capacidad de eliminación de sustancias extrañas y competencia inmunológica.
 30 (4) Presenta información sobre un antígeno a un linfocito T para establecer la inmunidad.
 (5) Es activado por el interferón para convertirse en un efector de la inmunidad mediada por células.
 (6) Es más resistente a los rayos X que un linfocito.

2. Importancia fisiológica de macrófagos

(1) Capacidad fagocítica

35 La fagocitosis es una de las funciones más conocidas de los macrófagos. Se puede creer que esta función es una de las funciones más básicas que se ha comprendido, ya que los organismos eran organismos unicelulares en el proceso de evolución desde el inicio de la vida. Por lo tanto, una de las características de los macrófagos es que su existencia tiene universalidad de especies transversalmente. Parece que esta característica proporciona una de las grandes ventajas para la investigación sobre funciones de los macrófagos. Es decir, si se desarrolla/investiga un remedio para las enfermedades de mamífero, los macrófagos de otras especies que no sean mamíferos puede ser funcionalmente útiles como material de investigación. Esto es debido al aspecto de que el macrófago es una célula filogenéticamente conservada.

(2) Función de defensa del huésped

45 Un segundo aspecto importante en cuanto a las funciones de los macrófagos es una acción de defensa del huésped. Esta acción se conoce como acción de defensa del huésped inespecífica, pero la investigación reciente ha demostrado que la acción de defensa del huésped del macrófago también es específica. Originalmente, el término, no especificidad ha sido una palabra que corresponde a la especificidad de antígeno y a la memoria inmunológica caracterizada por la célula T, y, en la actualidad, no se ha demostrado que los macrófagos tengan especificidad de antígeno o la memoria inmunológica en un sentido exacto. Por lo tanto, no es exactamente incorrecto que la acción de defensa del huésped del macrófago sea inespecífica. Sin embargo, por ejemplo, la respuesta de los macrófagos es cualitativamente diferente dependiendo de los tipos de patógenos, y una parte de estas respuestas cualitativamente diferentes corresponde a una diferencia en los receptores sobre la superficie celular de los macrófagos, que reconoce los patógenos. Por lo tanto, desde el punto de vista de la respuesta celular a la estimulación de una sustancia extraña (medio ambiente), se puede decir que la acción de los macrófagos es

específica.

Hoy en día, es habitual entender la acción de defensa del huésped sobre la base de los macrófagos como un sistema inmunológico innato y la acción de defensa del huésped sobre la base de las células T como un sistema inmunológico adquirido. Adicionalmente, teniendo en cuenta la universalidad filogenética, es una cuestión de rutina que el sistema inmunológico innato es también un sistema de defensa del huésped filogenéticamente muy conservado.

(3) Sistema inmunológico innato

El sistema inmunológico innato basado en los macrófagos desempeña un papel central en el sistema de defensa del huésped, que son el sistema de discriminación y eliminación de la sustancia extraña no solo en especies que no tienen el sistema inmunológico adquirido, sino también en especies que comprenden el sistema inmunológico adquirido. Incluso en los organismos que comprenden el sistema inmunológico adquirido, la función del sistema inmunológico innato cubre la discriminación y la eliminación de sustancias extrañas en casi todos los casos, y cuando esto no es suficiente, se recluta el sistema inmunológico adquirido. Incluso en este caso, la presentación del antígeno por el macrófago es esencial para el reconocimiento específico de la sustancia extraña, y cuando la eliminación de la sustancia extraña, los que desempeñan papeles centrales en el sistema de eliminación son los macrófagos y similares, que son las células que configuran el sistema inmunológico innato.

(4) Eliminación de sustancias extrañas

Por otra parte, las sustancias extrañas endógenas son eliminados por las células T citotóxicas características del sistema inmunológico adquirido (por ejemplo, la eliminación de células infectadas por virus), pero otras células T presentadas con el antígeno por los macrófagos son esenciales para la proliferación y la maduración de estas células T citotóxicas. Es decir, para que el sistema inmunológico adquirido funcione de manera significativa, el sistema inmunológico innato debe funcionar por completo y de forma adecuada hasta el fin.

(5) Fallo de la función

Por lo tanto, el fallo de la función de la fagocitosis o de la presentación de antígeno de los macrófagos puede convertirse principalmente una potencial causa de inmunodeficiencia. Por decirlo de forma concreta, los siguientes se conocen como el fallo de la función y enfermedades relacionadas con los aspectos expuestos en el punto I.1 anterior (Características generales de los macrófagos). Es decir:

1) Deficiencia de la adhesión leucocitaria, síndrome Chediak-Higashi y similares, son conocidos como una anomalía de la función fagocítica como anomalía de la fagocitosis de la sustancia extraña. En ambos casos, la anomalía se observa en la función fagocítica y, en este último, el transporte de una enzima lisosómica a una cavidad de vacío fagocítica es anormal, por lo que la capacidad de desinfección se reduce y la capacidad fagocítica se facilita notablemente.

2) Como la enfermedad como la anomalía de la defensa del huésped se incluye la candidiasis mucocutánea crónica. En los macrófagos en un paciente con esta enfermedad, la capacidad de migración se reduce y la capacidad de desinfección de candida también se reduce.

3) Como la enfermedad como la anomalía de la capacidad de eliminación de la sustancia extraña y la competencia inmunológica se puede incluir el síndrome de Wiskott-Aldrich. Los macrófagos de los pacientes exhiben una anomalía inmunológica complicada, tal como la anomalía en la migración y el defecto de una acción citotóxica dependiente de anticuerpos.

4) Como la disfunción de la capacidad de presentación de la información sobre el antígeno se conoce la deficiencia del antígeno de clase II del complejo mayor de la histocompatibilidad (MHC) en la que se produce una inmunodeficiencia grave con independencia de las células T y B normales.

5) Como la disfunción en el aspecto de que el macrófago es activado por un interferón y se convierte en el efector de la inmunidad celular, se conoce la deficiencia del receptor del interferón en el que un niño con un receptor del interferón deficiente no se puede defender de la infección de tuberculosis, que se convierte en mortal.

Adicionalmente, un mamífero con deficiencia del sistema inmunológico adquirido puede existir y vivir, pero no puede existir el animal con deficiencia de macrófagos. Y, se está demostrando que las sustancias fisiológicamente activas a las que se hace referencia en conjunto como citocinas, que realizan la señalización intercelular, desempeñan papeles importantes intercelulares en el sistema de defensa del huésped basado en la discriminación y la eliminación de una sustancia extraña. Los macrófagos producen y secretan una amplia variedad de citocinas. De esta manera, las funciones de los macrófagos son esenciales para la homeostasis del individuo también con respecto a la discriminación y la eliminación de una sustancia extraña.

(6) Características anatómicas

Las características anatómicas de los macrófagos son diferentes en función de los macrófagos específicos de tejido que son residentes en diversos tejidos y tienen caracteres inherentes. Esto es obvio cuando se observa en el tejido mucoso, que es un punto de contacto entre un individuo y un medio ambiente. Los macrófagos específicos residen

en las capas submucosas de los órganos respiratorios, los órganos digestivos y los órganos genitourinarios, respectivamente. Estos macrófagos específicos de tejido responden biológicamente a los ambientes internos y externos específicos de tejido. Esto sugiere que los macrófagos desempeñan un papel importante en la homeostasis del organismo, además de la discriminación y la eliminación de una sustancia extraña. Existen muchos aspectos desconocidos en la importancia fisiológica de los macrófagos específicos de tejido. Reflexionando sobre ello, teniendo en cuenta una existencia significativa de los macrófagos específicos de tejido desde un nuevo punto de vista, actualmente se puede prestar atención a su relación con diversas patologías.

(7) Relación con patologías

Dado que si se piensa en la importancia fisiológica del papel central que los macrófagos desempeñan en el sistema inmunológico, se ha sugerido encarecidamente que la disfunción de los macrófagos específicos de tejido está implicada en la inducción de patologías específicas de tejido. De hecho, en muchas enfermedades intratables, tal como la enfermedad de Crohn, que es una de las enfermedades intestinales inflamatorias, otras enfermedades autoinmunes, tal como la reumatoide, y enfermedades relacionadas con el envejecimiento, tal como la osteoporosis, la disfunción de los macrófagos está implicada en cierta forma. En las infecciones crónicas por bacterias resistentes a ácido, tales como los gérmenes de la tuberculosis, además de los problemas de las bacterias resistentes a ácido *per se*, se puede pensar que la disfunción de los macrófagos alveolares está presente en el contexto de la patología. Considerándolo de este modo, se puede decir que el desarrollo de un remedio que aumente la capacidad fagocítica de los macrófagos como una célula diana y, por lo tanto, aumente una concentración del remedio en el macrófago, es un objeto extremadamente importante y razonable para proporcionar una nueva terapia de enfermedades intratables, incluyendo enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis, para las que actualmente no existe una terapia eficaz.

II. Disfunción de los macrófagos y enfermedades

(1) Macrófago como vehículo del patógeno infeccioso

Según la OMS, la tuberculosis, el SIDA, el paludismo y similares son enfermedades crónicas intratables que deben ser considerados como las más importantes a escala mundial. Por ejemplo, se ha descrito que anualmente hay 800 millones o más pacientes con tuberculosis, de los que 300 millones mueren. Es una tarea urgente desarrollar un remedio (medicamento/formulación) eficaz como respuesta a estas enfermedades y su importancia social es extremadamente grande.

Por otro lado, con respecto a la defensa de la infección y la eliminación de un patógeno, una de las células que desempeña el papel más importante *in vivo* es el macrófago. De hecho, los macrófagos se distribuyen en todos los órganos. Estos macrófagos son diferentes en morfología y funciones dependiendo de los órganos en los que existen los macrófagos, pero son iguales en el aspecto de que realizan la defensa de la infección/eliminación del patógeno.

Por otro lado, durante el proceso de la evolución, los patógenos infecciosos han adquirido diversos medios para evitar el ataque de los macrófagos. Además, los patógenos infecciosos a menudo se ocultan en los macrófagos y convierten al macrófago en un huésped. Es cuestión de tiempo que el patógeno que ha tenido éxito en parasitar el macrófago de este modo cause una enfermedad infecciosa crónica y repetidamente, y no es inusual que de lugar a una consecuencia fatal. Es decir, en este caso, el macrófago que debe realizar de forma primaria la defensa de la infección/eliminación de un patógeno sirve como vehículo del patógeno infeccioso a la inversa.

(2) Patógenos en macrófagos

Un ejemplo típico de los mismos se puede observar en la tuberculosis. Es decir, el patógeno (*Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis*) es fagocitado por el macrófago en los alvéolos pulmonares, que es una ruta infecciosa en las primeras etapas, y está presente de forma estable en un fagosoma formado en ese momento. Es decir, el patógeno puede vivir haciendo que el macrófago que debía digerirlo de forma primaria sea un "refugio". Además, muchos patógenos causantes, tal como *Mycobacterium leprae*, que es un patógeno causante de la lepra, *Mycobacterium avium*, que es un patógeno causante de la micobacteriosis atípica, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* o *Chlamydia psittaci*, que es un patógeno causante de la clamidiosis de las enfermedades intratables cuya terapia radical no se ha establecido y se ha temido su propagación son iguales en el aspecto de que los macrófagos se convierten en el vehículo del patógeno infeccioso.

Para gérmenes de la tuberculosis, el virus del SIDA y similares, se realizan numerosos esfuerzos para su prevención. Sin embargo, una vez establecida la infección, no existe una terapia eficaz. Incluso si hay compuesto que tiene una acción de desinfección directa contra el patógeno infeccioso presente, en general, no es fácil lograr una concentración en el macrófago con el patógeno, que sea suficiente para exterminar el patógeno específico (exterminar en la invención significa que la totalidad o una parte de los patógenos se exterminan hasta desaparecer.) simplemente administrando un remedio apropiado.

Divulgación de la invención

De acuerdo con lo anterior, incluso si los patógenos extracelulares pueden exterminarse mediante la administración de un remedio eficaz, los macrófagos como vehículos del patógeno siguen vivos como fuentes de patógenos y continúan suministrando los patógenos. Lo anterior es una razón por la que actualmente no existe un tratamiento radical para el patógeno que parasita en el macrófago. La invención hace que este punto sea un objeto. Por el contrario, si es posible exterminar los macrófagos infectados con los patógenos como los vehículos del patógeno o exterminar los patógenos en los macrófagos infectados con los patógenos, muchas enfermedades infecciosas crónicas no tratables descritas anteriormente se pueden tratar de forma radical. Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar un remedio o medicamento para una enfermedad causada basada en la disfunción del macrófago o convirtiendo un macrófago en un vehículo.

