

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 872**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/557** (2006.01)

**C07C 259/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2004 E 14162471 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2792353**

54 Título: **Polimorfo de una sal de dietanolamina de treprostinil**

30 Prioridad:

**22.05.2003 US 472407 P**

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

**01.06.2018**

73 Titular/es:

**UNITED THERAPEUTICS CORPORATION  
(100.0%)  
1735 Connecticut Avenue, N.W. Third Floor  
Washington, DC 20009, US**

72 Inventor/es:

**PHARES, KEN y  
MOTTOLA, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 670 872 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**

Polimorfo de una sal de dietanolamina de treprostínil.

**5 Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas**

La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional de patente US nº de serie 60/472.407, presentada el 22 de mayo de 2003.

**10 Campo de la invención**

Los análogos de prostaciclina encuentran utilización en el fomento de la vasodilatación, la inhibición de la agregación plaquetaria y la formación de trombos, la estimulación de la trombolisis, la inhibición de la proliferación celular (incluyendo el remodelado vascular), la provisión de citoprotección, la prevención de la aterogénesis y la inducción de angiogénesis. Mediante dichos mecanismos miméticos de las prostaciclinas, el compuesto de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de/para: la hipertensión pulmonar, las enfermedades isquémicas (por ejemplo la enfermedad vascular periférica, el fenómeno de Raynaud, la esclerodermia, la isquemia miocárdica, el ictus isquémico y la insuficiencia renal), la insuficiencia cardiaca (incluyendo la insuficiencia cardiaca congestiva), condiciones que requieren anticoagulación (por ejemplo post-IM y la cirugía poscardiaca), la microangiopatía trombótica, la circulación extracorpórea, la oclusión de la vena retiniana central, la aterosclerosis, las enfermedades inflamatorias (por ejemplo la EPOC y la soriasis), la hipertensión (por ejemplo la preeclampsia), la reproducción y el parto, el cáncer u otras condiciones del crecimiento celular no regulado, la conservación de células/tejidos y otras áreas terapéuticas emergentes en las que el tratamiento con prostaciclina aparentemente presenta un papel beneficioso. Estos compuestos también han demostrado un beneficio aditivo o sinérgico en combinación con otros agentes cardiovasculares (por ejemplo bloqueantes del canal del calcio, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas endoteliales y agentes antiplaquetarios).

**Antecedentes de la invención**

La publicación N. Galie et al., "the new clinical trials on pharmacological treatment in pulmonary arterial hypertension", EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, vol. 20, nº 4, 1 de octubre de 2002, páginas 1037-1049, divulga el treprostínil para su utilización en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

El documento GB2070596 divulga el treprostínil como ácido libre y metil éster de treprostínil.

Muchos valiosos compuestos farmacológicamente activos no pueden administrarse eficazmente por vía oral debido a muchos motivos y generalmente se administran por las vías intravenosa o intramuscular. Estas vías de administración generalmente requieren la intervención de un médico u otro profesional del cuidado sanitario y pueden conllevar molestias considerables, así como potencialmente un traumatismo local en el paciente.

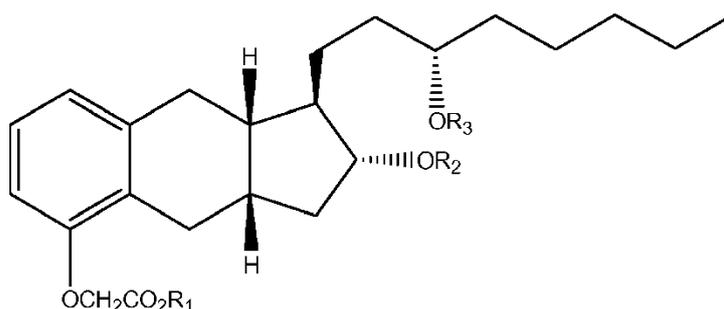
Un ejemplo de dicho compuesto es el treprostínil, un análogo químicamente estable de la prostaciclina. Aunque el treprostínil sodio (Remodulin®) ha sido autorizado por la Food and Drug Administration (FDA) para la administración subcutánea, el treprostínil como ácido libre presenta una biodisponibilidad oral absoluta inferior a 10%. De acuerdo con lo anterior, existe un interés clínico en la provisión de treprostínil por vía oral.

De esta manera, existe un procedimiento seguro y eficaz para incrementar la disponibilidad sistémica del treprostínil mediante la administración de treprostínil o análogos del treprostínil.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un polimorfo de una sal de dietanolamina de treprostínil que funde a 103°C.

La presente descripción se refiere a un compuesto que presenta la estructura I:



55

en el que,

$R^1$  es seleccionado independientemente de entre el grupo que consiste en H, grupos bencilo sustituidos y no sustituidos, y grupos en los que  $OR^1$  son ésteres de glicolamida sustituidos o no sustituidos;

$R^2$  y  $R^3$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  forman ésteres de aminoácidos o proteínas, con la condición de que la totalidad de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  no son H;

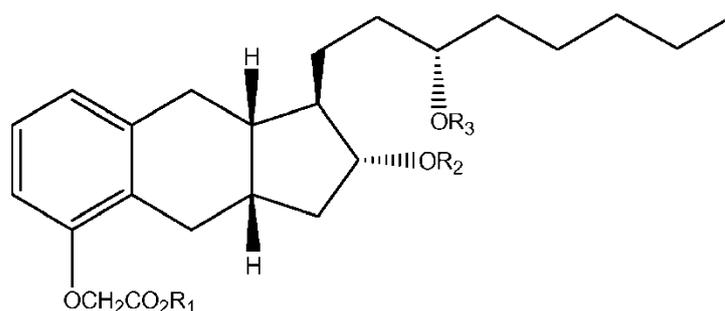
un enantiómero del compuesto;

y sales farmacéuticamente aceptables del compuesto y los polimorfos.

Preferentemente,  $R^1$  es un grupo bencilo sustituido o no sustituido, tal como  $CH_2C_6H_5$ . O preferentemente,  $OR^1$  es un éster de glicolamida sustituido o no sustituido,  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$ ,  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos,  $-(CH_2)_mCH_3$ ,  $-CH_2OH$ , y  $-CH_2(CH_2)_nOH$ , con la condición de que m sea 0, 1, 2, 3 o 4, y n sea 0, 1, 2, 3 o 4. Ventajosamente, uno de entre o ambos  $R^4$  y  $R^5$  son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H,  $-OH$ ,  $-CH_3$ , o  $-CH_2CH_2OH$ . Ventajosamente, uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser H. En algunos enantiómeros del compuesto  $R^1=R^2=R^3=H$ , o  $R^2=R^3=H$  y  $R^1=$ valinil amida.

La descripción se refiere asimismo a los compuestos en los que  $R^2$  y  $R^3$  son seleccionados independientemente de entre fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, dipéptidos, ésteres de tripéptidos y ésteres de tetrapéptidos. En algunos compuestos únicamente uno de entre  $R^2$  o  $R^3$  es un grupo fosfato. En otros compuestos  $R^2$  y  $R^3$  son seleccionados independientemente de entre grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, tales como ésteres de glicina o alanina. En la descripción, uno de entre  $R^2$  y  $R^3$  son H. En determinados de los presentes compuestos, la biodisponibilidad oral del compuesto es superior a la biodisponibilidad oral del treprostínil, tal como por lo menos 50% o 100% superior a la biodisponibilidad oral del treprostínil. Los compuestos anteriores pueden comprender además un inhibidor del transporte de p-gluco proteína. Cualquiera de estos compuestos puede asimismo comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción se refiere asimismo a un procedimiento de utilización de los compuestos anteriores terapéuticamente de/para: la hipertensión pulmonar, las enfermedades isquémicas, la insuficiencia cardiaca, las condiciones que requieren anticoagulación, la microangiopatía trombótica, la circulación extracorpórea, la oclusión de la vena retiniana central, la aterosclerosis, las enfermedades inflamatorias, la hipertensión, la reproducción y el parto, el cáncer u otras condiciones de crecimiento celular no regulado, conservación de las células/tejidos y otras áreas terapéuticas emergentes en las que el tratamiento con prostaciclina aparentemente presenta un papel beneficioso. Preferentemente, el procedimiento es un procedimiento de tratamiento de la hipertensión pulmonar y/o una vasculopatía periférica en un sujeto que comprende administrar oralmente una cantidad eficaz farmacéuticamente de un compuesto de la estructura II:



en el que,

$R^1$  es seleccionado independientemente de entre el grupo que consiste en H, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos arilalquilo y grupos en los que  $OR^1$  forman un éster de glicolamida sustituido o no sustituido;

$R^2$  y  $R^3$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  forman ésteres de aminoácidos o proteínas, con la condición de que la totalidad de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  no sean H;

un enantiómero del compuesto; y

una sal farmacéuticamente aceptable o polimorfo del compuesto.

En algunos de estos procedimientos, cuando  $OR^1$  forma un éster de glicolamida sustituido o no sustituido,  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$ , en el que  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH, grupos alquilo sustituidos y no sustituidos,  $-(CH_2)_mCH_3$ ,  $-CH_2OH$ , y  $-CH_2(CH_2)_nOH$ , con la condición de que m sea 0, 1, 2, 3 o 4, y n sea 0, 1, 2, 3 o 4. En otros procedimientos  $R^1$  es grupo alquilo  $C_1$ - $C_4$ , tal como metilo, etilo, propilo o butilo. En los procedimientos divulgados,  $R^1$  puede ser asimismo un grupo bencilo sustituido o no sustituido. En otros procedimientos,  $R^1$  puede ser  $-CH_3$  o  $-CH_2C_6H_5$ . Todavía en otros procedimientos, uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H. Alternativamente, uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  no son H y  $R^2$  y  $R^3$  son seleccionados independientemente de entre fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, dipéptidos, ésteres o tripéptidos y ésteres de tetrapéptidos. En algunos procedimientos, únicamente uno de  $R^2$  o  $R^3$  es un grupo fosfato. En unos procedimientos adicionales,  $R^2$  y  $R^3$  son seleccionados independientemente de entre grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, tales como ésteres de glicina o alanina. En otros procedimientos uno de entre  $R^1$  y  $R^2$  es H. En algunos procedimientos, se utilizan los enantiómeros del compuesto en los que  $R^1=R^2=R^3=H$ , o  $R^2=R^3=H$  y  $R^1=$ valinil amida.

En varios procedimientos la biodisponibilidad oral del compuesto es superior a la biodisponibilidad oral del treprostinil, tal como por lo menos 50% o 100% superior a la biodisponibilidad oral del treprostinil. Los presentes procedimientos pueden comprender además la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de glucoproteína P, simultáneamente, secuencialmente o antes de la administración del compuesto de estructura II. Preferentemente, el inhibidor de glucoproteína P se administra por vía oral o intravenosa. Los procedimientos dados a conocer pueden utilizarse para tratar la hipertensión pulmonar.

La presente descripción se refiere además a un procedimiento para incrementar la biodisponibilidad oral del treprostinil o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de glucoproteína P y administrar por vía oral una cantidad farmacéuticamente eficaz de treprostinil en un sujeto. Preferentemente, el inhibidor de glucoproteína P se administra antes o simultáneamente al treprostinil. La vía de administración del inhibidor de glucoproteína P puede variar, tal como la vía oral o la vía intravenosa. La presente descripción se refiere además a una composición que comprende treprostinil o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de glucoproteína P.

El presente compuesto puede administrarse además por vía tópica o transdérmica.

Se describen unas formulaciones farmacéuticas según la presente descripción que incluyen cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos mencionados anteriormente también pueden utilizarse para tratar el cáncer.

Resultarán evidentes objetos, características y ventajas adicionales de la invención a partir de la descripción detallada, a continuación.

#### 40 Breve descripción de los dibujos

las figuras 1A y 1B muestran las curvas de concentración plasmática frente al tiempo para la administración intravenosa e intraportal, respectivamente, de sal de dietanolamina de treprostinil en ratas, tal como se indica en el ejemplo 1.

las figuras 2A, 2B y 2C muestran las curvas de concentración plasmática frente al tiempo para la administración intraduodenal, intracolónica y oral, respectivamente, de sal de dietanolamina de treprostinil en ratas tal como se indica en el ejemplo 1.

la figura 3 muestra en una escala logarítmica las curvas de concentración plasmática promedio frente al tiempo para las vías de administración indicadas en el ejemplo 1.

la figura 4 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para el treprostinil en ratas tras la administración oral en ratas de metil-éster de treprostinil tal como se indica en el ejemplo 2.

la figura 5 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para el treprostinil en ratas tras la administración oral en ratas de bencil-éster de treprostinil tal como se indica en el ejemplo 2.

la figura 6 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para el treprostinil en ratas tras la administración oral en ratas de treprostinil diglicina tal como se indica en el ejemplo 2.

la figura 7 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo en ratas tras la administración oral en ratas de bencil-éster de treprostinil (0,5 mg/kg) y treprostinil diglicina (0,5 mg/kg) tal como se indica en el ejemplo 2 en comparación con treprostinil (1 mg/por cada kg).

la figura 8 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para treprostiniil en ratas tras la administración intraduodenal de monofosfato de treprostiniil (anillo) tal como se indica en el ejemplo 3.

5 la figura 9 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para treprostiniil en ratas tras la administración intraduodenal de treprostiniil monoalvalina (anillo) tal como se indica en el ejemplo 3.

10 la figura 10 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para treprostiniil en ratas tras la administración intraduodenal de treprostiniil monoalanina (anillo) tal como se indica en el ejemplo 3.

15 la figura 11 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para treprostiniil en ratas tras la administración intraduodenal de treprostiniil monoalanina (cadena) tal como se indica en el ejemplo 3, y

20 la figura 12 es una representación gráfica de la curva de concentración plasmática frente al tiempo para cada profármaco en comparación con treprostiniil solo del ejemplo 1, tal como se indica en el ejemplo 3. Se administró treprostiniil a una dosis de 1 mg/kg, mientras que los profármacos se administraron a una dosis de 0,5 mg/kg.

las figuras 13A-13D muestran las dosis, administradas cada dos horas en cuatro dosis, para 0,05 mg por dosis (total=0,2 mg), 0,125 mg por dosis (total=0,5 mg), 0,25 mg por dosis (total=1,0 mg) o 0,5 mg por dosis (total=2,0 mg), respectivamente.

25 la figura 14 muestra los perfiles farmacocinéticos de los comprimidos de liberación sostenida UT-15C y de las cápsulas de liberación sostenida, en estado de ayuno y en el estado alimentado.

la figura 15 muestra un espectro de difracción de rayos X de los polvos del polimorfomo Forma A.

30 la figura 16 muestra un espectro de IR del polimorfo Forma A.

la figura 17 muestra un espectro de Raman del polimorfo Forma A.

35 la figura 18 muestra los datos térmicos del polimorfo Forma A.

la figura 19 muestra los datos de sorción de humedad del polimorfo Forma A.

la figura 20 muestra el espectro de difracción de rayos X de los polvos del polimorfo Forma B.

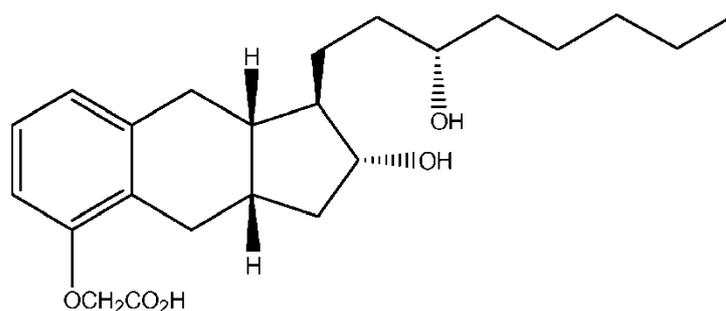
40 la figura 21 muestra los datos térmicos del polimorfo Forma B.

la figura 22 muestra los datos de sorción de humedad del polimorfo Forma B.

#### Descripción detallada de la invención

45 A menos que se indique lo contrario, "un" o "una se refiere a "uno o más". La presente descripción se refiere a compuestos y procedimientos para inducir efectos de tipo prostaciclina en un sujeto o paciente. Los compuestos pueden formularse en formulaciones farmacéuticas y medicamentos que resultan útiles en los procedimientos de la descripción. La descripción se refiere además a la utilización de los compuestos en la preparación de medicamentos y formulaciones farmacéuticas y para la utilización de los compuestos en el tratamiento de condiciones biológicas relacionadas con una actividad insuficiente de las prostaciclina tal como se describe de manera general en la sección de campo de la invención. La presente descripción se refiere asimismo a compuestos y procedimientos para el tratamiento del cáncer y trastornos relacionados con el cáncer.

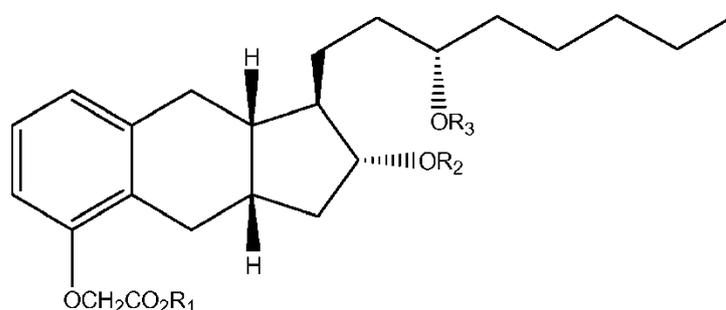
55 Preferentemente, los presentes compuestos son derivados químicos del (+)-treprostiniil, que presenta la estructura siguiente:



El treprostinil es un análogo químicamente estable de prostaciclina y, como tal, es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. La sal sódica del treprostinil, sal monosódica del ácido (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-hexahidro-2-hidroxi-1-[(3S)-3-hidroxiocetil]-1H-benz[f]indén-5-il]oxi]acético, se comercializa en forma de una solución para inyección con la denominación Remodulin®, que ha sido autorizada por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Preferentemente, los presentes compuestos son derivados del (-)-treprostinil, el enantiómero del (+)-treprostinil, ventajosamente, la sal de dietanolamina de treprostinil. La presente invención incluye además polimorfos de los compuestos anteriormente indicados, describiéndose dos formas, A y B, en los ejemplos, a continuación. De las dos formas, B resulta preferida. Una forma de realización particularmente preferida de la presente invención es la forma B de treprostinil dietanolamina.

Preferentemente, los presentes compuestos son clasificados generalmente como profármacos del treprostinil que convierten en treprostinil tras la administración a un paciente, tal como a través de la ingestión. Preferentemente, los profármacos presentan una pequeña o ninguna actividad por sí mismos y únicamente presentan actividad tras ser convertidos en treprostinil. Preferentemente, los presentes compuestos son producidos derivando químicamente el treprostinil para preparar ésteres estables, y en algunos casos, los compuestos son derivados a partir de los grupos hidroxilo. Los compuestos pueden ser proporcionados asimismo modificando los compuestos proporcionados en las patentes US nº 4.306.075 y nº 5.153.222 de la misma manera.

Preferentemente, la presente descripción se refiere a compuestos de la estructura I:



en los que,

R<sup>1</sup> es seleccionado independientemente de entre el grupo que consiste en H, grupos bencilo sustituidos o no sustituidos y grupos en los que OR<sup>1</sup> son ésteres de glicolamida sustituidos o no sustituidos;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, fosfato y grupos en los que OR<sup>2</sup> y OR<sup>3</sup> forman ésteres de aminoácidos o proteínas, con la condición de que la totalidad de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> no sean H;

enantiómeros del compuesto; y

sales farmacéuticamente aceptables del compuesto.

Preferentemente, cuando OR<sup>1</sup> son ésteres de glicolamida sustituidos o no sustituidos, R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>CONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> y R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH, grupos alquilo sustituidos y no sustituidos, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, y -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, con la condición de que m sea 0, 1, 2, 3 o 4, y n sea 0, 1, 2, 3 o 4.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que cuando los miembros son agrupados conjuntamente de una manera común, tal como en un grupo Markush o los grupos descritos en R de las estructuras I y II anteriormente y a continuación, la presente descripción comprende no únicamente el grupo completo presentado como un todo, sino que cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal. Por lo tanto, para

5 todos los objetivos, la presente descripción comprende no únicamente el grupo principal, sino asimismo el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. La presente descripción concibe asimismo la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la presente descripción. Por ejemplo,  $R^1$  puede excluir específicamente H, grupos bencilo sustituidos o no sustituidos, o grupos en los que  $OR^1$  son ésteres de glicolamida sustituidos o no sustituidos.

