

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 606**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2003 E 11010286 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2465537**

54 Título: **Microesferas que comprenden ONO-1301**

30 Prioridad:

10.10.2002 JP 2002298079

31.10.2002 JP 2002318830

22.04.2003 JP 2003117604

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

28.09.2016

73 Titular/es:

**ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
1-5, Doshomachi 2-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8526, JP**

72 Inventor/es:

**SAKAI, YOSHIKI;
NISHIURA, AKIO y
OGATA, TEPPEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 584 606 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

Microesferas que comprenden ONO-1301

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un acelerador de la producción del factor de reparación endógeno que comprende un agonista 12 de las prostaglandinas (en adelante denominadas "PG").

10 **Técnica anterior**

El tratamiento médico de regeneración está despertando el interés como terapia de regeneración en el momento de trastornos de tejidos y células tales como vasos sanguíneos, hígado, riñón, pulmón, páncreas, huesos, células de músculo esquelético, células de miocardio, células nerviosas centrales y periféricas y similares. El sistema de autorreparación incluye un sistema que se logra mediante la división celular de células maduras (sistema de duplicación simple) como la regeneración de muchos órganos parenquimatosos, tales como hígado y riñón y un sistema mediado por la inducción de proliferación y diferenciación de células madre (células precursoras) (sistema de células madre) como la regeneración de células hematopoyéticas. Actualmente, se dice que estos dos sistemas están presentes en la regeneración de muchos tejidos y órganos. Por ejemplo, se dice que estos dos sistemas están presentes también en la angiogénesis (regeneración), y existe un sistema de angiogénesis basado en el crecimiento de células endoteliales vasculares vecinas, células de músculo liso vascular y similares, efectuado mediante la liberación de diversos factores de reparación endógenos (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos factores de crecimiento de fibroblastos (FGF a/b), factor β de crecimiento de transformación (TGF- β), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), angiopoyetina, factor de inducción de hipoxia (HIF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), de células endoteliales (vasculares), células de músculo liso (vascular), fibroblastos, células sinoviales, células epiteliales, plaquetas, monocitos, linfocitos, macrófagos de la región lesionada (vecina) y un sistema de vasculogénesis en el que se forman vasos sanguíneos mediante la inducción de diferenciación de células madre endoteliales vasculares a partir de células de la médula ósea de un individuo maduro, efectuado mediante la liberación de diversas citocinas inflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-8, TNF α , IFN α/γ , G-CSF, GM-CSF, NO (monóxido nítrico) etc.), y diversos factores de reparación endógenos.

Con respecto a la presencia de células madre (células precursoras), están presentes no solo en los vasos sanguíneos, sino también en muchos tejidos tales como hepatocitos, células pancreáticas (β), células del miocardio, riñón, pulmón, hueso, articulación, nervio, grasa, piel y similares, y proliferan y se induce su diferenciación mediante diversos factores de reparación endógenos, y diversas citocinas inflamatorias y similares.

Cuando se acelera la producción de estos factores de reparación endógenos, se acelera la formación del paso de circulación colateral mediante el efecto de angiogénesis en la región isquémica. Además, se sabe que la prevención y el tratamiento (regeneración reparadora) de diversos trastornos de órganos se aceleran mediante la acción de inducción de diferenciación a partir de diversas células madre tisulares. Por ejemplo, se sabe que el HGF tiene una acción de aceleración del crecimiento celular, una acción de inducción de la morfogénesis, una acción de inducción de la diferenciación, una acción de aceleración de la migración y una acción antiapoptosis (por ejemplo, véase Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 639-644 (1997) etc.). Se sabe que estas aceleraciones de la producción de factores de reparación endógenos son eficaces para la prevención y/o tratamiento de, por ejemplo, enfermedades del hígado (por ejemplo, hepatitis fulminante, hepatitis aguda, cirrosis hepática, hígado graso, trasplante de hígado etc.), enfermedades del riñón (por ejemplo, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica etc.), enfermedades del pulmón (por ejemplo, neumonía aguda, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, etc.), enfermedades del páncreas (por ejemplo, diabetes mellitus, pancreatitis crónica, etc.), enfermedades de los huesos (por ejemplo, osteoartritis, reumatismo articular, osteoporosis, fractura ósea, lesión de periostio, etc.), enfermedades de órganos digestivos (por ejemplo, úlcera gástrica, úlcera duodenal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, etc.), enfermedades de degeneración de los nervios (por ejemplo, ictus, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, estenosis del canal medular, accidentes cerebrovasculares, enfermedad de moyamoya, etc.), complicaciones diabéticas (por ejemplo, trastorno nervioso, úlcera cutánea, nefropatía, enfermedad retiniana, etc.), enfermedades de células endoteliales vasculares (por ejemplo, reestenosis tras PTCA (angioplastia coronaria transluminal percutánea), arteriosclerosis, etc.), cardiopatías (por ejemplo, taquiarritmia supraventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía repentina, cardiomiopatía dilatada, etc.), enfermedades dentales (por ejemplo, enfermedad periodontal, herida por extracción de diente, herida oral, enfermedad de tejido periodontal, etc.), úlcera de decúbito, glaucoma, alopecia y similares.

La terapia de regeneración mediada por factores de reparación endógenos está atrayendo atención como terapia de angiogénesis (regeneración) y terapia de generación tisular en el momento de las enfermedades de órganos y tejidos tales como hígado, páncreas, riñón, corazón, nervios centrales/periféricos, vasos sanguíneos, dientes, ojos, periostio y huesos. Esto está atrayendo atención particularmente como terapia de regeneración de enfermedades de órganos isquémicas graves que no tiene métodos terapéuticos, y se analizan varios métodos en arteriosclerosis

obliterante (denominada "ASO" a continuación en el presente documento), enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio, angina de pecho etc.), neuropatía diabética, estenosis del canal medular, enfermedad cerebral isquémica (por ejemplo, accidentes cerebrovasculares, infarto cerebral, etc.), hipertensión pulmonar, fractura ósea o enfermedad de Alzheimer y similares.

5 Por ejemplo, los pacientes de enfermedades obstructivas de vasos sanguíneos periféricos tipificadas por la ASO y la enfermedad de Buerger muestran claudicación intermitente, dolor durante el reposo y úlcera y necrosis de las piernas, y finalmente se hace inevitable someterse a amputación de las piernas. Sin embargo, en la actualidad, no existe ningún método terapéutico eficaz para estos pacientes de ASO graves. Puesto que la inyección intravenosa de PGE 1 y un vasodilatador o inhibidor de la aglutinación plaquetaria como agente oral de cilostazol no muestra sus efectos en pacientes de ASO graves, no puede llevarse a cabo un tratamiento intravascular (dilatación con balón o inserción de endoprótesis vascular) y revascularización. Recientemente, se ha aplicado clínicamente una terapia génica en la que se administran directamente un plásmido del gen de VEGF y un plásmido del gen de HGF mediante inyección intramuscular en músculos esqueléticos de regiones isquémicas de las piernas de estos pacientes (véase *Circulation*, 97, 1114–1123 (1998) y *Gene Therapy*, 8, 181–189 (2001)) y su efecto está atrayendo atención. Además, también se han sometido a exámenes basales preparaciones de liberación lenta de una proteína de factor de crecimiento (por ejemplo, una lámina de inclusión de gelatina) (*Circulation*, 106, supl. 2, II 350 (2002)).

20 Por otro lado, está atrayendo atención una terapia de angiogénesis en la que se administran directamente células madre endoteliales vasculares separadas de la médula ósea o sangre periférica de un paciente en la región isquémica de una pierna mediante inyección intramuscular y se lleva a cabo en varios hospitales universitarios, lo que también está atrayendo atención (véase *THE LANCET*, 360,427–435 (1002)).

25 La introducción de estos genes y células madre directamente en regiones isquémicas usando un catéter vascular equipado con una aguja de baja invasión también se hizo posible en infarto de miocardio y angina de pecho, y está en aplicación clínica como terapia de angiogénesis. Por ejemplo, se ha notificado que la isquemia mejora para agina inestable mediante la inyección de un plásmido del gen de VEGF directamente en el músculo del corazón (*Circulation*, 98, 2800–2804 (1998)). Además, se consideró que PDGF está implicado en la angiogénesis tras ictus, ya que se observaba su aumento en la célula nerviosa de la región de fenanbla (el tejido no muere por el infarto pero no puede realizar su función) del foco de infarto de un paciente con infarto cerebral (*Stroke*, 28, 564–573 (1997)). También se ha intentado la terapia génica y similares usando un vector dirigido al cerebro mediante el líquido cefalorraquídeo a partir de la cisterna cerebelomedular en los accidentes cerebrovasculares isquémicos. Estos tratamientos son una terapia de angiogénesis terapéutica (regeneración) que provoca el desarrollo del paso de circulación colateral a la región isquémica y es una terapia de regeneración de tejido mediante la inducción de diferenciación de células madre tisulares. Sin embargo, la aplicación clínica de estas terapia génica y terapia celular tiene muchos problemas en cuanto a ética, seguridad (inmunidad, infección, cáncer, etc.), flexibilidad, economía y similares.

40 Como terapia de reapertura en el caso de la obstrucción de vasos sanguíneos en ASO, infarto de miocardio, angina de pecho, arteriosclerosis y similares, se ha llevado a cabo PTCA (angiopatía coronaria transluminal percutánea) con buenos resultados. Sin embargo, se sabe que se induce reestenosis por la lesión de células endoteliales vasculares alrededor de la obstrucción debido a la vasodilatación forzada mediante la dilatación con balón, endoprótesis vascular permanente y similares. Como método para prevenir la reestenosis, se administra un inhibidor de la aglutinación plaquetaria o similares, pero esto es todavía un estado insatisfactorio. Recientemente, se han desarrollado fármacos tales como antibióticos y agentes carcinostáticos (rapamicina, sirolimus, etc.) y una endoprótesis vascular recubierta con una preparación de radioisótopos tal como rayos β con buenos resultados en la prevención de la reestenosis (*N. Eng. J. Med.*, 346(23), 1769–1771 (2002)). Sin embargo, estos métodos también tienen muchos problemas desde un punto de vista a largo plazo. Por consiguiente, la preocupación se dirige hacia un medicamento que potencie la acción inhibitoria de aglutinación plaquetaria en regiones lesionadas tópicamente de células endoteliales vasculares y la acción de reparación del daño mediante crecimiento de células endoteliales.

55 Por otro lado, la prostaglandina (PG) es una sustancia natural fisiológicamente activa biosintetizada a partir de PGH2 en una ruta metabólica en el organismo vivo, que se denomina cascada del ácido araquidónico. Las enzimas de biosíntesis a partir de ácido araquidónico a PGH2 se denominan ciclooxigenasa (COX) y actualmente se conocen las COX-1, COX-2 y COX-3 (*Proc. Nail. Acad. Sci.*, 99, 1371 (2002)). Además, los compuestos que inhiben estas enzimas se usan generalmente como agentes antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios y agentes para prevenir enfermedades de sistemas de órganos circulatorios, como fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Particularmente, COX-2 inducida en regiones de inflamación está implicada en la biosíntesis de PG12, PGE2 y similares. Estas PG biosintetizadas están implicadas en la aparición de pirexia, dolor e inflamación en las regiones de inflamación y la cicatrización de las mismas. Es decir, las PG biosintetizadas en las regiones de inflamación actúan directamente como agentes que provocan inflamación, inducen diversas citocinas inflamatorias, provocan inflamación y aceleran la cicatrización de las mismas.

65 Por otro lado, se sabe que pacientes que tomaron AINE durante un periodo de tiempo prolongado tienen una tasa de mortalidad significativamente baja por cáncer de intestino grueso y cáncer de pulmón (*N. Eng. J. Med.*, 328, 1313–1316 (1993)). Se dice que esta acción tiene una acción inhibitoria del crecimiento de células cancerosas, ya que se

inhibe la angiogénesis para el crecimiento de tejido canceroso a través de la inhibición de la biosíntesis de PGI₂, PGE₂ y similares por el AINE. Es decir, está atrayendo atención una terapia antiangiogénesis que controla el crecimiento y la metástasis de los tumores inhibiendo la angiogénesis como nueva estrategia de tratamiento contra el cáncer. Además, se sabe que un inhibidor selectivo de COX-2 no induce úlcera gástrica cuando se administra, pero prolonga la cicatrización de la úlcera gástrica. Existe un informe que establece que su causa es la inhibición de la acción de angiogénesis para la reparación de tejidos lesionados (Am. J. Med, 104, 43S-51S (1998)). Además, los inhibidores de COX-2 selectivos controlan la angiogénesis acompañada por inflamación (Jpn. J. Pharmacol., 75, 105-114 (1997)).

Se sabe que PGI₂ tiene una acción inhibitoria de la aglutinación plaquetaria notablemente intensa, así como acciones tales como adhesión de plaquetas, vasodilatación e inhibición de la secreción de ácidos gástricos. Además, la administración de PGE₂ acelera la acumulación de células inflamatorias incluyendo monocitos y la producción de citocinas inflamatorias (por ejemplo, IL-1 (interleucina-1), IL-8, IL-6, IFN- α (interferón- α), TNF α (factor de necrosis tumoral α) y NO (monóxido nítrico), y actúa como agente que provoca inflamación.