Como resultado de un estudio intensivo, los presentes inventores ha conducido a una idea notablemente nueva en la que es un objeto exterminar los macrófagos infectados con los patógenos como vehículos de patógenos, exterminar los patógenos en los macrófagos infectados con los patógenos y actuar sobre los macrófagos cuya función se ha convertido en anormal debido a una enfermedad, y han realizado la invención. La presente invención se refiere a un medicamento para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Un medicamento de la invención se caracteriza por facilitar una actividad fagocítica de los macrófagos y exterminar los patógenos en los macrófagos.

Asimismo, el medicamento de la invención se caracteriza por facilitar la actividad fagocítica de los macrófagos y conducir a los macrófagos a la muerte celular.

Asimismo, el medicamento de la invención se caracteriza por facilitar la actividad fagocítica de los macrófagos y actuar sobre los macrófagos en un estado disfuncional.

Asimismo, es deseable que el medicamento de la invención sea para cualquiera de micobacteriosis, SIDA, clamidiosis o toxoplasmosis. Esto permite tratar eficazmente las enfermedades en las que los macrófagos retienen los patógenos.

Asimismo, es deseable que el medicamento de la invención sea para la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, cáncer o síndrome de inmunodeficiencia. Esto permite tratar eficazmente las enfermedades en las que los macrófagos se encuentran en un estado disfuncional. El SIDA está incluido en el síndrome de inmunodeficiencia.

Asimismo, es deseable que los macrófagos anteriores sean los que residen en los tejidos de las mucosas. Esto permite tratar eficazmente la enfermedad en sitios tales como los órganos respiratorios, los órganos digestivos y los órganos genitourinarios, en los que patógenos causan la infección primaria.

También es deseable que los macrófagos anteriores sean aquellos que residen en cualquiera de la cavidad peritoneal, epiplón mayor, mancha lechosa, alvéolo pulmonar, estroma pulmonar, hígado, área de la vena portal, bazo, médula ósea, timo, tracto digestivo, amígdalas palatinas, glándula suprarrenal, hipófisis, estroma de tiroides, islotes de Langerhans, glándula paratiroidea, glándula pineal, testículos, ovarios, oviducto, útero, placenta, piel, meninges, sustancia cerebral y plexo coroideo, o que los macrófagos anteriores sean microglía, células precursoras de la microglía, células gliales, células precursoras de las células gliales, células precursoras de los macrófagos residentes anteriores, células análogas de los macrófagos residentes anteriores, o células precursoras de las células análogas de los macrófagos residentes anteriores. Esto permite tratar con eficacia las enfermedades causadas en varios órganos y tejidos del cuerpo.

Asimismo, el medicamento de la invención se caracteriza por contener PLGA [copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico)] y ser la respuesta a la tuberculosis.

Asimismo, es deseable que contenga rifampicina. Esto permite proporcionar el medicamento para exterminar los gérmenes de la tuberculosis.

También, es deseable que contenga PLGA con un peso molecular de 1.500 a 150.000. Esto permite proporcionar una formulación de partículas finas que es biodegradable y es fagocitada por los macrófagos.

También, es deseable que contenga PLGA con un peso molecular de 1.500 a 75.000. Esto permite proporcionar una formulación de partículas finas que es fagocitada por los macrófagos y libera fácilmente un medicamento en los macrófagos.

También es deseable que contenga además al menos uno de PVA (alcohol polivinílico), PEG (polietilenglicol), PEO (óxido de polietileno), azúcar, proteína, péptido, fosfolípido o colesterol. Esto permite proporcionar una formulación de partículas finas que es fagocitada de forma activa en función de los tipos de macrófagos.

Además, es deseable que contenga adicionalmente al menos uno de PVA, PEG, PEO, azúcar, proteína, péptido, fosfolípido o colesterol y que sea una formulación de partículas finas, en la que los diámetros mayores de la partícula

son de 1 a 6 μm . Esto permite aprovechar de manera efectiva una función fagocítica de los macrófagos para incorporar en los macrófagos.

También, es deseable que contenga PLGA, en el que un peso molecular es de 5,000 a 20,000 y que sea para la tuberculosis. También es deseable que se fabrique por el método de emulsificación de membrana.

- 5 También, es deseable que contenga lipopolisacárido de *Pantoea agglomerans* y que sea para el SIDA.

También, es deseable que contenga lipopolisacárido de *Pantoea agglomerans* y que tenga un efecto citotóxico sobre las células de cáncer de pulmón.

La presente memoria incluye contenidos descritos en la memoria y/o en las figuras de la solicitud de patente japonesa n.º 2002-247871, que es la base de prioridad de la presente solicitud.

10 **Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 es una vista que ilustra por comparación una concentración de fármaco en un macrófago de un remedio de la invención con la de un remedio convencional.

La Fig. 2 es una vista que muestra una distribución del diámetro de la partícula de una formulación de partículas finas en un modo de realización de la invención.

- 15 La Fig. 3 es una vista que ilustra por comparación cuánto son las cantidades incorporadas en las células NR8383 diferentes mediante la administración de rifampicina de acuerdo con la invención y mediante su administración usando una solución utilizada convencionalmente.

- 20 La Fig. 4 es una vista (N.º 1) que ilustra una capacidad de retención de rifampicina de partículas finas de RFP-PLGA, es decir, que las cantidades de rifampicina liberadas son diferentes dependiendo de las composiciones de las partículas finas de PLGA. Los valores experimentales contienen una incertidumbre del 5 %.

La Fig. 5 es una vista (N.º 2) que ilustra una capacidad de retención de rifampicina de partículas finas de RFP-PLGA, es decir, que las cantidades de rifampicina liberadas son diferentes dependiendo de las composiciones de las partículas finas de PLGA. Los valores experimentales contienen una incertidumbre del 5 %.

- 25 La Fig. 6 es una vista que ilustra que los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos pueden exterminarse mediante la fagocitosis de las partículas de RFP-PLGA por los macrófagos que han fagocitado los gérmenes de la tuberculosis. La viabilidad se evaluó mediante clasificación de la siguiente manera: 1: 5 % o menos, 2: 5 a 25 %, 3: 25 a 50 %, 4: 50 a 75 %, y 5: 75 % o más. Una cantidad de rifampicina administrada es 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una sola administración (indicado por RFP en la figura) o 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (valor estimado) en la administración por RFP-PLGA (indicado por RFP-PLGA en la figura).

- 30 La Fig. 7 es una vista que ilustra que un efecto citotóxico de los macrófagos alveolares NR8383 en un estado disfuncional mediante cultivo conjunto con células de cáncer de pulmón de Sato en las células de cáncer de pulmón de Sato se mejora mediante la activación de una capacidad fagocítica de NR8383 usando lipopolisacárido. Los cuadrados abiertos indican el efecto citotóxico de NR8383 sin tratamiento con lipopolisacárido en las células de cáncer de pulmón de Sato y los cuadrados sólidos indican el efecto citotóxico de NR8383 tratadas con lipopolisacárido (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre las células de cáncer de pulmón de Sato (cocultivadas durante 4 horas). El efecto citotóxico (%) se evaluó mediante el cálculo de las cantidades de lactato deshidrogenasa liberada en el medio.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

- 40 En lo sucesivo en el presente documento, los modos de realización adecuados de la invención se describen con detalle en referencia a los dibujos adjuntos. No obstante, el alcance técnico de la presente invención no está limitado por estos modos de realización.

Una de las funciones comprendidas en los macrófagos enteros y específica de los macrófagos incluye la fagocitosis. La fagocitosis es una función en la que un sólido con un tamaño de aproximadamente 1 μm o más se incorpora activamente en una célula macrófago.

- 45 Por otro lado, si un sólido formado artificialmente es fagocitado activamente, es posible acumular el sólido en el macrófago a una concentración que generalmente no se puede lograr. Dicho sólido generalmente puede proporcionarse como una partícula, pero para fagocitar activamente, es necesario optimizar un diámetro de partícula, la propiedad de la superficie de la partícula (que tiene una carga, que tiene una cierta estructura flexible, etc.) ventajosa para la fagocitosis. Por ejemplo, es posible preparar la partícula que es fagocitada fácilmente por los macrófagos utilizando un material en el que el polilactato y el polietilenglicol se mezclan como sustrato.

Por lo tanto, si un medicamento que actúa sobre los patógenos infecciosos o los macrófagos infectados con los patógenos se mezcla para preparar la partícula, junto con la fagocitosis de la partícula, el medicamento se incorpora también activamente en el macrófago.

- 55 Una parte esencial de la invención está en el aspecto de que las enfermedades debidas a una disfunción de los macrófagos (I. 2. (5), (7), II. (1)), micobacteriosis, SIDA, clamidiosis, toxoplasmosis, cáncer y similares) se tratan aprovechando la función fagocítica de los macrófagos. Por lo tanto, el objeto anterior se logra mediante la

preparación de una formulación en la que un medicamento eficaz para ellos está contenido en partículas finas (vehículo del medicamento) que pueden ser fagocitadas por los macrófagos.

Típicamente, para la formulación que es una mezcla médica del vehículo del medicamento y el medicamento, es necesario diseñar con el fin de evitar la fagocitosis por los macrófagos. Sin embargo, la invención tiene una novedad en el aspecto de que aprovecha activamente la actividad fagocítica de los macrófagos según una idea que invierte completamente las creencias convencionales.

Como se ha mencionado anteriormente, como una de las funciones de defensa del huésped de los macrófagos, existe la fagocitosis. La fagocitosis es una función inherente observada característicamente en los macrófagos y es posible incorporar las partículas con un tamaño que no pueden incorporar las células que no sean los macrófagos. Los microorganismos patológicos, tales como las bacterias, son fagocitados por los macrófagos y descompuestos en los macrófagos. Por lo tanto, uno de importancia biológica de la función fagocítica de los macrófagos es poner en peligro los microorganismos patológicos. Además, los macrófagos se activan mediante la fagocitosis y se vuelven capaces de oponerse a los microorganismos patológicos en algunos casos. Este es un fenómeno conocido como activación de macrófagos por fagocitosis y esto permite que los macrófagos produzcan daños incluso en las células cancerosas. Por lo tanto, si los macrófagos se pueden activar mediante fagocitosis para potenciar la actividad fagocítica, se hace posible exterminar a los microorganismos patológicos de un modo más intenso.

A fin de que las partículas sean fagocitadas, se cree que es necesario comprender las siguientes naturalezas (propiedad de fagocitable)

Es decir:

- Un diámetro de partícula es de 1 a 6 μm . Tal partícula se conoce como partícula fina.
- Una superficie de la partícula se humedece con un medio (fluido corporal alrededor de los macrófagos *in vivo*) de macrófagos, pero la partícula no se disuelve inmediatamente y está presente como la partícula durante un cierto período de tiempo.
- La partícula es un sólido en un intervalo de temperatura de 20 a 45 °C.
- Una densidad específica de la partícula es mayor que la del medio (fluido corporal alrededor de los macrófagos *in vivo*) de los macrófagos.
- La partícula tiene una capa de superficie a través de la cual el agua y los iones son permeables.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la partícula se administra *in vivo*, se requiere que la superficie de la partícula tenga una capa macromolecular con alta histocompatibilidad. Es necesario mantener una forma de partícula hasta que se incorpora en los macrófagos, mientras que se metaboliza mediante descomposición en componentes no tóxicos para el cuerpo *in vivo* (degradabilidad *in vivo*) después de su incorporación en el macrófago o cuando no se incorpora.

Como macromolécula que cumple las dos condiciones anteriores y se puede moldear fácilmente en una partícula, el copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico) (en lo sucesivo denominado "PLGA") o ácido poliláctico (en lo sucesivo denominado "PL") es un candidato. El PL es más hidrófobo y requiere más tiempo que el PLGA para descomponerse. Por otro lado, el PLGA cambia la velocidad de descomposición en función de la relación de monómeros. Cuanto mayor es el peso molecular, mayor tiempo requiere su descomposición. Cuando el peso molecular de PLGA es 1.000 o menos, hay una posibilidad de que esté presente como un líquido en el intervalo de temperatura de 20 a 45 °C. Por lo tanto, el peso molecular del PLGA que está presente como un sólido en el intervalo de temperatura de 20 a 45 °C es, deseablemente, 1.500 o más.