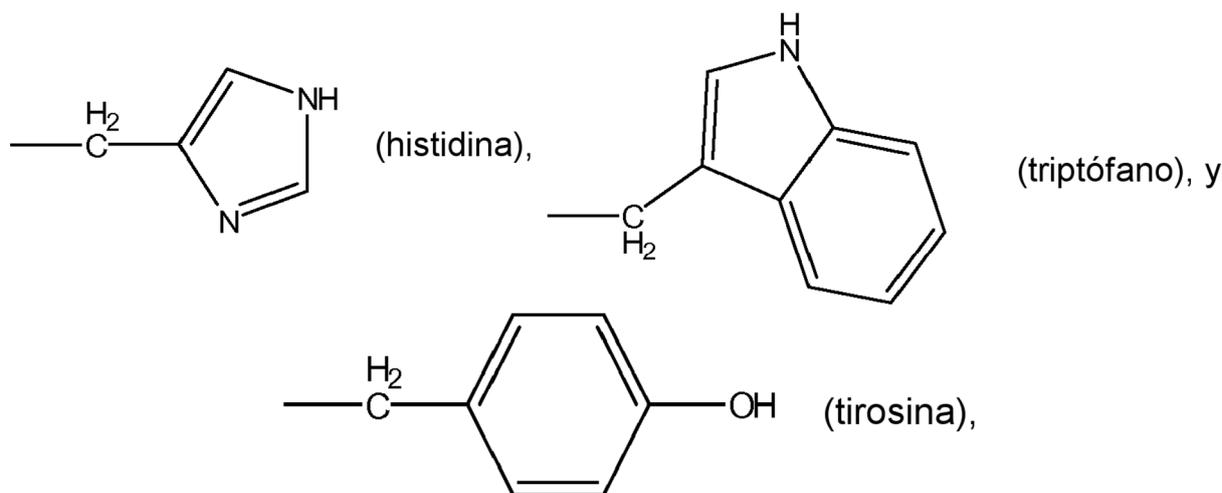
10 Preferentemente,  $R^1$  es un grupo bencilo sustituido o no sustituido, tal como  $-CH_2C_6H_5$ ,  $-CH_2C_6H_4NO_2$ ,  $-CH_2C_6H_4OCH_3$ ,  $-CH_2C_6H_4Cl$ ,  $-CH_2C_6H_4(NO_2)_2$ , o  $-CH_2C_6H_4F$ . El grupo bencilo puede ser sustituido en orto, meta, para, orto/para y sus combinaciones. Los sustituyentes adecuados en el anillo aromático incluyen halógenos (flúor, cloro, bromo, yodo), grupos  $-NO_2$ , grupos  $-OR^{16}$  en los que  $R^{16}$  es H o un grupo alquilo  $C_1$ - $C_4$ , y sus combinaciones.

15 Alternativamente, cuando  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$  entonces  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH,  $-CH_3$ , y  $-CH_2CH_2OH$ . En estos compuestos cuando  $R^1$  no es H, generalmente uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H.

20 Preferentemente uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H y  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$ , y uno de entre o ambos  $R^4$  y  $R^5$  son H,  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_2OH$ .

25 En los compuestos cuando uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  no son H,  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser seleccionados independientemente de entre fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, dipéptidos, ésteres de tripéptidos y ésteres de tetrapéptidos. Preferentemente, únicamente uno de entre  $R^2$  o  $R^3$  es un grupo fosfato. En los compuestos cuando por lo menos uno de entre  $R^2$  y  $R^3$  no es H,  $R^1$  es generalmente H. Preferentemente, uno de entre  $R^2$  y  $R^3$  es H y por lo tanto el compuesto de estructura I es derivado en únicamente uno de entre  $R^2$  y  $R^3$ . En los compuestos particulares,  $R^2$  es H y  $R^3$  se define como anteriormente. Preferentemente,  $R^1$  y  $R^3$  son H y  $R^2$  es un grupo en el que  $OR^2$  es un éster de un aminoácido o un dipéptido. Preferentemente,  $R^1$  y  $R^2$  son H y  $R^3$  es un grupo en el que  $OR^3$  es un éster de un aminoácido o un dipéptido.

30 Cuando uno de entre o ambos grupos  $OR^2$  y  $OR^3$  forman ésteres de aminoácidos o péptidos, es decir, dipéptidos, tripéptidos o tetrapéptidos, éstos pueden ser representados genéricamente como  $-COCHR^6NR^7R^8$  en los que  $R^6$  es seleccionado de entre el grupo que consiste en cadenas laterales de aminoácidos,  $R^7$  y  $R^8$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, y  $-COCHR^9NR^{10}R^{11}$ . Generalmente, la referencia a los aminoácidos o péptidos se refiere a los naturales, o L-isómero, de los aminoácidos o péptidos. Sin embargo, los presentes compuestos y procedimientos no están limitados a los mismos y los residuos de aminoácidos de D-isómero pueden ocupar el lugar de algunos o la totalidad de los L-aminoácidos. De manera similar, pueden utilizarse las mezclas de los D- y L-isómeros. Preferentemente, cuando el aminoácido es la prolina,  $R^7$  junto con  $R^6$  forma una estructura de anillo de pirrolidina.  $R^6$  puede ser cualquiera de las cadenas laterales de aminoácidos naturales, por ejemplo  $-CH_3$  (alanina),  $-(CH_2)_3NHCNH_2NH$  (arginina),  $-CH_2CONH_2$  (asparagina),  $-CH_2COOH$  (ácido aspártico),  $-CH_2SH$  (cisteína),  $-(CH_2)_2CONH_2$  (glutamina),  $-(CH_2)_2COOH$  (ácido glutámico),  $-H$  (glicina),  $-CHCH_3CH_2CH_3$  (isoleucina),  $-CH_2CH(CH_3)_2$  (leucina),  $-(CH_2)_4NH_2$  (lisina),  $-(CH_2)_2SCH_3$  (metionina),  $-CH_2Ph$  (fenilalanina),  $-CH_2OH$  (serina),  $-CHOHCH_3$  (treonina),  $-CH(CH_3)_2$  (valina),



45  $-(CH_2)_3NHCONH_2$  (citrulina) o  $-(CH_2)_3NH_2$  (ornitina). Ph designa un grupo fenilo.

50 En los compuestos anteriores,  $R^7$  y  $R^8$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados de entre el grupo que consiste en H, y  $-COCHR^9NR^{10}R^{11}$ , en los que  $R^9$  es una cadena lateral del aminoácido,  $R^{10}$  y  $R^{11}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados de entre el grupo que consiste en H, y  $-COCHR^{12}NR^{13}R^{14}$ , en los que  $R^{12}$  es una cadena lateral de aminoácido,  $R^{13}$  y  $R^{14}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados

independientemente de entre el grupo que consiste en H, y  $-\text{COCHR}^{15}\text{NH}_2$ . Un experto en la materia apreciará que las cadenas peptídicas pueden extenderse sobre el esquema siguiente hasta la longitud deseada e incluyen los residuos de aminoácidos deseados.

5 Preferentemente, cuando cualquiera de entre o ambos grupos  $\text{OR}^2$  y  $\text{OR}^3$  forman un éster de un péptido, tal como un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, etc. los péptidos pueden ser homopéptidos, es decir, repeticiones del mismo aminoácido, tal como arginil-arginina, o heteropéptidos, es decir, preparados a partir de diferentes combinaciones de aminoácidos. Los ejemplos de heterodipéptidos incluyen alanil-glutamina, glicil-glutamina, lisil-arginina, etc.

10 Como apreciará un experto en la materia, cuando únicamente uno de entre  $\text{R}^7$  y  $\text{R}^8$  incluye un enlace peptídico a otro aminoácido, tal como en los di-, tri- y tetrapéptidos, la cadena peptídica resultante será lineal. Cuando ambos  $\text{R}^7$  y  $\text{R}^8$  incluyen un enlace peptídico, entonces el péptido puede estar ramificado.

15 Preferentemente,  $\text{R}^1$  es H y uno de  $\text{R}^2$  o  $\text{R}^3$  es un grupo fosfato o H mientras que el otro  $\text{R}^2$  o  $\text{R}^3$  es un grupo de manera que  $\text{OR}^2$  u  $\text{OR}^3$  es un éster de un aminoácido, tal como un éster de glicina o alanina.

Se describen asimismo las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos así como la formulación farmacéutica de estos compuestos.

20 Generalmente, los compuestos indicados en la presente memoria presentan una biodisponibilidad oral mejorada en comparación con la biodisponibilidad oral del treprostinil, en forma de ácido libre o de sal. Los compuestos indicados pueden presentar una biodisponibilidad oral que es por lo menos 25%, 50%, 100%, 200%, 400% o más de la biodisponibilidad oral del treprostinil. La biodisponibilidad oral absoluta de dichos compuestos puede estar comprendida entre 10%, 15%, 20%, 25%, 30% y 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o superior al administrarlos por vía oral. En comparación, la biodisponibilidad oral absoluta del treprostinil es del orden de 10%, aunque el treprostinil sodio presenta una biodisponibilidad absoluta de aproximadamente 100% al administrarlo mediante infusión subcutánea.

30 Tal como entenderá el experto en la materia, para cualquier y todo propósito, en particular en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos dados a conocer en la presente memoria, y en particular los intervalos de biodisponibilidad indicados en la presente memoria también comprenden cualquiera y todos los subintervalos posibles y combinaciones de subintervalos de los mismos. A modo de mero ejemplo, un intervalo de 20% a 40% puede descomponerse en los intervalos de 20% a 32,5% y 32,5% a 40%, 20% a 27,5% y 27,5% a 40%, etc. Puede reconocerse fácilmente que un intervalo listado describe suficientemente y permite que el mismo intervalo se descomponga en por lo menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos iguales, etc. A título de ejemplo no limitativo, cada intervalo comentado en la presente memoria puede descomponerse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Tal como también entenderá el experto en la materia, toda expresión tal como "hasta", "por lo menos", "superior a", "inferior a", "más de" y similares incluye el número indicado y se refiere a intervalos que seguidamente pueden descomponerse en subintervalos tal como se ha comentado anteriormente. De la misma manera, todas las proporciones dadas a conocer en la presente memoria incluyen además todos los subintervalos comprendidos dentro de la proporción más amplia.

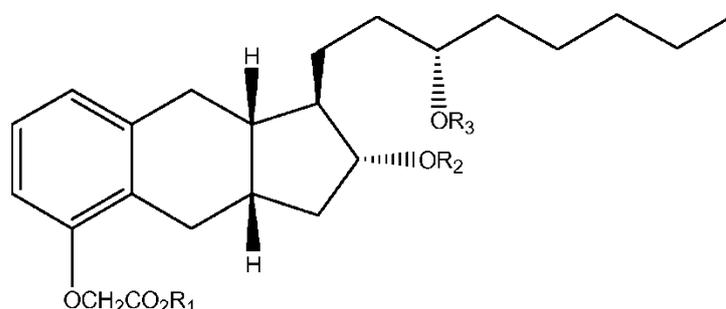
45 La administración de dichos compuestos puede realizarse mediante cualquier vía por la que el compuesto se encuentre biodisponible en cantidades eficaces, incluyendo las vías oral y parenteral. Los compuestos pueden administrarse por vía intravenosa, tópica, subcutánea, intranasal, rectal, intramuscular, transdérmica o mediante otras vías parenterales. Al administrarlos por vía oral, los compuestos pueden administrarse en cualquier forma de administración conveniente, incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, líquidos, suspensiones y similares.

50 Los ensayos han demostrado que el treprostinil puede resultar irritante al contacto con la piel. En contraste, algunos de los compuestos dados a conocer en la presente memoria, generalmente como profármacos del treprostinil, no son irritantes para la piel. De acuerdo con lo anterior, los presentes compuestos resultan muy adecuados para la administración tópica o transdérmica.

55 Al administrarlos en un sujeto, los compuestos anteriormente indicados y en particular los compuestos de estructura I, son miméticos de la prostaciclina y resultan útiles en el tratamiento de condiciones y trastornos con vasodilatación y/o inhibición de la agregación plaquetaria u otros trastornos en los que la prostaciclina ha demostrado ser beneficiosa, tal como en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente descripción se refiere a procedimientos para inducir efectos de tipo prostaciclina en un sujeto, comprendiendo la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos indicados en la presente memoria tales como los de estructura I, anteriormente, preferentemente por vía oral, en un paciente que requiere de dicho tratamiento. A título de ejemplo, los efectos vasodilatadores de los presentes compuestos pueden utilizarse para tratar la hipertensión pulmonar, que resulta de diversas formas de enfermedad de los tejidos conectivos, tales como el lupus, la esclerodermia o la enfermedad mixta del tejido conectivo. De esta manera, estos compuestos resultan útiles para el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

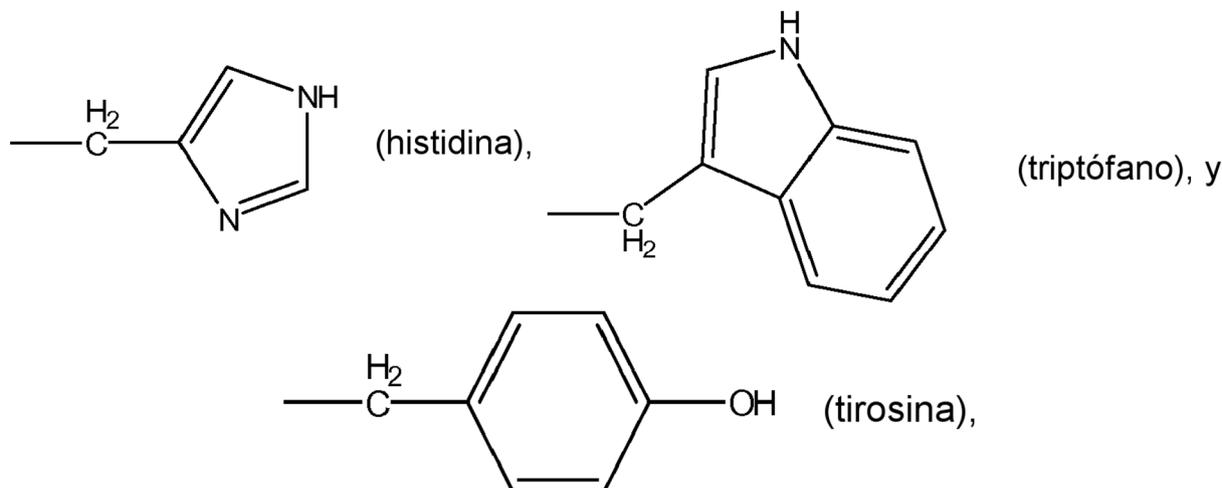
65

Preferentemente, la presente descripción se refiere asimismo a unos procedimientos para promover el efecto similar a la prostaciclina en un sujeto administrando una cantidad eficaz farmacéuticamente de un compuesto de estructura II:



- 5
- en el que,
- 10  $R^1$  es seleccionado independientemente de entre el grupo que consiste en H, grupos alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos arilalquilo y grupos en los que  $OR^1$  forma un éster de glicolamida sustituido o no sustituido;
- $R^2$  y  $R^3$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  forman ésteres de aminoácidos o proteínas, con la condición de que la totalidad de  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  no sean H;
- 15 un enantiómero del compuesto; y
- una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.
- 20 En los grupos en los que  $OR^1$  forma un éster de glicolamida sustituido o no sustituido,  $R^1$  puede ser  $-CH_2CONR^4R^5$ , en el que  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH, grupos alquilo sustituidos y no sustituidos,  $-(CH_2)_mCH_3$ ,  $-CH_2OH$ , y  $-CH_2(CH_2)_nOH$ , con la condición de que m sea 0, 1, 2, 3 o 4, y n sea 0, 1, 2, 3 o 4.
- 25 En otros procedimientos de inducción de la vasodilatación o tratamiento de la hipertensión,  $R^1$  puede ser un grupo alquilo, tal como metilo, etilo, propilo o butilo. En otros procedimientos  $R^1$  es un grupo bencilo sustituido o no sustituido, tal como  $-CH_2C_6H_5$ ,  $-CH_2C_6H_4NO_2$ ,  $-CH_2C_6H_4OCH_3$ ,  $-CH_2C_6H_4Cl$ ,  $-CH_2C_6H_4(NO_2)_2$ , o  $-CH_2C_6H_4F$ . El grupo bencilo puede estar sustituido en orto, meta, para, orto/para y sus combinaciones. Los sustituyentes adecuados en el anillo aromático incluyen halógenos (flúor, cloro, bromo, yodo), grupos  $-NO_2$ , grupos  $-OR^{16}$  en los que  $R^{16}$  es H o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y sus combinaciones.
- 30 Alternativamente, cuando  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$  entonces  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, OH,  $-CH_3$ , y  $-CH_2CH_2OH$ . En estos procedimientos cuando  $R^1$  no es H, generalmente uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H.
- 35 En algunos procedimientos, uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H y  $R^1$  es  $-CH_3$ ,  $-CH_2C_6H_5$ . En otros procedimientos cuando uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  son H, entonces  $R^1$  es  $-CH_2CONR^4R^5$ , y uno de entre o ambos  $R^4$  y  $R^5$  son H,  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_2OH$ .
- 40 En los procedimientos cuando uno de entre o ambos  $R^2$  y  $R^3$  no son H,  $R^2$  y  $R^3$  pueden ser seleccionados independientemente de entre fosfato y grupos en los que  $OR^2$  y  $OR^3$  son ésteres de aminoácidos, dipéptidos, ésteres de tripéptidos y ésteres de tetrapéptidos. Preferentemente, únicamente uno de entre  $R^2$  o  $R^3$  es un grupo fosfato. En los procedimientos cuando por lo menos uno de entre  $R^2$  y  $R^3$  no es H,  $R^1$  es generalmente H. En otros procedimientos, uno de entre  $R^2$  y  $R^3$  es H y el otro  $R^2$  o  $R^3$  es como se define en otro lugar en la presente memoria.
- 45 En algunos procedimientos,  $R^2$  es H y  $R^3$  no es H. Preferentemente,  $R^1$  y  $R^3$  son H y  $R^2$  es un grupo en el que  $OR^2$  es un éster de un aminoácido o un dipéptido. Preferentemente,  $R^1$  y  $R^2$  son H y  $R^3$  es un grupo en el que  $OR^3$  es un éster de un aminoácido o un dipéptido.
- 50 En los procedimientos, cuando uno de entre o ambos grupos  $OR^2$  y  $OR^3$  forman ésteres de aminoácidos o péptidos, es decir, dipéptidos, tripéptidos o tetrapéptidos, éstos pueden ser representados genéricamente como  $-COCHR^6NR^7R^8$  en los que  $R^6$  es seleccionado de entre el grupo que consiste en cadenas laterales de aminoácidos,  $R^7$  y  $R^8$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, y  $-COCHR^9NR^{10}R^{11}$ . Preferentemente, cuando el aminoácido es la prolina,  $R^7$  junto con  $R^6$  forma una estructura de anillo de pirrolidina.  $R^6$  puede ser cualquiera de las cadenas laterales de aminoácidos naturales, por ejemplo  $-CH_3$  (alanina),  $-(CH_2)_3NHCNH_2NH$  (arginina),  $-CH_2CONH_2$  (asparagina),  $-CH_2COOH$  (ácido aspártico),  $-CH_2SH$  (cisteína),  $-(CH_2)_2CONH_2$  (glutamina),  $-(CH_2)_2COOH$  (ácido glutámico),  $-H$  (glicina),  $-CHCH_3CH_2CH_3$  (isoleucina), -
- 55

CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (leucina), -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> (lisina), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> (metionina), -CH<sub>2</sub>Ph (fenilalanina), -CH<sub>2</sub>OH (serina), -CHOHCH<sub>3</sub> (treonina), -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (valina),



5

-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> (citrulina) o -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (ornitina). Ph designa un grupo fenilo.

En los procedimientos anteriores, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados de entre el grupo que consiste en H, y -COCHR<sup>9</sup>NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, en los que R<sup>9</sup> es una cadena lateral de un aminoácido, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados de entre el grupo que consiste en H, y -COCHR<sup>12</sup>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, en los que R<sup>12</sup> es una cadena lateral de aminoácidos, R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en H, y -COCHR<sup>15</sup>NH<sub>2</sub>. Un experto en la materia apreciará que las cadenas peptídicas pueden extenderse en el esquema siguiente hasta la longitud deseada e incluir los residuos de aminoácidos deseados.

15

Preferentemente, cuando cualquiera de entre o ambos grupos OR<sup>2</sup> y OR<sup>3</sup> forman un éster de un péptido, tal como un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, etc. los péptidos pueden ser homopéptidos, es decir, repeticiones del mismo residuo de aminoácido o heteropéptidos, es decir, preparados a partir de diferentes combinaciones de aminoácidos.

20

Como apreciará un experto en la materia, cuando únicamente uno de entre R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> incluye un enlace peptídico a otro aminoácido, tal como en los di-, tri- y tetrapéptidos, la cadena peptídica resultante será lineal. Cuando ambos R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> incluyen un enlace peptídico, entonces el péptido puede estar ramificado.

Todavía en otros procedimientos R<sup>1</sup> es H y uno de R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> es un grupo fosfato o H mientras que el otro R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> es un grupo de manera que OR<sup>2</sup> u OR<sup>3</sup> es un éster de un aminoácido, tal como un éster de glicina o alanina.