La patente japonesa JP-A-6-87811 da a conocer en su memoria descriptiva que el derivado de oxima es útil para la prevención y/o el tratamiento de trombosis, arteriosclerosis, cardiopatía isquémica, úlcera gástrica, hipertensión y similares, ya que tiene inhibición de aglutinación plaquetaria, inhibición de adhesión de plaquetas, acciones de inhibición de vasodilatación y secreción de ácidos gástricos, pero no describe o sugiere sobre la acción de angiogénesis ejerciendo una acción de crecimiento de células endoteliales vasculares y células de músculo liso basándose en la acción de aceleración de producción del factor de reparación endógeno, y en las diversas enfermedades de células y órganos (las enfermedades descritas anteriormente que van a prevenirse y tratarse (regeneración de reparación) por HGF) mediante inducción de diferenciación de diversas células madre provocada por esta acción de aceleración de producción del factor de reparación endógeno y similares.

Además, en Diabetologia., 40,1053-1061 (1997) se ha notificado que un derivado de PGI₂, Beraprost (sal de sodio del ácido (\pm) - (1R, 2R, 3aS, 8bS)-2, 3, 3a, 8b-terahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S, 4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofuran-5-butanoico) aumenta la producción de HGF en células endoteliales vasculares *in vitro* y muestra acción de crecimiento de células endoteliales, pero no existen descripciones sobre la acción de aceleración de la angiogénesis mediante la administración tópica de una preparación persistente de Beraprost y sobre su utilidad para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades de órganos.

Además, la PGE₂ se conoce como producto metabólico en la cascada de ácido araquidónico y se sabe que sus acciones tienen diversas funciones tales como acción de protección celular, acción de contracción uterina, acción de producción de dolor, acción de aceleración del peristaltismo de órganos digestivos, acción de estimulación, acción de inhibición de la secreción de ácidos gástricos, acción de reducción de la tensión arterial, acción diurética y similares.

A partir de estudios en los últimos años, se ha revelado que están presentes subtipos que tienen respectivamente papeles diferentes en el receptor de PGE₂. Los subtipos conocidos en la actualidad se dividen aproximadamente en cuatro, y se denominan respectivamente EP1, EP2, EP3 y EP4 (J. Lipid Mediators Cell Signaling, 12, 379-391 (1995)). Examinando su parte de papeles y encontrando de ese modo un compuesto que no se une a otros subtipos de receptores, se hizo posible obtener un medicamento que tiene menos efectos secundarios.

Por ejemplo, la patente japonesa JP-A-11-193268 da a conocer en su memoria descriptiva que un derivado de omega-cicloalquil-prostaglandina E₂ es útil en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inmunitarias (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria, trasplante de órgano, etc.), asma, anomalía de la osteogénesis, muerte de células nerviosas, hepatopatía, parto prematuro, aborto, enfermedades del nervio retiniano tales como glaucoma y similares, pero no describe ni sugiere la acción de liberación de factores de reparación endógenos, la acción de inducción de la diferenciación de células madre y la acción de aceleración de la angiogénesis.

Por ejemplo, el documento WO00/03980 da a conocer en su memoria descriptiva que compuesto representado por la fórmula (1-b), una sal tóxica del mismo o un clatato de ciclodextrina del mismo, que se usa en la presente invención como agonista de EP4 es útil en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades incluyendo enfermedades inmunitarias (esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico, rechazo tras trasplante de órgano, etc.), asma, anomalía de la osteogénesis, muerte de células nerviosas, enfermedad del pulmón, hepatopatía, hepatitis aguda, glomerulonefritis, insuficiencia renal, hipertensión, isquemia del miocardio, síndrome de reacción inflamatoria sistémica, dolor por quemadura, septicemia, síndrome de hemofagocitosis, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, lesión por quemadura, granuloma sistémico, colitis neoplásica, enfermedad de Crohn, hipercitocinemia en el momento de la diálisis, insuficiencia orgánica múltiple, choque, anomalía del sueño, aglutinación plaquetaria y similares, pero no describe ni sugiere la acción de liberación de factores de reparación endógenos, la acción de inducción de la diferenciación de células madre y la acción de aceleración de la angiogénesis.

Divulgación de la invención

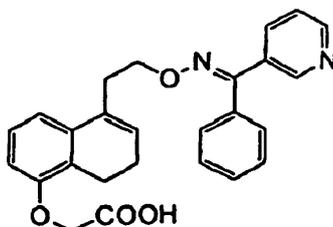
El problema que subyace a la presente invención es proporcionar un acelerador de la producción de factores de reparación endógenos, un inductor de la diferenciación de células madre (inductor de la diferenciación de células precursoras) y un acelerador de la angiogénesis que sean útiles como agentes preventivos y terapéuticos de enfermedades de órganos (isquémicas) y tengan menos efectos secundarios.

Con el objetivo de encontrar un acelerador de la producción del factor de reparación endógeno, un inductor de la diferenciación de células madre y un acelerador de la angiogénesis, que son útiles como agentes preventivos y terapéuticos de enfermedades de órganos (isquémicas), los presentes inventores han realizado estudios intensivos y han encontrado como resultado que un agonista de PGI₂ puede lograr el objeto.

Asimismo, los inventores han considerado que cuando un agonista de PGI₂, un agonista de EP₂ o un agonista de EP₄ se podrían administrar por vía tópica a una región isquémica que requiere angiogénesis o una región dañada que requiere reparación tisular, será posible producir un factor de reparación endógeno, una citocina inflamatoria y similares, en la periferia de la región tópica dañada, además de la vasodilatación de los vasos sanguíneos que quedan en la región isquémica y acción inhibitoria de la aglutinación de plaquetas, de modo que se podría crear un medicamento que tiene menos efectos secundarios en la administración sistémica. Además, se consideró que cuando es posible producir una preparación farmacéutica para la liberación persistente durante un período hasta que se efectúa la angiogénesis (regeneración) o la reparación de tejido en la región isquémica o periferia de la región tópica de la lesión tisular, se podría crear un medicamento que tiene menos efectos secundarios en la administración sistémica y con un mejor cumplimiento de la administración de la frecuencia de administración pequeña.

Por ejemplo, la angiogénesis requiere un período de generalmente de 1 semana a 6 meses, más preferiblemente de 1 semana a 8 semanas, y se requiere la liberación persistente del ingrediente activo en la región isquémica durante el período. Además, puesto que los agonistas de PGI₂, los agonistas de EP₂ y los agonistas de EP₄ muestran acción de vasodilatación y acción inhibitoria de la aglutinación de plaquetas, además de la acción de aceleración de la angiogénesis y de la acción de inducción de la diferenciación de células madre vasculares cuando se acelera la producción de varios factores de crecimiento endógenos, se consideró que mostrarán un efecto preventivo y/o terapéutico más fuerte sobre enfermedades isquémicas de los órganos cuando se añaden estas acciones.

Por lo tanto, los inventores también han encontrado como resultado de estudios intensivos que una preparación persistente de un agonista de PGI₂, es decir, ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidaminoxil)etil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético (en lo sucesivo, denominado en ocasiones "Compuesto 1") que tiene la siguiente estructura:



o una sal del mismo se puede conseguir el objetivo descrito anteriormente.

La presente invención se refiere a una preparación de microesferas persistente que comprende un polímero biodegradable y ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilideaminoxil]-etil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético o una sal del mismo y una composición farmacéutica y un agente que comprende la preparación de microesferas.

De acuerdo con la presente invención, la preparación de microesferas se utiliza como un acelerador de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada de infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva y arteriopatía coronaria.

Realizaciones preferidas de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Todas las sales farmacológicamente aceptables se incluyen en las sales del ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilideaminoxil]-etil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético. Es preferible que las sales farmacológicamente aceptables no tengan toxicidad y sean solubles en agua. Los ejemplos de la sal adecuada del compuesto de la presente invención incluyen sales de metales alcalinos (potasio, sodio, litio, etc.), sales de metales alcalinotérreos (calcio, magnesio, etc.), sales de amonio (sal de tetrametilamonio, sal de tetrabutilamonio, etc.), sales de aminas orgánicas (trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, bencilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)metilamina, lisina, arginina, N-metil-D-glucamina) y sales de

adición de ácido (sales de ácidos inorgánicos (clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato, nitrato, etc.), sales de ácidos orgánicos (acetato, trifluoroacetato, lactato, tartrato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, isetionato, glucuronato, gluconato, etc.). También se incluyen en las sales de los compuestos de la presente invención solvatos, o solvatos de sales de metales alcalinos (alcalinotérreo), sales de amonio, sales de aminas orgánicas y sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención. Es preferible que los solvatos no sean tóxicos y sean solubles en agua. Los ejemplos de solvatos apropiados incluyen solvatos de agua, disolventes de sistemas de alcohol (etanol, etc.).

El compuesto de la presente invención se convierte en sales farmacológicamente aceptables mediante métodos convencionalmente conocidos.

Los métodos de producción del compuesto utilizado en la presente invención: El ácido (E) -[5-[2-[1-fenil-1-(3piridil)metilidenaminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético (compuesto 1) se describe en el ejemplo 2 (g) del documento JP-A6-87811.

Toxicidad:

Puesto que la toxicidad del principio activo de la presente invención es muy baja, es lo suficientemente seguro para su uso como medicamento.

Aplicabilidad industrial

Aplicación a preparaciones farmacéuticas:

Puesto que el compuesto 1 de la presente invención tiene la acción de aceleración de la angiogénesis, es útil, por ejemplo, como agente preventivo y/o terapéutico para enfermedades de órganos isquémicas (por ejemplo, arteriosclerosis obliterante, enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud, enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio, angina de pecho), neuropatía diabética, estenosis del canal medular, enfermedad cerebral isquémica (por ejemplo, accidentes cerebrovasculares, infarto cerebral), hipertensión pulmonar, fractura ósea, enfermedad de Alzheimer). Además, puesto que el compuesto 1 usado en la presente invención tiene la acción de aceleración de la producción de factores de reparación endógenos, basándose en su acción de inducción de la diferenciación a partir de las células madre respectivas para reparar tejidos, es útil como agente preventivo y/o terapéutico para diversas enfermedades de órganos (por ejemplo, enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatitis fulminante, hepatitis aguda, cirrosis hepática, hígado graso, trasplante de hígado), enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica), enfermedades del pulmón (por ejemplo, neumonía aguda, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, enfermedades del páncreas (por ejemplo, diabetes mellitus, pancreatitis crónica), enfermedades de los huesos (por ejemplo, osteoartritis, reumatismo articular, osteoporosis, fractura ósea, lesión de periostio), enfermedades de órganos digestivos (por ejemplo, úlcera gástrica, úlcera duodenal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), enfermedades de degeneración nerviosa (por ejemplo, ictus, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, estenosis del canal medular, accidentes cerebrovasculares, enfermedad de moyamoya), complicaciones diabéticas (por ejemplo, trastorno nervioso, úlcera cutánea, nefropatía, enfermedad retiniana), enfermedades de células endoteliales vasculares (por ejemplo, reestenosis tras PTCA (angiopatía coronaria transluminal percutánea), cardiopatías (por ejemplo, taquiarritmia supraventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía coronaria, cardiomiopatía repentina, cardiomiopatía dilatada), enfermedades dentales (por ejemplo, enfermedad periodontal, herida por dental, herida oral, enfermedad del tejido periodontal), úlcera de decúbito, glaucoma y alopecia).

El agente de la presente invención puede administrarse como fármaco concomitante en combinación con otro agente para (1) complementar y/o reforzar el efecto preventivo y/o terapéutico del agente de la presente invención, (2) mejorar la cinética y absorción del agente de la presente invención y reducir su dosis, y/o (3) aliviar los efectos secundarios del agente de la presente invención.

El fármaco concomitante del agente de la presente invención con otro agente puede administrarse en forma de un fármaco de combinación en el que ambos componentes se formulan en una preparación farmacéutica, o se administran como preparaciones farmacéuticas separadas. Cuando se administra como preparaciones farmacéuticas separadas, incluye la administración simultánea y la administración en momentos diferentes. Además, la administración en momentos diferentes puede llevarse a cabo administrando en primer lugar el agente de la presente invención y luego administrando el otro agente, o administrando en primer lugar el otro agente y luego administrando el agente de la presente invención, y los métodos de administración respectivos pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El otro agente puede ser un compuesto de bajo peso molecular, una proteína de alto peso molecular, un polipéptido, un polinucleótido (ADN, ARN o un gen) antisentido, un señuelo o un anticuerpo, o una vacuna o una célula madre separada de un tejido. La dosis del otro agente puede seleccionarse opcionalmente basándose en la dosis usada clínicamente. Además, la razón de combinación del agente de la presente invención con el otro agente puede seleccionarse opcionalmente dependiendo de la edad y el peso corporal del sujeto al que va a administrarse, el

método de administración, el periodo de administración, la enfermedad que va a tratarse, los síntomas y la combinación. Por ejemplo, pueden usarse desde 0,01 hasta 100 partes en masa del otro agente basándose en 1 parte en masa del agente de la presente invención. El otro agente puede administrarse como una razón de combinación opcional de una o dos o más especies seleccionadas opcionalmente del grupo homólogo y grupo heterogéneo mostrado a continuación

La enfermedad en la que su efecto preventivo y/o terapéutico se ejerce mediante el fármaco concomitante descrito anteriormente no está particularmente limitada y puede ser cualquier enfermedad en la que el efecto preventivo y/o terapéutico del agente de la presente invención se puede complementar y/o reforzar.