Adicionalmente, para la liberación de un medicamento contenido en la partícula de PLGA desde la partícula, en el caso del PLGA con un peso molecular de aproximadamente 20.000, el medicamento se libera de una forma casi de orden cero. Es decir, una cantidad liberada siempre se retiene constantemente. Sin embargo, en el caso de la partícula de PLGA con un peso molecular de aproximadamente 44.000 o 75.000, se ha observado una liberación de tipo pulso en la que el medicamento se libera después de un período de tiempo constante en lugar de la liberación de orden cero. Por otra parte, el período de tiempo en el que se observa el tipo de pulso de una liberación del medicamento se retrasa en la formulación de PLGA con un peso molecular grande. Es decir, un patrón de la liberación del medicamento de las partículas de PLGA depende del peso molecular del PLGA. Además, se prevé que la velocidad de descomposición del PLGA en relación con la liberación del medicamento no sólo se retrasa junto con el incremento de peso molecular del PLGA, sino también la velocidad es más rápida *in vivo*, tal como en el macrófago, que *in vitro*, y, por lo tanto, parece que es posible utilizar con eficacia los que tienen un intervalo de peso molecular de hasta 150.000.

Desde los puntos de vista anteriores, parece que una formulación de partículas finas con diámetros de partícula de 1 a 6 formadas por PLGA, en las que peso molecular es de 1.500 a 150.000 y una relación entre el monómero de ácido láctico/ácido glicólico es de 50:50 a 75:25 (intervalo aceptable) y una formulación de partículas finas con diámetros de partícula de 1 a 6 μm compuestas por PLGA, en las que el peso molecular es de 5.000 a 75.000 y una relación de monómeros de ácido láctico/ácido glicólico es de 50: 50 a 75:25 (intervalo adecuado) son fagocitadas fácilmente por los macrófagos y son óptimas para el objeto de que el medicamento se libere manteniendo una

persistencia constante de la formulación de partículas finas, que incluye internamente el medicamento en los macrófagos.

Provisión de un remedio nuevo que permita el exterminio específico de macrófagos que retienen patógenos infecciosos

- 5 Aprovechando de manera activa la actividad fagocítica específica de los macrófagos que retienen varios patógenos infecciosos, incluyendo gérmenes de la tuberculosis, con el fin de exterminar los agentes patógenos en los macrófagos o los macrófagos *per se* que retienen los patógenos, los siguientes remedios son eficaces.

(1) Un remedio que facilita la actividad fagocítica de los macrófagos.

(2) Un remedio que tiene un efecto de exterminio directo de los patógenos infecciosos en los macrófagos.

- 10 (3) Un remedio que actúa sobre los macrófagos.

Para el remedio de (1), es deseable tener la naturaleza capaz de ser fagocitado de forma selectiva por los macrófagos que retienen/no retienen los patógenos infecciosos. Convencionalmente, se ha sabido que está presente una sustancia que activa la actividad fagocítica de los macrófagos (materia conocida en la técnica). Un intento de desarrollar un remedio que actúe sobre los patógenos en los macrófagos aprovechando de forma activa esta naturaleza no se realiza en absoluto (materia nueva). En los tipos de (2) y (3), no solo se pretenden varios medicamentos que actúan directamente sobre los patógenos sino también se pueden usar como medicamentos genes *per se*, tales como ADN o ARN, que tiene una acción para modificar las funciones fisiológicas de los macrófagos que retienen/no retienen los patógenos. No se ha realizado un intento de desarrollar un remedio eficaz para la eliminación de patógenos infecciosos mediante la combinación de (1), (2) y (3) y el remedio de la invención es un remedio de tipo nuevo eficaz para el tratamiento de patógenos infecciosos (materia nueva).

Por ejemplo, en Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Vol. 42, No. 10:2682–2689, 1998), se divulga una acción antituberculosos de partículas que contienen rifampicina en PLGA. Sin embargo, en el presente informe no se describe la facilitación de la actividad fagocítica por las partículas de PLGA. Además, puesto que en las partículas de PLGA que contienen rifampicina, la eficacia del fármaco como un fármaco antituberculosis no ha mejorado en comparación con la rifampicina de forma individual, es evidente que tiene características diferentes de las de las partículas de la invención. Adicionalmente, como se muestra en la FIG. 4 y la FIG. 5, el peso molecular del PLGA es importante para controlar la liberación de rifampicina. Sin embargo, en el informe anterior no se describe el peso molecular del PLGA utilizado durante la preparación de PLGA. Se presume que, probablemente, debido al uso de PLGA que tiene un peso molecular diferente del de las partículas de la invención, no se ha traducido en que tiene la función de un fármaco antituberculosis. En la preparación de las partículas de PLGA que tienen la actividad de fármaco antituberculosis, usando las que son adecuadas con respecto al peso molecular del PLGA, debe evaluarse la relación de monómeros y los diámetros de las partículas preparadas, la incorporación de las partículas por fagocitosis de los macrófagos y la actividad antituberculosis en los macrófagos. Tomados los aspectos anteriores en conjunto, en las partículas de PLGA descritas anteriormente, se observa una cierta uniformidad de los materiales debido a que la relación de monómeros de PLGA y los diámetros de las partículas entran en el "intervalo adecuado" de la invención, pero no se describen las características correctas para las partículas y no se observa la acción de los fármacos antituberculosis. Por lo tanto, es difícil llegar a un ejemplo previo que niega la novedad y la actividad inventiva de la invención.

Adicionalmente, en Pharmaceutical Research (Vol. 17, No. 8:955–961, 2000), se describe un procedimiento para preparar partículas que contienen rifampicina hechas usando PLGA con un peso molecular de 82.500. Este procedimiento para la preparación de las partículas es diferente del de la invención. Se divulga un efecto de exterminio del germen de la tuberculosis de las partículas de PLGA que contienen rifampicina usando PLGA con un peso molecular de 82.500 en Pharmaceutical Research (Vol. 18, No. 9:1315–1319, 2001). Esto muestra que la actividad antituberculosis de las partículas de PLGA que contienen rifampicina es inferior al efecto de la rifampicina de forma individual *in vitro* y que no se puede decir que exista un efecto del tratamiento evidente en experimentos con animales. A fin de que las partículas de PLGA que contienen rifampicina para provocar la acción antituberculosa, las partículas deben tener una degradabilidad apropiada y una alta tasa de rifampicina incluida internamente. Sin embargo, en el artículo citado anteriormente, dichas características por las que depende la actividad no se han examinado y se ha investigado la actividad antituberculosa. Se sabe que la degradabilidad y la tasa incluida internamente están reducidas en las partículas de PLGA con un peso molecular grande, y por lo tanto, parece que debido al uso de PLGA con un peso molecular alto de 82.500, no se provocó la acción antituberculosa. Como anteriormente se han realizado investigaciones similares a las presentadas en la invención, pero nunca se ha efectuado el intento de exterminar los patógenos parasitarios intracelulares aprovechando la actividad fagocítica del macrófago y consiguiendo esta activación. Asimismo, se ha preparado PLGA que contiene rifampicina, pero no se han realizado investigaciones adecuadas para los procedimientos de preparación y la propiedad material con el fin de permitir conseguir el objeto de la invención. Adicionalmente, en Pharmaceutical Research (Vol. 18, No. 10:1405–1410, 2001), existe una descripción de que se supone que las partículas de PLGA que contienen rifampicina se incorporan en los macrófagos. No obstante, también en este caso, las partículas no se han incorporado de forma activa en los macrófagos o no se ha preparado ninguna formulación en la que se pretenda la activación, y, de hecho, no se ha examinado la tasa fagocítica de las partículas de PLGA que contienen rifampicina. Accidentalmente, la concentración de rifampicina en los macrófagos *in vitro* usando las partículas de PLGA que contienen rifampicina descritas en este informe es de solo 0,45 $\mu\text{g}/10^6$ células. En el caso del uso de partículas finas de PLGA que contienen rifampicina, no solo se activa la fagocitosis sino que también la concentración de rifampicina en los

macrófagos alcanza $6 \mu\text{g}/10^6$ células es 13 veces o más. A partir de lo anterior, si se pretende inducir la fagocitosis en los macrófagos y exterminar los microorganismos patológicos en los macrófagos, es evidente que es difícil conseguirlo solo conteniendo el fármaco en microesferas. Adicionalmente, en todos los informes previos, no se ha examinado si las partículas de PLGA que contienen rifampicina exterminan los gérmenes de la tuberculosis intracelular usando los macrófagos alveolares que son las células diana de los gérmenes de la tuberculosis. Como es evidente en referencia al "Macrophage Which Supports Life," mencionado anteriormente, los macrófagos son muy específicos de tejido y, por tanto, es un hecho bien conocido que el resultado obtenido usando los macrófagos presentes en la sangre no se pueden aplicar a los macrófagos específicos de tejido, por ejemplo los macrófagos alveolares. Es decir, como una novedad de la invención, la novedad del concepto es una cuestión de rutina. Los ejemplos que apoyan este concepto incluyen los aspectos de que se usan los macrófagos alveolares y se induce la actividad fagocítica de las células, y la alta concentración del medicamento se retiene realmente en los macrófagos alveolares y que se producen y proporcionan las partículas de PLGA que contienen rifampicina en las que el exterminio de los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos alveolares por la formulación es, evidentemente, más excelente que el producido por la rifampicina sola.

Por otra parte, se ha conocido ampliamente que la producción de sustancias antibacterianas no específicas, por ejemplo, peróxido de hidrógeno y radicales de oxígeno de los macrófagos se potencia mediante la fagocitosis de las partículas por los macrófagos. Por ejemplo, en el European Journal of Pharmaceutical Sciences (Vol. 15, pp. 197–207, 2000), se divulga que la producción de peróxido de hidrógeno a partir de macrófagos cultivados cuyos caracteres se parecen a los de los monocitos en sangre se potencia mediante fagocitosis de las partículas de PLGA. Sin embargo, no se describe que la fagocitosis de PLGA por los macrófagos mejora la actividad fagocítica. Adicionalmente, dado que la activación de los macrófagos es muy diversa, la mejora de la producción de peróxido de hidrógeno por la fagocitosis no se está combinada directamente con la mejora de la fagocitosis.

Cuando se lleva a cabo el tratamiento real de la enfermedad infecciosa, una formulación en la que un medicamento de tipo (2) o (3) está contenido (en un remedio de tipo (1) es eficaz. Es decir, para que el remedio de (2) o (3) actúe con eficacia en los macrófagos, el remedio de tipo (1) facilita la actividad fagocítica de los macrófagos para mejorar la función que porta el remedio de tipo (2) o (3) en los macrófagos. Es decir, como se muestra en la Fig. 1, el remedio previsto por la invención es fácilmente fagocitado por los macrófagos, facilita la actividad fagocítica al ser fagocitado, y, por lo tanto, la concentración del remedio en los macrófagos se hace notablemente mayor en comparación con el caso de administrar el remedio solo. Es decir, en comparación con el fármaco incorporado en los macrófagos en una solución de fármaco convencional en el lado derecho, las partículas finas que incluyen el fármaco interno de acuerdo con la invención en el lado izquierdo se incorporan activamente en los macrófagos para aumentar la concentración de fármaco en los macrófagos. De esta manera, "facilitar la actividad fagocítica de los macrófagos" descrito en las reivindicaciones significa que la concentración del remedio en los macrófagos se hace notablemente mayor en comparación con el caso de la administración del remedio solo porque el remedio mejora la capacidad fagocítica de los macrófagos. Ejemplo de aplicación específica: tuberculosis

Tuberculosis se expone como ejemplo con respecto a la eficacia del remedio presentada en la invención. Los gérmenes de la tuberculosis invaden las vías respiratorias hasta los alvéolos pulmonares por gotas y son fagocitados por los macrófagos alveolares. Por lo general, los patógenos fagocitados están destinados a descomponerse mediante un ataque de proteasa en las células. Sin embargo, los gérmenes de la tuberculosis evitan el ataque de la proteasa y están vivos en los macrófagos. Estos gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos migran fuera de los macrófagos y suministran persistentemente los gérmenes de la tuberculosis en un cuerpo huésped. En la actualidad, como fármacos antituberculosis, se utilizan medicamentos tales como isoniazida, rifampicina, sulfato de estreptomicina y etambutol. Todos los medicamentos son eficaces para los gérmenes de la tuberculosis fuera de los macrófagos, pero no presentan ningún efecto sobre los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos alveolares. Esto se atribuye principalmente a que no se obtiene una concentración de medicamento suficiente para exterminar los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos alveolares.

Por lo tanto, si se obtiene la concentración de medicamento suficiente para exterminar los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos alveolares, aprovechando la fagocitosis de los macrófagos alveolares, también es posible exterminar los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos alveolares. En este caso, la fagocitosis se utiliza con el fin de aumentar selectivamente la concentración de medicamento en los macrófagos.

A. Remedio que mejora la capacidad fagocítica de los macrófagos

Usando PLGA como ejemplo, se describen un procedimiento para producir un remedio que mejore la capacidad fagocítica de los macrófagos y sus efectos.