25

En algunos procedimientos, el compuesto administrado puede presentar una biodisponibilidad oral que es por lo menos 25%, 50%, 100%, 200% o 400% de la biodisponibilidad oral del treprostínil. Resulta generalmente preferido administrar compuestos que presentan biodisponibilidades orales absolutas más elevadas, tales como 15%, 20%, 25%, 30% y 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o superiores al administrarlos por vía oral.

30

Se ha descubierto que el treprostínil inhibe la metástasis de las células de cáncer, tal como se da a conocer en la solicitud de patente US n° de serie 10/006.197, presentada el 10 de diciembre de 2001 y el n° de serie 10/047.802, presentada el 16 de enero de 2002.

35

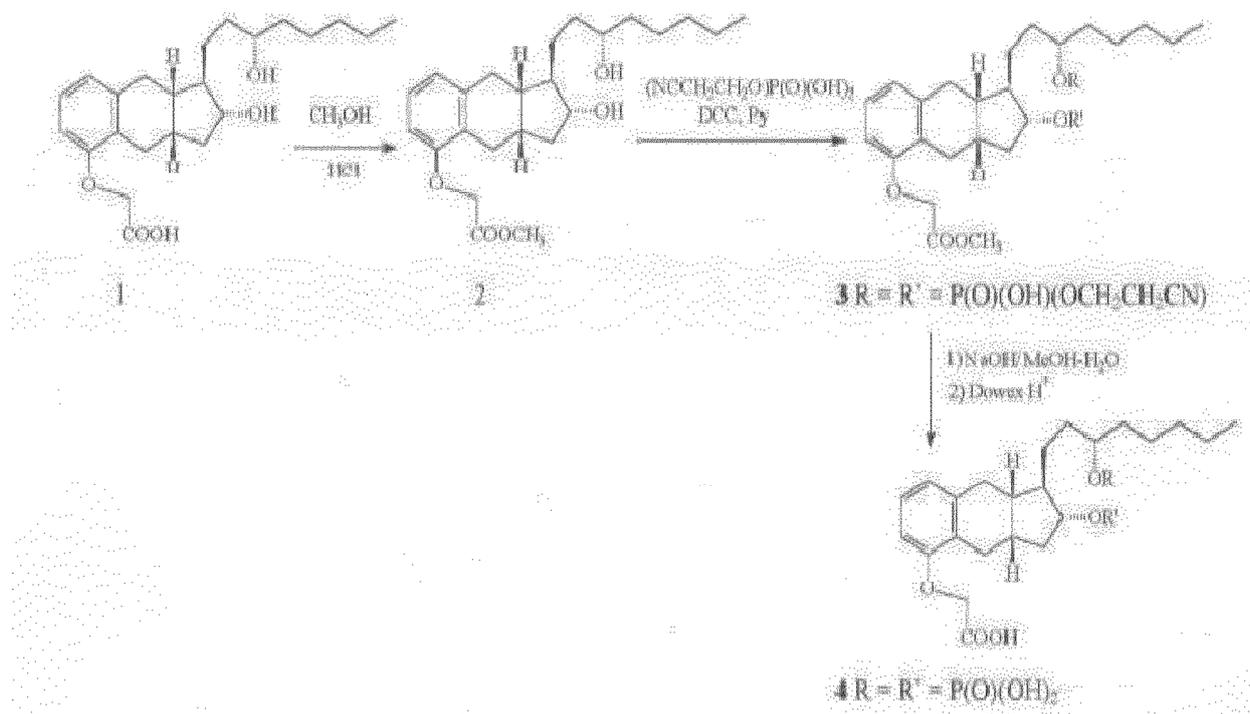
De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los compuestos descritos anteriormente, y en particular los de estructura I y II, también pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer y trastornos relacionados con el cáncer, y de esta manera la presente descripción se refiere a composiciones y procedimientos farmacéuticos para el tratamiento del cáncer. Pueden conseguirse formulaciones y procedimientos adecuados de utilización de los presentes compuestos mediante la sustitución de los compuestos de la presente descripción, tales como los de estructura I y II por los compuestos activos dados a conocer en las solicitudes de patente US n° de serie 10/006.197 y n° 10/047.802, presentadas el 16 de enero de 2002.

40

La síntesis de los compuestos siguientes de estructura I y estructura II puede llevarse a cabo de la manera siguiente:

45

Síntesis del metil éster de treprostínil (2) y éster de bifosfato de treprostínil



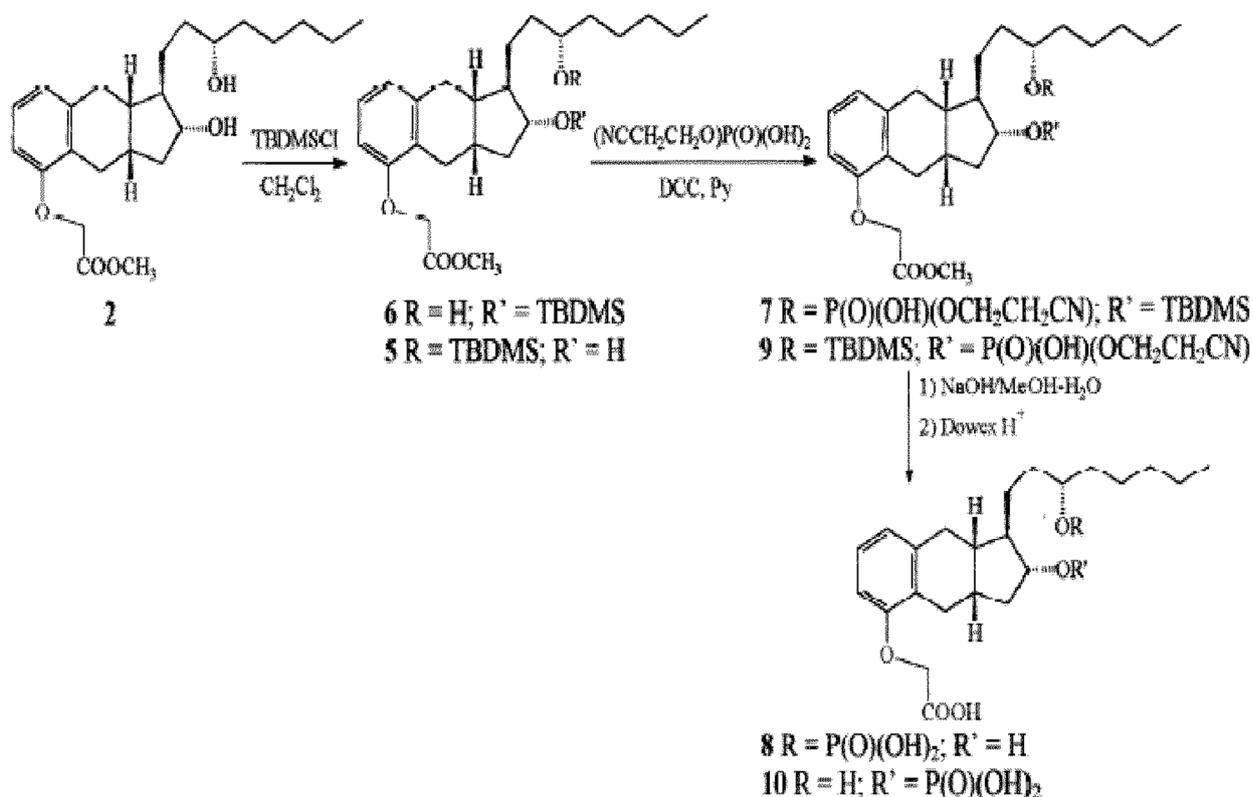
#### Síntesis del metil éster de treprostinil (2)

- 5 Se prepara metil éster de treprostinil (2) tratando 1,087 g (2,8 mmoles) de treprostinil (1) con 50 mol de una disolución saturada de ácido clorhídrico seco en metanol. Tras 24 horas a temperatura ambiente, se evapora el metanol hasta sequedad y se toma el residuo en 200 ml de diclorometano. La disolución de diclorometano se lava con una disolución de carbonato potásico acuoso al 10%, y a continuación con agua a un pH neutro, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se elimina el disolvente al vacío proporcionando metil éster de treprostinil (2) en un rendimiento de 48% como un aceite amarillo. El metil éster en bruto es utilizado como tal en las reacciones siguientes.

#### Síntesis del éster de bifosfato de treprostinil (4)

- 15 El procedimiento es adaptado al modo de Steroids, 2(6), 567-603(1963). El metil éster de treprostinil (2) (60 mg, 0,15 mmoles) se disuelve en 2 ml de piridina seca y una disolución de piridinio de la disolución de piridinio preparada anteriormente de 2-cianoetil fosfato 1 M (0,3 ml, 0,3 mmoles) (cf. Methods in Enzymology, 1971, 18(c), 54-57) es concentrada hasta la sequedad al vacío a 40°C. La piridina anhidra es añadida y la mezcla de reacción se concentra de nuevo; se repite la operación dos veces para eliminar el agua completamente. Finalmente se disuelve el residuo en 2 ml de piridina anhidra y se añaden 190 mg (0,9 mmoles) de diciclohexilcarbodiimida como una disolución en 2 ml de piridina anhidra. La mezcla de reacción se agita magnéticamente en un matraz cerrado durante 48 horas a temperatura ambiente. Se añade 1 ml de agua y tras una hora, se concentra la mezcla hasta una pasta espesa al vacío. Se trata la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente con 3 ml de una disolución de agua/metanol 1/9 que contiene 35 mg de hidróxido de sodio. El sólido blanco (diciclohexilurea) formado es eliminado por filtración y se lava bien con agua. La disolución metanólica acuosa se concentra casi hasta sequedad al vacío, se añade agua y la disolución se extrae con n-butanol (3 x 2 ml) a continuación con cloruro de metileno (1 x 2 ml). El pH de la disolución se ajusta hasta 9,0 mediante un tratamiento con una resina de intercambio iónico de ácido sulfónico (H + ciclo – Dowex), el tratamiento con resina de Dowex durante un tiempo mayor (~ 12 horas) conduce a la escisión del grupo TBDMS y la recuperación del grupo carboxilo libre. Se filtra la resina y la disolución se concentra hasta sequedad proporcionando el bisfosfato correspondiente 4 (43 mg, rendimiento de 52%).

#### Síntesis de éster de 3'-monofosfato de treprostinil (8) y éster de 2-monofosfato de treprostinil (10)



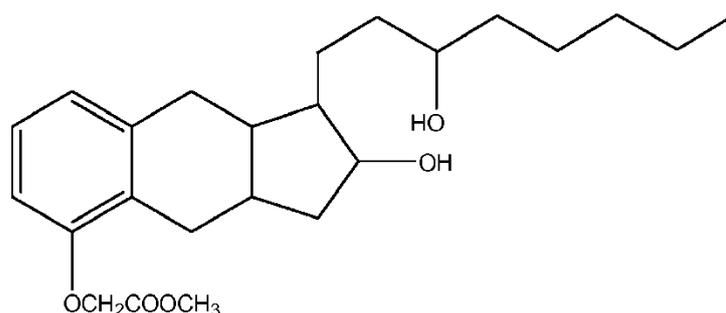
#### Síntesis del metil éster de TBDMS monoprotegido de treprostinil (5 y 6)

- 5 Se adapta el procedimiento a partir de *Org. Synth.*, 1998, 75, 139-145. El metil éster de treprostinil (2) (305,8 mg, 0,75 mmoles) se disuelve en 15 ml de diclorometano anhidro y se enfría la disolución en un baño de hielo a 0°C. Se añaden imidazol (102 mg, 1,5 mmoles) y cloruro de terc-butildimetil sililo (226,2 mg, 1,5 mmoles) y la mezcla se mantiene bajo agitación a 0°C durante 30 minutos, a continuación se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se añade agua (25 ml) y se separa la capa orgánica. La capa acuosa se extrae a continuación con diclorometano (3 x 50 ml). Las capas orgánicas se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra la disolución y se elimina el disolvente al vacío proporcionando 447 mg de producto de reacción en bruto. El producto de reacción en bruto se separa mediante cromatografía en columna (gel de sílice, 35% de acetato de etilo/hexanos) proporcionando 140 mg de metil éster de treprostinil protegido de bis-TBDMS, 160 mg de metil éster de treprostinil protegido de 2-TBDMS (6) y 60 mg de metil éster de treprostinil protegido de 3'-TBDMS (5).

#### Síntesis de éster de monofosfato de treprostinil 8/10

- 15 El procedimiento es adaptado al modo de *Steroids*, 1963, 2(6), 567-603 y es el mismo para (8) y (10) partiendo de (6) y (5) respectivamente. El metil éster protegido de TBDMS de treprostinilo (6) (46 mg, 0,09 mmoles) se disuelve en 2 ml de piridina seca y una disolución de piridinio de la disolución de piridinio preparada anteriormente de 2-cianoetilfosfato 1 M (0,2 ml, 0,2 mmoles) (cf. *Methods in Enzymology*, 1971, 18(c), 54-57) se concentra hasta sequedad al vacío a 40°C. Se añade la piridina anhidra y la mezcla de reacción se concentra de nuevo; la operación se repite dos veces para eliminar el agua completamente. Finalmente el residuo se disuelve en 2 ml de piridina anhidra y 116 mg (0,56 mmoles) de dicitlohexilcarbodiimida se añaden como una disolución en 2 ml de piridina anhidra. La mezcla de reacción en un matraz cerrado se agita magnéticamente durante 48 horas a temperatura ambiente a oscuras. Se añaden 5 ml de agua y tras una hora, la mezcla se concentra hasta una pasta espesa al vacío. La mezcla de reacción se trata durante la noche a temperatura ambiente con 10 ml de una disolución de agua/metanol 1/9 que contiene 100 mg de hidróxido de sodio. El sólido blanco (dicitlohexilurea) formado se elimina por filtración y se lava bien con agua. La disolución metanólica acuosa se concentra casi hasta sequedad al vacío, se añade agua y la disolución se extrae con n-butanol (3 x 10 ml), a continuación con cloruro de metileno (1 x 10 ml). El pH de la disolución se ajusta hasta 9,0 mediante tratamiento con una resina de intercambio iónico de ácido sulfónico (H<sup>+</sup> ciclo - Dowex); el tratamiento con resina de Dowex durante un tiempo más largo (~ 12 horas) conduce a la escisión del grupo TBDMS y la recuperación del grupo carboxilo libre. La resina se filtra y la disolución se concentra hasta sequedad proporcionando el monofosfato correspondiente 8 (33 mg, rendimiento de 68%).

#### Síntesis de metil éster de treprostinil (2)



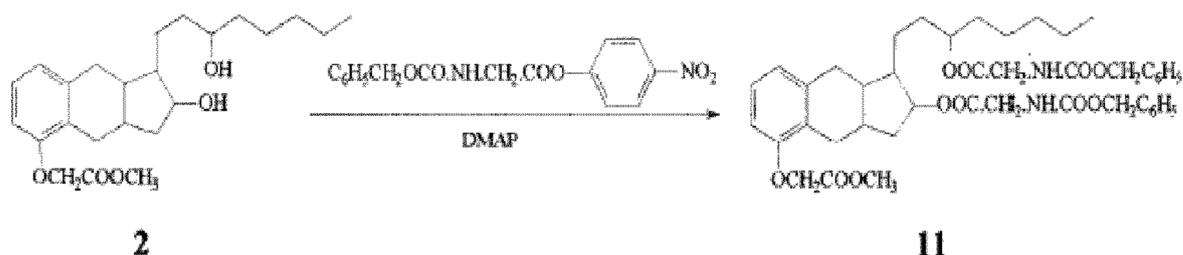
2

5 Se añade (2) (1 g; 2,56 mmol) a metanol (50 ml) antes de saturación con ácido clorhídrico gaseoso y la mezcla se somete a turbulencias para proporcionar una disolución acuosa que se deja permanecer durante la noche a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente al vacío y se neutraliza el residuo con una disolución de carbonato de potasio al 20% y se extrae en diclorometano. La capa orgánica se lava con agua, se seca en sulfato de magnesio anhidro y se evapora para proporcionar el producto en bruto (0,96 g). La purificación mediante tlc preparativa (placa de gel de sílice; eluyente: 7:3 (v/v) hexano-etil acetato) proporciona 2 (0,803; 77,5%), aceite incoloro.

10 Síntesis de dietanolamina de tretteprostinil (UT-15C)

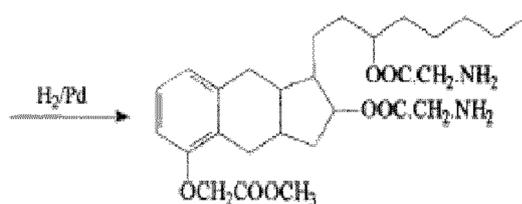
Se disuelve ácido tretteprostinil en una mezcla de proporción molar 1:1 de etanol:agua y se añade y disuelve dietanolamina. La disolución se calienta y se añade acetona como un antidisolvente durante el enfriamiento.

15 Síntesis de diglicil éster de metil éster de tretteprostinil (12)



2

11



12

20 Se añaden sucesivamente a una disolución agitada magnéticamente de (2) metil éster 2 (0,268 g; 0,66 mmoles) en diclorometano (30 ml) N-carbobenciloglicina p-nitrofenil éster (0,766 g; 2,32 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (250 mg; 2,05 mmoles). La disolución amarilla resultante se agita a 20°C durante 24 horas, a continuación se trata con una disolución de hidróxido de sodio al 5% (20 ml) y se prolonga la agitación durante 15 min. Se añade diclorometano (50 ml), se separan las capas y la fase orgánica es lavada con una disolución de hidróxido de sodio al 5% (6 x 20 ml), agua (30 ml), ácido clorhídrico al 10% (2 x 40 ml), disolución de bicarbonato de sodio al 5% (40 ml) y se seca en sulfato de sodio anhidro. La eliminación del disolvente proporciona un aceite viscoso amarillo pálido en bruto (11) (0,61 g). La purificación mediante cromatografía en columna rápida sobre gel de sílice que eluye con gradiente 9/1 a 1/2 (v/v) hexano-etil éter proporciona 0,445 g (85,3%) de 11, cristales blancos, p.f. 70-72°C. 'FI-NMR [CDCl<sub>3</sub>; δ(ppm)]: 3,786 (s)(3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,875 (d)(2H) y 3,940 (d)(2H)(NH-CH<sub>2</sub>-COO), 4,631 (s) (2H, OCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>), 4,789 (m) (1H, adyacente a OOC-CH<sub>2</sub>NHcbz) y 4,903 (m) (1H, adyacente a OOCCH<sub>2</sub>NHcbz), 5,09 (s)(4H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>O), 5,378 (m) (1H) y 5,392 (m)(1H)(NH), 7,329 (m)(10H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). LR ESI-MS (m/z): 787,1 [M+H]<sup>+</sup>, 804,1 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 809,3 [M+Na]<sup>+</sup>, 825,2 [M+K]<sup>+</sup>, 1590,5 [2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 1595,6 [2M+Na]<sub>+</sub>.

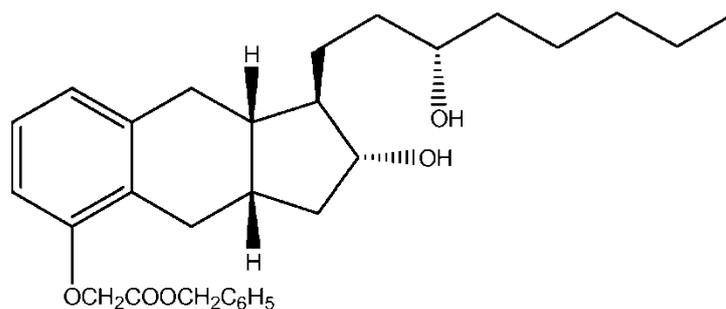
25

30

## Metil éster, diglicil éster (12)

Se introduce una disolución de éster (11) (0,4 g; 0,51 mmoles) en metanol (30 ml) en la botella de presión de un aparato de hidrogenación Parr, se añade paladio en carbón al 10% (0,2 g; 0,197 mmoles Pd), se cierra el aparato, se purga tres veces con hidrógeno y se carga con hidrógeno a 50 p.s.i. Se inicia una agitación y se realiza la hidrogenación durante 5 horas a temperatura ambiente. Se elimina el hidrógeno de la instalación mediante aspiración al vacío y se sustituye con argón. Se filtra el catalizador a través de celita que se deposita sobre un montaje y el filtrado se concentra al vacío para proporcionar 0,240 g (91%) de 4, sólido blanco p.f. 98-100°C.