Los ejemplos del otro agente incluyen un agente antitrombótico, un agente de mejora de la circulación, un dilatador del músculo liso bronquial, un fármaco antiinflamatorio, un anestésico local, un analgésico, un cemento óseo, un lubricante de articulaciones, un derivado de prostaglandina, una proteína de factor de reparación endógeno, un gen de factor de reparación endógeno y diversas células madre de órganos.

Los ejemplos del agente antitrombótico incluyen preparaciones de heparina (heparina de sodio, heparina de calcio, dalteparina de sodio), anticoagulantes orales (warfarina de potasio), agentes antitrombina (gabexato mesilato, nafamostat mesilato, argatroban), anti-inhibidores de la aglutinación plaquetaria (aspirina, dipiridamol, clorhidrato de ticlopidina, beraprost de sodio, cilostazol, ozagrel de sodio, clorhidrato de sarpogrelato, eicosapentanoato de etilo), agentes trombolíticos (urocinasa, tisocinasa, alteplasa, nateplasa, monteplasa, pamiteplasa), inhibidores del factor Xa e inhibidores del factor VIIa.

Los ejemplos del agente de mejora de la circulación incluyen tartrato de ifenprodil, aniracetam, clorhidrato de donepezil, clorhidrato de amantadina, nicergolina, ibudilast, un sistema de papaverina, un sistema de nicotina, un antagonista de calcio, un agonista del receptor β y un antagonista del receptor α .

Los ejemplos del dilatador de músculo liso bronquial incluyen estimulantes β_2 (por ejemplo, clorhidrato de efedrina, sulfato de isoprenalina, sulfato de salbutamol, clorhidrato de tulobuterol), fármacos de teofilina (por ejemplo, diprofilina, aminofilina, teofilina de colina) o fármacos anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio, bromuro de flutropio, bromuro de oxitropio).

Los ejemplos del anestésico local incluyen una preparación de esteroides, procaína, clorhidrato de cocaína, clorhidrato de lidocaína, clorhidrato de ropivacaína y similares.

Los ejemplos de un analgésico incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como aspirina, indometacina, diclofenaco, meloxicam y celecoxib, analgésico opioide tal como codeína y morfina, pentazocina, clorhidrato de buprenorfina y bromhidrato de eptazocina.

Los ejemplos del cemento óseo incluyen fosfato de calcio.

Los ejemplos del lubricante de articulaciones incluyen suveniril.

Los ejemplos del derivado de prostaglandina incluyen PGE1, PGE2 y PGI2 o profármacos de los mismos, lipoPGE1, 6^oxoPGE1, derivados de 6-oxoPGE1, ornoprostil, limaprostil, enptostil, misoprostol.

Los ejemplos del factor de reparación endógeno según la "proteína de factor de reparación endógeno y el gen del factor de reparación endógeno" incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos factores de crecimiento de fibroblastos (FGF a/b), factor β de crecimiento de transformación (TGF- β), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), angiopoyetina, factor de inducción de hipoxia (HIF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de sus familias.

Además, no solo los compuestos encontrados hasta ahora, sino también los que se descubrirán en el futuro también se incluyen en los otros agentes capaces de complementar y/o reforzar los agentes preventivos y/o terapéuticos de la presente invención, basándose en el mecanismo descrito anteriormente.

Cuando el agente de la presente invención, o el fármaco concomitante del agente de la presente invención con otro agente, se usa para el fin descrito anteriormente, se administra generalmente de manera sistémica o tópica en forma oral o parenteral.

Su dosis varía dependiendo de la edad, el peso corporal, los síntomas, el efecto terapéutico, el método de administración y el periodo de tratamiento, pero está habitualmente dentro del intervalo de 1 ng hasta 100 mg por adulto por vez, desde una hasta varias veces al día mediante administración oral, o dentro del intervalo de 0,1 ng hasta 50 mg por adulto por vez, desde una hasta varias veces al día, desde una hasta varias veces a la semana o desde una hasta varias veces en 3 meses mediante administración parenteral en forma de una preparación

persistente, o administrada de manera continua en una vena dentro del intervalo de 1 hora hasta 24 horas al día. Puesto que la dosis varía según diversas condiciones como norma tal como se describió anteriormente, existe un caso en el que una dosis más pequeña que el intervalo anterior es suficiente o un caso que requiere una administración que excede el intervalo.

5 Cuando el agente de la presente invención, o el fármaco concomitante del agente de la presente invención con otro agente, se administra, se usa como preparaciones sólidas para uso interno o preparaciones líquidas para uso interno para administración oral, o como inyecciones, inyecciones subcutáneas o intramusculares, preparaciones externas, supositorios, colirios, inhalaciones y preparaciones que contienen dispositivos médicos y similares para administración parental.

La preparación sólida para uso interno para su uso en la administración oral incluye comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y gránulos. En las cápsulas se incluyen cápsulas duras y cápsulas blandas.

15 En una preparación sólida de este tipo para uso interno, se usan uno o más principios activos como tales, o se mezclan con un relleno (lactosa, manitol, glucosa, celulosa microcristalina, almidón), un aglutinante (hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, aluminometasilicato de magnesio), un agente disgregante (glicolato de celulosa de calcio), un lubricante (estearato de magnesio), un agente estabilizante y un agente que ayuda en la solubilización (ácido glutámico, ácido aspártico) y se usan preparando la mezcla para dar una preparación farmacéutica. Si es necesario, ésta puede recubrirse con un agente de recubrimiento (sacarosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa), o recubrirse con dos o más capas. Se incluyen cápsulas adicionales de una sustancia absorbible tal como gelatina.

25 La preparación líquida para uso interno para su uso en la administración oral incluye soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. En una preparación líquida de este tipo, se disuelven, se suspenden o se emulsionan uno o más principios activos en un diluyente usado de manera general (agua purificada, etanol, una solución mixta de los mismos). Además, esta preparación líquida puede contener un agente de humectación, un agente de suspensión, un agente emulsionante, un edulcorante, un aromatizante, un agente aromático, un conservante.

30 Las formas farmacéuticas para uso externo para su uso en administración parenteral incluyen, por ejemplo, pomadas, geles, cremas, fomentaciones, preparaciones adhesivas, linimentos, pulverizaciones, inhalaciones, pulverizaciones, aerosoles, colirios y gotas nasales. Además, estos pueden sellarse con un polímero biodegradable y usarse como dispositivos médicos (sutura quirúrgica, un perno para su uso en el tratamiento de una fractura ósea).
35 Contienen uno o más principios activos y se preparan mediante un método convencionalmente conocido o se basan en una fórmula usada de manera general.

Las pomadas se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan suspendiendo o fundiendo uno o más principios activos en una base. La base de pomada se selecciona de las que se conocen convencionalmente o que se usan de manera general. Por ejemplo, se usa una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias, que se seleccionan de ácidos grasos superiores o ésteres de ácidos grasos superiores (ácido adípico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, éster de ácido adípico, éster de ácido mirístico, éster de ácido palmítico, éster de ácido esteárico, éster de ácido oleico), ceras (cera de abejas, cera de ballena, ceresina), tensioactivos (éster de ácido fosfórico de polioxietileno alquil éter), alcoholes superiores (cetanol, alcohol estearílico, alcohol cetosteárico), aceite de silicio (dimetilpolisiloxano), hidrocarburos (vaselina hidrófila, vaselina blanca, lanolina purificada, parafina líquida), glicoles (etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, macrogol), aceite vegetal (aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de trementina), aceite animal (aceite de visón, aceite de yema de huevo, escualano, escualeno), agua, aceleradores de la absorción y agentes de prevención de erupciones. Además, pueden estar contenidos agentes que mantienen la humedad, conservantes, estabilizantes, antioxidantes y aromatizantes.

Los geles se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan fundiendo uno o más principios activos en una base. La base del gel se selecciona de las que se conocen convencionalmente o que se usan de manera general. Por ejemplo, se usa una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias, que se seleccionan de alcoholes inferiores (etanol, alcohol isopropílico), agentes gelificantes (carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa), agentes neutralizantes (trietanolamina, diisopropanolamina), tensioactivos (monoestearato de polietilenglicol), gomas, agua, aceleradores de la absorción y agentes de prevención de erupciones. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes y aromatizantes.

60 Las cremas se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan fundiendo o emulsionando uno o más principios activos en una base. La base de crema se selecciona de las que se conocen convencionalmente o que se usan de manera general. Por ejemplo, se usa una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias, que se seleccionan de ésteres de ácidos grasos superiores, alcoholes inferiores, hidrocarburos, alcoholes polihidroxilados (propilenglicol, 1,3-butilenglicol), alcoholes superiores (2-hexildecanol, cetanol), emulsionantes (polioxietileno alquil éteres, ésteres de

ácidos grasos), agua, aceleradores de absorción y agentes de prevención de erupciones. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes, aromatizantes y similares.

5 Las fomentaciones se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan fundiendo uno o más principios activos en una base y luego extendiendo y recubriendo el material amasado resultante sobre un soporte. La base de fomentación se selecciona de las que se conocen convencionalmente o que se usan de manera general. Por ejemplo, se usa una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias, que se seleccionan de espesantes (ácido poliacrílico, polivinilpirrolidona, goma arábiga, almidón, gelatina, metilcelulosa), agentes de humectación (urea, glicerol, propilenglicol), rellenos (caolín, óxido de zinc, talco, calcio, magnesio), agua, agentes solubilizantes, agentes de pegajosidad y agentes de prevención de erupciones. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes y aromatizantes. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes y aromatizantes.

15 Las preparaciones adhesivas se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan fundiendo uno o más principios activos en una base y luego extendiendo y recubriendo el material resultante sobre un soporte. La base de la preparación adhesiva se selecciona de las que se conocen convencionalmente o que se usan de manera general. Por ejemplo, se usa una única sustancia o una mezcla de dos o más sustancias, que se seleccionan de bases de polímero, aceites y grasas, ácidos grasos superiores, agentes de pegajosidad y agentes de prevención de erupciones. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes y aromatizantes.

25 Los linimentos se producen mediante un método convencionalmente conocido o basado en una fórmula usada de manera general. Por ejemplo, se preparan disolviendo, suspendiendo o emulsionando uno o más principios activos en una única sustancia o dos o más sustancias seleccionadas de agua, alcoholes (etanol, polietilenglicol), ácidos grasos superiores, glicerol, jabón, emulsionantes y agentes de suspensión. Además, pueden estar contenidos conservantes, antioxidantes y aromatizantes.

30 Además de los diluyentes usados de manera general, las pulverizaciones e inhalaciones pueden contener estabilizantes tales como hidrogenosulfito de sodio y agentes de tamponamiento que pueden proporcionar tonicidad, por ejemplo, agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio, citrato de sodio y ácido cítrico. Los métodos de producción de pulverizaciones se describen de forma ilustrativa en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 2.868.691 y la patente de Estados Unidos n.º 3.095.355.

35 Las soluciones, suspensiones, emulsiones e inyecciones sólidas que se usan disolviendo o suspendiendo en un disolvente antes de su uso se incluyen en las inyecciones para administración parenteral. Las inyecciones se usan disolviendo, suspendiendo o emulsionando uno o más principios activos en un disolvente. Estas inyecciones pueden inyectarse en una vena, una arteria, músculo, bajo la piel, en el cerebro, una articulación, un hueso y otras regiones tópicas de órganos, o administrarse directamente usando un catéter de vasos sanguíneos equipado con una aguja. Como disolvente, por ejemplo, se usan agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, aceite vegetal, alcoholes tales como propilenglicol, polietilenglicol y etanol, y combinaciones de los mismos. Además, tales inyecciones pueden contener un estabilizante, un agente que ayuda a la solubilización (ácido glutámico, ácido aspártico, Polisorbato 80 (marca comercial registrada), un agente de suspensión, un agente emulsionante, un agente calmante, un agente de tamponamiento y un conservante. Estas se producen esterilizando en la etapa final o mediante una operación aséptica. Además, es posible preparar una preparación sólida aséptica, tal como una preparación liofilizada, y usarla disolviendo en agua destilada esterilizada o aséptica para inyección u otro disolvente antes de su uso.

50 Los colirios para administración parenteral incluyen un líquido de colirio, un líquido de colirio de tipo suspensión, un líquido de colirio de tipo emulsión, un líquido de colirio de tipo solución antes de su uso y una pomada para ojos.