I. Mejora de la capacidad fagocítica de los macrófagos mediante la formulación de partículas finas de PLGA (en esta sección, una partícula fina de PLGA *per se* es un ingrediente del medicamento.)

1. Método para la preparación de partículas finas de PLGA

(a) Materiales

(1) PLGA [copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico), relación monomérica: 75:25, peso molecular: 20.000

(Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA-7520)

(2) Grado de polimerización de PVA (alcohol polivinílico): 500 (b) Preparación de la formulación de partículas finas de PLGA

(1) 500 mg de PLGA se disuelven en 1,5 ml de cloruro de metileno.

(2) El PVA se disuelve en agua para convertirse en 0,3 % (p/v).

(3) Cuando se añaden 8 ml de una solución acuosa de PVA de (2) a una solución de (1) y se agita durante 3 minutos, se forma una emulsión de aceite en agua (de tipo a/a).

(4) Se añade (3) en 200 ml de una solución acuosa de PVA de (2), y se agita a temperatura ambiente a 520 rpm durante 3 horas.

(5) Una formulación de partículas finas se precipita mediante centrifugación (3.000 rpm, 15 minutos), se separa y se lava adicionalmente dos veces mediante la adición de 10 ml de agua destilada usando una centrífuga.

(6) Secado a presión reducida en un desecador durante 24 horas.

(7) Una distribución del diámetro de partícula de la formulación de partículas finas resultante se muestra en la Fig. 2. Como es evidente a partir de esta figura, la formulación de partículas finas preparada tiene un pico en un diámetro de aproximadamente 2 µm y tiene una distribución de 1 a 10 µm. Esta partícula es un sólido a temperatura ambiente. Un rendimiento calculado a partir de PLGA (500 mg) usado para la preparación y un peso total de la formulación recuperada era de aproximadamente 90 %.

(8) Otros ejemplos

Las características (peso molecular y composición) de las partículas finas de PLGA fabricadas adicionalmente se muestran de forma correcta continuación.

1. PLGA-5005 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50)

2. PLGA-5010 (PLGA, peso molecular: 10.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50)

3. PLGA-5020 (PLGA, peso molecular: 20.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50)

4. PLGA-7505 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico: 75:25)

5. PLGA-7510 (PLGA, peso molecular: 10.000; ácido láctico/ácido glicólico: 75:25)

El procedimiento para preparar la formulación de partículas finas de PLGA es el mismo que 1. (b) (1) a (6), excepto el tipo de PLGA.

Un diámetro promedio de partícula de la formulación de partículas finas resultante fue aproximadamente 2 µm, incluso cuando se utilizó cualquier PLGA. Un rendimiento calculado a partir de PLGA (500 mg) usado para la preparación y un peso total de la formulación recuperada era de aproximadamente 90 %.

2. Efecto de mejora de la fagocitosis de macrófagos alveolares mediante fagocitosis de la formulación de partículas finas de PLGA

(1) Las células de macrófagos alveolares (células NR8383) se preparan a 1×10^6 células/ml en un medio (Ham F-12K, 15 % de suero bovino fetal), añadido en una placa de 24 pocillos, y se añaden 0,04, 0,4 o 4 µg la formulación de partículas finas PLGA-7520, que a continuación se cultivaron en una incubadora de gas de dióxido de carbono (37 °C).

(2) Una hora después del cultivo, se retira el medio, se añaden 0,1 ml de solución salina que contiene 0,25 % de tripsina/tampón fosfato (en lo sucesivo PBS), se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se retira el sobrenadante del cultivo y se realiza el lavado.

(3) Se añaden 0,1 ml del medio y se mezclan con 0,1 ml de 80 % de Percoll (Pharmacia) para preparar 40 % de solución Percoll. Esto se superpone en 0,1 ml de 70 % de Percoll colocado en un 1,5 ml de un tubo de muestra, y se centrifuga (8000 rpm, 10 minutos).

(4) Después de la centrifugación, se recogen las células presentes en una interfaz y después de lavar las células con PBS, se añade 1 ml del medio. Se añaden partículas de látex de poliestireno (FITC-PSLP) con un diámetro de partículas de 2,0 µm marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 1×10^7 y una mezcla se cultiva durante una hora. El marcaje con FITC fluorescente es para realizar fácilmente el análisis cuantitativo.

(5) Después del cultivo, se lleva a cabo la centrifugación (700 rpm, 5 minutos), a continuación, se añade 1 ml de PBS a los macrófagos en una capa de precipitado, y la centrifugación se repite dos veces.

(6) Después de la eliminación de PBS, se añaden 0,1 ml de formalina al 10 %/PBS a las células, se fija durante 5 minutos, después se añade 1 ml de agua destilada, se retira el sobrenadante, se añade 1 ml de agua destilada de nuevo, y se retira el sobrenadante. Después de retirar el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de agua destilada para suspender las células y se toman 0,02 ml de la suspensión, se extienden sobre un portaobjetos de vidrio y se secan.

(7) Con un microscopio de fluorescencia se fotografían múltiples campos visuales y se mide un número de células NR8383 que han incorporado FITC PSLP por cada 100 células.

(8) Un cambio de cantidades fagocitadas con FITC-PSL en los macrófagos por la formulación de partículas finas de PLGA es como se muestra en la Tabla 1. Una adición de una cantidad baja de la formulación de partículas finas de PLGA no afecta notablemente a la capacidad fagocítica de los macrófagos, pero es evidente que la adición de 0,4 (µg/ml) activa notablemente la capacidad fagocítica.

Tabla 1 Efecto de mejora de la formulación de partículas finas de PLGA sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos

Cantidad de formulación de partículas finas de PLGA (µg/ml)	Velocidad de captación de FITC-PSLP (%)
0	11,6
0,004	8,8
0,04	12,3
0,4	20,2

II. Mejora de la capacidad fagocítica de los macrófagos por el lipopolisacárido

5 1. Procedimiento de preparación de lipopolisacárido

(a) Material

(1) *Pantoea agglomerans* perteneciente a la bacteria gramnegativa, género *Pantoea*

(b) Preparación de lipopolisacárido

10 (1) *Pantoea agglomerans* se añade a 7 litros de caldo (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, 1 g/l de glucosa, pH 7,5), se cultiva con agitación a 35 °C durante 24 horas y se recogen aproximadamente 70 g del cuerpo bacteriano húmedo.

15 (2) Se suspendieron 70 g del cuerpo bacteriano en 500 ml de agua destilada, se añadieron 500 ml de 90 % de fenol con calor, se agitó a 65 a 70 °C durante 20 minutos, se enfrió y después se recogió una capa acuosa. La capa acuosa recogida se dializa durante la noche para eliminar el fenol y una solución interna de la diálisis se somete a ultrafiltración para concentrar por una membrana de corte de peso molecular 200.000 con gas nitrógeno a dos atmósferas.

20 (3) Un lipopolisacárido congelado/seco en bruto resultante se disuelve en agua destilada, se aplica en una cromatografía de intercambio aniónico (suministrado por Pharmacia, Q-Sepharose Fast Flow), una solución de muestra se pasa a través de una columna usando un tampón que contiene 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) y 10 mM de NaCl, y una fracción de la actividad de Limulus se eluye con de 200 a 400 mM de NaCl/10 mM de Tris-HCl (pH 7,5). Por ultrafiltración de esta solución eluida, desalinizando, concentrando y congelando/secando en las mismas condiciones que el anterior, es posible producir aproximadamente 300 mg de lipopolisacárido purificado a partir de aproximadamente 70 g del cuerpo bacteriano en húmedo.

2. Efecto de mejora sobre la fagocitosis de los macrófagos alveolares por lipopolisacárido

25 (1) Se prepararon células macrófagos alveolares (NR8383) a 1×10^6 células/ml en un medio (Ham F-12K, 15 % de suero bovino fetal) y se añaden a una placa de 24 pocillos. Se añade el lipopolisacárido para llegar a 1 µg/ml y el cultivo se realiza en un incubador de gas dióxido de carbono (37 °C).

30 (2) Después de cultivar durante una hora, las células se transfieren a un tubo de muestra de 1,5 ml y el medio se elimina mediante centrifugación (2.000 rpm, 5 minutos). Después, se añaden 0,1 ml de 0,25 % de tripsina/PBS y el tubo se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos, después el sobrenadante del cultivo se elimina mediante centrifugación (2.000 rpm, 5 minutos) y se realiza un lavado con PBS.

(3) A ello se añaden 0,1 ml del medio y se mezclan con 0,1 ml de 60 % de Percoll para preparar una solución de 30 % de Percoll, que después se centrifuga (8.000 rpm, 10 minutos).

35 (4) Después de la centrifugación, se recogen las células presentes en la superficie del líquido y se lavan dos veces con PBS. Después se añade 1 ml del medio, FITC-PSLP con un diámetro de partícula de 2,0 µm a 1×10^7 , que después se cultiva durante una hora.

(5) Después del cultivo, se retira el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de 0,25 % de tripsina/PBS y se deja una mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añaden 1 ml del medio y después se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos).

40 (6) Se añade 1 ml de PBS a los macrófagos en una capa precipitada, se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos) y se retira el sobrenadante. De nuevo se añade 1 ml, se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos) y se retira el sobrenadante.

(7) Después de retirar el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de formalina al 10 %/PBS a las células, se fija durante 5 minutos, después se añade 1 ml de agua destilada, se retira el sobrenadante, se añade 1 ml de agua destilada de nuevo, y se retira el sobrenadante.

45 (8) Después de retirar el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de agua destilada para suspender las células, se toman 0,02 ml de la suspensión, se extienden sobre un portaobjetos de vidrio y se secan.

(9) Con un microscopio de fluorescencia se fotografían múltiples campos visuales y se mide el número de células NR8383 que han incorporado FITC PSLP por cada 500 células.

(10) El incremento de la cantidad fagocitada-FITC-PSLP de los macrófagos por el lipopolisacárido se muestra en la Tabla 2. Es evidente que la capacidad fagocítica del macrófago es activada por el lipopolisacárido.

Tabla 2 Activación de la capacidad fagocítica de los macrófagos por lipopolisacárido

Cantidad añadida de lipopolisacárido (µg/ml)	Velocidad de captación de FITC-PSLP (%)
0	31
1,0	51

5 B. Remedio que actúa sobre los patógenos en los macrófagos

Migración eficaz de rifampicina (fármaco antituberculoso) en los macrófagos mediante fagocitosis de la formación de partículas finas de RFP-PLGA

1. Preparación de la formación de partículas finas de PLGA que incluye rifampicina en su interior

(a) Materiales

- 10 (1) PLGA [copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico), relación monomérica: 75:25 o 50: 50, peso molecular: 5.000, 10.000 o 20.000, Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA-5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520.
(2) Rifampicina
(3) Grado de polimerización de PVA (alcohol polivinílico): 500. 500 (b) Preparación de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA
- 15 (1) PLGA (500 mg) y rifampicina (0, 50, 100 o 200 mg) se disuelven en 1,5 ml de cloruro de metileno.
(2) El PVA se disuelve en agua para convertirse en 0,3 % (p/v).
(3) Cuando se añaden 8 ml de una solución acuosa de PVA de (2) a una solución de (1) y se agita durante 3 minutos, se forma una emulsión de tipo a/a.
- 20 (4) Se añade (3) en 200 ml de una solución acuosa de PVA de (2), y se agita a temperatura ambiente a 520 rpm durante 3 horas.
(5) Una formulación de partículas finas se precipita mediante centrifugación (3.000 rpm, 15 minutos), se separa y se lava adicionalmente dos veces mediante la adición de 10 ml de agua destilada usando una centrífuga.
(6) Secado a presión reducida en un desecador durante 24 horas.
(7) Las partículas finas de PLGA producidas (peso molecular y composición) se muestran correctamente a
- 25 continuación.
- 30 1. RFP-PLGA 5005 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50).
2. RFP-PLGA 5010 (PLGA, peso molecular: 10.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50).
3. RFP-PLGA 5020 (PLGA, peso molecular: 20.000; ácido láctico/ácido glicólico: 50:50).
4. RFP-PLGA 7505 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico: 75:25).
5. RFP-PLGA 7510 (PLGA, peso molecular: 10.000; ácido láctico/ácido glicólico: 75:25).
6. RFP-PLGA 7520 (PLGA, peso molecular: 20.000; ácido láctico/ácido glicólico: 75:25).

La distribución del tamaño de partícula y las características de todas las formulaciones de partículas finas resultantes eran las mismas que las de las formulaciones de partículas finas de PLGA sola (A. I. 1. (b) (7)).