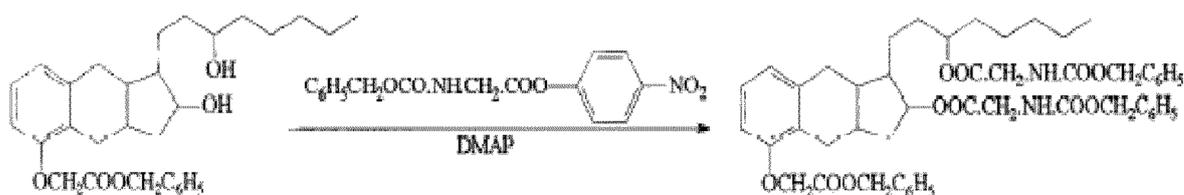
## 10 Síntesis de bencil éster de treprostínil (13)



13

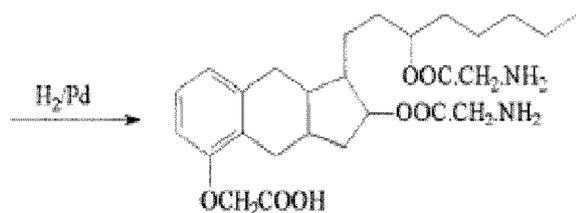
15 A una disolución agitada de (2) (2 g; 5,12 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (20 ml) se le añaden de manera consecutiva bromuro de bencilo (0,95 ml; 7,98 mmoles) y trietilamina recién destilada (1,6 ml; 11,48 mmoles) a temperatura ambiente y la disolución obtenida se somete a reflujo con agitación durante 12 horas. Se forma de manera gradual un precipitado blanco. Se destila el disolvente al vacío y el residuo es tratado con agua (30 ml). Al extraer con cloruro de metileno se produce la formación de la emulsión. Las capas orgánica y acuosa podrían separarse únicamente tras un tratamiento con una disolución de ácido clorhídrico al 5% (20 ml). La capa orgánica es lavada con agua, secada en sulfato de sodio anhidro, y se evapora, el residuo es secado adicionalmente bajo una presión reducida en pentóxido de fósforo para proporcionar un aceite viscoso amarillo (2,32 g) que se purifica mediante cromatografía de capa fina preparativa (placa de gel de sílice; eluyente: 1:2, v/v, hexano/etil éter). Rendimiento: 81,2%.

## 25 Síntesis de bis-glicil éster de treprostínil (15)



13

14



15

## Bencil éster, di-cbcGli éster (14)

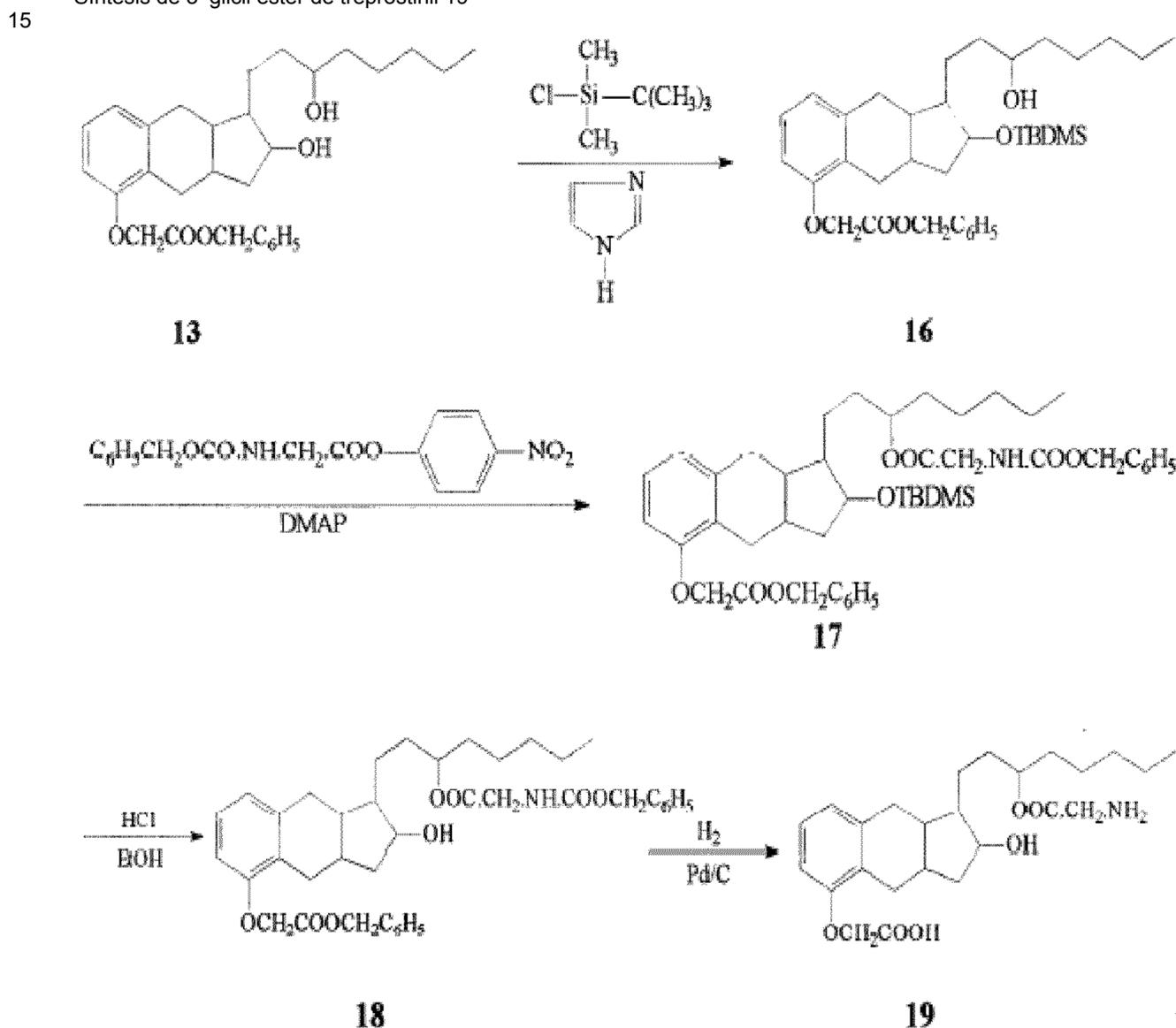
30 A una disolución agitada magnéticamente de bencil éster 13 (1 g; 2,08 mmoles) en diclorometano (50 ml) se le añaden N-carbobenciloxyglicina p-nitrofenil éster (2,41 g; 7,28 mmoles) y 4-(dimetilamino) piridina (788 mg; 6,45

mmoles). La disolución amarilla resultante es agitada a 20°C durante 21 horas, se lava a continuación sucesivamente con una disolución de hidróxido de sodio al 5% (6 x 45 ml), ácido clorhídrico al 10% (2 x 40 ml), disolución de bicarbonato sódico al 5% (40 ml) y se seca en sulfato de sodio anhidro. La eliminación del disolvente, seguida por el secado en pentóxido de fósforo bajo una presión reducida, proporciona un aceite amarillo pálido en bruto 14 (2,61 g). La purificación mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice eluyendo con gradiente 9:1 a 1:2 (v/v) hexano-etil éster proporciona (14) (1,51 g; 84,1%) como un aceite muy viscoso, incoloro.

Diglicil éster (15)

Se hidrogena una disolución de éster (14) (0,4 g; 0,46 mmoles) en metanol (30 ml) en 10% de Pd/C como se describe para el éster (12). El desarrollo y el secado en pentóxido de fósforo al vacío proporciona 0,170 g (72,7%) de éster 15, sólido blanco p.f. 155-158°C.

Síntesis de 3'-glicil éster de treprostínil 19



Bencil éster, t-butildimetilsilil monoéster (16)

Una disolución de cloruro de terc-butildimetilsilil (0,45 g; 2,98 mmoles) en diclorometano se añade por goteo a lo largo de 10 minutos, a temperatura ambiente, a una disolución agitada de bencil éster (0,83 g; 1,73 mmoles) e imidazol (0,33 g; 4,85 mmoles) en diclorometano (20 ml). Se prolonga la agitación durante la noche y se añade a continuación agua (20 ml), la mezcla se agita durante una hora, se separan las capas, la capa orgánica se seca en sulfato de sodio anhidro y se concentra al vacío para proporcionar un aceite ligeramente amarillo (1,15 g). El producto en bruto es una mezcla de los mono-TBDMS (16) y di-TBDMS ésteres (<sup>1</sup>H-NMR). La cromatografía en columna en gel de sílice, que eluye con una mezcla de hexano-etil acetato 9:1 (v/v), proporciona de inmediato el di-

éster (0,618 g) en una primera fracción, y el éster 16 (0,353 g; rendimiento respecto a 13: 34,4%) en las fracciones siguientes. La tlc analítica en gel de sílice del éster 16 presenta únicamente un punto (eluyente: 3:2 (v/v) hexano-etil éter). A continuación, en las condiciones de reacción anteriores, el otro posible isómero (mono-TBDMS éster en el hidroxilo de cadena lateral) no se aprecia.

Otro experimento en el que la proporción molar cloruro de terc-butildimetilsilil: éster 13 se reduce a 1,49 (seguido por cromatografía en columna rápida del producto en gel de sílice, que eluye con un gradiente 9,5/0,5 a 3/1 (v/v) de hexano-etil éter) conduce a un contenido reducido (36,5%, como un material aislado puro) del subproducto de di-OTBDMS no deseado. Las fracciones de mono-OTBDMS éster (45,1%; material aislado) consisten en éster 16 (98%) y su isómero de cadena lateral (2%) que podrían separarse claramente; esto se demuestra (tlc, NMR) únicamente en la última de las fracciones monoéster.

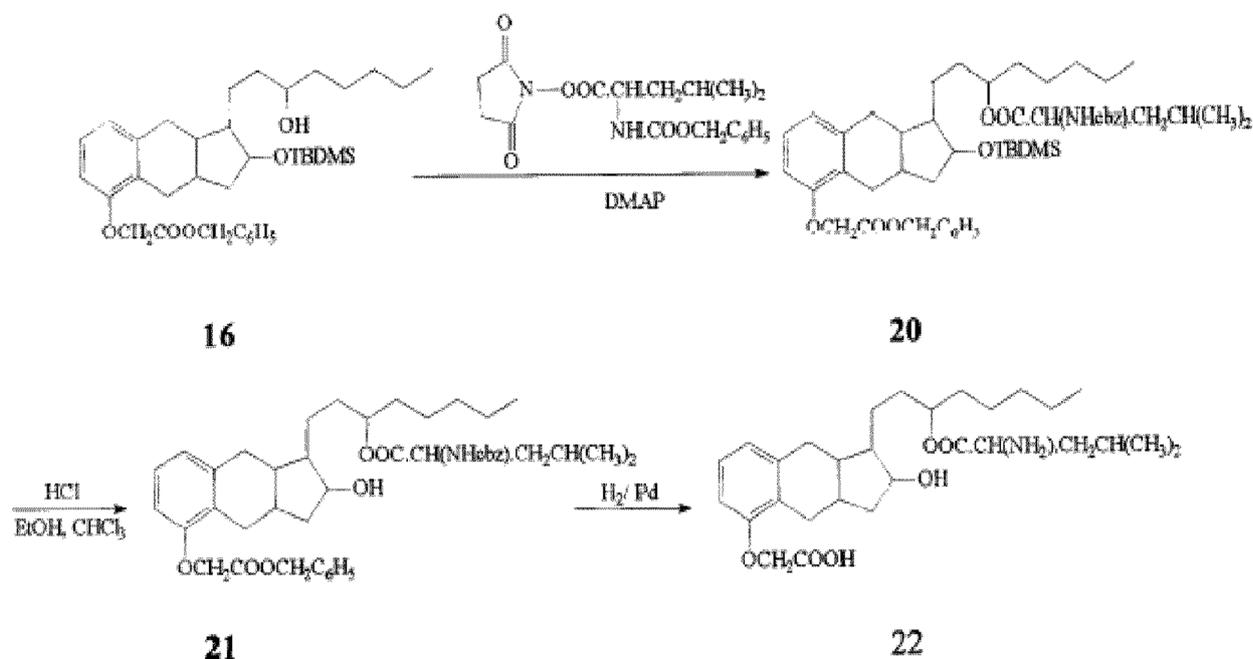
Bencil éster, cbc-glicil monoéster (18)

A una disolución agitada magnéticamente de éster 16 (0,340 g; 0,57 mmoles) en diclorometano (15 ml) se le añaden N-carbobenciloxiglicina p-nitrofenil éster (0,445 g; 1,35 mmoles) y 4-(dimetilamino) piridina (150 mg; 1,23 mmoles) sucesivamente. La disolución es agitada a 20°C durante 40 horas. El desarrollo como se describe para los ésteres 11 y 14 proporciona un producto en bruto (0,63 g) que contiene 17 al 90% y 18 al 10% (<sup>1</sup>H-NMR). Para eliminar completamente el grupo TBDMS protector, se disuelve esta mezcla en etanol (30 ml) y se somete a hidrólisis ácida (HCl al 5%, 7 ml) agitando durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a continuación a presión reducida y se extrae el residuo en diclorometano (3 x 50 ml); la capa orgánica se separa, se lava una vez con agua (50 ml), se seca en sulfato de sodio y se concentra al vacío para proporcionar un éster en bruto 18 (0,51 g). La purificación mediante cromatografía en columna rápida como para los ésteres 11 y 14 proporciona el éster 18 (0,150 g; rendimiento total: 39,1%) como un aceite viscoso, incoloro.

Glicil monoéster (19)

Se hidrogena una disolución de éster 18 (0,15 g; 0,22 mmoles) en metanol (30 ml) en pd/C al 10% como se describe para el éster 12 y 15. El desarrollo y el secado en pentóxido de fósforo al vacío proporciona éster 10 (0,98 g; 98,0%), cristales brillantes, blancos p.f. 74-76°C. LR ESI-MS (m/z): 448,2 [M+H]<sup>+</sup>, 446,4 [M-H]<sup>-</sup>.

Síntesis de 3'-L-leucil éster de treprostnil 22



Bencil éster, t-butildimetilsilil monoéster, cbc-L-leucil monoéster (20)

A una disolución agitada de éster (0,38 g; 0,64 mmoles) y N-carbobenciloxi-L-leucina N-hidroxisuccinimida éster (0,37 g; 1,02 mmoles) en 10 ml de diclorometano se le añade 4-(dimetilamino)piridina (0,17 g; 1,39 mmoles), a continuación se prolonga la agitación a temperatura ambiente durante 2 días. Se elimina el disolvente al vacío y el producto en bruto (0,9 g) se somete a cromatografía en columna rápida en gel de sílice que eluye con 9:1 hexano-acetato de etilo; la fracción recogida en primer lugar proporciona un aceite (0,51 g) que, sobre la base del espectro de NMR y la tlc, se demuestra ser una mezcla 2:1 de éster 20 y el éster de partida 16. La tlc preparativa en gel de

silíce (eluyente: etil acetato-hexano 1:4) proporciona 20 en bruto, aceite incoloro (rendimiento total sobre la base de 7:62,6%).

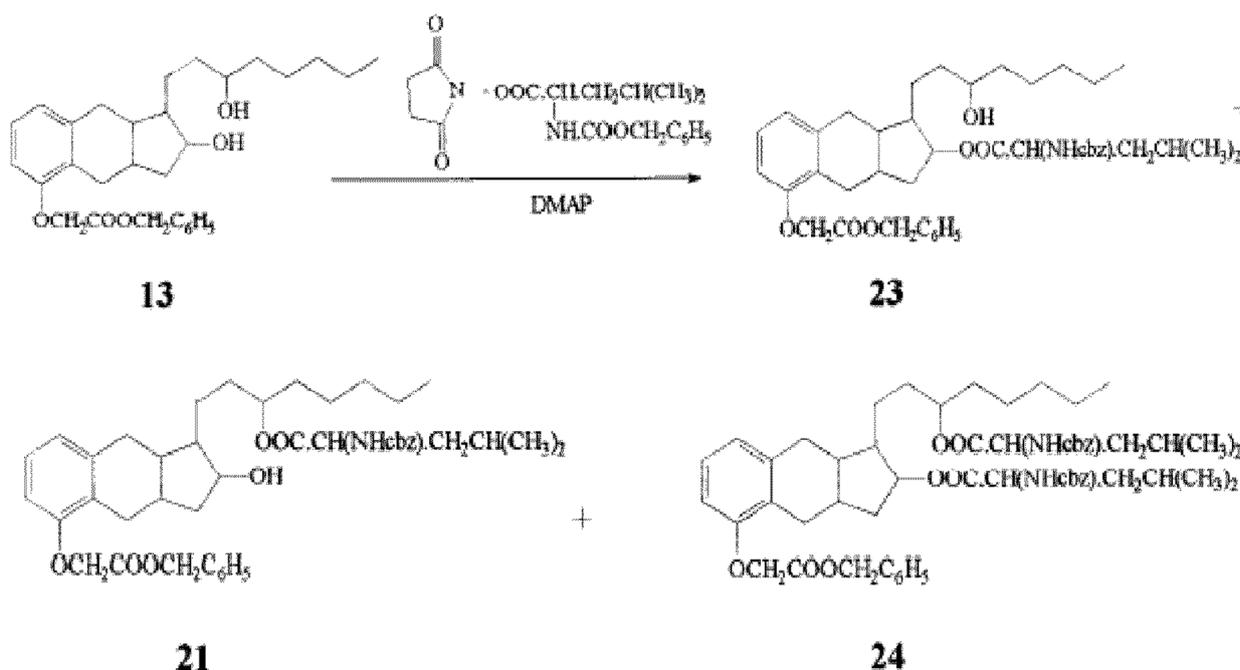
Bencil éster, cbc-L-leucil monoéster (21)

La desprotección del hidroxilo de ciclopentenilo en el t-butildimetilsilil monómero 20 se logra mediante el tratamiento con una disolución de ácido clorhídrico diluido como se describe para 18, con la excepción de que una mezcla de 1:5 (v/v) cloroformo-etanol, en lugar de únicamente etanol, se utiliza para asegurar la homogeneidad. El desarrollo proporciona 20, aceite incoloro, en un rendimiento de 87,6%.

L-leucil monoéster (22)

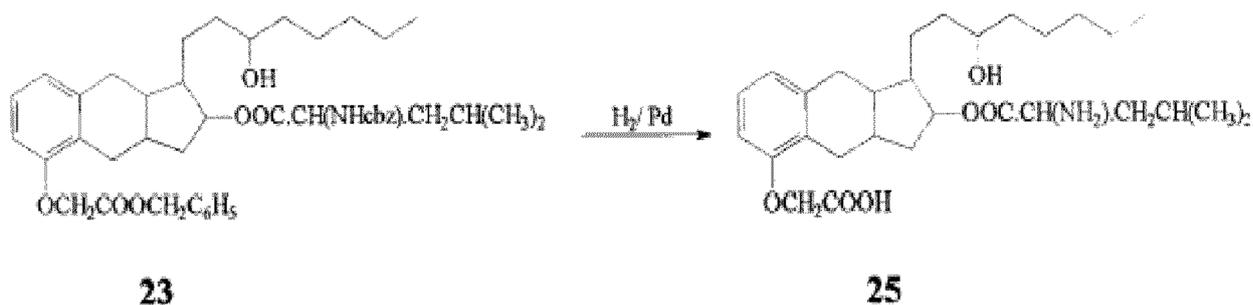
Se realiza la hidrogenólisis de los grupos bencilo y N-carbobenciloxi en 21 como para 18. El desarrollo proporciona 22 (95,3%), sólido blanco, p.f. 118-120°C.