55 Estos colirios se producen según un método convencionalmente conocido. Por ejemplo, se usan disolviendo, suspendiendo o emulsionando uno o más principios activos en un disolvente. Como disolvente de colirios, por ejemplo, se usan agua purificada esterilizada, solución salina fisiológica, otros disolventes acuosos o disolventes no acuosos para inyección (por ejemplo, aceite vegetal) y combinaciones de los mismos. Si es necesario, los colirios pueden contener además sustancias seleccionadas opcionalmente de agentes de tonicidad (cloruro de sodio, glicerol concentrado), agentes de tamponamiento (fosfato de sodio, acetato de sodio), tensioactivos (Polisorbato 80 (marca comercial registrada), estearato de polioxilo 40, aceite de ricino endurecido con polioxietileno), estabilizantes (citrato de sodio, edetato de sodio) y antisépticos (cloruro de benzalconio, parabeno).

60 Estas se producen esterilizando en la etapa final o mediante una operación aséptica. Además, es posible preparar una preparación sólida aséptica, tal como una preparación liofilizada, y usarla disolviendo en agua purificada destilada esterilizada o aséptica u otro disolvente antes de su uso.

65 Como inhalaciones para administración parenteral, se incluyen aerosoles, polvos para inhalación o soluciones para inhalación, y dichas soluciones para inhalación pueden estar en una forma que se usa disolviendo o suspendiendo en agua u otro disolvente apropiado antes de su uso.

Estas inhalaciones se producen según métodos convencionalmente conocidos.

Por ejemplo, en el caso de soluciones para inhalación, se preparan seleccionando opcionalmente antisépticos (cloruro de benzalconio, parabeno), agentes colorantes, agentes de tamponamiento (fosfato de sodio, acetato de sodio), agentes de tonicidad (cloruro de sodio, glicerol concentrado), espesantes (polímero de carboxivinilo) y aceleradores de la absorción, si es necesario.

En el caso de polvos para inhalación, se preparan seleccionando opcionalmente lubricantes (ácido esteárico y una sal del mismo), aglutinantes (almidón, dextrina), rellenos (lactosa, celulosa), agentes colorantes, antisépticos (cloruro de benzalconio, parabeno) y aceleradores de la absorción, si es necesario.

Cuando se administran soluciones para inhalación, se usa generalmente un pulverizador (atomizador o nebulizador), y se usa generalmente un dispositivo de administración por inhalación para polvos cuando se usan polvos para inhalación.

Como otras composiciones para administración parenteral, se incluyen supositorios para administración rectal y óvulos para administración vaginal, que contienen uno o más principios activos y se formulan de la manera habitual.

Aplicación a regiones tópicas:

Como administración tópica de la presente invención, el método de administración no está particularmente limitado, siempre que el agente de la presente invención o un fármaco concomitante del agente de la presente invención con otro agente pueda suministrarse de manera tópica a regiones de una enfermedad. Sus ejemplos incluyen inyecciones y agentes de inclusión que van a usarse en músculo, bajo la piel y en la piel, vasos sanguíneos, músculo del corazón, alvéolos, partes de articulaciones, vértebras, partes óseas, partes de raíces de dientes y órganos lesionados, preparaciones que contienen dispositivos médicos en las que el agente de la presente invención o un fármaco concomitante del agente de la presente invención con otro agente está contenido en un dispositivo médico (endoprótesis vascular, perno de fijación, fijador, hilo), o agentes de recubrimiento recubiertos con el mismo, preparaciones sólidas tales como gránulos y polvos, preparaciones adhesivas, geles, pomadas, películas, preparaciones incluidas en un polímero biodegradable o dispositivos médicos incluidos.

Como preparación persistente de la presente invención, la preparación farmacéutica no está limitada, siempre que el principio activo pueda suministrarse de manera persistente a una región de una enfermedad. Sus ejemplos incluyen inyecciones de liberación sostenida (por ejemplo, preparaciones de microcápsulas, preparaciones de microesferas, preparaciones de nanoesferas), preparaciones de inclusión (por ejemplo, preparaciones de película), pomadas, recubrimientos en los que el principio activo está contenido o recubierto en un dispositivo médico (endoprótesis vascular, perno de fijación, fijador, sutura).

Las preparaciones de microesferas de la presente invención son composiciones farmacéuticas de partículas finas con un polímero biodegradable, que contienen un principio activo como principio activo.

Está presente un polímero bioabsorbible en el sistema de liberación sostenida de fármacos de la presente invención, que se logra mediante un polímero natural o un polímero sintético. El mecanismo para controlar la velocidad de liberación sostenida a partir del mismo incluye un tipo de control de la degradación, un tipo de control de la dispersión o un tipo de control de la permeación de la membrana.

Los ejemplos del polímero natural como polímero bioabsorbible de la presente invención incluyen polisacáridos producidos por plantas (por ejemplo, celulosa, almidón, ácido alginico), polisacáridos producidos por animales y proteínas (por ejemplo, quitina, quitosano, colágeno, gelatina, albúmina, glicosaminoglicano) y poliésteres y polisacáridos producidos por microorganismos (por ejemplo, poli-3-hidroxiálcanoato, ácido hialurónico).

Además, los ejemplos del polímero biodegradable incluyen polímeros de ésteres de ácidos grasos o copolímeros de los mismos, ésteres de ácido poliacrílico, ácidos polihidroxi-butíricos, oxalatos de polialquileno, poliortoésteres, ácidos de policarbonato y poliamino, que pueden usarse solos o como una mezcla de los mismos. Los ejemplos de los polímeros de ésteres de ácidos grasos o copolímeros de los mismos incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido policítrico, ácido polimálico, polietilensuccinato, polibutilensuccinato, poli- ϵ -caprolactona, adipato-tereftalato de butileno o copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, que pueden usarse solos o como una mezcla de los mismos. Además de estos, pueden usarse éster de poliácido α -acrílico, poliácido $-\beta$ -hidroxibutírico, oxato de poli trimetileno, poliortoéster, poliortocarbonato, polietilencarbonato, poli (ácido- γ -bencil-glutámico, alcohol polivinílico), carbonato de poliéster, anhídrido de poliácido), acrilato de policiano, polifosfazina o poli-L-alanina solos o como una mezcla de los mismos. Se prefiere ácido poliláctico, ácido poliglicólico o copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, y más preferente es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico.

El peso molecular promedio de estos polímeros biodegradables de alto peso molecular que van a usarse en la presente invención es, preferiblemente, de aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 800.000, más preferiblemente desde aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 200.000. Por ejemplo, en el caso de poli

(ácido láctico), su peso molecular promedio en peso es preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000. Es más preferiblemente de aproximadamente 6.000 hasta aproximadamente 50.000. El ácido poliláctico puede sintetizarse según el método de producción convencionalmente conocido. En el caso del copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, su razón de composición de ácido láctico y ácido glicólico es, preferiblemente, de aproximadamente 100/0 a aproximadamente 50/50 (p/p), de manera particularmente preferible de aproximadamente 90/10 a aproximadamente 50/50 (p/p). El peso molecular promedio en peso del copolímero de ácido láctico-ácido glicólico es preferiblemente de aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000. Es más preferiblemente de aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 80.000. El copolímero de ácido láctico-ácido glicólico puede sintetizarse según el método de producción convencionalmente conocido. Además, con el fin de controlar la descarga inicial, pueden añadirse aminoácidos básicos (por ejemplo, ácido alginico).

Según la descripción, el peso molecular promedio en peso es un peso molecular basado en poliestireno medido mediante cromatografía de permeación en gel (CPG).

El polímero biodegradable de alto peso molecular descrito anteriormente puede cambiarse dependiendo de la fuerza de la actividad farmacológica del principio activo y la liberación de fármaco de interés, siempre que se logre el objetivo de la presente invención, y por ejemplo se usa en una cantidad de aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 10.000 veces (razón en peso), preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1.000 veces (razón en peso), más desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 veces (razón en peso), basándose en dicha sustancia fisiológicamente activa.

Las microesferas de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, mediante un método de secado por inmersión (por ejemplo, método ac/a, método a/ac, método a/ac/a), un método de separación de fases, un método de secado por pulverización, un método de granulación con fluido supercrítico o un método correspondiente a los mismos.

A continuación se describen métodos de producción específicos en el secado por inmersión (método ac/a) y secado por pulverización.

(1) En el método de secado por inmersión (método ac/a), se prepara en primer lugar una solución de disolvente orgánico de un polímero biodegradable. Es preferible que el disolvente orgánico que va a usarse en la producción de las microesferas de la presente invención tenga un punto de ebullición de 120 °C o menos. Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen hidrocarburos halogenados (por ejemplo, diclorometano, cloroformo), ésteres alifáticos (por ejemplo, acetato de etilo), éteres, hidrocarburos aromáticos y cetonas (acetona). Pueden usarse dos o más de los mismos mezclando en una razón opcional. Un disolvente orgánico deseable es diclorometano o acetónitrilo. El disolvente orgánico es preferiblemente diclorometano. La concentración del polímero biodegradable en la solución de disolvente orgánico varía dependiendo del peso molecular del polímero biodegradable y la clase del disolvente orgánico, pero se selecciona generalmente dentro del intervalo de aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 80 % (v/p). Es preferiblemente de aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 70 % (v/p), más preferiblemente desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 60 % (v/p).

Se añade un principio activo y se disuelve en la solución de disolvente orgánico así obtenida de polímero biodegradable. La cantidad de este principio activo que va a añadirse varía dependiendo de la clase de agente, la acción de angiogénesis y el periodo de tiempo que persiste el efecto, pero es de aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 90 % (p/p), preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 80 % (p/p), más preferiblemente desde aproximadamente el 0,3 % hasta el 30 % (p/p), como concentración del polímero biodegradable de alto peso molecular en la solución de disolvente orgánico.

A continuación, la solución de disolvente orgánico así preparada se añade adicionalmente a una fase acuosa para formar una emulsión ac/a usando un agitador o emulsionante. El volumen de fase acuosa en este caso se selecciona generalmente de aproximadamente 1 vez hasta aproximadamente 10.000 veces del volumen de fase oleosa. Esto se selecciona más preferiblemente desde aproximadamente 2 veces hasta aproximadamente 5.000 veces. Esto se selecciona particularmente preferiblemente de aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 2.000 veces. Puede añadirse un agente emulsionante a la fase acuosa de la fase externa descrita anteriormente. El agente emulsionante puede ser cualquier agente que pueda formar de manera general una emulsión ac/a estable. Los ejemplos del agente emulsionante incluyen un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico, un derivado de aceite de ricino de polioxietileno, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa, lecitina y gelatina. Estos pueden usarse en una combinación opcional. La concentración del agente emulsionante en la fase acuosa externa es, preferiblemente, de aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 20 % (p/p). Es más preferiblemente de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10 % (p/p), de manera particularmente preferible de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 5 % (p/p).

Se emplea un método usado de manera general para la evaporación del disolvente en la fase oleosa. El método se lleva a cabo bajo presión habitual o reduciendo gradualmente la presión mientras se agita usando un agitador o agitador magnético o usando un evaporador rotatorio mientras se ajusta el grado de vacío. Tras fraccionar las microesferas así obtenidas mediante centrifugación o filtración, el principio activo libre, agente emulsionante y similares adherido a la superficie de las microesferas se lavan varias veces repetidamente con, por ejemplo, una solución de tensioactivo o un alcohol, y las microesferas resultantes se dispersan de nuevo en agua destilada o

un medio de dispersión que contiene un relleno (manitol, sorbitol, lactosa, etc.) y se liofilizan. Como el método ac/a descrito anteriormente, pueden producirse microesferas mediante un método en el que un principio activo se dispersa en una solución de disolvente orgánico de polímero biodegradable, concretamente un método s/ac/a.

5 (2) Cuando las microesferas se producen mediante un método de secado por pulverización, el disolvente orgánico en el que un polímero biodegradable y un principio activo se disuelven, o una emulsión de los mismos, se pulveriza en una cámara de secado de un dispositivo secador por pulverización (secador por pulverización) usando una boquilla, y el disolvente orgánico o agua en las gotas de partículas finas se evapora en el plazo de un periodo de tiempo extremadamente corto para preparar microesferas. Como boquilla, hay un tipo de boquilla de fluido doble, un tipo de boquilla a presión y un tipo de disco rotatorio.

10 En este caso, con el fin de prevenir la agregación de las microesferas, si es necesario, es eficaz pulverizar un disolvente orgánico o solución acuosa de un agente de prevención de la agregación (manitol, lactosa, gelatina, etc.) a través de otra boquilla, simultáneamente con la pulverización de la emulsión ac/a. Como las microesferas obtenidas de este modo, se lleva a cabo una eliminación más completa del agua y el disolvente en las microesferas a presión reducida, con calentamiento, si es necesario.

15 Las microesferas de la presente invención pueden prepararse para dar diversas formas farmacéuticas de preparación farmacéutica, por ejemplo, como tales, o usando una composición farmacéutica en forma esférica, de varilla, aguja, perno, filamento, gragea, película o crema como sustancia material.