- 35 (8) La formación de partículas finas de 4 mg en las que hay contenidos 0, 50, 100 o 200 mg de rifampicina está en 500 mg de PLGA se disuelve en 1 ml de cloruro de metileno, y después se mide una absorbancia a 475 nm con un espectrofotómetro.
(9) Las cantidades de rifampicina recuperadas en la formación de partículas finas de RFP-PLGA (la partícula fina de PLGA-7520 formada por PLGA de peso molecular de 20.000 y el ácido láctico/ácido glicólico de 75/25) se muestran en la Tabla 3. Como es evidente a partir de este resultado, se encuentra que la rifampicina se ha
- 40 formulado de manera eficiente.

Tabla 3 Cantidades de rifampicina incluidas en el interior de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA

Rifampicina (mg)	Cantidad de PLGA (mg)	Rifampicina incluida internamiento (%)
0	500	—
50	500	83
100	500	82
200	500	89

2. Otro procedimiento de preparación de la formación de partículas finas de RFP–PLGA (procedimiento de emulsión en membrana, conocido en la materia)

Usando un procedimiento de emulsión de membrana se preparó la formación de partículas finas de RFP–PLGA 7510.

- 5 El procedimiento de emulsión de membrana es un procedimiento de emulsión en el uno (fase de dispersión) de dos tipos de líquidos que no se mezclan juntos se presan para dispersar en otro líquido (fase continua) a través de una membrana de vidrio poroso. Mediante el uso de este procedimiento, es posible obtener una emulsión con un diámetro de partícula uniforme.

(a) Materiales

- 10 (1) PLGA [copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico)], relación monomérica: 75:25, peso molecular: 10.000 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA7510).
 (2) Rifampicina
 (3) Grado de polimerización de PVA (alcohol polivinílico): 500 (b) Preparación de la formulación de partículas finas de RFP–PLGA
- 15 (1) 500 mg de PLGA y 100 mg de rifampicina se disuelven en 10 ml de cloruro de metileno.
 (2) El PVA se disuelve en agua para convertirse en 0,3 % (p/v).
 (3) Cuando una solución (1) se dispersa en 100 ml de solución acuosa de PVA de (2) a través de una membrana de SPG (Ise Chemicals Corporation, tamaño de poro fino: 0,49 µm), se forma una emulsión de aceite en agua (de tipo a/a/).
- 20 (4) Se añade (3) en 200 ml de una solución acuosa de PVA de (2), y se agita a temperatura ambiente a 520 rpm durante 3 horas.
 (5) Una formulación de partículas finas se precipita mediante centrifugación (3.000 rpm, 15 minutos), se separa y se lava adicionalmente dos veces mediante la adición de 10 ml de agua destilada usando una centrífuga.
 (6) Secado a presión reducida en un desecador durante 24 horas.
- 25 (7) Un diámetro promedio de partícula de la formulación de partículas finas resultante es 1,98 µm. Un rendimiento de PLGA calculado a partir de PLGA (500 mg) usado para la preparación y un peso total de la formulación recuperada era de aproximadamente 90 %. El rendimiento de rifampicina fue de aproximadamente 75 %. Esta partícula es un sólido a temperatura ambiente.

3. Otros ejemplos mediante el procedimiento de emulsión de membrana

- 30 Las partículas finas de RFP–PLGA (peso molecular y composición) distintas de la formulación de partículas finas de RFP–PLGA 7510 se muestran en conjunto más adelante.
- 35 1. RFP–PLGA 5005 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico 50:50)
 2. RFP–PLGA 5010 (PLGA, peso molecular: 10.000; ácido láctico/ácido glicólico 50:50)
 3. RFP–PLGA 5020 (PLGA, peso molecular: 20.000; ácido láctico/ácido glicólico 50:50)
 4. RFP–PLGA 7505 (PLGA, peso molecular: 5.000; ácido láctico/ácido glicólico 75:25)
 5. RFP–PLGA 7520 (PLGA, peso molecular: 20.000; ácido láctico/ácido glicólico 75:25)

El procedimiento para preparar estas formulaciones de partículas finas de RFP–PLGA es el mismo que el procedimiento de emulsión en membrana a excepción de tipos de PLGA.

- 40 Los diámetros promedio de partícula de las formulaciones de partículas finas resultantes son 2,20 µm de PLGA 5005, 2,66 µm de PLGA 5010, 2,29 µm de PLGA 5020, 2,00 µm de PLGA 7505, y 1,85 µm de PLGA 7520. Todos los rendimientos de PLGA calculados a partir de PLGA (500 mg) usado para la preparación y un peso total de la formulación recuperada fueron aproximadamente 90 %. Los rendimientos de rifampicina fueron aproximadamente 87 % en PLGA 5005, aproximadamente 78 % de PLGA 5010, aproximadamente 67 % de PLGA 5020, aproximadamente 91 % de PLGA 7505 y aproximadamente 58 % en PLGA 7520.

45 4. Liberación de rifampicina de partículas finas de RFP–PLGA

- (1) Con independencia de las partículas finas de RFP–PLGA (50 mg) preparadas mediante el procedimiento de emulsión por membrana se dispersaron en 5 ml de tampón fosfato a pH 7,4 (fuerza iónica: 0,154 M) retenida a 37 °C (temperatura).
 (2) Los sobrenadantes se recogieron con el tiempo mediante centrifugación y 5 ml de tampón de fosfato a pH 7,4 (fuerza iónica: 0,154 M) se añadieron a las partículas finas restantes.
 (3) Se midió una concentración eluida en el sobrenadante.
 La medición se realizó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 475 nm.
 (4) Las velocidades de liberación de rifampicina desde las respectivas partículas finas RFP–PLGA en el sobrenadante se muestran en la FIG. 4 y la FIG. 5. A partir de los datos del presente experimento, se demostró que las velocidades de liberación de rifampicina de PLGA con pesos moleculares de 5.000 y 10.000, es decir,
- 55

PLGA 5005, PLGA 5010, 7505 PLGA y PLGA 7510 fueron rápidas. A partir de estos resultados, se ha demostrado que las composiciones de PLGA en las que el peso molecular es de 5.000 a 10.000 y la relación de ácido láctico y ácido glicólico es de 50:50 o 75:25 son excelentes en la migración del fármaco en los macrófagos a través de la fagocitosis.

5 5. Incremento selectivo de la concentración intracelular de rifampicina mediante fagocitosis de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA (PLGA-7520)

- (1) La formulación de partículas finas de RFP-PLGA preparada se dispersa de nuevo en PBS, se realiza la centrifugación (400 rpm, 5 minutos) para eliminar las partículas grandes y la formulación de partículas finas (aproximadamente 30 % en peso) preparada en tamaños de aproximadamente 1 a 3 μm mediante observación al microscopio se utilizan para los siguientes experimentos.
- (2) Las células NR8383 cultivadas a 5×10^5 células/0,9 ml en un medio se introducen en una placa de 24 pocillos, se añaden 0,12 mg/0,1 ml de cada formulación de partículas finas de RFP-PLGA y se cultivan durante 12 horas.
- (3) Después del cultivo, se retira el medio, se añaden 0,1 ml de 0,25 % de tripsina/PBS, después se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se retira el sobrenadante del cultivo y se realiza el lavado.
- (4) O. (3) Se añade 1 ml del medio y se mezcla con 0,1 ml de 80 % de Percoll para preparar 40 % de solución Percoll. Esto se superpone en 0,1 ml de 70 % de Percoll colocado en un 1,5 ml de un tubo de muestra, y se centrifuga (8000 rpm, 10 minutos).
- (5) Después de la centrifugación, se recogen las células presentes en una interfaz, se lavan con PBS y después la rifampicina incorporada en las células se extrae con cloruro de metileno.
- (6) Se determina una cantidad de rifampicina a partir de la absorbancia a 475 nm.
- (7) Como control, se prepara una solución en dimetilsulfóxido (DMSO) de rifampicina en la misma cantidad que la que contenía 0,12 mg de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA, esta se añade a una placa de 24 pocillos a la que se añade 1 ml del medio de y se añaden células NR8383.
- (8) Las células se cultivan durante 12 horas, posteriormente, las células (5×10^5 células) se recogen y la rifampicina en las células se extrae con cloruro de metileno.
- (9) La captación de las cantidades de rifampicina por los macrófagos se muestran en la Fig. 3. Se muestra que la rifampicina a aproximadamente 19 veces se incorpora en la cantidad de adición de 40 ($\mu\text{g}/5 \times 10^5$ células/pocillo/ml) de rifampicina en el caso de la presente formulación de partículas finas de RFP en comparación con el medio convencional que contiene rifampicina.

C. Medicamento (A + B) que mejora la capacidad fagocítica de los macrófagos y actúa sobre los patógenos en los macrófagos Efecto de mejora sobre la actividad fagocítica de los macrófagos mediante fagocitosis de la formulación de las partículas finas de RFP-PLGA

1. Preparación de formulación de partículas finas de RFP-PLGA (a) Materiales

- (1) PLGA [copolímero de poli(ácido láctico/ácido glicólico), relación monomérica: 75:25 o 50:50, peso molecular: 5.000, 10.000 o 20.000, Wako Pure Chemical Industries Ltd., PLGA-5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520.
- (2) Rifampicina
- (3) Grado de polimerización de PVA (alcohol polivinílico): 500 (b) Preparación de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA
- (1) 500 mg de PLGA y 100 mg de rifampicina se disuelven en 1,5 ml de cloruro de metileno.
- (2) El PVA se disuelve en agua para convertirse en 0,3 % (p/v).
- (3) Cuando se añaden 8 ml de una solución acuosa de PVA de (2) a una solución de (1) y se agita durante 3 minutos, se forma una emulsión de tipo a/a.
- (4) Se añade (3) en 200 ml de una solución acuosa de PVA de (2), y se agita a temperatura ambiente a 520 rpm durante 3 horas.
- (5) Una formulación de partículas finas se precipita mediante centrifugación (3.000 rpm, 15 minutos), se separa y se lava adicionalmente dos veces mediante la adición de 10 ml de agua destilada usando una centrífuga.
- (6) Secado a presión reducida en un desecador durante 24 horas.
- (7) La distribución del tamaño de partícula y las características de todas las formulaciones de partículas finas resultantes eran las mismas que las de las formulaciones de partículas finas de PLGA sola (A. I. 1. (a) (7)).
- (8) La formulación de partículas finas se dispersa de nuevo en PBS, se realiza la centrifugación (400 rpm, 5 minutos) para eliminar la formulación de partículas grandes y la formulación de partículas finas preparada en tamaños de aproximadamente 1 a 3 μm se usa para los experimentos siguientes.

55 2. Mejora de la actividad fagocítica de los macrófagos mediante fagocitosis de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA (PLGA-7520)

- (1) Las células de macrófagos alveolares (NR8383) se preparan a 1×10^6 células/ml en un medio (Ham F-12K, 15 % de suero bovino fetal), añadido en una placa de 24 pocillos, y se añaden 0,012, 0,12 o 1,2 μg de la formulación de partículas fina, que a continuación se cultivan en una incubadora de gas de dióxido de carbono

(37 °C).

(2) Una hora después del cultivo, las células se transfieren a 1,5 ml de un tubo de muestra, se retira del medio, se añaden 0,1 ml de 0,25 % de tripsina/PBS, una mezcla se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos, se retira el sobrenadante del cultivo y se realiza el lavado.

(3) A esto se añaden 0,1 ml del medio y 0,1 ml de 90 % de Percoll para formar 45 % de Percoll y después se realiza la centrifugación (8.000 rpm, 10 minutos).

(4) Después de la centrifugación, se recogen las células presentes en la superficie del líquido y se lavan dos veces con PBS. Después se añaden 1 ml del mismo medio como el usado en (1), FITC-PSLP con un diámetro de partícula de 2,0 μm a 1×10^7 , que después se cultivan durante una hora.

(5) Después del cultivo, se retira el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de 0,25 % de tripsina/PBS y se deja una mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añaden 1 ml del medio y después se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos).

(6) Se añade 1 ml de PBS a los macrófagos en una capa precipitada, se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos) y se retira el sobrenadante. De nuevo se añade 1 ml, se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos) y se retira el sobrenadante.

(7) Después de retirar el sobrenadante, se añaden 0,1 ml de formalina al 10 %/PBS a las células, se fija durante 5 minutos, después se añade 1 ml de agua destilada y, después, se realiza la centrifugación (700 rpm, 5 minutos), se añade 1 ml de agua destilada de nuevo, y se retira el sobrenadante. A ello se añaden 0,1 ml de agua destilada para suspender las células, se toman 0,02 ml de la suspensión, se extienden sobre un portaobjetos de vidrio y se secan.

(8) Con un microscopio de fluorescencia se fotografían múltiples campos visuales y se mide el número los macrófagos (células NR8383) que han incorporado FITC PSLP por cada 500 células.