Síntesis del 2-L-leucil éster de treprostínil 25



Bencil éster, cbc-L-leucil monoésteres (21, 23) y -diéster (24)

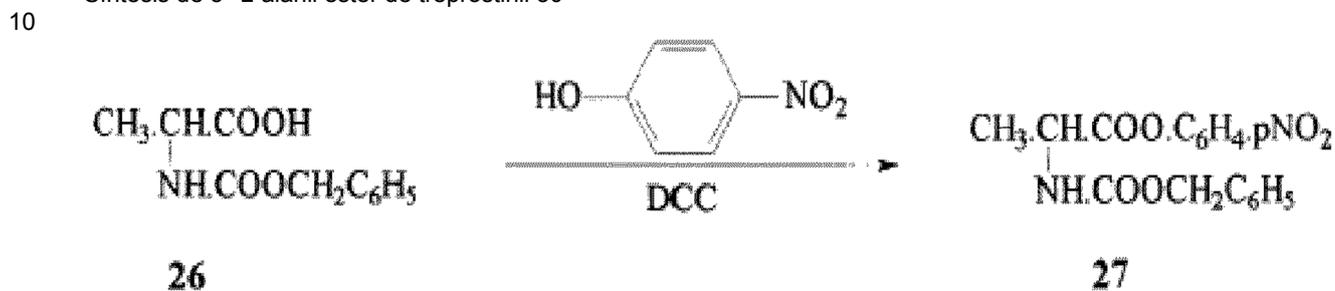
A una disolución agitada de éster 13 (0,53 g; 1,10 mmoles) y N-carbobenciloxi-L-leucina N-hidroxisuccinimida éster (0,76 g; 2,05 mmoles) en diclorometano (30 ml) se le añade 4-(dimetilamino) piridina (0,29 g; 2,37 mmoles), a continuación se prolonga la agitación a temperatura ambiente durante 1 día. La disolución se diluye con diclorometano (40 ml), se lava sucesivamente con una disolución de hidróxido de sodio al 5% (4 x 25 ml), ácido clorhídrico al 10% (2 x 30 ml), una disolución de bicarbonato de sodio al 5% (50 ml), se seca en sulfato de sodio anhidro y se concentra a presión reducida para proporcionar el producto en bruto (0,85 g), como un aceite amarillo, viscoso. La cromatografía en capa fina revela una mezcla compleja en la que los ésteres 13 y 21 así como la cbc-L-leucina podrían identificarse a través de los valores  $r_f$  correspondientes, únicamente como productos menores. El producto en bruto se somete a cromatografía rápida a través de una columna de gel de sílice que eluye con un gradiente hexano-etil éter. A 7:3 (v/v) de hexano-etil éter, la primera fracción proporciona el cbc-L-leucil diéster 24 (6% del producto sometido a cromatografía) mientras que las dos fracciones siguientes proporcionan el cbc-L-leucil monoéster 23 (54% del producto en bruto, como aislado puro 23; rendimiento de 57,6%, respecto a 2). Se verifica la pureza de ambos compuestos mediante tlc analítica y NMR. El otro isómero, el cbz-L-leucil monoéster 21 constituye únicamente aproximadamente 5% del producto en bruto y se aísla mediante tlc preparativa del último únicamente una mezcla de 23/21 3:1.



L-leucil monoéster (25)

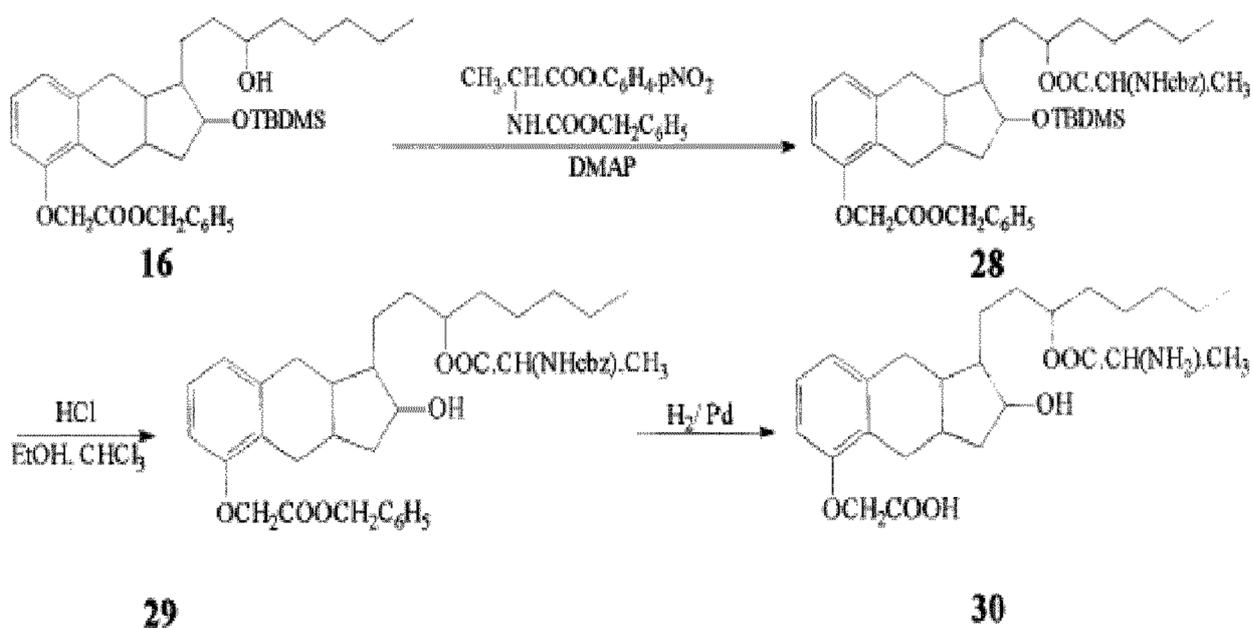
- 5 Se realiza la hidrogenólisis de 23 al éster 25 como se describe para el compuesto 12 pero la reacción se lleva a cabo a 35 p.s.i., durante la noche. El desarrollo y el secado en pentóxido de fósforo al vacío proporciona 25, sólido blanco p.f. 153-155°C, en rendimiento cuantitativo.

Síntesis de 3'-L-alanil éster de treprostín 30



N-cbc-L-alanil p-nitro fenil éster (27)

- 15 A una disolución agitada que contiene N-carbobenciloxi-L-alanina (1 g; 4,48 mmoles) y p-nitrofenol (1 g; 7,19 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (7 ml) se le añade una suspensión fina de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (1,11 g; 5,38 mmoles) en tetrahidrofurano (5 ml) durante 30 minutos. La agitación se prolonga a temperatura ambiente durante 18 horas, se añade ácido acético glacial (0,3 ml), se filtra 1,3-diciclohexilurea y se elimina el disolvente al vacío, a 40°C, para proporcionar un aceite amarillo-rojizo, viscoso (2,5 g). El espectro de <sup>1</sup>H-NMR presenta una mezcla que consiste en N-carbobenciloxi-L-alanina p-nitrofenil éster (27), p-nitrofenol sin reaccionar y una cantidad pequeña de DCU, que se utiliza como tal en la etapa de reacción próxima.



- 25 Bencil éster, cbc-L-alanil monoéster (29)

Una disolución de 4-(dimetilamino)piridina (0,30 g; 2,49 mmoles) en diclorometano (3 ml) se vierte rápidamente (durante 5 minutos) en una disolución agitada magnéticamente de éster 16 (0,37 g; 0,62 mmoles) y N-carbobenciloxi-L-alanina p-nitrofenil éster en bruto (0,98 g) en diclorometano (12 ml). La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente, se diluye a continuación con diclorometano (50 ml) y se lava cuidadosamente con una disolución de hidróxido de sodio al 5% (7 x 35 ml), ácido clorhídrico al 10% (3 x 35 ml), una disolución de bicarbonato de sodio al 5% (50 ml), se seca en sulfato de sodio anhidro y se concentra a presión reducida para proporcionar el éster 28 en bruto (1,1 g). Este último se disuelve en etanol (30 ml), 5% de ácido clorhídrico (8 ml) y cloroformo (5 ml) se añaden y la disolución se agita durante la noche. Los disolventes se eliminan al vacío, el residuo se incluye en diclorometano, se lava a un pH 7 con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 5%, se seca en sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evapora proporcionando 29 en bruto (1,04 g). La purificación mediante cromatografía en columna en gel de sílice, que eluye con gradiente hexano-etil éter, permite la separación de una fracción (a hexano:etil éter= 1:1 v/v) de 29 en bruto como un aceite muy viscoso incoloro (0,11 g; 25,8% de rendimiento total, sobre la base de 16).

5

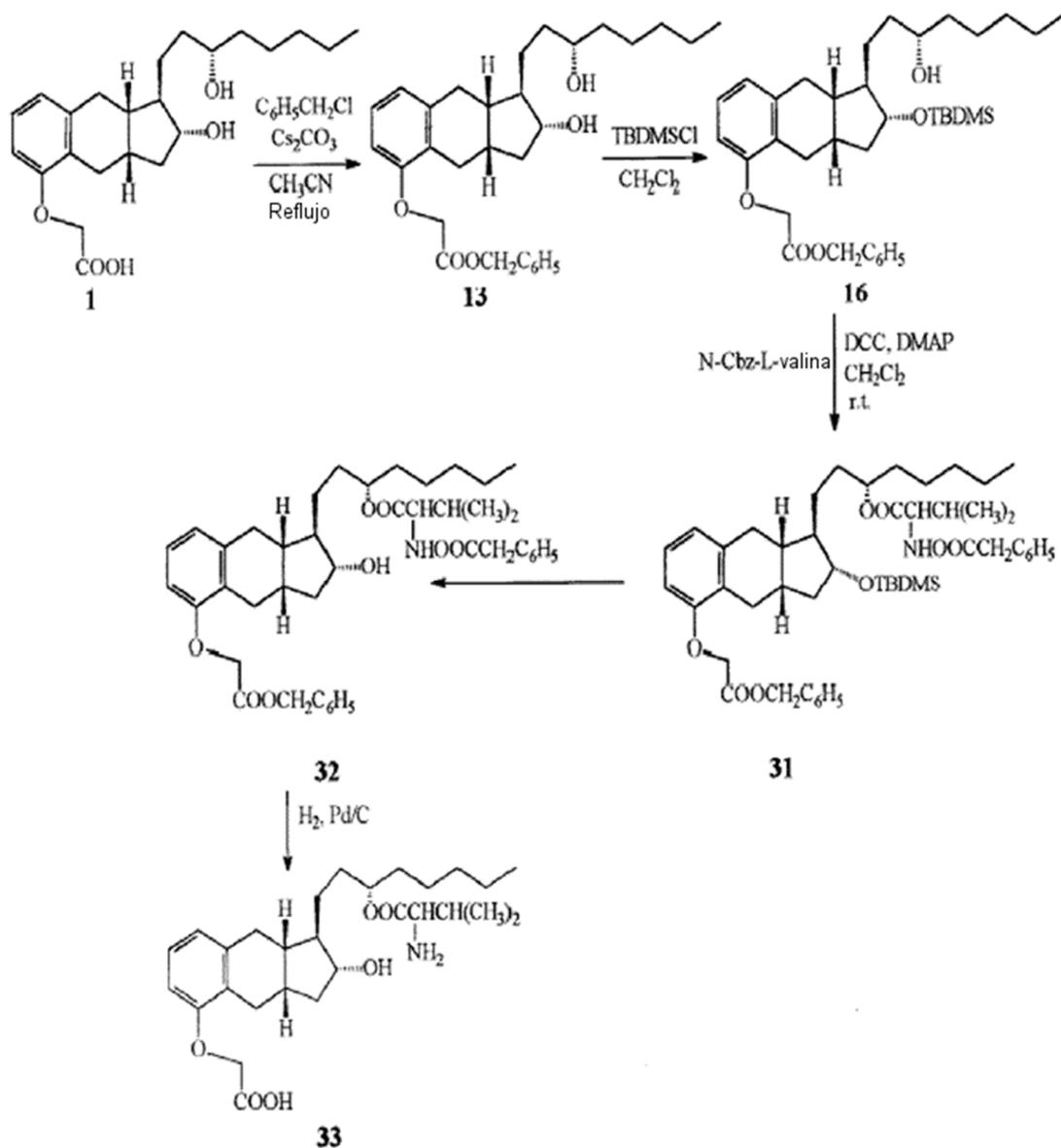
10

15 L-alanil monoéster (30)

La eliminación de los grupos bencilo y N-carbobenciloxi en 29 se alcanza a través de la hidrogenación catalítica como se describe para 12. Se obtiene el éster 30 (rendimiento: 97,2%) como un aceite parcialmente cristalizado, amarillo pálido.

20

Síntesis del 3'-L-valina éster de bencil éster de treprostinil 33



## Síntesis del bencil éster de treprostínil 13

El bencil éster 11 se sintetiza adaptando el procedimiento descrito por J. C. Lee et al. en *Organic Prep. and Proc. Intl.*, 1996, 28(4), 480-483. A una disolución de 1 (620 mg, 1,6 mmoles) y carbonato de cesio (782,4 mg, 2,4 mmoles) en acetonitrilo se le añade bromuro de bencilo (0,48 ml, 4 mmoles) y se agita la mezcla a reflujo durante 1 hora. Tras enfriar a temperatura ambiente, se filtra el precipitado y se concentra el filtrado al vacío. El residuo se disuelve en cloroformo (150 ml) y se lava con una disolución acuosa al 2% de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 30 ml). La capa orgánica se lava con salmuera, se seca en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente al vacío para proporcionar 750 mg del bencil éster 13 en bruto (rendimiento de 98%) como un aceite viscoso amarillo. El bencil éster 13 en bruto puede ser purificado mediante cromatografía en columna (100-0% de diclorometano(metanol) pero puede utilizarse en bruto en las reacciones siguientes.

## Síntesis del bencil éster de treprostínil protegido de TBDMS 16

El procedimiento para la síntesis del bencil éster protegido de TBDMS se adapta a partir de *Organic Synth.*, 1998, 75, 139-145. El bencil éster 13 (679 mg, 1,4 mmoles) se disuelve en diclorometano anhidro (20 ml) y se enfría la disolución hasta 0°C en un baño de hielo. Se añaden imidazol (192 mg, 2,8 mmoles) y cloruro de t-butildimetilsilil (TBDMS1) (420 mg, 2,8 mmoles) y la mezcla se mantiene bajo agitación durante otra media hora en el baño de hielo y a continuación se deja durante la noche a temperatura ambiente. Se añaden 40 ml de agua a la mezcla de reacción y se separa la capa orgánica. Se extrae la capa acuosa con 3 x 50 ml de diclorometano. Las capas orgánicas combinadas son secadas en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtradas y el disolvente se elimina al vacío. Esto proporciona 795 mg del material que demuestra ser una mezcla del bencil éster 5 protegido de mono TBDMS con el bencil éster protegido de bis-TBDMS. Se obtiene 16 en bruto (249 mg) mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluyente 35% de etil acetato/hexano).

## Síntesis de N-cbc-L-valina éster del bencil éster de treprostínil protegido de TBDMS 31

El procedimiento utilizado se adapta a partir de *Tetrahedron Lett.*, 1978, 46, 4475-4478. Una disolución de NCbc-L-valina (127 mg, 0,5 mmoles), N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (111 mg, 0,5 mmoles), compuesto 16 (249 mg, 0,4 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (6 mg, 0,05 mmoles) en diclorometano anhidro (15 ml) se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la esterificación. Se filtra la disolución y se filtra la N,N-diciclohexilurea formada. Se diluye el filtrado con diclorometano (80 ml) y se lava con agua (3 x 30 ml), una disolución de ácido acético acuosa (2 x 30 ml) y a continuación de nuevo con agua (3 x 30 ml). La capa orgánica se seca en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente al vacío proporcionando 369 de 31 en bruto. El 31 en bruto se obtiene mediante cromatografía (gel de sílice, 35% de etil acetato/hexano).

## Síntesis del 3'-N-Cbc-L-valina éster del bencil éster de treprostínil 32

Se alcanza la disolución del grupo de TBDMS en el compuesto 31 utilizando una adaptación del procedimiento descrito en *Org. Letters*, 2000, 2(26), 4177-4180. El N-Cbc-L-valina éster del bencil éster protegido de TBDMS 31 (33 mg, 0,04 mmoles) se disuelve en metanol (5 ml) y se añade tribromuro de tetrabutylamonio (TBATB) (2 mg, 0,004 mmoles). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas hasta que se completa la desprotección de TBDMS. El metanol se evapora y el residuo se introduce en diclorometano. La disolución de diclorometano se lava con salmuera y se seca a continuación en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras filtrar el agente de secado el disolvente se evapora hasta la sequedad proporcionando 30,2 mg del compuesto 32 en bruto.

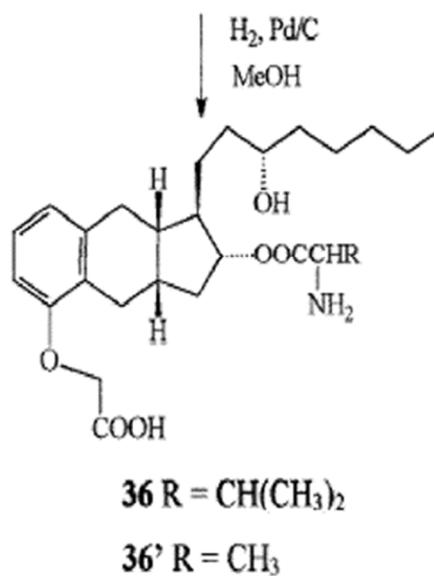
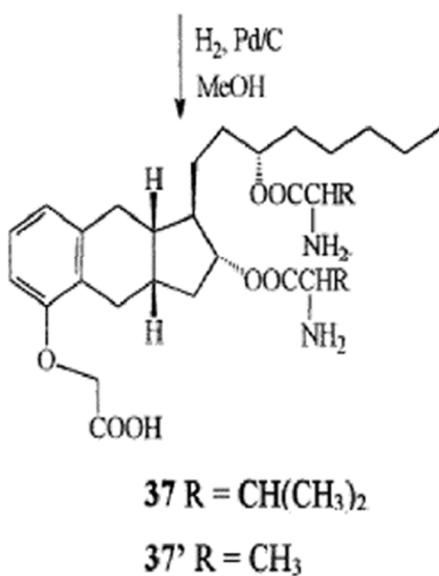
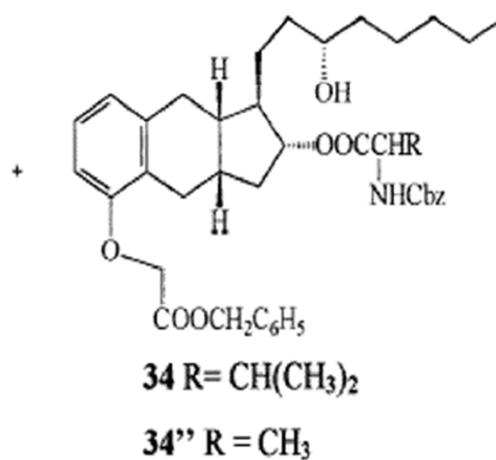
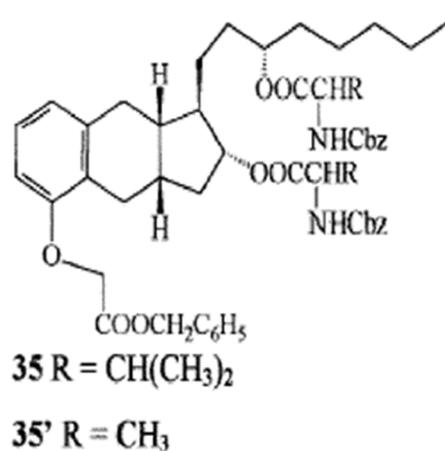
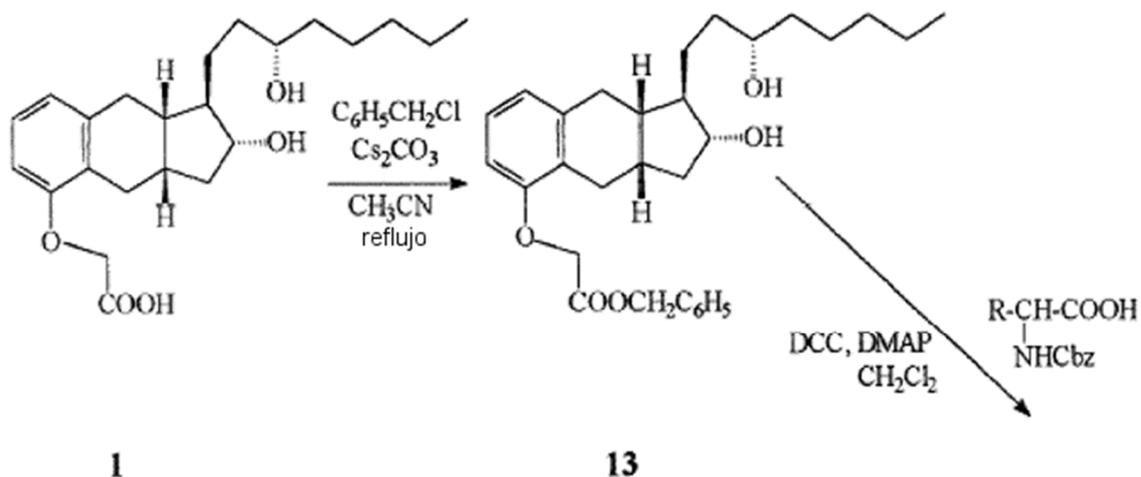
## Síntesis del 3'-L-valina éster de treprostínil 33

Se eliminan los grupos bencilo y bencilo carboxi mediante hidrogenación catalítica a presión atmosférica en presencia de 10% en peso de paladio en carbón activado. El 3'-N-Cbc-L-valina éster del bencil éster 32 (30,2 mg, 0,004 mmoles) se disuelve en metanol (10 ml) y se añade una cantidad catalítica de Pd/C. Se elimina el aire mediante agitación magnética a partir del matraz y se admite a continuación hidrógeno. Se mantiene la mezcla de reacción bajo hidrógeno y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación se elimina el hidrógeno con vacío. La mezcla de reacción se filtra a continuación a través de una capa de celita y se elimina el disolvente al vacío para proporcionar el 3'-L-valina éster de treprostínil 33 en bruto (15 mg, 0,03 mmoles).