20 Además, usando esta preparación farmacéutica, puede administrarse como preparaciones parenterales para administración tópica (por ejemplo, inyecciones y agentes de inclusión que van a usarse en músculo, bajo la piel y en la piel, músculo del corazón, cavidad abdominal, bronquios, vasos sanguíneos, alvéolos, región lesionada del endotelio vascular, cerebro, médula, dentro de la duramadre, fuera de la duramadre, partes de articulaciones, 25 vértebras, partes óseas, partes periodontales y diversos órganos, preparaciones sólidas tales como gránulos y polvos, preparaciones líquidas tales como suspensiones, preparaciones adhesivas, preparaciones de película, pomadas, preparaciones que contienen dispositivos médicos en las que el principio activo está contenido en un dispositivo médico (endoprótesis vascular, perno, hilo de sutura), agentes de recubrimiento recubiertos con el mismo) . Además, puede administrarse directamente en, por ejemplo, una región isquémica del músculo del corazón 30 usando un catéter de vasos sanguíneos.

35 Por ejemplo, cuando las microesferas se preparan para dar inyecciones, pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas prácticas para inyección preparando las microesferas para dar suspensiones acuosas junto con un agente de dispersión, un conservante, un agente de tonicidad, un agente de tamponamiento y un agente de ajuste del pH. Además, se preparan para dar inyecciones que pueden usarse de manera práctica como suspensiones oleosas mediante dispersión junto con un aceite vegetal o su mezcla con fosfolípido tal como lecitina, o un triglicérido de ácido graso de cadena mediana (por ejemplo, Migliol 812).

40 El tamaño de partícula de las microesferas, por ejemplo cuando se usan como inyecciones de suspensión, puede estar dentro de un intervalo tal que su grado de dispersión y propiedad de paso a través de la aguja se satisfacen, y puede mostrarse a modo de ejemplo un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 μm como tamaño de partícula promedio. Está preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 1 hasta 150 μm , más preferiblemente un tamaño de partícula de dentro del intervalo de aproximadamente 2 a 100 μm . Tal como se describió anteriormente, es preferible que la composición farmacéutica de la presente invención sea una suspensión.

45 Es preferible que la composición farmacéutica de la presente invención esté en forma de partículas finas. Esto se debe a que la composición farmacéutica no produce en los pacientes demasiado dolor cuando se administra a través de una aguja que se usa para inyección subcutánea o intramuscular habitual. La composición farmacéutica de la presente invención es particularmente preferible como inyecciones. Cuando las microesferas se preparan para dar preparaciones estériles, puede emplearse un método en el que todas las etapas de producción se llevan a cabo en 50 condiciones asépticas, un método en el que se esterilizan con rayos gamma, un método en el que se añade un antiséptico, aunque no está particularmente limitado.

55 La acción del principio activo de la composición farmacéutica de la presente invención tiene una propiedad de liberación sostenida, y el periodo de liberación sostenida varía dependiendo de la clase y cantidad de combinación y similares del polímero biodegradable, tiene un periodo de liberación sostenida generalmente de 1 semana hasta 3 meses, de modo que puede usarse como acelerador de la inducción de la diferenciación de células madre o un acelerador de la angiogénesis acelerando la producción de diversos factores de reparación endógenos en regiones de enfermedad de órganos (isquémicas).

60 Aunque la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de la clase y el contenido del principio activo, las formas farmacéuticas, el periodo de tiempo persistente de la liberación del fármaco, el animal al que va a administrarse, puede ser una cantidad eficaz del principio activo. Por ejemplo, cuando la composición se usa como microesferas en una región isquémica, puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,001 mg a 500 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a 50 mg, por vez, como 65 principio activo por adulto (50 kg en peso corporal), desde una vez al día hasta una vez en 3 meses.

Además, para, por ejemplo, el frío, entumecimiento, claudicación intermitente, dolor en reposo o úlcera cutánea en las extremidades en el caso de ASO, enfermedad de Buerger o neuropatía diabética, es preferible llevar a cabo la administración intramuscular del agente de la presente invención o su preparación persistente, por ejemplo, a la región enferma o las proximidades de la misma de manera continua durante un periodo de aproximadamente desde una vez al día hasta 4 semanas.

Para, por ejemplo, el infarto de miocardio, la angina de pecho, es preferible llevar a cabo directamente administración intramuscular del agente de la presente invención o su preparación persistente, por ejemplo, a la región del músculo del corazón isquémica o la proximidad de la misma, y es preferible llevar a cabo la administración directamente mediante toracotomía o usando, por ejemplo un catéter de vasos sanguíneos equipado con aguja. Como el periodo de administración, es preferible llevar a cabo la administración intramuscular de forma continua, por ejemplo, durante un periodo de aproximadamente una vez al día a 4 semanas.

En el caso de, por ejemplo, osteoporosis, daño del tejido periodontal, fractura ósea y osteoartritis, es preferible administrar el agente de la presente invención o su preparación persistente solo, o mezclándolo con un cemento óseo, un lubricante de articulaciones o una herramienta protésica por vía tópica a la región enferma o las proximidades de la misma.

En el caso de hipertensión pulmonar y EPOC, es preferible llevar a cabo la inhalación del agente de la presente invención o su preparación persistente como soluciones para inhalación o polvos para inhalación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un resultado medido de la acción de aceleración de la formación de órganos huecos del compuesto 1 (ácido (E) -[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil) metilidenaminoxijetil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético.

La figura 2 muestra un resultado de la prueba de liberación de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 1.

La figura 3 muestra un resultado de la prueba de liberación de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2.

La figura 4 muestra un resultado de la prueba de liberación de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 3.

La figura 5 muestra un resultado medido de las acciones de aceleración de la formación de órganos huecos del compuesto de referencia 3 (ácido (5Z, 9β, 11α, 13E)-17,17-propano-11,16-dihidroxi-9-cloro-20-norprost-5,13-dienoico) y el compuesto de referencia 4 (ácido (11α, 13E, 15α)-9-oxo-11,15-dihidroxi-16-(3-metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

A continuación se muestran pruebas farmacológicas como ejemplos de la presente invención, pero estos son para entender a fondo la presente invención y no limitar el alcance de la presente invención. En este sentido, se aplicaron la mejora de la precisión de medición y la modificación de la sensibilidad de medición tal como sigue a los métodos de medición para evaluar los compuestos de la presente invención.

Ejemplo 1

Medición de la acción de aceleración de la angiogénesis (*in vitro*):

Método de ensayo:

Se cultivó un kit de angiogénesis (fabricado por Kurabo; constituido por células endoteliales vasculares de vena de cordón umbilical humano y fibroblastos de piel humana normales) durante 3 horas, y luego se cambió el medio de cultivo (el medio para uso de angiogénesis unido al kit de angiogénesis se usó como medio de cultivo y se cultivó a 37 °C en un entorno húmedo de 5 % de dióxido de carbono-95 % de aire, y se usó un incubador de dióxido de carbono BNA-121D como incubador) y se añadió un agente que va a someterse a prueba a cada pocillo (0,5 ml/pocillo). Se llevó a cabo el intercambio de medio también en el 3º, 6º y 8º día tras el comienzo del cultivo y se añadió el agente nuevo que va a someterse a prueba. La clase y concentración del agente que va a someterse a prueba fueron sin tratar, disolvente (DMSO) al 0,1 %, compuesto 1 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} mol/l, VEGF-A 0,1, 1 y HGF 0,1, 1 y 10 ng/ml, y se llevó a cabo el cultivo usando 3 pocillos para cada concentración. Se llevó a cabo la fijación 10 días tras el comienzo del cultivo, y se llevó a cabo la tinción de órganos huecos con anticuerpo anti-CD31 usando un kit de tinción de órganos huecos (fabricado por Kurabo). Como evaluación, se montó Chalkley Grid (una lente de rejilla, fabricada por Kurabo) sobre el ocular de un microscopio, y se evaluó la formación de órganos huecos contando las intersecciones de los puntos de disposición al azar de Chalkley Grid con el órgano hueco formado (haciendo referencia al método de evaluación de J. Pathol., 177, 275–283 (1995)). Se llevó a cabo el recuento en 12 posiciones por pocillo, y se calculó el total.

Como agente que va a someterse a prueba, se disolvió el compuesto 1 (ácido (E) -[5-[2-[1-fenil-1-(3piridil) metilidenaminoxietil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mol/l que después usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

5 Como VEGF-A (factor-A de crecimiento endotelial vascular), se diluyó la solución de 2 µg/ml de VEGF contenida en el kit de reactivo control de angiogénesis de Kurabo con el medio de cultivo y se usó.

Como HGF (factor de crecimiento de hepatocitos humanos), se diluyó la solución de 5 µg/ml de HGF adquirida de R & D System-Funakoshi con el medio de cultivo y se usó.

10

Método de análisis estadístico:

Se compararon los recuentos de formación de órganos huecos en los pocillos sin tratar con los de los pocillos tratados con concentraciones respectivas de muestras de prueba mediante la prueba de Dunnett (prueba bilateral). El nivel de significación se fijó en el 5 %.

15

En este sentido, se mostraron los datos mediante el valor promedio de 3 pocillos y la desviación estándar.

Los resultados de la prueba se muestran en la figura 1.

20

Resultados:

El compuesto 1 aceleró la formación de órganos huecos de manera estadísticamente significativa en 10^{-8} y 10^{-7} mol/l. Además, el VEGF-A y HGF aceleraron la formación de órganos huecos a una concentración de 10 ng/ml. Basándose en los resultados anteriores, se reveló que el compuesto 1 tiene un efecto de aceleración de la angiogénesis que tiene una fuerza equivalente a los agentes de control positivo VEGF-A y HGF en un sistema de cocultivo de células endoteliales vasculares humanas y fibroblastos humanos.

25

Ejemplo 2

30

Medición de la acción de producción de proteína del factor de reparación endógeno (HGF, VEGF) (*in vitro*):

Método de ensayo:

35 Se cultivó un kit de angiogénesis (fabricado por Kurabo; constituido por células endoteliales vasculares de vena de cordón umbilical humano y fibroblastos de piel humana normales) durante 3 horas, y luego se cambió el medio de cultivo (el medio para uso de angiogénesis unido al kit de angiogénesis se usó como medio de cultivo y se cultivó a 37 °C en un entorno húmedo de 5 % de dióxido de carbono-95 % de aire, y se usó un incubador de dióxido de carbono BNA-121D como incubador) y se añadió un agente que va a someterse a prueba a cada pocillo (0,5 ml/pocillo). El agente que va a someterse a prueba era disolvente (DMSO) al 0,1 % y compuesto 1 10^{-7} mol/l, y se llevó a cabo el cultivo usando 3 pocillos para cada uno. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo antes del comienzo del cultivo y 1, 2, 6, 24, 48 y 72 horas tras el comienzo. Se midieron las concentraciones de proteína de HGF y VEGF en los sobrenadantes de cultivo usando un kit de ELISA (R % D system-Funakoshi).

40

45 Como agente que va a someterse a prueba, se disolvió el compuesto 1 (ácido (E) -[5-[2-[1-fenil-1-(3piridil) metilidenaminoxietil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]acético en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución de 10^{-4} mol/l que después se usó diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

50

Método de análisis estadístico:

Se compararon los resultados de los pocillos control de disolvente con los de los pocillos tratados con el agente que va a someterse a prueba mediante la prueba de Dunnett (prueba bilateral). El nivel de significación se fijó en el 5 %.

En este sentido, se mostraron los datos mediante el valor promedio de 3 pocillos y la desviación estándar.

55

Los resultados de la prueba tras 72 horas del cultivo se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

Agente analizado	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
Control de disolvente (DMSO)	110 ± 16	2004 ± 76
Compuesto 1	518 ± 15***	3034 ± 30***
***: p < 0,001 frente a control de disolvente		

60

Resultados:

El compuesto 1 aceleró la producción de proteína de HGF y proteína de VEGF de manera estadísticamente significativa en comparación con el control de disolvente, a las 72 horas del cultivo a una concentración de 10^{-7} mol/l.

Ejemplo 3

Producción de preparaciones persistentes:

Ejemplo de preparación 1

Se preparó una solución en diclorometano (1 ml) de 100 mg de un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (denominado "PLGA" a continuación en el presente documento) (ácido poliláctico:ácido glicólico = 1:1 (% en moles), peso molecular promedio en peso 40.000, PLGA5-1, fabricado por Mitsui Kagaku) y compuesto 1 (5 mg). Se preparó una emulsión AC/A añadiendo la solución preparada anteriormente a 300 ml de una solución acuosa de poli (alcohol vinílico) al 0,1 % (Nacalai Tesque) (pH 3,0, ajustado con ácido clorhídrico 1 N) que se agitó a 5.000 rpm usando TK Robomix (Tokushu Kiki, tipo MARK II 2.5), y agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se agitó esta emulsión AC/A a temperatura ambiente durante 2 horas para evaporar el diclorometano, y se solidificó la fase oleosa y luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos usando una centrifuga (Hitachi, O5PR22). Se desechó el sobrenadante, y se dispersó el residuo en agua destilada para inyección (35 ml) y luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos usando la centrifuga. Se desechó el sobrenadante, y se dispersó el residuo en Tween 80 al 0,2 % (35 ml) y luego se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos usando la centrifuga. Se desechó el sobrenadante, y se dispersó el residuo en agua destilada para inyección (35 ml) y luego se centrifugó de nuevo a 3.000 rpm durante 10 minutos usando la centrifuga. Desechando finalmente el sobrenadante, se empapó el precipitado en metanol helado seco, se congeló y luego se secó a presión reducida, produciendo de ese modo una preparación de microesferas del compuesto 1.