(9) El aumento de las cantidades de FITC-PSLP fagocitadas por los macrófagos debido a la fagocitosis de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA es como se muestra en la Tabla 4. Es evidente que la capacidad fagocítica de los macrófagos es activada por la formulación de partículas finas de RFP-PLGA.

Tabla 4 Efecto de mejora sobre la fagocitosis de FITC-PSLP por las células NR8383 que han fagocitado la formulación de las partículas finas de RFP-PLGA

Cantidad de formulación de partículas finas de RFP-PLGA ($\mu\text{g/ml}$)	Velocidad de captación de FITC-PSLP (%)
0	31
0,012	45
0,12	47
1,2	52

A partir de los resultados anteriores, (1) se ha demostrado que la formulación de partículas finas de PLGA y el lipopolisacárido activan la capacidad fagocítica de los macrófagos. Asimismo, se ha demostrado (2) que la migración de la rifampicina en los macrófagos se incrementa considerablemente por la inclusión internamente en la formulación de partículas finas de PLGA y (3) que la capacidad fagocítica de los macrófagos se activa incluso cuando la rifampicina está contenida en la formulación de partículas finas de PLGA. Por tanto, la formulación de partículas finas de PLGA que contiene rifampicina activa la capacidad fagocítica de los macrófagos, lo que tiene como resultado una concentración incrementada de rifampicina en los macrófagos y, por tanto, hace posible conseguir el objeto de la invención para afectar con eficacia contra los patógenos retenidos en los macrófagos. Los resultados anteriores indican un ejemplo del nuevo remedio, en el que el remedio que actúa sobre los patógenos en los macrófagos se incorpora efectivamente en los macrófagos "facilitando la actividad fagocítica de los macrófagos", que es un concepto básico de la invención.

3. Efecto de exterminio sobre los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos mediante fagocitosis de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA

(a) Método de medición de la viabilidad de los gérmenes de la tuberculosis (BCG) en macrófagos

(1) La vacuna de BCG desecada se disolvió en solución salina (12 mg/ml), se agitó, después se transfirió el medio KRD (3 a 4 ml) a un matraz de cultivo T-25, después se añadieron 40 μl de una suspensión de BCG y se cultivaron en un incubador seco a 37 °C.

(2) En el experimento, se introdujo una solución bacteriana y perlas de vidrio en una proporción de 1:4 en un tubo de muestra, que después se agitó durante un minuto mediante un mezclador en vórtex. Después, el cuerpo bacteriano se dispersó mediante sonicación durante 5 minutos usando un lavador ultrasónico.

(3) Las células NR8383 a una concentración de 1×10^6 células/ml se colocaron en una placa de 6 pocillos (volumen total de 5 ml). Los gérmenes de la tuberculosis (BCG) a 10 por célula (multiplicidad de infección (Mdi)=10) se añadieron a un medio de cultivo celular.

(4) Después de infectar a 37 °C en una incubadora con gas dióxido de carbono durante 4 horas, se realizó la centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos (SCT15B) y después se eliminó el sobrenadante. Usando un medio

libre de suero, la centrifugación también se repitió dos veces para eliminar las bacterias presentes fuera de las células.

(5) Las células NR8383 a una concentración de 1×10^6 células/ml se colocaron en una placa de 24 pocillos.

(6) Las respectivas partículas finas de RFP-PLGA a 10 por célula se añadieron al medio de cultivo de las células NR838.

(7) Después de fagocitar a 37 °C en el incubador de gas de dióxido de carbono durante 4 horas, las partículas presentes fuera de las células se eliminaron usando 25 % de tripsina.

(8) Se añadió 80 % de Percoll para formar una solución de 40 % Percoll-células y se añadió otro 70 % de Percoll para generar un gradiente de densidad. Tras la centrifugación (SORVALL Biofuge Fresco) a 10.000 rpm durante 5 minutos, las células en una interfaz entre 40 % y 70 % de Percoll se recogieron para separar las células de RFP-PLGA.

(9) Usando PBS, también la centrifugación se repitió dos veces para eliminar el Percoll.

(10) Las tasas de bacterias vivas y las bacterias muertas se midieron usando un procedimiento de tinción para diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (EB). La FDA se disolvió en acetona a una concentración de 5 mg/ml y 20 µl de la misma se diluyeron con 1 ml de PBS en uso. El EB se disolvió en PBS a una concentración de 20 µg/ml y 50 µl de la misma se diluyeron con 1 ml de PBS en uso. Se mezclaron cantidades iguales de FDA y EB diluidos y se usaron para tinción. Esta solución mezclada (1 µl) se colocó en un portaobjetos de vidrio, sobre el mismo se depositó 1 µl de la solución bacteriana, que después se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se observó con microscopio fluorescente. En las bacterias vivas la FDA se descompone mediante la actividad esterase derivada de las bacterias para emitir fluorescencia con un color verde. Por otro lado, en las bacterias vivas, no hay actividad esterase, por lo que no se observa tinción con FDA y las bacterias se tiñen con EB para emitir fluorescencia con un color naranja.

(b) Efecto de exterminio de la formulación de partículas finas de RFP-PLGA incorporadas en los macrófagos mediante fagocitosis en los gérmenes de tuberculosis

(1) Con el fin de examinar un efecto exterminador de gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos por las partículas finas de RFP-PLGA, las partículas finas de RFP-PLGA se administraron a los macrófagos (macrófagos infectados con los gérmenes tuberculosis), que han fagocitado previamente los gérmenes de la tuberculosis, y estas partículas finas fueron fagocitadas por los macrófagos.

(2) Los resultados de examinar cómo los efectos de exterminio de RFP-PLGA que migraban en los macrófagos por la fagocitosis exhibían fagocitosis contra los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos se muestran en la Fig. 6. Es evidente que la concentración intracelular de rifampicina es significativamente más alta en la dosis de las partículas finas de RFP-PLGA que contienen rifampicina de aproximadamente un veinteavo (Mdl=10, a una cantidad estimada de rifampicina es 5 µg/ml, y, por tanto, la rifampicina en la formulación de partículas finas corresponde a un veinteavo de la cantidad en el caso de administra rifampicina sola) que en la dosis de rifampicina sola (100 µg/ml). La administración de las partículas finas de RFP-PLGA en los macrófagos alveolares infectados con gérmenes de tuberculosis exterminó los gérmenes de tuberculosis en las células a una eficiencia de 20 veces o más en comparación con la administración de rifampicina sola. Es decir, administrando el fármaco mediante la fagocitosis de las partículas, un coeficiente de tratamiento se mejoró 20 veces o más con independencia del efecto antituberculoso del fármaco *per se*.

Provisión de remedio que facilita la actividad fagocítica de los macrófagos y actúa sobre los macrófagos en estado disfuncional

Se sabe que normalmente numerosos macrófagos infiltran los tejidos cancerosos. Esto se basa en el hecho de que porque las células cancerosas son sustancias extrañas para un cuerpo vivo, los macrófagos se acumulan con el fin de eliminar las células cancerosas. Si los macrófagos funcionan normalmente, dañan las células cancerosas y desaparecen. No obstante, si los macrófagos funcionan anormalmente, no pueden dañar las células cancerosas, crecen y se produce la formación de una masa tumoral. Como ya se ha descrito, activando los macrófagos, se hace posible también dañar las células cancerosas. Por tanto, facilitando la actividad fagocítica de los macrófagos, es posible hacer que los macrófagos con disfunción adquieran un efecto citotóxico sobre las células cancerosas y tratar con eficacia el cáncer.

Por otro lado, como se muestra en la tabla 2, la fagocitosis por los macrófagos alveolares se mejoró en un 166 % mediante el tratamiento con lipopolisacárido (1 µg/ml) y los macrófagos alveolares fueron activados por el lipopolisacárido. Por tanto, parece que los macrófagos alveolares cuya actividad fagocítica se ha activado mediante el lipopolisacárido produce el efecto citotóxico sobre las células cancerosas de pulmón. Por tanto, en el presente documento se muestra un ejemplo del efecto citotóxico sobre las células de cáncer de pulmón de los macrófagos alveolares activados por el lipopolisacárido.

Ejemplo de aplicación específica: cáncer de pulmón

El efecto citotóxico sobre las células de cáncer de pulmón mediante la activación de los macrófagos alveolares se muestra como el ejemplo de aplicación.

1. Activación de macrófagos alveolares por lipopolisacárido y cocultivo de macrófagos alveolares con células de cáncer de pulmón de Sato

(1) Las células NR8383 a una concentración de 1×10^6 células/ml se colocaron en una placa de 24 pocillos (volumen total: 1,5 ml). Como control se añadieron 5 % de suero bovino fetal, 150 μ l de medio F-12K y 150 μ l de 10 μ g/ml de lipopolisacárido.

(2) Las células se dejaron en el incubador de gas de dióxido de carbono a 37 °C durante 24 horas.

(3) Las células de cáncer de pulmón de Sato se prepararon a una concentración de 1×10^5 células/ml, y se añadieron 50 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos.

(4) Se prepararon células NR8383 tratadas en la sección (1) a concentraciones de 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 y 1×10^4 células/ml, y se añadieron 50 μ l por pocillo a la placa de 96 pocillos (volumen total: 100 μ l).

(5) Las células se dejaron en el incubador de gas de dióxido de carbono a 37 °C durante 4 horas.

2. Efecto citotóxico de los macrófagos cocultivados con células de cáncer de pulmón de Sato sobre las células de cáncer de pulmón

(1) El efecto citotóxico de los macrófagos activados por lipopolisacárido descrito en 1 y cocultivados con células de cáncer de pulmón de Sato sobre células de cáncer de pulmón se evaluó a partir de cantidades de lactato deshidrogenasa liberada por las células en el medio. Por lo tanto, la placa se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos, y 50 μ l del sobrenadante se transfirió a otra placa de 96 pocillos.

(2) Posteriormente, se añadieron 50 μ l de una solución de sustrato unido a un kit (ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96, Promega, cat. G1780) para medir las cantidades de lactato deshidrogenasa. Como control positivo se usó un líquido de dilución de la enzima lactato deshidrogenasa (líquido de dilución 5.000 veces, 50 μ l) unido al kit.

(3) La placa se protegió de la luz con papel de aluminio y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

(4) La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de un líquido de detención.

(5) Una absorbancia a 495 nm se midió utilizando un lector de microplacas (modelo 550, Bio-Rad).

(6) La citotoxicidad (%) se calculó a partir de cada absorbancia.

(7) El efecto citotóxico de NR8383 en las células de cáncer de pulmón de Sato se muestra en la Fig. 7. Se ha demostrado que la fagocitosis por NR8383 tratadas con lipopolisacárido se facilita en comparación con NR8383 sin tratamiento con lipopolisacárido y, en consecuencia, el efecto citotóxico sobre el cáncer de pulmón de Sato se potencia en función de las relaciones celulares.

Provisión de remedio que facilite la actividad fagocítica de los macrófagos y conduce a los macrófagos que retienen patógenos a la muerte celular

El remedio en la presente realización se caracteriza porque conduce a los macrófagos que retienen los patógenos a la muerte celular, facilitando la actividad fagocítica de los macrófagos.

Como se muestra en la Tabla 2, el lipopolisacárido bien conocido como un activador de macrófagos facilita la actividad fagocítica de los macrófagos. Asimismo, el interferón- γ que es una citocina representativa de los factores de activación de macrófagos facilita la actividad fagocítica. Es decir, la facilitación de la actividad fagocítica de los macrófagos es uno de los indicadores de la activación de los macrófagos. Se puede decir que la facilitación de la actividad fagocítica por la fagocitosis es la inducción de la activación de macrófagos, que es la facilitación de la fagocitosis por la estimulación, que es la fagocitosis. También se ha sabido que se induce un cambio de la estructura de la membrana en los macrófagos y se induce un factor de necrosis tumoral unido a la membrana (TNF) en el macrófago. Por lo tanto, junto con la activación de los macrófagos por la estimulación, que es la fagocitosis, se induce el TNF unido a la membrana.

El SIDA se produce debido a la destrucción de las células T por la infección con el virus del SIDA, que da lugar a inmunodeficiencia. El virus del SIDA no solo infecta a las células T sino también a los macrófagos. Esta infección se inicia mediante la adhesión del virus a la proteína CD4 expresada habitualmente en las membranas de las células T y los macrófagos. Los macrófagos infectados con el virus del SIDA no conducen a la muerte celular, pero produce el virus del SIDA de forma persistente y se convierte en el vehículo del patógeno infeccioso como se describe con detalle en II. (2).