## Síntesis del 2-L-valina éster de treprostínil 36/bis-valina éster de treprostínil 37

Síntesis del 2-L-alanina éster de treprostínil 36'/bis-L-alanina éster de treprostínil 37'

60



Síntesis del 2-N-Cbc-L-valina éster de bencil éster de treprostínil 34 y bis-N-Cbc-L-valina éster de bencil éster de treprostínil 35

5

El procedimiento utilizado se adapta a partir de Tetrahedron Lett., 1978, 46, 4475-4478. Se agita a temperatura ambiente una disolución de N-Cbc-L-valina (186 mg, 0,7 mmoles) N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (167 mg, 0,8 mmoles), compuesto 13 (367 mg, 0,8 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (12 mg, 0,09 mmoles) en

5 diclorometano anhidro (15 ml) hasta que se completa la esterificación. La disolución se filtra y se filtra la N,N-diciclohexilurea formada. Se diluye el filtrado con diclorometano (100 ml) y se lava con agua (3 x 50 ml), una disolución de ácido acético acuosa al 5% (2 x 50 ml) y a continuación de nuevo con agua (3 x 50 ml). La capa orgánica se seca en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente al vacío proporcionando 556 mg de producto en bruto. El producto se separa mediante cromatografía (gel de sílice, 35% de etil acetato/hexano) proporcionando 369,4 mg de 2-valina éster 34 y 98 mg de bis-valina éster 35.

10 Síntesis de 2N-Cbc-L-alanina éster de bencil éster de treprostnil 34' y bis-N-Cbc-L-alanina éster de bencil éster de treprostnil 35'

10 El procedimiento utilizado se adapta a partir de Tetrahedron Lett., 1978, 46, 4475-4478. Se agita a temperatura ambiente una disolución de NCbc-L-alanina (187 mg, 0,84 mmoles) N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (175 mg, 0,85 mmoles), compuesto 13 (401 mg, 0,84 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (UMAP) (11,8 mg, 0,1 mmoles) en diclorometano anhidro (15 ml) hasta que se completa la esterificación. La disolución se filtra y se filtra la N,N-diciclohexilurea formada. Se diluye el filtrado con diclorometano (100 ml) y se lava con agua (3 x 50 ml), una disolución de ácido acético acuosa al 5% (2 x 50 ml) y a continuación de nuevo con agua (3 x 50 ml). La capa orgánica se seca en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente al vacío proporcionando 516 mg de producto en bruto. El producto se separa mediante cromatografía (gel de sílice, 35% de etil acetato/hexano) proporcionando 93,4 mg de 2-alanina éster 34' y 227 mg de bis-alanina éster 35'.

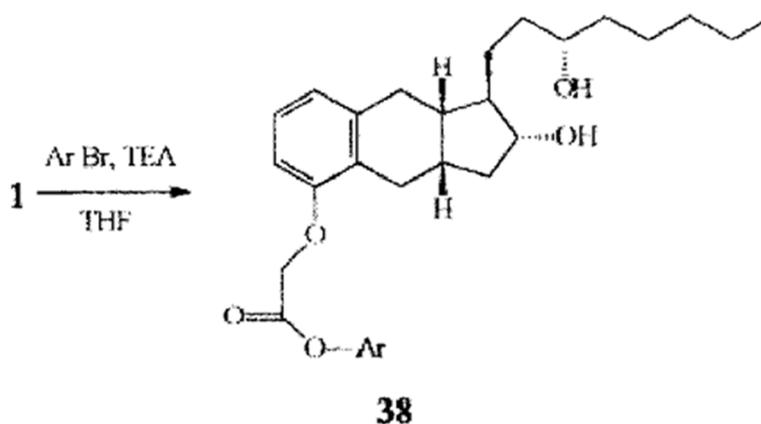
20 Síntesis de 2-L-valina éster de treprostnil 36/bis-L-valina éster de treprostnil 37

25 Los grupos bencilo y bencilo carboxi son eliminados mediante hidrogenación catalítica a presión atmosférica en presencia de 10% en peso de paladio en carbón activado. El 2-N-Cbc-L-valina éster del bencil éster de treprostnil 34 (58,2 mg, 0,08 mmoles)/bis-N-Cbc-L-valina éster del bencil éster de treprostnil 35 (55,1 mg, 0,06 mmoles) se disuelve en metanol (10 ml) y se añade una cantidad catalítica de Pd/C. Se elimina el aire mediante agitación magnética a partir del matraz y se admite a continuación hidrógeno. Se mantiene la mezcla de reacción bajo hidrógeno y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación se elimina el hidrógeno con vacío. La mezcla de reacción se filtra a continuación a través de una capa de celita y se elimina el disolvente al vacío para proporcionar el 2-L-valina éster de treprostnil 36 en bruto (40 mg, 0,078 mmoles)/bis-L-valina éster de treprostnil 37 (23 mg, 0,04 mmoles).

30 Síntesis de 2-L-alanina éster de treprostnil 36'/bis-L-alanina éster de treprostnil 37'

35 Los grupos bencilo y bencilo carboxi son eliminados mediante hidrogenación catalítica a presión atmosférica en presencia de 10% en peso de paladio en carbón activado. El 2-N-Cbc-L-alanina éster del bencil éster de treprostnil 34' (87,4 mg, 0,13 mmoles)/bis-N-Cbc-L-alanina éster del bencil éster de treprostnil 35' (135 mg, 0,15 mmoles) se disuelve en metanol (15 ml) y se añade una cantidad catalítica de Pd/C. Se elimina el aire mediante agitación magnética a partir del matraz y se admite a continuación hidrógeno. Se mantiene la mezcla de reacción bajo hidrógeno y se agita a temperatura ambiente durante 20 horas, a continuación se elimina el hidrógeno con vacío. La mezcla de reacción se filtra a continuación a través de una capa de celita y se elimina el disolvente al vacío para proporcionar el 2-L-valina éster de treprostnil 36' en bruto (57 mg, 0,12 mmoles)/bis-L-alanina éster de treprostnil 37' (82 mg, 0,15 mmoles).

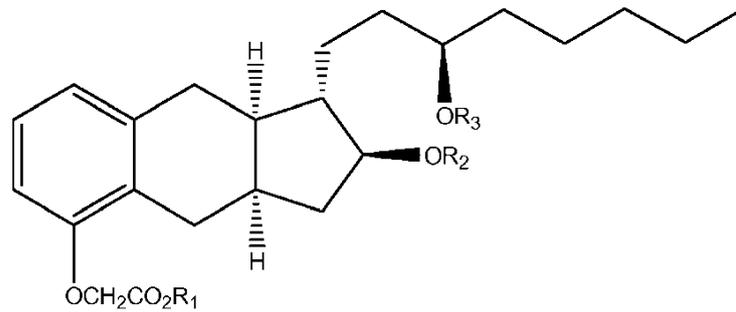
45 Síntesis de los bencil ésteres de treprostnil 38 a-e



50 A 4-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>; b 4-(CH<sub>3</sub>O)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>; c 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>; d 2,4-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>; e 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>

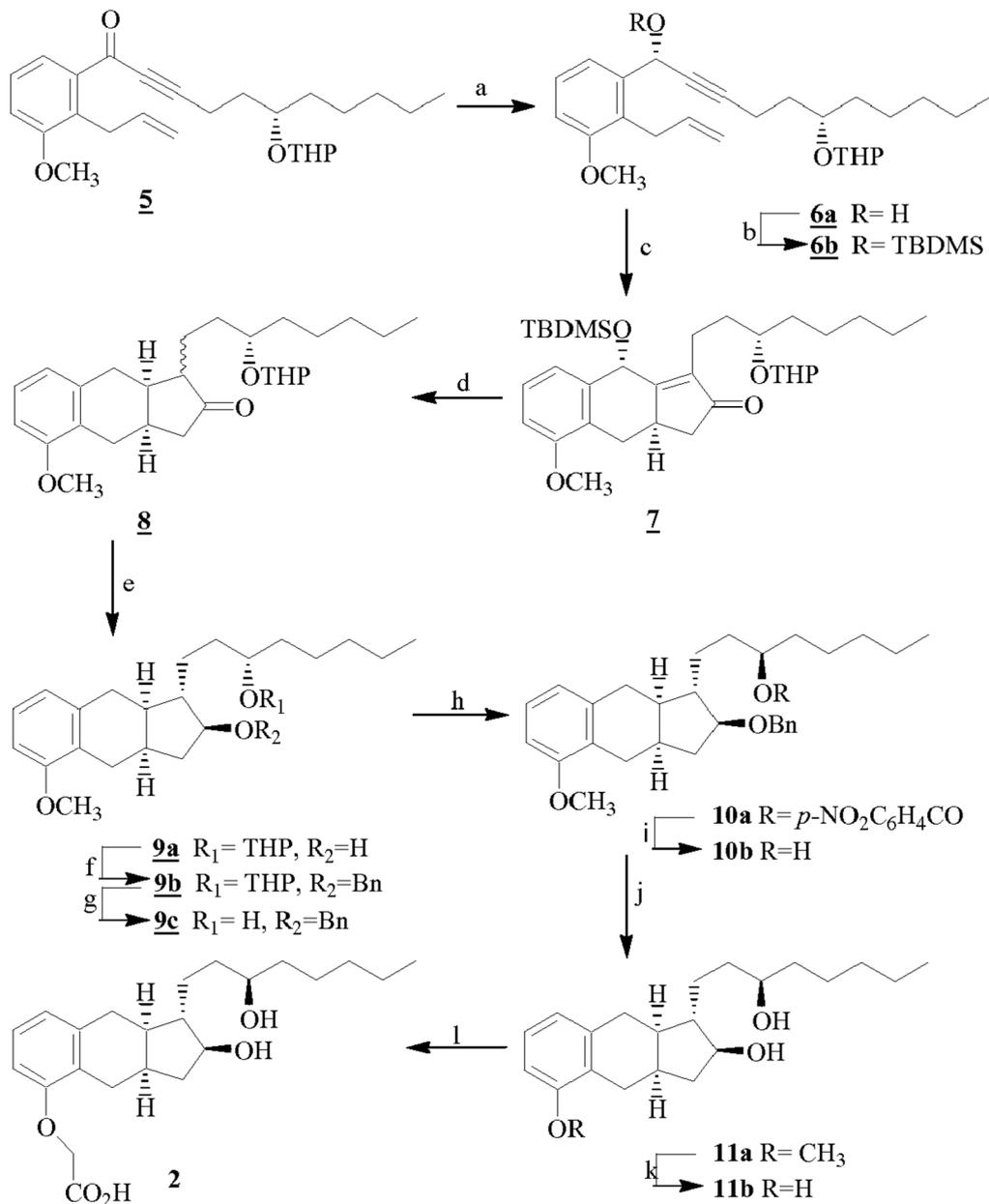
La síntesis de los bencil ésteres de treprostnil 38 a-e se realiza utilizando el procedimiento para el bencil éster 13.

Los enantiómeros de estos compuestos, presentados a continuación, pueden ser sintetizados utilizando reactivos y sintones de quiralidad enantiomérica de los reactivos anteriores.



5

Puede sintetizarse el (-)-treprostinil como se presenta a continuación:



10 (a) (S)-2-metil-CBS-oxazaborolidina, BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, THF, -30°C, 85%. (b) TBDMSCl, imidazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 95%. (c) CO<sub>2</sub>(CO)<sub>8</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 hr. r.t. a continuación CH<sub>3</sub>CN, 2 hr. Reflujo 98%. (d) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd/C (10%), EtOH, 50 psi/24 hr.

78% (e) NaOH, EtOH, NaBH<sub>4</sub>. 95%. (f) BnBr, NaH, THF, 98%. (g) CH<sub>3</sub>OH, TsOH. 96%. (h) i. Ácido p-nitrobenzoico, DEAD, TPP, benceno. (i) CH<sub>3</sub>OH, KOH, 94%. (j) Pd/C (10%), EtOH, 50 psi/2 hr, cuant. (k). Ph<sub>2</sub>PLi, THF. (1) i. ClCH<sub>2</sub>CN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. ii, KOH, CH<sub>3</sub>OH, reflujo. 83% (2 etapas).

5 Brevemente, el enantiómero del fármaco comercial (+)-treprostinil es sintetizado utilizando la reacción de Pauson Khand intramolecular estereoselectiva como etapa clave y la inversión de Mitsunobu del grupo hidroxilo de cadena lateral. La configuración absoluta del (-)-treprostinil es confirmada mediante una estructura de rayos X del derivado de L-valina amida.

10 El procedimiento siguiente es utilizado para preparar la (-)-treprostinil-metil-L-valina amida: a una disolución agitada de (-)-treprostinil (391 mg, 1 mmol) y clorhidrato de L-valina metil éster (184 mg, 1,1 mmoles) en DMF (10 ml) bajo Ar se le añade secuencialmente un reactivo pyBOP (1,04 g, 2 mmoles), diisopropil etil amina (0,52 ml, 3 mmoles). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche (15 horas). La eliminación del disolvente al vacío y purificación mediante cromatografía proporcionan un sólido blanco 12 (481 mg, 86%), que es recristalizado  
15 (10% de etil acetato en hexano) para proporcionar unos cristales adecuados para los rayos X.

Resultarán evidentes para un experto en la materia varias modificaciones de estos esquemas sintéticos que pueden producir unos compuestos adicionales expuestos en la presente memoria.

20 Existen dos barreras principales a la administración del treprostinil en el sistema circulatorio. Una de estas barreras es que el treprostinil experimenta un efecto de primer paso elevado. Tras la primera circulación por el hígado, aproximadamente el 60% de los niveles plasmáticos de treprostinil han sido metabolizados, dejando sólo aproximadamente 40% de la dosis absorbida. Además, una barrera importante a la administración oral del treprostinil es que el compuesto es susceptible de un mecanismo de flujo de salida en el tracto gastrointestinal. La permeabilidad del treprostinil se ha medido a través de monocapas de células Caco-2. Se midió la tasa de transporte apical a basal en  $1,39 \times 10^6$  cm/s, que es indicativa de un compuesto altamente permeable. Sin embargo, la tasa de transporte basal a apical era de  $12,3 \times 10^6$  cm/s, lo que sugiere que el treprostinil es expulsado eficientemente del lado seroso al lado luminal de las células epiteliales. Estos datos sugieren que el treprostinil es susceptible a la glucoproteína P, un transportador multifármaco unido a la membrana. Se cree que la bomba de flujo de salida de glucoproteína P evita que determinados compuestos farmacéuticos atraviesen las células mucosales del intestino delgado y, por lo tanto, resulten absorbidos a la circulación sistémica.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden treprostinil, el compuesto de estructura I o el compuesto de estructura II o sus sales farmacéuticamente aceptables y sus combinaciones en combinación con uno o más inhibidores de glucoproteína P. Se ha demostrado que varios agentes farmacológicos no citotóxicos conocidos inhiben la glucoproteína P, dados a conocer en las patentes US nº 6.451.815, nº 6.469.022 y nº 6.171.786.

Entre los inhibidores de glucoproteína P se incluyen formas solubles en agua de vitamina E, polietilenglicol, poloxámeros, incluyendo Pluronic F-68, óxido de polietileno, derivados de aceite de ricino polioxietileno, incluyendo Cremophor EL y Cremophor RH 40, crisina, (+)-taxifolina, naringenina, diosmina, quercetina, ciclosporina A (también conocida como ciclosporina), verapamilo, tamoxifeno, quinidina, fenotiazinas y 9,10-dihidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil]fenil]-4-acridín-carboxamida o una sal de la misma.

45 Los polietilenglicoles (PEG) son polímeros líquidos y sólidos de fórmula general H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH, en la que n es superior o igual a 4, que presentan diversos pesos moleculares medios comprendidas entre aproximadamente 200 y aproximadamente 20.000. Los PEG también son conocidos como alfa-hidro-omega-hidroxi poli-(oxi-1,2-etanodiol)polietilenglicoles. Por ejemplo, PEG 200 es un polietilenglicol en el que el valor medio de n es 4 y el peso molecular medio de entre aproximadamente 190 y aproximadamente 210. PEG 400 es un polietilenglicol en el que el valor medio de n está comprendido entre 8,2 y 9,1 y el peso molecular medio es de entre aproximadamente 380 y aproximadamente 420. De manera similar, PEG 600, PEG 1500 y PEG 4000 presentan valores medios de n de entre 12,5 y 13,9, de entre 29 y 36 y de entre 68 y 84, respectivamente, y pesos moleculares medios de entre 570 y 630, de entre 1.300 y 1.600 y de entre 3.000 y 3.700, respectivamente, y PEG 1000, PEG 6000 y PEG 8000 presentan pesos moleculares medios de entre 950 y 1.050, de entre 5.400 y 6.600 y de entre 7.000 y 9.000, respectivamente. Los polietilenglicoles de peso molecular medio variable de entre 200 y 20.000 son bien conocidos y apreciados en la técnica farmacéutica y se encuentran fácilmente disponibles.

Los polietilenglicoles preferidos para la utilización en la presente descripción son polietilenglicoles que presentan un peso molecular medio de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 20.000. Los polietilenglicoles más preferidos presentan un peso molecular medio de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 8.000. Más específicamente, los polietilenglicoles más preferidos para la utilización en la presente descripción son PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000, PEG 1450, PEG 1500, PEG 4000, PEG 4600 y PEG 8000. Los polietilenglicoles más preferidos para la utilización en la presente invención son PEG 400, PEG 1000, PEG 1450, PEG 4600 y PEG 8000.

65 El polisorbato 80 es un éster de oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con aproximadamente 20 moles

de óxido de etileno por cada mol de sorbitol y anhídridos de sorbitol. El polisorbato 80 está constituido de derivados de sorbitán mono-9-octadecanoato poli(oxi-1,2-etandiilo). El polisorbato 80, también conocido como Tween 80, es bien conocido y apreciado en la técnica farmacéutica y se encuentra fácilmente disponible.

5 La vitamina E soluble en agua, también conocida como succinato de d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 [TPGS], es un derivado soluble en agua de vitamina E de origen natural. El TPGS puede prepararse mediante la esterificación del grupo ácido del succinato cristalino del ácido d-alfa-tocoferílico con polietilenglicol 1000. Este producto es bien conocido y apreciado en la técnica farmacéutica y se encuentra fácilmente disponible. Por ejemplo, un producto de vitamina E soluble en agua se encuentra disponible comercialmente de Eastman Corporation como vitamina E  
10 TPGS.

15 La naringenina es el compuesto bioflavonoide 2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona y también es conocido como 4',5,7-trihidroxiflavanona. La naringenina es la aglucona de la naringina, que es un producto natural que se encuentra en la fruta y corteza del pomelo. La naringina se encuentra fácilmente disponible para el público a partir de proveedores comerciales.

20 La quercetina es el compuesto bioflavonoide 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirán-4-ona y también es conocido como 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona. La quercetina es la aglucona de la quercitrina, de la rutina y de otros glucósidos. La quercetina se encuentra fácilmente disponible para el público a partir de proveedores comerciales.

25 La diosmina es el compuesto glucósido flavónico natural 7-[[6-O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil)-beta-D-glucopiranosil]oxi]-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona. La diosmina puede aislarse a partir de diversas fuentes vegetales, incluyendo frutas de cítricos. La diosmina se encuentra fácilmente disponible para el público a partir de proveedores comerciales.

30 La crisina es el compuesto natural 5,7-dihidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona, que puede aislarse a partir de diversas fuentes vegetales. La crisina se encuentra fácilmente disponible para el público a partir de proveedores comerciales.

35 Los poloxámeros son copolímeros en bloque de alfa-hidro-omega-hidroxipoli(oxietilén)poli(oxipropilén)poli(oxietileno). Los poloxámeros son una serie de copolímeros en bloque estrechamente relacionados de óxido de etileno y óxido de propileno que se ajustan a la fórmula general  $HO(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$ . Por ejemplo, el poloxámero 124 es un líquido en el que "a" es 12 y "b" es 20, y que presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 2.090 y aproximadamente 2.360; el poloxámero 188 es un sólido en el que "a" es 80 y "b" es 27, y que presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 7.680 y aproximadamente 9.510; el poloxámero 237 es un sólido en el que "a" es 64 y "b" es 37, y que presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 6.840 y aproximadamente 8.830; el poloxámero 338 es un sólido en el que "a" es 141 y "b" es 44, y que presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 12.700 y  
40 aproximadamente 17.400, y el poloxámero 407 es un sólido en el que "a" es 101 y "b" es 56, y que presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 9.840 y aproximadamente 14.600. Los poloxámeros son bien conocidos y apreciados en la técnica farmacéutica y se encuentran fácilmente disponibles comercialmente. Por ejemplo, Pluronic F-68 es un poloxámero disponible comercialmente de BASF Corp. Los poloxámeros preferidos para la utilización en la presente descripción son poloxámeros tales como poloxámero 188, Pluronic F-68 y similares.