Ejemplo de preparación 2

Se preparó una solución en diclorometano (1 ml) de 100 mg de un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (denominado "PLGA" a continuación en el presente documento) (ácido poliláctico:ácido glicólico = 1:1 (% en moles), peso molecular promedio en peso 20.000, PLGA5020, Wako Pure Chemical Industries) y compuesto 1 (5 mg). Después de eso, se llevó a cabo la misma operación del ejemplo de preparación 1 para producir una preparación de microesferas del compuesto 1.

Ejemplo de preparación 3

Se preparó una solución en diclorometano (3 ml) de 100 mg de un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (que se denominará PLGA a continuación en el presente documento) (ácido poliláctico:ácido glicólico = 1:1 (% en moles), peso molecular promedio en peso 40.000, PLGA5-1, fabricado por Mitsui Kagaku) y compuesto 1 (5 mg). Después de eso, se llevó a cabo la misma operación del ejemplo de preparación 1 para producir una preparación de microesferas del compuesto 1.

Ejemplo de preparación de ensayo 1

Medición de la eficiencia de inclusión:

Se mezclaron las microesferas producidas en los ejemplos de preparación 1, 2 y 3 (respectivamente 10 mg aproximadamente) con una solución en acetonitrilo que contenía un patrón interno apropiado y se disolvieron llevando a cabo un tratamiento ultrasónico. Se midió el contenido de compuesto 1 de cada una de las soluciones mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, y se calculó la eficiencia de inclusión del compuesto 1 en la microesfera mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Eficiencia de inclusión (\%)} = (\text{contenido encontrado/contenido calculado}) \times 100$$

Como resultado, la preparación de microesferas del ejemplo de preparación 1 mostró una eficiencia de inclusión del 70,9 %, la preparación de microesferas del ejemplo de preparación 2 mostró una eficiencia de inclusión del 100 % y la preparación de microesferas del ejemplo de preparación 3 mostró una eficiencia de inclusión del 74,3 %.

Ejemplo de preparación de ensayo 2: Ensayo de liberación *in vitro*:

Se añadió cada una de las preparaciones de microesferas producidas en los ejemplos de preparación 1, 2 y 3 a Tween 80 al 0,2 %/tampón fosfato 1/15 M pH 6,8 a una concentración de 100 µg/ml como agente y se dispersaron de manera uniforme mediante tratamiento ultrasónico usando Vortex. Se dispensó 1 ml de esto en envases y se puso en un horno con temperatura constante de 37 °C. Se muestrearon periódicamente los envases y se

centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos, y se midió la cantidad residual del compuesto 1 en las microesferas del aglomerado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

5 Los resultados de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 1 se muestran en la figura 2, y los resultados de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 en la figura 3, y los resultados de la preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 3 en la figura 4.

10 En este sentido, la razón residual en las figuras 2, 3 y 4 significa una razón de compuesto 1 restante en microesferas con respecto a la inicial.

15 Como resultado, la preparación de microesferas del ejemplo de preparación 1 liberó aproximadamente el 40 % del agente durante 14 días, y la preparación de microesferas del ejemplo de preparación 2 liberó toda la cantidad durante aproximadamente 10 días. La preparación de microesferas del ejemplo de preparación 3 liberó aproximadamente el 60 % durante 28 días.

15 **Ejemplo 4**

20 Ensayo de angiogénesis (ensayo *in vivo*) usando el modelo de isquemia de pata de rata (arteriosclerosis obliterante (ASO))

25 El modelo de isquemia de pata se preparó ligando la arteria femoral izquierda de rata. Se midió el flujo sanguíneo en las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments) 2 semanas tras la preparación, y se dividieron los animales en 6 grupos (n = 5) de tal manera que el valor promedio del flujo sanguíneo se hizo casi uniforme.

30 Comenzando el siguiente día del agrupamiento, se administró 0,1 ml/sitio, 2 sitios, del agente que va a someterse a prueba mediante inyección intramuscular en el aductor femoral izquierdo, una vez a la semana, 4 veces en total como solución que va a someterse a prueba. Una semana después de la finalización de la administración final, se midieron los flujos sanguíneos de las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments), y se compararon y examinaron los flujos sanguíneos de la pata tratada (pata izquierda) y la pata no tratada (pata derecha). Resultados de pata tratada/pata no tratada (%) se muestran en la tabla 2.

35 En este sentido, la construcción de la solución que va a someterse a prueba es tal como sigue. Grupo de disolvente (control): 0,2 p/v de solución de Tween 80 (0,2 ml).

Grupo de polímero:

40 Se suspendió el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico usado en el ejemplo de preparación 2 en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml). En este sentido, la cantidad del copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico es idéntica a la cantidad contenida en el compuesto 1 MS (1 mg).

Grupo de compuesto 1 (1 mg):

45 Se suspendió el compuesto 1 (1 mg) en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

Grupo de compuesto 1 MS (0,01 mg):

50 La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,01 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

Grupo de compuesto 1 MS (0,1 mg):

55 La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,1 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

Grupo de compuesto 1 MS (1 mg):

60 La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 1 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

TABLA 2

Solución a analizar	Razón de flujo sanguíneo de pata tratada/pata no tratada (%)
Control	67,3 ± 5,1
Polímero	68,7 ± 4,1
Compuesto 1 (mg)	76,2 ± 2,8**##
Compuesto 1 MS (0,01 mg)	74,0 ± 7,1
Compuesto 1 MS (0,1 mg)	78,3 ± 4,6**##
Compuesto 1 MS (mg)	89,0 ± 4,4**##\$\$

** : diferencia significativa del control a $p < 0,01$ (prueba de la t de Student)
 ## : diferencia significativa del polímero a $p < 0,01$ (prueba de la t de Student)
 \$\$: diferencia significativa del compuesto 1 (1 mg) $p < 0,01$ (prueba de la t de Student)

Resultados:

- 5 Aunque se encontró recuperación significativa del flujo sanguíneo frente al control incluso mediante la administración del compuesto 1 solo (1 mg), se observó un efecto adicional de mejora del flujo sanguíneo más fuerte que el compuesto 1 (1 mg) mediante la administración de la preparación de microesferas (MS) (ejemplo de preparación 2) del compuesto 1.
- 10 En comparación con el grupo de polímero, se encontró un efecto de mejora del flujo sanguíneo correlativo con la dosis en la preparación del compuesto 1 MS, y se encontró una acción de efecto de mejora del flujo sanguíneo significativa en el compuesto 1 MS (0,1 mg) y el compuesto 1 MS (1 mg).

Ejemplo 5

- 15 Ensayo de angiogénesis usando el modelo de isquemia de pata de rata (arteriosclerosis obliterante (ASO)); determinación de la dosis mínima eficaz (ensayo *in vivo*):

- 20 El modelo de isquemia de pata se preparó ligando la arteria femoral izquierda de rata. Se midió el flujo sanguíneo en las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments) 1 semana tras la preparación, y se dividieron los animales en 4 grupos (n = 5) de tal manera que el valor promedio del flujo sanguíneo se hizo casi uniforme.

- 25 Comenzando el siguiente día del agrupamiento, se administró 0,1 ml/sitio, 2 sitios, del agente que va a someterse a prueba mediante inyección intramuscular en el aductor femoral izquierdo (grupo de polímero, grupo de compuesto 1 MS), una vez a la semana, 4 veces en total como solución que va a someterse a prueba. Una semana después de la finalización de la administración final, se midieron los flujos sanguíneos de las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments), y se compararon y examinaron los flujos sanguíneos de la pata tratada (pata izquierda) y la pata no tratada (pata derecha). Resultados de pata tratada/pata no tratada (%) se muestran en la tabla 3.

En este sentido, la construcción de la solución que va a someterse a prueba es tal como sigue.

Grupo de polímero:

- 35 Se suspendió el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico usado en el ejemplo de preparación 2 en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml). En este sentido, la cantidad del copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico es idéntica a la cantidad contenida en el compuesto 1 MS (0,1 mg).

- 40 Grupo de compuesto 1 MS (0,03 mg):

La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,03 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

- 45 Grupo de compuesto 1 MS (0,1 mg):

La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,1 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

- 50 Grupo de compuesto 1 MS (0,3 mg):

La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,3 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

55

TABLA 3

Solución a analizar	Razón de flujo sanguíneo de pata tratada/pata no tratada (%)
Polímero	57,3 ± 4,5
Compuesto 1 MS (0,03 mg)	65,1 ± 3,7*
Compuesto 1 MS (0,1 mg)	68,4 ± 3,2**
Compuesto 1 MS (0,3 mg)	72,7 ± 4,6**
*: p < 0,05 frente a polímero (prueba t de Student)	
**: p < 0,01 frente a polímero (prueba t de Student)	

Resultados:

- 5 En comparación con el grupo de polímero, se encontró un efecto de mejora del flujo sanguíneo correlativo con la dosis en la preparación de microesferas (MS) del compuesto 1, y se encontró una acción del efecto de mejora del flujo sanguíneo significativa en el compuesto 1 MS (0,03 mg). Esto, puesto que no se encontró acción de efecto de mejora del flujo sanguíneo significativa en el compuesto 1 MS (0,01 mg) en el ejemplo 4, se sugirió que la dosis eficaz mínima es de 0,03 mg.

10

Ejemplo 6

Ensayo de angiogénesis usando el modelo de isquemia de pata de rata (arteriosclerosis obliterante (ASO)); utilidad de la administración tópica (ensayo *in vivo*):

15

El modelo de isquemia de pata se preparó ligando la arteria femoral izquierda de rata. Se midió el flujo sanguíneo en las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments) 1 semana tras la preparación, y se dividieron los animales en 4 grupos (n = 5) de tal manera que el valor promedio del flujo sanguíneo se hizo casi uniforme.

20

Comenzando en el siguiente día del agrupamiento, se administró 0,1 ml/sitio, 2 sitios, del agente que va a someterse a prueba mediante inyección intramuscular en regiones isquémicas del aductor femoral izquierdo (grupo de polímero, grupo de compuesto 1, grupo de compuesto 1 MS) y región normal de la extremidad superior en el hombro derecho (grupo de compuesto 1 MS), una vez a la semana, 4 veces en total como solución que va a analizarse. Una semana después de la finalización de la administración final, se midieron los flujos sanguíneos de las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments), y se compararon y examinaron los flujos sanguíneos de la pata tratada (pata izquierda) y la pata no tratada (pata derecha). Resultados de pata tratada/pata no tratada (%) se muestran en la tabla 4.

25

- 30 En este sentido, la construcción de la solución que va a someterse a prueba es tal como sigue.

Grupo de polímero:

Se suspendió el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico usado en el ejemplo de preparación 2 en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml). En este sentido, la cantidad del copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico es idéntica a la cantidad contenida en el compuesto 1 MS (1 mg).

35

Grupo de compuesto 1 (0,1 mg):

Se suspendió el compuesto 1 (0,1 mg) en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

40

Grupo de compuesto 1 MS (0,1 mg):

La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,1 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

45

TABLA 4

Solución a analizar	Razón de flujo sanguíneo de pata tratada/pata no tratada (%)
Polímero ^{a)}	57,3 ± 4,5
Compuesto 1 (0,1 mg) ^{a)}	60,5 ± 3,1
Compuesto 1 MS (0,1 mg) ^{b)}	56,9 ± 5,6
Compuesto 1 MS (0,1 mg) ^{a)}	68,4 ± 3,2*
a): Administración intramuscular en la parte femoral izquierda isquémica	
b): Administración intramuscular en la extremidad superior normal derecha	
**: p < 0,01 frente a polímero (prueba t de Student)	

Resultados:

Aunque no se encontró un aumento significativo en el flujo sanguíneo mediante la administración intramuscular del compuesto 1 MS (0,1 mg) en la extremidad superior normal derecha, se encontró un aumento significativo en el flujo sanguíneo mediante la administración intramuscular de la misma dosis en la parte femoral izquierda isquémica. Basándose en esto, se sugirió que la eficacia del compuesto 1 no está mediada por flujo sanguíneo, pero su administración tópica en regiones isquémicas es importante. Además, puesto que no se observó acción de aumento del flujo sanguíneo significativa mediante la administración tópica del compuesto 1 en la región isquémica, se sugirió la eficacia de la preparación persistente (MS).

Ejemplo 7

Ensayo de angiogénesis usando el modelo de isquemia de pata de rata (arteriosclerosis obliterante (ASO)); acción de vasodilatación y acción de aceleración de la angiogénesis (ensayo *in vivo*):

El modelo de isquemia de pata se preparó ligando la arteria femoral izquierda de rata. Se midió el flujo sanguíneo en las patas traseras usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments) 1 semana tras la preparación, y se dividieron los animales en 2 grupos (n = 5) de tal manera que el valor promedio del flujo sanguíneo se hizo casi uniforme.