Por lo tanto, si se puede conducir a los macrófagos infectados con el virus del SIDA a la muerte celular, se consigue el exterminio de los vehículos del patógeno infeccioso. Como un ejemplo capaz de realizar esta posibilidad, se muestra que el TNF unido a la membrana puede actuar sobre las células de macrófagos infectados con el virus del SIDA (VIH) para dirigir específicamente a las células a la muerte celular.

Ejemplo de aplicación específica: Inducción de muerte de las células infectadas por el VIH por las células que expresan TNF unido a la membrana

Como ejemplo cuando el TNF induce muerte celular en las células infectadas con patógenos, se muestra el efecto del TNF sobre las células MOLT-4 infectadas con el VIH.

1. Producción de células que expresan TNG unido a la membrana

(1) Con el fin de expresar de forma estable el TNF unido a membrana, de acuerdo con un informe anterior (Journal of Virology, vol. 63, pp. 2504–2509, 1989), se produjo un plásmido de expresión (pMT2 β G/Hu–proTNF) para el TNF unido a la membrana murino y humano.

(2) Después, este plásmido se mezcló con un plásmido para la selección de transformantes, en los que se incorpora un gen de resistencia a neomicina a una proporción de. 10:1 y se introduce en células de fibroblastos (células NIH3T3) derivadas de embrión murino.

(3) Las células NIH3T3 anteriores transformadas se cultivaron en presencia de 800 μ g/ml de neomicina que es un marcador de selección en el incubador con gas dióxido de carbono a 37 °C durante aproximadamente 2 semanas.

(4) Después del cultivo, se adquirió un clon de TNF incorporado en las células.

(5) Se confirmó que el clon adquirido expresaba el TNF unido a la membrana mediante un inmunoensayo enzimático.

2. Preparación de células MOLT–4 infectadas por el VIH

(1) Para las células infectadas con el VIH, las células MOLT-4 se infectaron en el medio (RPMI 1640, añadiendo 10 % de suero bovino fetal, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml)) en el incubador de gas de dióxido de carbono a 37 °C de acuerdo con el informe anterior (Journal of Virology, vol. 63, pp. 2504–2509, 1989) Utilizando células infectadas por el VIH (cepa HTLV–IIIB). Cuando la infección por el virus del SIDA se establece en células MOLT-4, las células MOLT-4 exhiben características para producir de forma persistente el virus del SIDA. Por tanto, con respecto a la producción del virus del SIDA, una célula MOLT–4 es un modelo del macrófago infectado por el virus del SIDA.

(2) En esta condición la infección, el 90 % o más de las células MOLT–4 infectadas con el VIH se convirtió en positivas para los anticuerpos frente al VIH.

(3) Por lo tanto, mediante las células infectadas con el VIH, el VIH se introdujo en casi todas las células MOLT-4 y se prepararon células MOLT–4 infectadas con el VIH.

3. Inducción de muerte celular de las células infectadas por el VIH por las células que expresan TNF unido a la membrana

(1) Las células NIH3T3 en las que el plásmido de TNF se había introducido se cultivaron a semiconfluencia en una placa de cultivo de 24 pocillos.

(2) Después, se añadió una cierta cantidad de células MOLT-4 infectadas con VIH y se mezclaron/cultivaron en el incubador de gas de dióxido de carbono a 37 °C durante 3 días.

(3) Con el fin de examinar el efecto del TNF unido a la membrana expresado sobre las células infectadas con el VIH, la viabilidad de las células infectadas con el VIH se midió mediante un procedimiento de exclusión con colorante azul tripán.

(4) Como resultado, se observó que la muerte celular se indujo en 40 % de las células MOLT–4 infectadas con el VIH por el cultivo mixto con las células que expresan TNF unido a la membrana.

Como es evidente a partir del ejemplo anterior, es evidente que el TNF unido a la membrana induce específicamente la muerte celular en las células infectadas con el virus del SIDA (VIH). A partir de estos fenómenos, se puede ver que los macrófagos con disfunción mediante la retención de los patógenos son activados mediante la fagocitosis de los patógenos y, en consecuencia, el TNF unido a la membrana inducido conduce a los macrófagos infectados con patógenos a la muerte celular.

Las enfermedades producidas por la retención de patógenos por los macrófagos incluyen micobacteriosis, SIDA, clamidiosis o toxoplasmosis y similares. La micobacteriosis incluye la tuberculosis, cuyo patógeno causal es *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis*, la lepra, cuyo patógeno causal es *Mycobacterium leprae*, o la micobacteriosis atípica cuyo patógeno causal es *Mycobacterium avium* y similares, o similares. Como patógenos causantes de clamidiosis, existen *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* y similares. La presente invención se puede aplicar eficazmente a todos ellos. El efecto de exterminio de las partículas finas de RFP-PLGA sobre los gérmenes de la tuberculosis en los macrófagos que se muestran en el presente modo de realización no se lleva a cabo a menos que se libere rifampicina de las partículas finas de RFP-PLGA incorporadas en los fagosomas por fagocitosis y son posibles al menos dos pasadas a través de las estructuras de la membrana vesicular intracelular, en la que la rifampicina atraviesa la membrana del fagosoma y también atraviesa la membrana del fagosoma que impregna contiene los gérmenes de la tuberculosis. Las estrategias de supervivencia de los patógenos causantes mostrados anteriormente en los macrófagos son diversas. Durante toda la micobacteriosis, *Legionella* y *Toxoplasma*, los patógenos causantes están vivos en los macrófagos al sobrevivir en los fagosomas. *Listeria* y *Chlamydia* tienen las características de que los patógenos causantes salen de los fagosomas. Este aspecto de existencia intracelular de los patógenos causantes se supone que se compara más fácilmente con un caso en el que los patógenos causantes existen en los fagosomas porque la eficacia del fármaco se puede anticipar cuando el fármaco atraviesa la membrana del fagosoma una vez desde la perspectiva de la liberación del fármaco. El SIDA es similar a *Listeria* y similares en el aspecto de que la eficacia del fármaco se puede anticipar si el fármaco se libera en los patógenos causantes presentes en las células. A partir de lo anterior, la

invención es un tratamiento prometedor para los patógenos causantes descritos anteriormente.

Los medicamentos para diversas enfermedades a las que la invención se puede aplicar de manera efectiva se citan a continuación.

- 5 1) Micobacteriosis: rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida, azitromicina, kanamicina, sulfato de estreptomycin, enviomicina, etioniamida, cicloserina, levofloxacino, diafenilsulfona.
- 2) SIDA: azidotimidina, didesoxiinosina
- 3) Clamidiosis: clorhidrato de minociclina, clorhidrato de doxiciclina, claritromicina, esparfloxacino, roxitromicina, levofloxacino.
- 4) Toxoplasmosis: pirimetamina, sulfamonometoxina, acetilspiramina.
- 10 5) Paludismo: fosfato de cloroquina, sulfato de quinina, sulfadoxina, mefloquina.
- 6) Cáncer: 5-fluorouracilo, adriamicina, cisplatino, etopósido, mitomicina, vincristina, taxol, camptotecina, vinblastina, ciclofosfamida, bleomicina.
- 7) Enfermedad de Crohn: salazosulfapiridina, glucocorticoides.
- 8) Reumatoide: tiomato sódico de oro, penicilamina, bucilamina, glucocorticoides.

15 **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con la invención, es posible proporcionar un remedio que puede tratar eficazmente una enfermedad causada por macrófagos con disfunción o macrófagos como vehículos.

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad debida a una disfunción de los macrófagos, seleccionándose dicha enfermedad de micobacteriosis, SIDA, clamidiosis, tuberculosis, toxoplasmosis, paludismo, cáncer, enfermedad de Crohn y reumatoide, comprendiendo dicho medicamento PLGA [copolímero poli(ácido láctico/ácido glicólico)] con un peso molecular de 5.000 a 10.000, que aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y extermina la totalidad o una parte de los patógenos presentes en los macrófagos.
5
2. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además rifampicina.
3. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además al menos uno de PVA (alcohol polivinílico), PEG (polietilenglicol), PEO (óxido de polietileno), azúcar, proteína, péptido, fosfolípido o colesterol.
10
4. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además al menos uno de PVA (alcohol polivinílico), PEG (polietilenglicol), PEO (óxido de polietileno), azúcar, proteína, péptido, fosfolípido o colesterol y que es una formulación de partículas finas en la que los diámetros mayores de partícula son de 1 a 6 μm .
5. El medicamento para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, fabricado por el procedimiento de emulsión de membrana.
15
6. Un medicamento para el tratamiento de cáncer de pulmón, comprendiendo dicho medicamento lipopolisacárido de Pantoea agglomerans y teniendo un efecto citotóxico sobre las células de cáncer de pulmón, que aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y actúa sobre los macrófagos en un estado disfuncional.
7. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos macrófagos son residentes en el tejido de la mucosa.
20

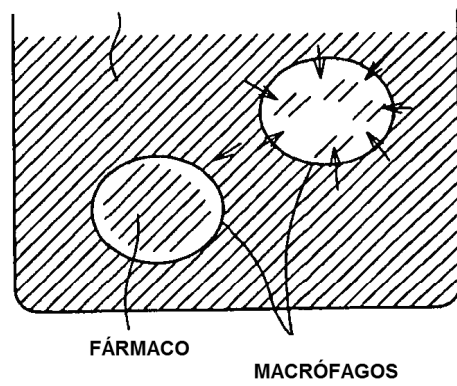
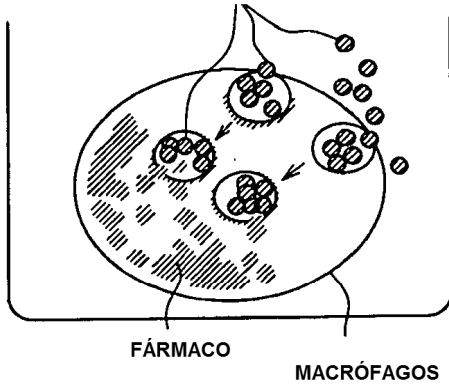
FIG. 1

MACRÓFAGOS FAGOCÍTICOS
DE PARTÍCULAS FINAS

MACRÓFAGOS SUMERGIDOS
EN SOLUCIÓN MÉDICA

PARTÍCULAS FINAS DE INCLUSIÓN DE FÁRMACO

SOLUCIÓN MÉDICA



CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO
EN LAS PARTÍCULAS FINAS

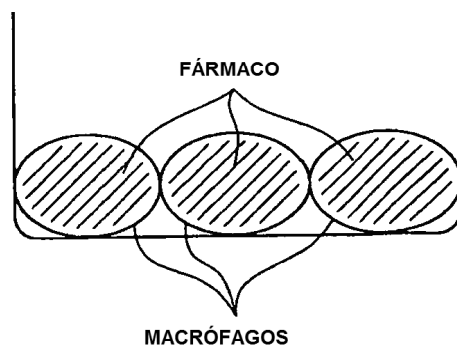
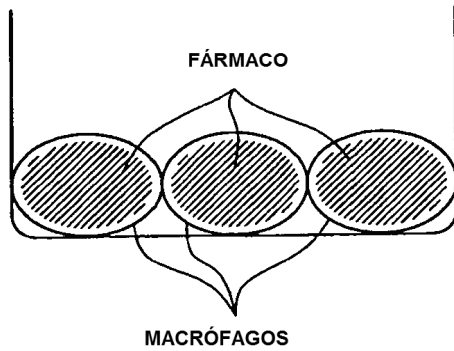


FIG. 2

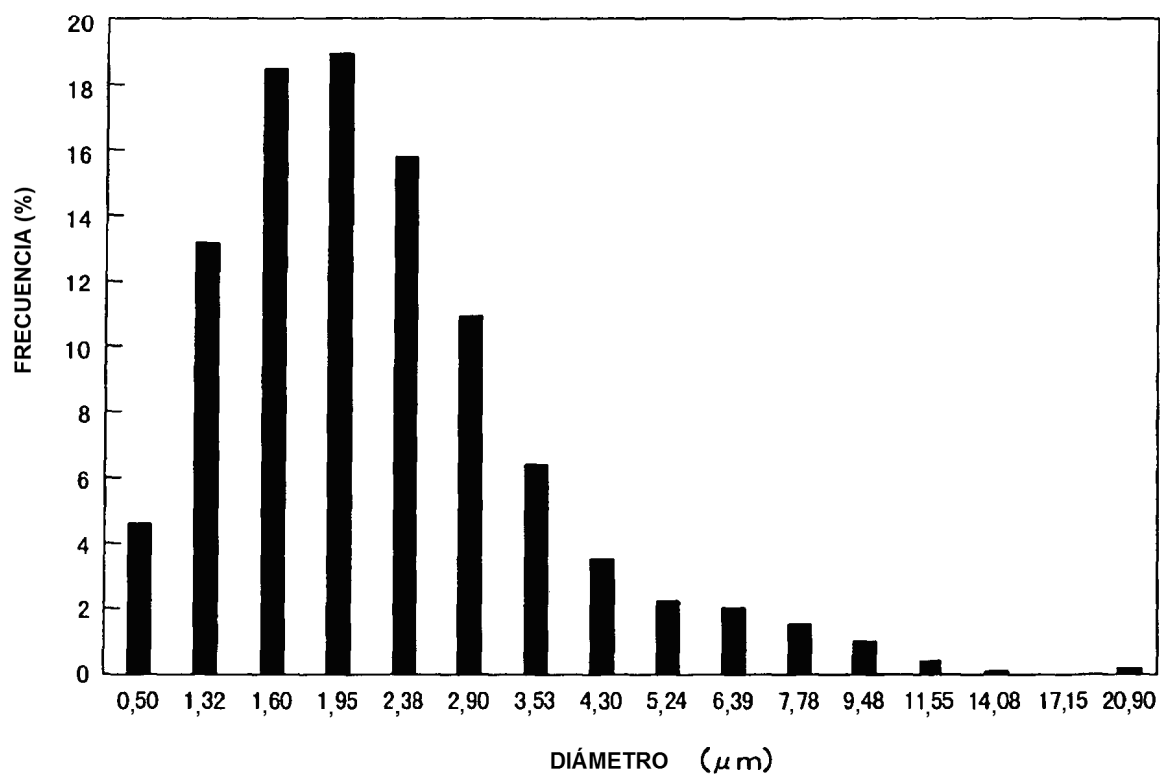
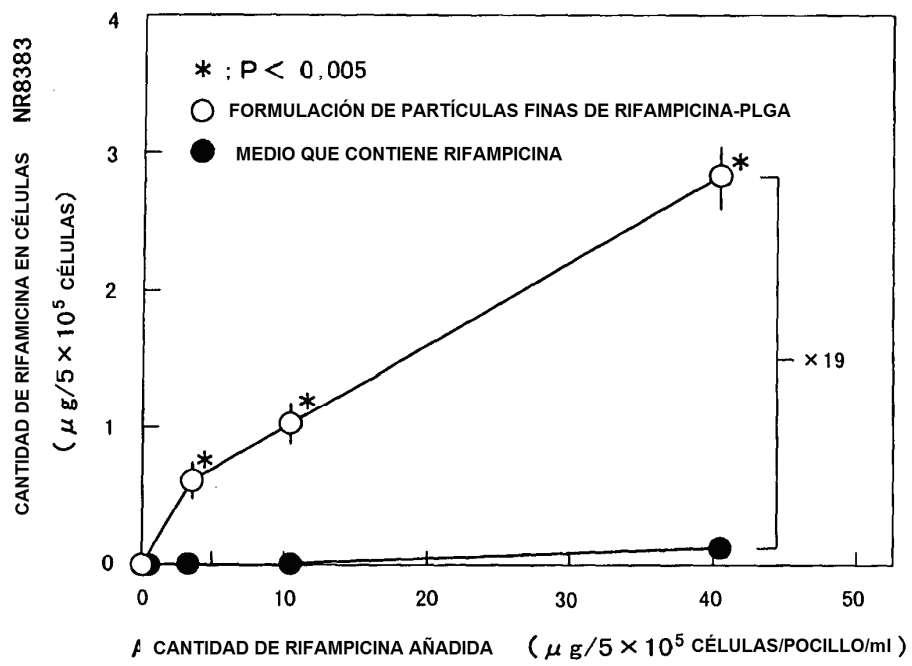
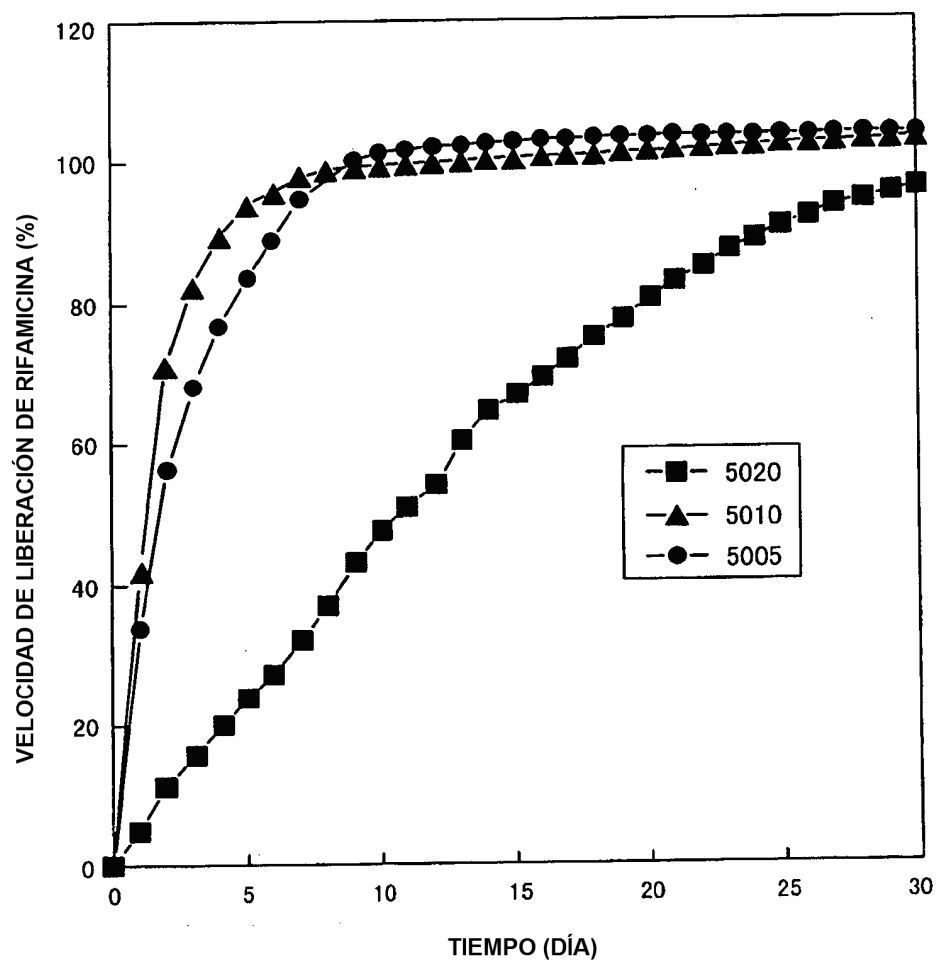


FIG. 3



F I G. 4



F I G. 5

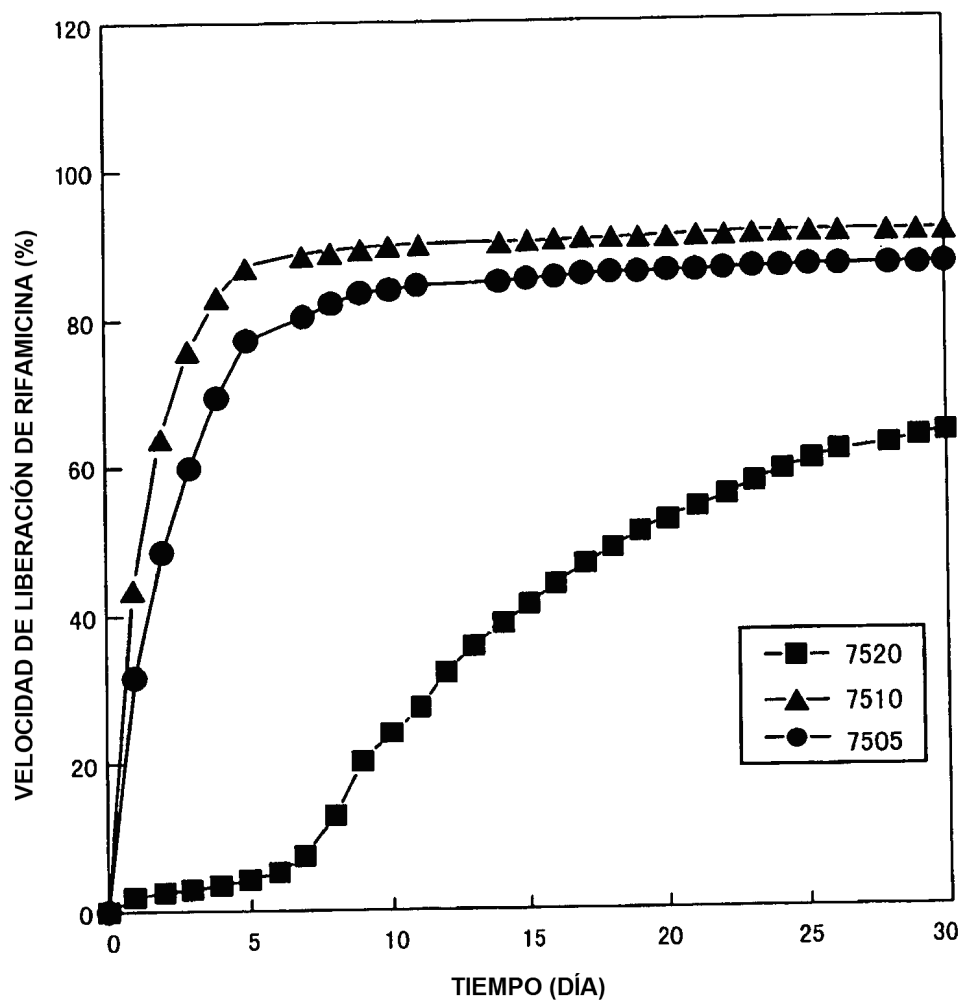


FIG. 6

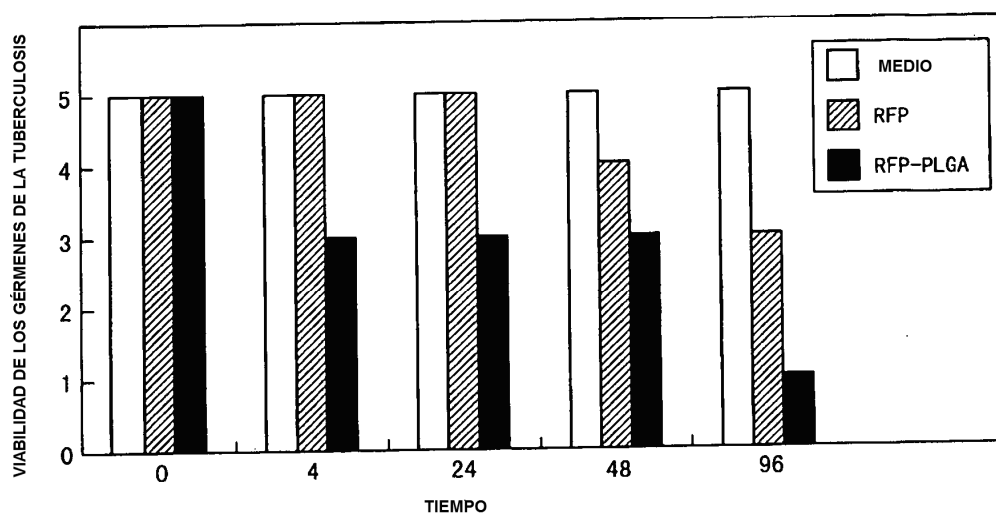
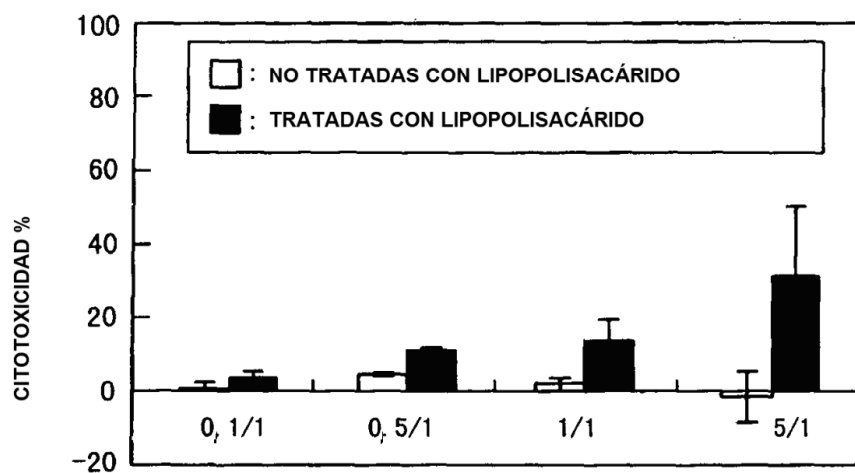


FIG. 7



PROPORCIÓN CELULAR DE CÉLULAS NR8383 Y CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN DE SATO