Comenzando el siguiente día del agrupamiento, la solución que se va a analizar se administró mediante inyección intramuscular en el aductor femoral izquierdo (grupo de polímero, grupo de compuesto 1 MS), una vez a la semana, 4 veces en total. Se midieron los flujos sanguíneos de las patas traseras 3 días tras la segunda administración (en el 10º día tras el agrupamiento) y tras 1 semana y 2 semanas de la finalización de la administración final, usando un aparato de obtención de imágenes láser Doppler (Moor Instruments), y se compararon y examinaron los flujos sanguíneos de la pata tratada (pata izquierda) y la pata no tratada (pata derecha). Los resultados de pata tratada/pata no tratada (%) se muestran en la tabla 5.

En este sentido, la construcción de la solución que va a someterse a prueba es tal como sigue.

Grupo de polímero:

Se suspendió el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico usado en el ejemplo de preparación 2 en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml). En este sentido, la cantidad del copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico es idéntica a la cantidad contenida en el compuesto 1 MS (0,3 mg).

Grupo de compuesto 1 MS (0,3 mg):

La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 0,3 mg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,2 ml).

TABLA 5

Solución a analizar	Razón de flujo sanguíneo de pata tratada/pata no tratada (%)			
	Antes de la 1ª administración	Tras 3 días de la 2ª administración	Tras una semana de la 4ª administración	Tras dos semanas de la 4ª administración
Polímero	36,7 ± 4,2	49,8 ± 5,8	57,3 ± 4,5	61,3 ± 2,5
Compuesto 1 MS (0,3 mg)	36,6 ± 4,3	59,9 ± 3,7*	72,7 ± 4,6*	72,4 ± 5,7**
*: p < 0,05 frente a polímero (prueba t de Student)				
**: p < 0,01 frente a polímero (prueba t de Student)				

Resultados:

En comparación con el grupo al que se le administró polímero, se observó un aumento del flujo sanguíneo significativo de aproximadamente el 10 % en la región isquémica por el compuesto 1 MS (0,3 mg) incluso en el 10º día tras la primera administración (3 días tras la 2ª administración). Puesto que es necesario un periodo de aproximadamente 4 semanas para la angiogénesis y el compuesto 1 está bajo liberación en la región tónica 10 isquémica 3 días tras la 2ª administración, se sugirió que este efecto de mejora es un efecto de aumento del flujo sanguíneo mediante acciones directas tales como acción de vasodilatación y acción inhibitoria de la aglutinación plaquetaria del compuesto 1 de liberación lenta. Además, también se observó una acción de aumento del flujo sanguíneo significativa de aproximadamente el 11 % tras 1 semana y 2 semanas de la administración final. Se consideró basándose en esto que la liberación del compuesto 1 a partir de la preparación de microesferas desaparecía completamente tras una semana de la administración final, y se sugirió que este efecto no son las acciones directas del compuesto 1 (acción de vasodilatación, acción inhibitoria de la aglutinación plaquetaria, etc.),

sino un efecto mediante la acción de angiogénesis.

Ejemplo 8

5 Ensayo de angiogénesis (ensayo *in vivo*) usando un modelo de trasplante de esponja en ratón:

10 Con anestesia, se realizó una incisión de una parte dorsal de un ratón y se incrustó en la misma una esponja de uretano en forma de disco (aproximadamente de 5 mm de espesor y 13 mm de diámetro). Se llevó a cabo la administración del agente por vía tópica administrándolo directamente en la esponja una vez al día durante un total de 14 veces comenzando en el día de la preparación del modelo de trasplante de esponja, o en el día que se termina la operación y al 7º día. A 15º día del trasplante de la esponja, se extrajo la esponja que contiene tejido de granulación y se observó a simple vista, y luego se midió su masa húmeda. Además, se mezcló esto con agua destilada en una cantidad 4 veces más grande que la masa húmeda, se homogeneizó y se centrifugó, y luego se sometió el sobrenadante a la medición del contenido de hemoglobina usando la prueba de hemoglobina β de Wako (fabricada por Wako Pure Chemical Industries). Los resultados de medición del contenido de hemoglobina total en las esponjas extraídas se muestran en la tabla 6.

En este sentido, la construcción de la solución que va a someterse a prueba es tal como sigue.

20 Grupo de polímero:

Se suspendió el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico usado en el ejemplo de preparación 2 en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml). En este sentido, la cantidad del copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico es idéntica a la cantidad contenida en el compuesto 1 MS (200 µg).

25

Grupo de compuesto 1 (20 µg):

Se suspendió el compuesto 1 (20 µg) en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

30 Grupo de compuesto 1 (40 µg):

Se suspendió el compuesto 1 (40 µg) en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

35 Grupo de compuesto 1 (200 µg):

Se suspendió el compuesto 1 (200 µg) en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

Grupo de compuesto 1 MS (200 µg):

40 La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 200 µg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

Grupo de compuesto 1 MS (400 µg):

45 La preparación de microesferas producida en el ejemplo de preparación 2 que contenía 400 µg de compuesto 1 se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

Grupo de compuesto de referencia 3 (20 µg):

50 El compuesto de referencia 3 (20 µg) se suspendió en solución de Tween 80 al 0,2 % p/v (0,05 ml).

TABLA 6

Solución a analizar	Peso húmedo de la esponja (g)	Contenido de hemoglobina (mg/g de tejido húmedo)
Polímero ^{b)}	0,4542 ± 0,0303	1,973 ± 0,564
Compuesto 1 (20 µg) ^{a)}	0,3843 ± 0,0681	2,403 ± 0,533
Compuesto 1 (40 µg) ^{a)}	0,5136 ± 0,0938	3,010 ± 0,808
Compuesto 1 (200 µg) ^{b)}	0,4123 ± 0,0320	1,964 ± 0,289
Compuesto 1 MS (200 µg) ^{b)}	0,5317 ± 0,1413	3,523 ± 0,482**
Compuesto 1 MS (400 µg) ^{b)}	0,5655 ± 0,1130	4,822 ± 1,218**
Compuesto de referencia 3 (20 µg) ^{a)}	0,5193 ± 0,0792	4,588 ± 0,488**

a): una vez al día, 14 días de administración repetida

b): dos administraciones en intervalos de 7 días

** : p < 0,01 frente a polímero (prueba de Dunnett)

Resultados:

Se encontró formación de granulación en las esponjas a las que se les administró el compuesto 1 MS (200 µg) (dos administraciones a intervalos de 7 días) y el compuesto 1 MS (400 µg) (dos administraciones a intervalos de 7 días), y se volvieron de color rojo pálido, rojo o marrón oscuro. Además, cuando se midió la concentración de hemoglobina en el tejido de granulación formado en cada esponja, se observó un aumento significativo en la concentración de hemoglobina en comparación con el grupo de polímero de manera que se confirmó el efecto de angiogénesis. Por otro lado, en el caso del compuesto 1 (20 µg) (14 días de administración repetida) y el compuesto 1 (40 µg) (14 días de administración repetida), la concentración de hemoglobina en el tejido de granulación formado en cada esponja mostró una tendencia de aumento, pero no es un aumento significativo. Además, la concentración de hemoglobina en el tejido de granulación formado en la esponja no aumentó en el caso del compuesto 1 (200 µg) (dos administraciones en intervalos de 7 días). Basándose en esto, se encontró que la preparación de liberación lenta del compuesto 1 (compuesto 1 MS) es particularmente útil en la inducción de la angiogénesis. Además, se encontró formación de granulación en la esponja a la que se le administró el compuesto de referencia 3 (20 µg) (14 días de administración repetida), y se volvieron de color rojo pálido, rojo o marrón oscuro. Además, cuando se midió la concentración de hemoglobina en el tejido de granulación formado en la esponja, se observó un aumento significativo en la concentración de hemoglobina en comparación con el grupo de polímero de manera que se confirmó el efecto de angiogénesis.

20 **Ejemplo 9 (Referencia)**

Medición de la acción de aceleración de la angiogénesis (*in vitro*):

Método de ensayo:

Se cultivó un kit de angiogénesis (fabricado por Kurabo; constituido por células endoteliales vasculares de vena de cordón umbilical humano y fibroblastos de piel humana normales) durante 3 horas, y luego se cambió el medio de cultivo (el medio para uso de angiogénesis unido al kit de angiogénesis se usó como medio de cultivo y se cultivó a 37 °C en un entorno húmedo de 5 % de dióxido de carbono-95 % de aire, y se usó un incubador de dióxido de carbono BNA-121D como incubador) y se añadió un agente que va a someterse a prueba a cada pocillo (0,5 ml/pocillo). Se llevó a cabo el intercambio de medio también en el 3º, 6º y 8º día tras el comienzo del cultivo y se añadió el agente nuevo que va a someterse a prueba. La clase y concentración del agente que va a someterse a 40 pruebas fueron sin tratar; DMSO: 0,1 %; α-CD: 0,0118, 0,118 y 1,18 mg/ml; PGE2-αCD: 1, 10 y 100 nmol/l; compuesto de referencia 3 (agonista de EP2), compuesto de referencia 4 (agonista de EP4), agonista de EP1 y agonista de EP3: 1, 10 y 100 nmol/l, VEGF: 0,1, 1 y 10 ng/ml; y HGF: 0,1, 1 y 10 ng/ml, y se llevó a cabo el cultivo usando 3 pocillos para cada concentración. Se llevó a cabo la fijación 10 días tras el comienzo del cultivo, y se llevó a cabo la tinción de órganos huecos con anticuerpo anti-CD31 usando un kit de tinción de órganos huecos (fabricado por Kurabo). Como evaluación, se montó Chalkley Grid (una lente de rejilla, Kurabo) sobre el ocular de un microscopio, y se evaluó la formación de órganos huecos contando las intersecciones de los puntos de disposición al azar de Chalkley Grid con el órgano hueco formado (haciendo referencia al método de evaluación de J. Pathol., 177, 275-283 (1995)). Se llevó a cabo el recuento en 12 posiciones por pocillo, y se calculó el total.

En este sentido, se disolvió el compuesto de referencia 3 como agonista de EP2 (ácido (5Z,9β,11α,13E)-17,17-propano-11,16-dihidroxi-9-cloro-20-norprost-5,13-dienoico) en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mol/l que luego se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

El compuesto de referencia 4 como agonista de EP4 (ácido (11α,13E,15α)-9-oxo-11,15-dihidroxi-16-(3metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} que después se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

El agonista de EP1 (ácido (13E)-(11α,15S,17S)-2,5-etano-6,9-dioxo-11,15-dihidroxi-17,20-dimetilprost13-enoico; el compuesto descrito en el ejemplo 1 en la memoria descriptiva del documento JP-A-11-322709) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mol/l que después se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

El agonista de EP3 (ácido 11α, 15α-dimetoxi-9-oxoprost-5Z, 13E-dienoico; el compuesto descrito en el ejemplo 1 en la memoria descriptiva del documento WO98/34916) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mol/l que luego se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

PGE2-αCD se disolvió en agua destilada para inyección para preparar soluciones de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} mol/l que luego se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

Como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), se diluyó la solución de 2 µg/ml de VEGF contenida en el kit de reactivo control de angiogénesis de Kurabo con el medio de cultivo y se usó.

Como HGF (factor de crecimiento de hepatocitos humanos), se diluyó la solución de 5 µg/ml de HGF adquirida de R & D System-Funakoshi con el medio de cultivo y se usó.

Método de análisis estadístico:

5 Se compararon los recuentos de formación de órganos huecos en los pocillos sin tratar con los de los pocillos tratados con concentraciones respectivas de muestras de prueba mediante la prueba de Dunnett (prueba bilateral). El nivel de significación se fijó en el 5 %.

10 En este sentido, se mostraron los datos mediante el valor promedio de 3 pocillos y la desviación estándar.

Los resultados de la prueba se muestran en la figura 5.

Resultados:

15 El PGE2-αCD, el compuesto de referencia 3 (agonista de EP2) y el compuesto de referencia 4 (agonista de EP4) aceleraron significativamente la formación de órganos huecos a concentraciones de 10 nmol/l y 100 nmol/l. Además, el VEGF y el HGF aceleraron la formación de órganos huecos a una concentración de 10 ng/ml. Sin embargo, el agonista de EP1, agonista de EP3 y α-CD no ejercieron influencia sobre la formación de órganos huecos.

20 **Ejemplo 10 (Referencia)**

Medición de la acción de liberación de factores de reparación endógenos (*in vitro*):

25 Método de ensayo:

Se cultivó un kit de angiogénesis (fabricado por Kurabo; constituido por células endoteliales vasculares de vena de cordón umbilical humano y fibroblastos de piel humana normales) durante 3 horas, y luego se cambió el medio de cultivo (el medio para uso de angiogénesis unido al kit de angiogénesis se usó como medio de cultivo y se cultivó a 30 37 °C en un entorno húmedo de 5 % de dióxido de carbono-95 % de aire, y se usó un incubador de dióxido de carbono BNA-121D como incubador) y se añadió un agente que va a someterse a prueba a cada pocillo (0,5 ml/pocillo). Se midieron las concentraciones de HGF y VEGF en los sobrenadantes de cultivo 3 días tras el comienzo del cultivo. Las clases y concentraciones del agente que va a someterse a prueba fueron sin tratar; DMSO: 0,1 %; PGE1-αCD: 100 nmol/l; PGE2-αCD: 100 nmol/l; y compuesto de referencia 3 (agonista de EP2) y 35 compuesto de referencia 4 (agonista de EP4): 100 nmol/l, y el cultivo se llevó a cabo usando 3 pocillos para cada concentración. Se midieron las concentraciones de HGF y VEGF usando un kit de ELISA (R % D system-Funakoshi).

En este sentido, se disolvió el compuesto de referencia 3 como agonista de EP2 (ácido (5Z,9β,11α,13E) -17, 17propano-11,16-dihidroxi-9-cloro-20-norprost-5,13-dienoico) en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución de 10⁻⁴ mol/l que luego se usó diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

45 El compuesto de referencia 4 como agonista de EP4 (ácido (11α, 3E,15α)-9-oxo-11, 15-dihidroxi-16-(3metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico) se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución de 10⁻⁴ mol/l que después se usó diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

PGE1-αCD y PGE2-αCD se disolvieron en agua destilada para inyección para preparar soluciones de 10⁻⁴ mol/l que luego se usaron diluyendo 1/1000 veces con el medio de cultivo.

50 Método de análisis estadístico:

Se compararon las concentraciones de HGF y VEGF en los sobrenadantes del grupo control de disolvente con los de 10 los grupos tratados con agente mediante la prueba de Dunnett (prueba bilateral). El nivel de significación se fijó en el 5 %.

55 En este sentido, se mostraron los datos mediante el valor promedio de 3 pocillos y la desviación estándar.

Los resultados de la prueba tras 72 horas del cultivo se muestran en la tabla 7.

60

TABLA 7

Agente analizado	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
Sin tratar	110 ± 16	2004 ± 76
PGE1- α CD	2043 ± 77***	2710 ± 50***
PGE2- α CD	1735 ± 95***	3032 ± 165****
Agonista de EP2 (Compuesto de referencia 3)	1865 ± 48***	2762 ± 51***
Agonista de EP4 (Compuesto de referencia 4)	379 ± 12***	2936 ± 69***
*** p < 0,001 frente a sin tratar (prueba de Dunnett)		

Resultados:

- 5 PGE1- α CD, PGE2- α CD, el compuesto de referencia 3 (agonista de EP2) y el compuesto de referencia 4 (agonista de EP4) aumentaron significativamente las concentraciones de HGF y VEGF en sobrenadantes a una concentración de 100 nmol/l.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación de microesferas persistentes que comprende un polímero biodegradable y ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenaminoxijetil]-7,8-dihidronaftalen-1-iloxi]-acético o sales del mismo.
2. La preparación de microesferas persistentes de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polímero biodegradable es un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico.
- 10 3. La preparación de microesferas persistentes de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 para su uso como acelerador de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva y arteriopatía coronaria.
- 15 4. La preparación de microesferas persistentes para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la enfermedad es infarto de miocardio.
5. La preparación de microesferas persistentes para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la enfermedad es insuficiencia cardíaca congestiva.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende la preparación de microesferas persistentes de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva y arteriopatía coronaria.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad es infarto de miocardio.
- 30 9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad es insuficiencia cardíaca congestiva.
10. Un agente que comprende la preparación de microesferas persistentes de las reivindicaciones 1 o 2.
- 35 11. El agente de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva y arteriopatía coronaria.
12. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad es infarto de miocardio.
- 40 13. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad es insuficiencia cardíaca congestiva.

FIG. 1

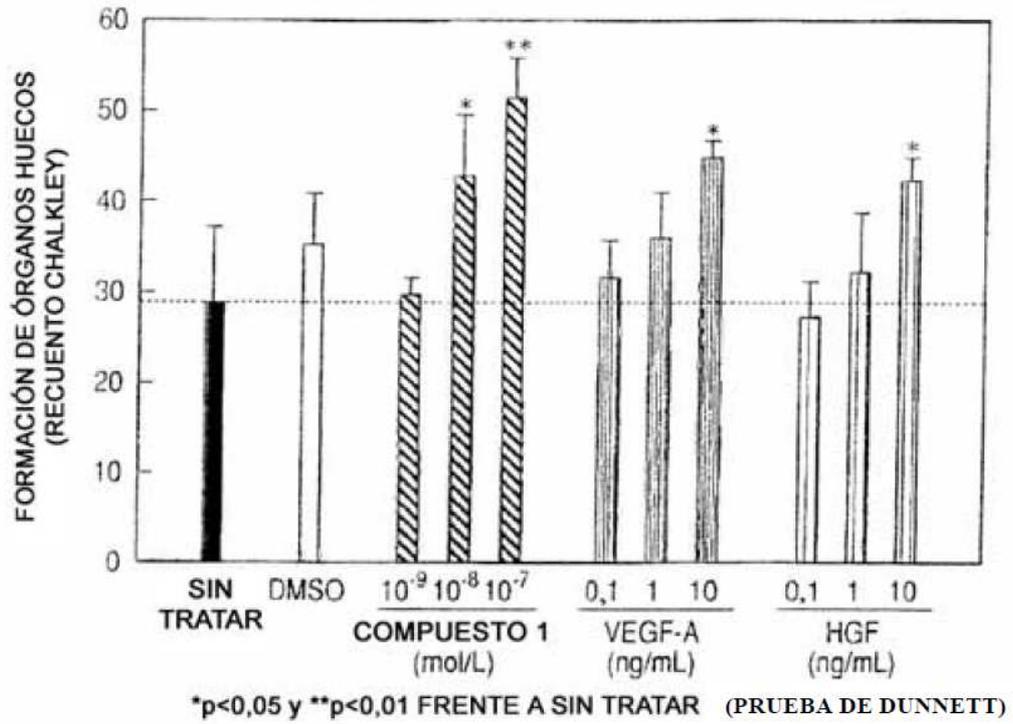


FIG. 2

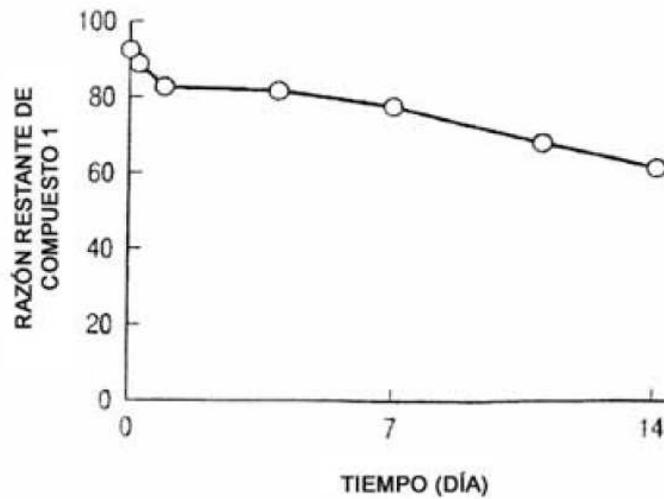


FIG. 3

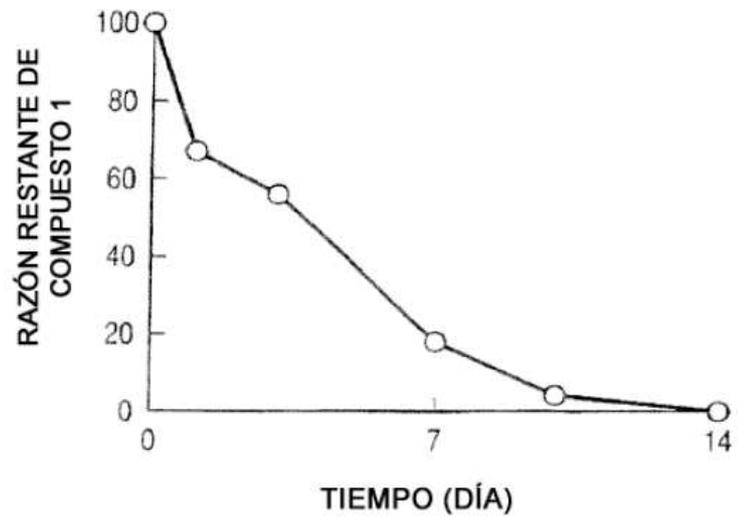


FIG. 4

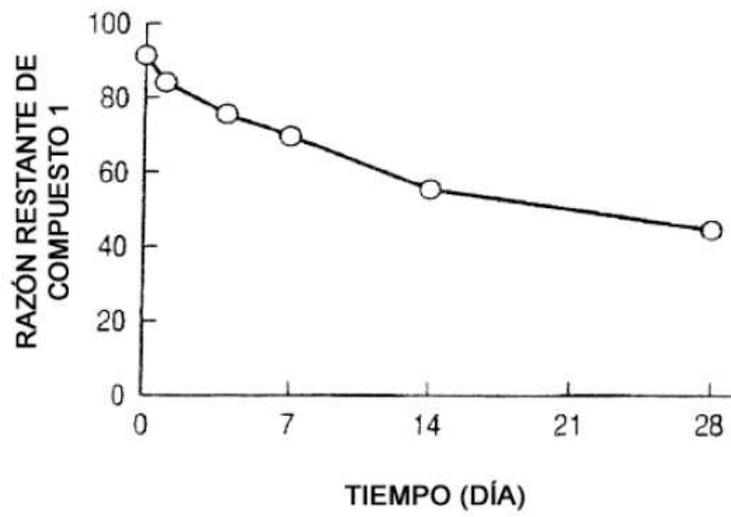
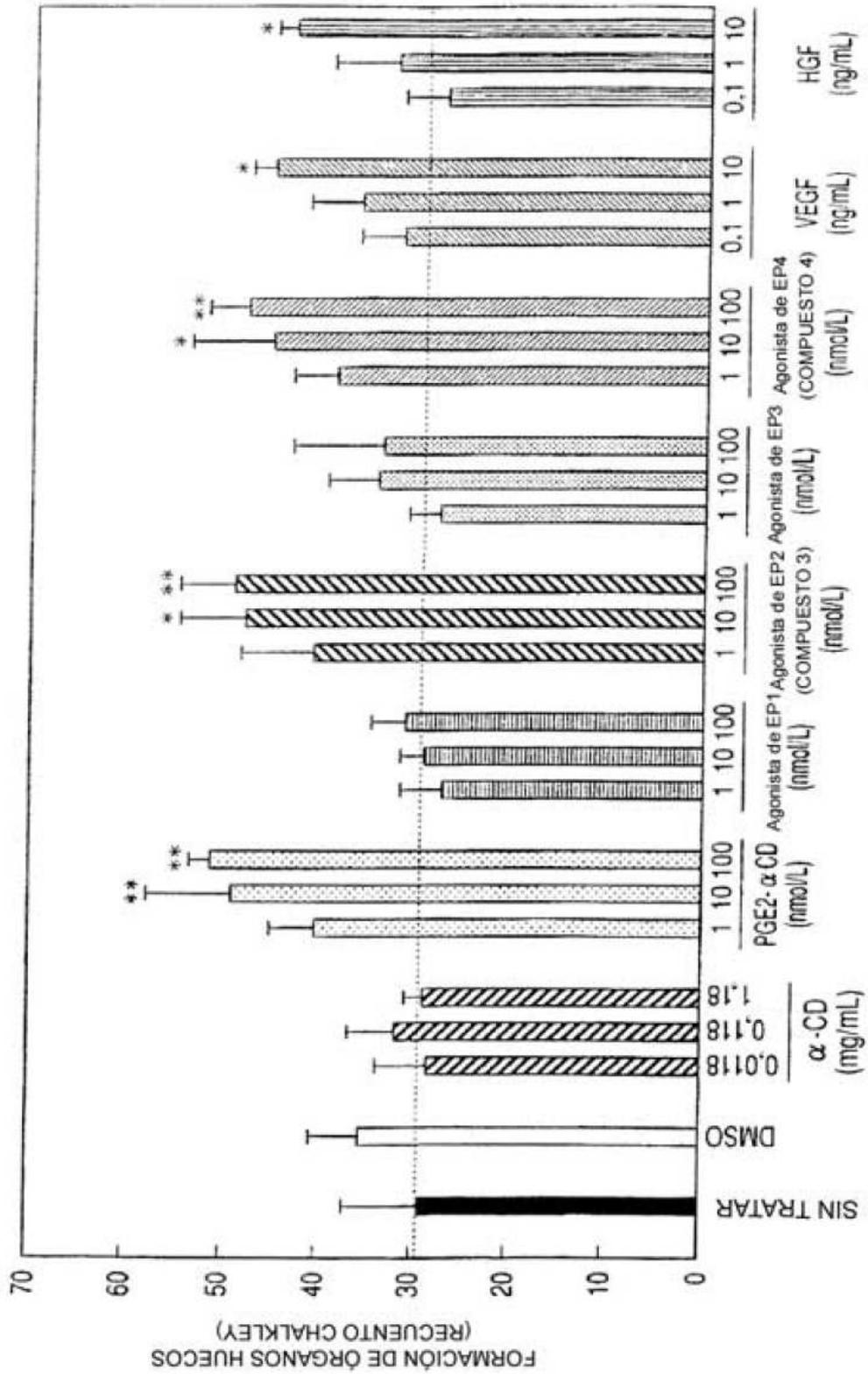


FIG. 5



*p<0,05 y **p<0,01 FRENTE A SIN TRATAR (PRUEBA DE DUNNETT)