45 Los derivados de aceite de ricino polioxietileno son una serie de materiales obtenidos haciendo reaccionar cantidades variables de óxido de etileno con aceite de ricino o aceite de ricino hidrogenado. Estos derivados de aceite de ricino polioxietileno son bien conocidos y apreciados en la técnica farmacéutica y se encuentran disponibles comercialmente varios tipos diferentes de material, incluyendo los Cremophors disponibles de BASF Corporation. Los derivados de aceite de ricino polioxietileno son mezclas complejas de diversos componentes hidrófobos e hidrófilos. Por ejemplo, en el aceite de ricino de polioxilo 35 (también conocido como Cremophor EL), los constituyentes hidrófobos comprenden aproximadamente 83% de la mezcla total, siendo el componente principal, ricinoleato de glicerol polietilenglicol. Entre otros constituyentes hidrófobos se incluyen ésteres de ácido graso de polietilenglicol conjuntamente con cierta cantidad de aceite de ricino no modificado. La parte hidrófila del  
50 aceite de ricino de polioxilo 35 (17%) consiste de polietilenglicoles y etoxilatos de glicerilo.

55 En el aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40 (Cremophor RH 40), aproximadamente 75% de los componentes de la mezcla son hidrófobos. Dichos componentes comprenden principalmente ésteres de ácido graso de glicerol polietilenglicol y ésteres de ácido graso de polietilenglicol. La parte hidrófila consiste de polietilenglicoles y etoxilatos de glicerol. Los derivados de aceite de ricino polioxietileno preferidos para la utilización en la presente invención con  
60 aceite de ricino de polioxilo 35, tal como Cremophor EL, y aceite de ricino hidrogenado de polioxilo 40, tal como Cremophor RH 40. Cremophor EL y Cremophor RH 40 se encuentran disponibles comercialmente de BASF Corporation.

65 El óxido de polietileno es un homopolímero no iónico de óxido de etileno que se ajusta a la fórmula general  $(OCH_2CH_2)_n$  en la que n representa el número medio de grupos de oxietileno. Los óxidos de polietileno se

encuentran disponibles en diversos grados que son bien conocidos y apreciados por la técnica farmacéutica y se encuentran disponibles comercialmente varios tipos diferentes de material. El grado preferido de óxido de polietileno es NF y similares, los cuales se encuentran disponibles comercialmente.

5 La (+)-taxifolina es (2R-trans)-2-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dihidro-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirán-4-ona. Otros nombres comunes para (+)-taxifolina son (+)-dihidroquercetina, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona, diquertina, taxifoliol y distilina. La (+)-taxifolina es bien conocida y apreciada en la técnica farmacéutica y comercialmente se encuentra fácilmente disponible.

10 El inhibidor de glucoproteína P referente para la utilización en la presente descripción es la vitamina E soluble en agua, tal como la vitamina E TPGS y los polietilenglicoles. De los polietilenglicoles, los inhibidores de glucoproteína P más preferidos son PEG 400, PEG 1000, PEG 1450, PEG 4600 y PEG 8000.

15 La administración de un inhibidor de glucoproteína P puede ser mediante cualquier vía por la que el inhibidor de glucoproteína P se encontrará biodisponible en cantidades eficaces, incluyendo las vías oral y parenteral. Aunque la administración oral resulta preferida, los inhibidores de glucoproteína P también pueden administrarse por vía intravenosa, tópica, subcutánea, intranasal, rectal, intramuscular o por otras vías parenterales. En el caso de que se administre por vía oral, el inhibidor de glucoproteína P puede administrarse en cualquier forma de administración conveniente, incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, líquidos, suspensiones y similares.

20 Generalmente, una cantidad inhibidora eficaz de glucoproteína P de un inhibidor de glucoproteína P es aquella cantidad que resulta eficaz para proporcionar la inhibición de la actividad del sistema de transporte activo mediado por glucoproteína P presente en el intestino. Una cantidad de inhibición de la glucoproteína P eficaz puede variar entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 1.000 mg de inhibidor de glucoproteína P como dosis diaria dependiendo del inhibidor de glucoproteína P particular seleccionado, la especie de paciente que debe tratarse, el régimen de administración y otros factores que se encuentran perfectamente comprendidos dentro de las capacidades que posee el experto ordinario en las técnicas médicas para la evaluación y valoración. Sin embargo, una cantidad preferida típicamente es de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, y una cantidad más preferida típicamente es de entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg. Las cantidades anteriormente indicadas de un inhibidor de glucoproteína P pueden administrarse entre una y múltiples veces al día. Típicamente en la administración oral, las dosis se administran en un régimen que requiere una, dos o tres dosis al día.

35 En el caso de que se seleccione vitamina E soluble en agua o un polietilenglicol como inhibidor de glucoproteína P, una cantidad preferida típicamente será de entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 1.000 mg; una cantidad más preferida típicamente será de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg y una cantidad preferida adicional típicamente será de entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg. La cantidad más preferida de vitamina E soluble en agua o un polietilenglicol será de entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg. Las cantidades anteriormente indicadas de vitamina E soluble en agua o polietilenglicol pueden administrarse entre una y múltiples veces cada día. Típicamente, las dosis se administran en un régimen que requiere una, dos o tres dosis al día, resultando preferidas una y dos.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "coadministración" se refiere a la administración en un paciente de tanto un compuesto que presenta propiedades vasodilatadoras y/o inhibitoras de la agregación plaquetaria, incluyendo los compuestos indicados en las patentes US nº 4.306.075 y nº 5.153.222 que incluyen treprostinil y las estructuras I y II indicadas en la presente memoria, como un inhibidor de glucoproteína P de manera que el efecto farmacológico del inhibidor de glucoproteína P en la inhibición del transporte mediado por la glucoproteína P en el intestino es manifiesto en el momento en que está absorbiendo el compuesto por el mismo. Evidentemente el compuesto y el inhibidor de glucoproteína P pueden administrarse en tiempos diferentes o concurrentemente. Por ejemplo, el inhibidor de glucoproteína P puede administrarse en el paciente en un tiempo anterior a la administración del compuesto terapéutico, de manera que se pretrate el paciente en preparación de la administración del compuesto vasodilatador. Además, puede resultar conveniente que el paciente resulte pretratado con el inhibidor de glucoproteína P de manera que se alcancen niveles de equilibrio del inhibidor de glucoproteína P antes de la administración de la primera dosis del compuesto terapéutico. También se encuentra contemplado que los compuestos vasodilatadores y/o inhibidores de la agregación plaquetaria y el inhibidor de glucoproteína P se administran esencialmente de manera concurrente en formas de administración separadas o en la misma forma de administración oral.

60 La presente descripción expone además que el compuesto vasodilatador y/o inhibidor de la agregación plaquetaria y el inhibidor de glucoproteína P puedan administrarse en formas de administración separadas o en la misma forma de administración oral combinada. La coadministración del compuesto y el inhibidor de glucoproteína P puede llevarse a cabo convenientemente mediante la administración oral de una forma de administración combinada que contenga tanto el compuesto como el inhibidor de glucoproteína P.

65 De esta manera, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica de combinación para la administración oral que comprende una cantidad eficaz vasodilatadora y de inhibición de la agregación plaquetaria

de un compuesto indicado en la presente memoria y una cantidad eficaz de inhibición de la glucoproteína P de un inhibidor de glucoproteína P. Dicha forma de administración oral de combinación puede proporcionar la liberación inmediata de tanto el compuesto vasodilatador y/o inhibidor de la agregación plaquetaria como de inhibidor de la glucoproteína P o puede proporcionar la liberación sostenida de compuesto vasodilatador y/o compuesto inhibidor de la agregación plaquetaria, de inhibidor de glucoproteína P o de ambos. El experto en la materia podrá determinar fácilmente las propiedades apropiadas de la forma de administración de combinación de manera que se consiga el efecto deseado de coadministración del compuesto vasodilatador y/o inhibidor de la agregación plaquetaria y del inhibidor de la glucoproteína P.

De acuerdo con lo anterior, la presente descripción se refiere a una mejora de la biodisponibilidad de treprostinil, un fármaco de estructura I o II, y sus sales farmacéuticamente aceptables mediante la coadministración de un inhibidor de la glucoproteína P. Mediante la coadministración de dichos compuestos y un inhibidor de glucoproteína P, puede incrementarse la cantidad total del compuesto respecto a la que circularía de otro modo en la sangre en ausencia del inhibidor de glucoproteína P. De esta manera, la coadministración según la presente descripción puede provocar un incremento del área bajo la curva (ABC) de los presentes compuestos respecto al observado al administrar los compuestos separadamente.

Típicamente, la biodisponibilidad se evalúa midiendo la concentración de fármaco en la sangre en diversos puntos del tiempo después de la administración del fármaco, seguido de la integración de los valores obtenidos durante el tiempo, rindiendo la cantidad total de fármaco circulante en la sangre. Esta medición, denominada "área bajo la curva" (ABC), es una medida directa de la biodisponibilidad del fármaco. Se cree que, preferentemente, derivar el treprostinil en los grupos hidroxilo R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> puede ayudar a superar las barreras para el suministro de treprostinil oral bloqueando estos sitios, y por lo tanto la tasa metabólica puede ser reducida para permitir que el compuesto evite algunos de los primeros efectos de paso. Asimismo, con un aminoácido expuesto, el profármaco puede ser absorbido de manera activa a partir del sistema transportador dipeptídico que existe en el tubo gastrointestinal. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a unos compuestos, tales como los descubiertos en las estructuras I y II, que reducen el primer efecto de paso del treprostinil y/o reducen el mecanismo de eflujo del tubo gastrointestinal.

Preferentemente, en el procedimiento de tratamiento de la hipertensión en un sujeto, el sujeto es un mamífero y más preferentemente un ser humano.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir cualquiera de los compuestos de cualquiera de las formas de realización indicadas anteriormente, solas o en combinación, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable tal como los indicados en la presente memoria.

La presente descripción se refiere asimismo a unas composiciones que pueden prepararse mezclando uno o más compuestos de la presente descripción, o sus sales farmacéuticamente aceptables, con portadores, excipientes, ligantes diluyentes o similares farmacéuticamente aceptables, para tratar o mejorar una diversidad de trastornos relacionados con la vasoconstricción y/o la agregación plaquetaria. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a la cantidad de uno o más compuestos de la presente descripción suficiente para resultar en la mejora de síntomas del trastorno. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como los procedimientos convencionales de granulado, mezcla, disolución, encapsulado, liofilización, emulsificación o levigación, entre otros. Las composiciones pueden encontrarse en forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las presentes composiciones pueden formularse para diversas vías de administración, por ejemplo mediante la administración oral, mediante la administración transmucosal, mediante administración rectal, mediante administración transdérmica o subcutánea, así como inyección intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular o intraventricular. El compuesto o los compuestos de la presente descripción también puede administrarse mediante cualquiera de las vías anteriormente indicadas, por ejemplo de manera local y no sistémica, tal como inyección en forma de una formulación de liberación sostenida. Las formas de administración siguientes se proporcionan a título de ejemplo y no deben interpretarse como limitativas de la presente descripción.

Para la administración oral, bucal y sublingual, resultan aceptables como formas sólidas de administración, polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, perlas de gel y pastillas. Éstas pueden prepararse, por ejemplo, mediante la mezcla de uno o más compuestos de la presente descripción, o sus sales farmacéuticamente aceptables, con por lo menos un aditivo o excipiente, tal como un almidón u otro aditivo. Los aditivos o excipientes adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, sorbitol, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábica, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros o glicéridos sintéticos o semisintéticos, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa y/o polivinilpirrolidona. Opcionalmente, las formas de administración oral pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tal como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como el estearato de magnesio, o conservantes tal como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente desintegrante, ligantes, espesantes, tampones, edulcorantes, agentes saborizantes o agentes perfumantes. Adicionalmente, pueden añadirse para la identificación tintes o pigmentos. Los comprimidos pueden tratarse adicionalmente con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.

Adicionalmente, los ensayos muestran que los presentes compuestos, que incluyen el treprostinil, y en particular los compuestos de estructura I y II presentan una biodisponibilidad aumentada cuando se suministran al duodeno. Por lo tanto, ventajosamente, la presente descripción implica la administración preferida del compuesto deseado en el duodeno, así como formulaciones farmacéuticas que consiguen la administración duodenal. La administración duodenal puede llevarse a cabo mediante cualesquiera medios conocidos en la técnica. Preferentemente, los presentes compuestos pueden formularse en una forma de administración de recubrimiento entérico. Generalmente, las formas de administración de recubrimiento entérico habitualmente se recubren con un polímero que no es soluble a pH bajo, pero se disuelven rápidamente al exponerlas a condiciones de pH de 3 o superior. Dicha forma de administración aprovecha la diferencia de pH entre el estómago, que es de aproximadamente 1 a 2, y el duodeno, en donde el pH tiende a ser superior a 4.

Las formas de administración líquidas para la administración oral pueden encontrarse en forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones, mezclas en suspensión y soluciones farmacéuticamente aceptables, las cuales pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de suspensiones o soluciones líquidas utilizando un líquido estéril, tal como, aunque sin limitación, un aceite, agua, un alcohol y combinaciones de los mismos. Pueden añadirse surfactantes, agentes de suspensión y agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados para la administración oral o parenteral.

Tal como se ha indicado anteriormente, entre las suspensiones pueden incluirse aceites. Entre dichos aceites se incluyen, aunque sin limitación, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación en suspensión puede contener además ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Entre las formulaciones en suspensión pueden incluirse alcoholes, tales como, aunque sin limitación, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. En formulaciones en suspensión también pueden utilizarse éteres, tales como, aunque sin limitación, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y petrolato, y agua.

Entre las formas de administración inyectables se incluyen generalmente suspensiones acuosas o suspensiones aceitosas, las cuales pueden prepararse utilizando un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden presentarse en fase solución o en forma de una suspensión, que se prepara con un solvente o diluyente. Entre los solventes o vehículos aceptables se incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, pueden utilizarse aceites estériles como solventes o agentes de suspensión. Preferentemente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono-, di- o triglicéridos.

Para la inyección, la formulación farmacéutica pueden ser unos polvos adecuados para la reconstitución con una solución apropiada, tal como se ha indicado anteriormente. Entre los ejemplos de ellos se incluyen de manera no limitativa, la liofilización, los polvos secados mediante centrifugación o pulverización, los polvos amorfos, los gránulos, los precipitados o las partículas. Para la inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, surfactantes, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de los mismos. Los compuestos pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, tal como la inyección de bolo o la infusión continua. Una forma de administración unitaria para la inyección puede ser en ampollas o en recipientes multidosis.

Además de dichas formas de administración representativas que se han indicado anteriormente, los excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos por el experto en la materia y, de esta manera, se encuentran incluidos en la presente descripción. Dichos excipientes y portadores se describen en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey, 1991, que se incorpora a la presente memoria como referencia.

Las formulaciones de la descripción pueden diseñarse para que sean de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada y de liberación sostenida, tal como se ha indicado anteriormente. De esta manera, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para la liberación controlada o para la liberación lenta.

Las composiciones de la invención pueden comprender además, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada con el fin de proporcionar un almacenamiento y/o efecto de administración prolongado. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden comprimirse formando pellets o cilindros e implantarse intramuscularmente o subcutáneamente en forma de inyecciones de depósito o como implantes, tal como estents. Dichos implantes pueden utilizar materiales inertes conocidos, tales como siliconas y polímeros biodegradables.

Las dosis específicas pueden ajustarse según las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, las condiciones de salud generales, el sexo y la dieta del sujeto, los intervalos de dosis, las vías de administración, la tasa de excreción y las combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que

contienen cantidades eficaces son adecuadas dentro de los límites de la experimentación rutinaria y por lo tanto, adecuadas dentro del alcance de la presente descripción.

La dosis terapéuticamente eficaz puede variar según la vía y la forma de administración. El compuesto o compuestos preferidos de la presente descripción es una formulación que muestra un índice terapéutico elevado. El índice terapéutico es la proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos que pueden expresarse como la proporción entre la LD<sub>50</sub> y la ED<sub>50</sub>. La LD<sub>50</sub> es la dosis letal para el 50% de la población y la ED<sub>50</sub> es la dosis terapéuticamente eficaz para el 50% de la población. La LD<sub>50</sub> y la ED<sub>50</sub> se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos de células animales o animales experimentales.

Un procedimiento de preparación de formulaciones farmacéuticas incluye la mezcla de cualquiera de los compuestos anteriormente indicados con un portador farmacéuticamente aceptable y agua o una solución acuosa.

Entre las formulaciones farmacéuticas y medicamentos según la descripción se incluyen cualquiera de los compuestos de estructura I, II o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos indicados anteriormente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. De esta manera, el compuesto de la descripción puede utilizarse para preparar medicamentos y formulaciones farmacéuticas. Preferentemente, los medicamentos y formulaciones farmacéuticas comprenden cualquiera de los compuestos de estructura I o sus sales farmacéuticamente aceptables. La descripción se refiere asimismo a la utilización de cualquiera de los compuestos de estructura I, II o sus sales farmacéuticamente aceptables por sus efectos de tipo prostaciclina. La descripción se refiere asimismo a la utilización de cualquiera de los compuestos de estructura I, II o sus sales farmacéuticamente aceptables o para el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

La descripción se refiere además a kits que comprenden uno o más de los compuestos de estructura I o II conjuntamente con instrucciones para la utilización de los compuestos. Preferentemente, se proporcionan kits que comprenden los compuestos con efectos de tipo prostaciclina indicados en la presente memoria en combinación con uno o más inhibidores de la glucoproteína P, conjuntamente con instrucciones para la utilización de los kits.

A título ilustrativo, un kit de la descripción puede incluir uno o más comprimidos, cápsulas, pastillas, perlas de gel o formulaciones líquidas que contienen el biointensificador de la presente descripción, y uno o más comprimidos, cápsulas, pastillas, perlas de gel o formulaciones líquidas que contienen un compuesto de efecto de tipo prostaciclina indicado en la presente memoria en cantidades de dosis comprendidas dentro de los intervalos indicados anteriormente. Dichos kits pueden utilizarse en hospitales, clínicas, consultas médicas o en los hogares de los pacientes, para facilitar la coadministración de los agentes potenciadores y los agentes diana. Los kits también deberían incluir como inserto, información de administración impresa para la coadministración de los agentes potenciador y diana.

Las abreviaturas y definiciones siguientes se utilizan a lo largo de toda la presente solicitud:

generalmente la referencia a un determinado elemento, tal como hidrógeno o H, pretende incluir todos los isótopos de dicho elemento. Por ejemplo en el caso de que un grupo R se defina que incluye hidrógeno o H, también incluye deuterio y tritio.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "inhibidor de la glucoproteína P" se refiere a compuestos orgánicos que inhiben la actividad del sistema de transporte activo mediado por la glucoproteína P presente en el intestino. El sistema de transporte activamente transporta fármacos que han sido absorbidos a través de la luz intestinal y hacia el interior del epitelio intestinal de salida nuevamente a la luz. La inhibición de este sistema de transporte activo mediado por la glucoproteína P provocará que se transporte menos fármaco de nuevo hacia la luz y, de esta manera, incrementará el transporte neto de fármaco a través del epitelio intestinal e incrementará la cantidad de fármaco finalmente disponible en la sangre.

Las expresiones "biodisponibilidad oral" y "biodisponibilidad con la administración oral" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles sanguíneos/plasmáticos) de una cantidad dada de fármaco administrar por vía oral en un paciente.

La expresión "alquilo no sustituido" se refiere a grupos alquilo que no contienen heteroátomos. De esta manera, la expresión incluye grupos alquilo de cadena lineal, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. La expresión incluye además isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal, incluyendo, aunque sin limitación, los siguientes, que se proporcionan a título de ejemplo: -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), y otros. La expresión incluye además grupos de alquilo cíclico, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo y dichos anillos sustituidos con grupos alquilo de cadena lineal o ramificada tal como se ha definido anteriormente. La expresión incluye además grupos de alquilo policíclico, tales como, aunque sin limitación, adamantilo, norbornilo y

biciclo[2.2.2]octilo y dichos anillos sustituidos con grupos de alquilo lineal y ramificada tal como se ha definido anteriormente. De esta manera, la expresión grupos alquilo no sustituido incluye grupos de alquilo primario, grupos de alquilo secundario y grupos de alquilo terciario. Los grupos alquilo no sustituidos pueden unirse a uno o más átomos de carbono, uno o más átomos de oxígeno, uno o más átomos de nitrógeno y/o uno o más átomos de azufre en el compuesto parental. Entre los grupos alquilo no sustituidos preferidos se incluyen grupos alquilo de cadena lineal o ramificada y grupos de alquilo cíclico que presentan entre 1 y 20 átomos de carbono. Los grupos alquilo no sustituidos más preferidos de entre dichos grupos presentan entre 1 y 10 átomos de carbono, mientras que resultan todavía más preferidos de entre dichos grupos los que presentan entre 1 y 5 átomos de carbono. Entre los grupos alquilo no sustituidos más preferidos se incluyen grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que presentan entre 1 y 3 átomos de carbono y entre ellos se incluyen metilo, etilo, propilo y  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .

La expresión "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo no sustituido tal como se ha definido anteriormente en el que uno o más enlaces con uno o más carbonos o uno o más hidrógenos son sustituidos por un enlace con átomos no de hidrógeno y no de carbono, tal como, aunque sin limitación, un átomo de halógeno en haluros tales como F, Cl, Br e I, y un átomo de oxígeno en grupos tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi, grupos ariloxi y grupos éster; un átomo de azufre en grupos tales como grupos tiol, grupos alquil- y aril-sulfuro, grupos sulfona, grupos sulfonilo y grupos sulfóxido; un átomo de nitrógeno en grupos tales como aminas, amidas, alquilaminas, dialquilaminas, arilaminas, alquilarylaminas, diarilaminas, N-óxidos, imidas y enamidas; un átomo de silicio en grupos tales como en grupos triarilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarilsililo y grupos triarilsililo, y otros heteroátomos en otros grupos diversos. Entre los grupos alquilo sustituidos se incluyen además grupos en los que uno o más enlaces a uno o más átomos de carbono o de hidrógeno se sustituyen por un enlace a un heteroátomo, tal como oxígeno en los grupos carbonilo, carboxilo y éster; nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Entre los grupos alquilo sustituidos preferidos se incluyen, entre otros, grupos alquilo en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se sustituyen por uno o más enlaces a átomos de flúor. Un ejemplo de un grupo alquilo sustituido es el grupo trifluorometilo y otros grupos alquilo que contienen el grupo trifluorometilo. Entre otros grupos alquilo se incluyen aquellos en los que uno o más enlaces a un átomo de carbono o hidrógeno se sustituyen por un enlace a un átomo de oxígeno de manera que el grupo alquilo sustituido contenga un grupo hidroxilo, alcoxi, ariloxi o hetrocicliciloxi. Entre todavía otros grupos alquilo se incluyen grupos alquilo que presentan un grupo amina, alquilamina, dialquilamina, arilamina, (alquil)(aril)amina, diarilamina, heterociclicilamina, (alquil)(heterociclicil)amina, (aril)(heterociclicil)amina o diheterociclicilamina.

La expresión "arilalquilo no sustituido" se refiere a grupos alquilo no sustituidos tal como se ha definido anteriormente en los que un enlace de hidrógeno o de carbono del grupo alquilo no sustituido se sustituye por un enlace a un grupo arilo tal como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, metilo ( $-\text{CH}_3$ ) es un grupo alquilo no sustituido. En el caso de que un átomo de hidrógeno del grupo metilo se sustituya por un enlace a un grupo fenilo, tal como en el caso de que el carbono del metilo se una a un carbono de benceno, el compuesto es un grupo arilalquilo no sustituido (es decir, un grupo bencilo). De esta manera, la expresión incluye, aunque sin limitación, grupos tales como bencilo, difenilmetilo y 1-feniletilo ( $-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)(\text{CH}_3)$ ), entre otros.

La expresión "arilalquilo sustituido" presenta el mismo significado con respecto a los grupos arilalquilo no sustituidos que los grupos arilo sustituidos con respecto a los grupos arilo no sustituidos. Sin embargo, un grupo arilalquilo sustituido incluye además grupos en los que un enlace de carbono o de hidrógeno de la parte alquilo del grupo se sustituye por un enlace a un átomo no de carbono o no de hidrógeno. Entre los ejemplos de grupos de arilalquilo sustituido se incluyen de manera no limitativa  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})(\text{C}_6\text{H}_5)$  y  $-\text{CH}_2(2\text{-metilfenilo})$ , entre otros.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal con una base inorgánica, base orgánica, ácido inorgánico, ácido orgánico o aminoácido básico o ácido. Como sales de bases inorgánicas, la descripción incluye, por ejemplo, metales alcalinos tales como sodio o potasio; metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio o aluminio, y amonio. Como sales de bases orgánicas, la descripción incluye, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina. Como sales de ácidos inorgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido borhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Como sales de ácidos orgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico. Como sales de aminoácidos básicos, la presente descripción incluye, por ejemplo, arginina, lisina y ornitina. Entre los aminoácidos ácidos se incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

El término "tratamiento" en el contexto de la presente invención se refiere a un alivio de los síntomas asociados a una condición, trastorno o enfermedad biológica, o detienen la progresión o agravamiento adicional de dichos síntomas, o la prevención o la profilaxis de la enfermedad o el trastorno. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de los pacientes que presentan hipertensión pulmonar, el tratamiento con éxito puede incluir una reducción, la vasodilatación directa de lechos vasculares arteriales pulmonares y/o sistémicas y la inhibición de la agregación plaquetaria. El resultado de dicha vasodilatación generalmente reduce la poscarga del ventrículo derecho e izquierdo y una salida cardíaca incrementada y el volumen sistólico. También pueden resultar efectos inotrópicos y lusitrópicos negativos relacionados con la dosis. La manifestación externa de dichos efectos físicos puede incluir una reducción de los síntomas de la hipertensión, tal como la falta de aliento y un incremento de la capacidad de ejercicio.

La presente invención descrita de manera general de esta manera, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a título ilustrativo y no limitativos de la presente invención.

5 **Ejemplos**

Se proporcionan unos ejemplos no relacionados con una sal de dietanolamina de treprostiniil para comparación o como información de antecedentes y no forman parte de la invención.

10 **Ejemplo 1**

En el presente ejemplo, se comparó la biodisponibilidad del treprostiniil en ratas tras la administración oral, intraduodenal, intracolónica y por la vena portal con el fin de determinar las posibles barreras para la biodisponibilidad. Además de la biodisponibilidad, se determinaron varios parámetros farmacocinéticos.

15

Administración en animales

Se evaluó la biodisponibilidad del treprostiniil en ratas Sprague-Dawley macho. Se obtuvieron quince ratas modificadas quirúrgicamente de Hilltop Lab Animals (Scottsdale, PA). Los animales fueron enviados de Hilltop a Absorption Systems' West Chester University Facility (West Chester, PA), en donde fueron alojados durante por lo menos veinticuatro horas antes de ser utilizados en el estudio. Los animales fueron sometidos a ayuno durante aproximadamente 16 horas antes de la administración. Las quince ratas utilizadas en el presente estudio se dividieron en cinco grupos (I, II, III, IV y V).

25 En la tabla 1 se presenta el peso de los animales y el régimen de administración.

Tabla 1

Grupo	Nº de rata	Peso (g)	Vía de administración	Día de estudio	Volumen de dosis (ml/kg)	Dosis (mg/kg)
I	118	327	Intravenosa	0	2	1
	119	329	Intravenosa	0	2	1
	120	320	Intravenosa	0	2	1
II	121	337	Vena intraportal	0	2	1
	122	319	Vena intraportal	0	2	1
	123	330	Vena intraportal	0	2	1
III	124	329	Intraduodenal	0	2	1
	125	331	Intraduodenal	0	2	1
	126	324	Intraduodenal	0	2	1
IV	127	339	Intracolónica	0	2	1
	128	333	Intracolónica	0	2	1
	129	320	Intracolónica	0	2	1
V	130	293	Oral	0	2	1
	131	323	Oral	0	2	1
	132	332	Oral	0	2	1

30 Las muestras se extrajeron en los puntos temporales siguientes.

IV e IPV: 0 (predosis) 2, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 minutos

35

ID, IC y Oral: 0 (predosis) 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos

Se recogieron aproximadamente 0,50 a 0,75 ml de sangre completa de la vena yugular de una rata canulada. La sangre se transfirió a tubos heparinizados y se dejó sobre hielo hasta la centrifugación. Tras la centrifugación, se depositó el plasma sobre hielo hasta congelarla a -70°C antes de transportarla a Absorption Systems.

40 Análisis de muestras de plasma

Las muestras se analizaron utilizando los procedimientos siguientes:

Preparación de solución de administración

45

Se preparó la solución de administración mediante la combinación de 15,2 mg de treprostiniil dietanolamina (12,0 mg de la forma ácida libre) con 24 ml de dextrosa al 5%. A continuación, se sonicó la solución hasta la disolución,

## ES 2 670 872 T3

obteniendo una concentración final de 0,5 mg/ml. El pH final de la solución de administración era de 4,6. En el momento de la administración la solución de administración era transparente y homogénea.

### Patrones y preparación de las muestras

Para determinar la concentración del treprostínil en las muestras de plasma de rata, se prepararon patrones con plasma de rata recolectado en heparina obtenido de Lampire Biological Laboratories (lote n° 021335263) que manera que contuviesen 1.000, 300, 100, 30, 10, 3, 1 y 0,3 ng/ml de treprostínil. Los patrones plasmáticos se trataron de manera idéntica a las muestras de plasma.

Se prepararon muestras de plasma mediante extracción en fase sólida. Tras equilibrar una placa de extracción, se introdujeron 150 µl de una muestra de plasma en el pocillo y se aplicó vacío. A continuación, se lavó el lecho de extracción con 600 µl de acetonitrilo: agua desionizada (25:75) con ácido fórmico al 0,2%. El compuesto se eluyó con 600 µl de 90% acetonitrilo y 10% acetato amónico. Se recolectaron los eluidos y se evaporaron a sequedad. El residuo se reconstituyó con 150 µl de acetonitrilo: agua desionizada (50:50) con 0,5 µg/ml de tolbutamida (a modo de patrón interno).

### Condiciones de HPLC

Columna:	Keystone Hypersil BDS C18 30 x 2 mm de d.i., 3 µm.
Tampón fase móvil:	NH <sub>4</sub> OH 25 mM hasta pH 3,5 con ácido fórmico al 85%.
Depósito A:	10% tampón y 90% agua.
Depósito B:	10% tampón y 90% acetonitrilo.

### Composición de la fase móvil:

### Programa de gradiente:

tiempo	Duración	Curva de grad.	% de A	% de B
-0,1	0,10	0	80	20
0	3,00	1,0	10	90
3,00	1,00	1,0	0	100
4,00	2,00	0	80	20

Caudal:	300 µl/min.
Vol. iny.:	10 µl
Tiempo de operación:	6,0 min.
Tiempo de retención:	2,6 min.
Espectrómetro de masas	
Aparato:	PE SCIEX API 2000
Interfaz:	Electropulverización ("Turbopulverización iónica"):
Modo:	Monitorización de múltiples reacciones (MMR)

	Ión precursor	Ión producto
Treprostínil	389,2	331,2
IS	269,0	170,0

Gas nebulizador: 25	Gas de secado: 60, 350°C	Cortina de gas: 25	Pulverización iónica: -5.000V
Orificio: -80 V	Anillo: -350V	Q0: 10V	IQ1: 11V
	ST: 15V		
R01: 11V	IQ2: 35V	R02: 40V	IQ3: 55V
CAD Gas: 4			R03: 45V

### Validación del procedimiento

La tabla 2 lista las recuperaciones medias (n=6) y el coeficiente de variación (c.v.) para plasma de rata con adición de treprostínil. Se compararon todas las muestras con una curva patrón preparada en dH<sub>2</sub>O:acetonitrilo 50:50 con 0,5-5 µg/ml de tolbutamida para determinar el porcentaje de treprostínil recuperado del plasma.

Tabla 2: exactitud y precisión del procedimiento

Concentración de adición	Porcentaje recuperado	Coeficiente de variación
1000 ng/ml	85,6	5,2
100 ng/ml	89,6	11,6

Concentración de adición	Porcentaje recuperado	Coefficiente de variación
10 ng/ml	98,8	7,0

Análisis farmacocinético

Se llevó a cabo el análisis farmacocinético en la concentración plasmática media para cada punto temporal.

5 Los datos se sometieron a análisis no compartimental utilizando el programa farmacocinético WinNonlin v. 3.1 (2).

Resultados:

10 Observaciones clínicas

Antes de iniciar los experimentos se observó que se requerirían dosis suprafarmacológicas de treprostínil para alcanzar concentraciones plasmáticas que pudiesen analizarse con una sensibilidad adecuada. Utilizando la dosis de 1 mg/kg se observaron algunos efectos adversos en animales que recibieron la administración por vía intravenosa y a través de la vena intraportal.

15 Todas las ratas en las que realizó la administración por vía intravenosa mostraron signos de letargia extrema cinco minutos después de la administración pero recuperaron por completo la actividad normal treinta minutos después de la administración. Además, quince minutos después de la administración los tres animales que recibieron la administración a través de la vena portal mostraron signos de letargia. Una rata (n° 123) murió antes de extraer la muestra de los treinta minutos. Las otras ratas se recuperaron por completo. Las ratas restantes no mostraron ninguna reacción adversa tras la administración del compuesto.

25 Análisis de las muestras

Las concentraciones plasmáticas medias para cada vía de administración se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Concentraciones plasmáticas medias (n=3) (ng/ml)										
Tiempo (min.)	Predosis	2	5	15	30	60	120	240	360	480
Intravenosa	0	1.047,96	364,28	130,91	55,56	14,45	4,45	1,09	0,50	0,30
Vena intraportal*	0	302,28	97,39	47,98	21,94	11,06	3,87	2,51	4,95	5,14
Intraduodenal	0	----	61,76	31,67	18,57	13,55	5,91	1,11	0,89	0,90
Intracolónica	0	----	7,46	3,43	3,52	1,48	0,64	0,36	0,06 <sup>^</sup>	0,20 <sup>^</sup>
Oral	0	----	4,52	2,90	3,67	2,06	4,52	1,82	0,90	0,96

\* $\eta=2$ ,  
<sup>^</sup>la concentración se encuentra bajo el límite de cuantificación (LDC) del procedimiento analítico

30 Las curvas de concentración plasmática frente al tiempo para la administración intravenosa, intraportal, intraduodenal, intracolónica y oral se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 3 muestra las curvas de concentración plasmática media frente al tiempo para las cinco vías de administración. En los experimentos mostrados en dichas figuras se utilizó la sal dietanolamina. La tabla 4 muestra los parámetros farmacocinéticos determinados para el treprostínil. En la tabla 5 se muestran las biodisponibilidades individuales de cada rata.

Tabla 4

Biodisponibilidad media y parámetros farmacocinéticos del treprostínil en ratas							
Vía de administración	ABC <sub>480 min</sub> media (min.·ng/ml)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (min)	T <sub>1/2</sub> (min)	Biodisponibilidad media (%) ± SD	Volumen de distribución* (L·kg <sup>-1</sup> )	CLs (ml·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )*
Intravenosa	11.253,49	2120 <sup>ψ</sup>	0	94	NA	1,98	88,54
Vena intraportal	4.531,74	302	2	ND	40,3 ± 5,5	ND	ND
Intraduodenal	2.712,55	62	5	ND	24,1 ± 0,5	ND	ND
Intracolónica	364,63	8	5	ND	3,2 ± 2,5	ND	ND
Oral	1.036,23	5	5	ND	9,2 ± 1,4	ND	ND

\*Normalizado respecto al peso medio de las ratas  
 ND: no determinado  
<sup>ψ</sup> Valor extrapolado

Tabla 5

Biodisponibilidades individuales del treprostínil en ratas			
Vía de administración	Nº de rata	ABC <sub>480 min</sub> media (min.ng/ml)	Biodisponibilidad media (%)
Intravenosa	118	10302,85	NA
	119	9981,52	NA
	120	13510,65	NA
Vena intraportal	121	4970,67	44,2
	122	4093,21	36,4
	123	ND	ND
Intraduodenal	124	2725,68	24,2
	125	2763,60	24,6
	126	2646,05	23,5
Intracolónica	127	72,63	0,7
	128	395,08	3,5
	129	625,20	5,6
Oral	130	998,70	8,9
	131	907,60	8,1
	132	1203,73	10,7

NA: no aplicable  
ND: no determinado

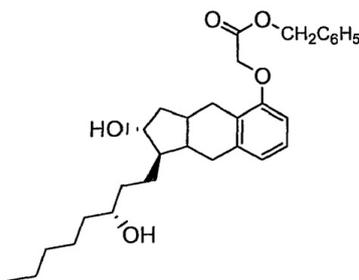
### Conclusiones

5 El treprostínil presenta una semivida de eliminación en plasma de 94 minutos. La fase de distribución del treprostínil presenta una semivida de 10,3 minutos y más de 90% de la distribución y eliminación del compuesto se ha producido tras 60 minutos de la administración. El volumen de distribución ( $V_d=1,98$  l/kg) es superior al agua corporal total de la rata (0,67 l/kg), indicando una amplia partición en los tejidos. La eliminación sistémica del treprostínil (88,54 ml/min/kg) es superior al flujo sanguíneo hepático, lo que significa que intervienen mecanismos extrahepáticos de lavado en la eliminación del compuesto.

15 La eliminación hepática de primer paso del treprostínil resulta en una biodisponibilidad media en la vena intraportal de 40,3%. Se observó una absorción rápida aunque incompleta tras la administración intraduodenal, intracolónica y oral ( $T_{max} \leq 5$  min.). A partir de la comparación de la biodisponibilidad en la vena intraportal (40,3%) e intraduodenal (24,1%) se infirió que aparentemente se absorbía en el intestino aproximadamente 60% del compuesto. La biodisponibilidad intraduodenal media era prácticamente tres veces superior que la biodisponibilidad oral, sugiriendo que la degradación del treprostínil en el estómago o el vaciado gástrico podrían influir sobre el grado de absorción sistémica.

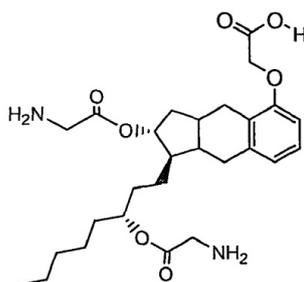
### Ejemplo 2

20 En el presente ejemplo se determinan las concentraciones del treprostínil en ratas Sprague-Dawley macho tras una única dosis oral de los compuestos siguientes:

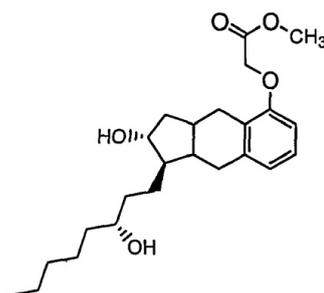


bencil-éster de treprostínil

25



treprostilil diglicina



metil-éster de treprostilil

## Parte experimental

5

### Preparación de solución de administración

Todos los vehículos de administración se prepararon menos de 2 horas antes de la administración.

#### 10 1. Metil-éster de treprostilil

Se preparó una solución de metil-éster de treprostilil mediante la disolución de 2,21 mg de metil-éster de treprostilil con 0,85 ml de dimetilacetamida (DMA). A continuación, dicha solución se diluyó con 7,65 ml de PEG400:polisorbato 80:agua, 40:1:49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,26 mg/ml de metil-éster de treprostilil, equivalente a 0,25 mg/ml de treprostilil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

15

#### 2. Bencil-éster de treprostilil

Se preparó una solución de bencil-éster de treprostilil mediante la disolución de 2,58 mg de bencil-éster de treprostilil con 0,84 ml de dimetilacetamida (DMA). A continuación, dicha solución se diluyó con 7,54 ml de PEG400:polisorbato 80:agua, 40:1:49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,268 mg/ml de bencil-éster de treprostilil, equivalente a 0,25 mg/ml de treprostilil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

25

#### 3. Treprostilil diglicina

Se preparó una solución de treprostilil diglicina mediante la disolución de 1,86 mg de compuesto con 0,58 ml de dimetilacetamida (DMA). A continuación, dicha solución se diluyó con 5,18 ml de PEG 400:polisorbato 80:agua, 40:1:49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,323 mg/ml de treprostilil diglicina, equivalente a 0,25 mg/ml de treprostilil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

30

### Administración en animales

35

Se evaluaron las concentraciones plasmáticas de treprostilil tras la administración de cada profármaco en ratas Sprague-Dawley macho. Se obtuvieron las ratas de Hilltop Lab Animals (Scottdale, PA). Los animales se trasladaron de Hilltop a las instalaciones de West Chester University de Absorption Systems (West Chester, PA). Se aclimataron durante como mínimo veinticuatro horas antes de utilizarse en el estudio. Los animales fueron sometidos a ayuno durante aproximadamente 16 horas antes de la administración. Las ratas utilizadas en el presente estudio se dividieron en tres grupos (I, II y III). Los grupos I a III recibieron las administraciones el mismo día.

40

En la tabla 6 se proporciona el peso de los animales y el régimen de administración.

Tabla 6. Diseño del estudio

5

Grupo	Nº de rata	Peso (kg)	Vía de administración	Compuesto administrado	Volumen de dosis (ml/kg)	Dosis* (mg/kg)
I	638	306	Oral	Metil-éster de treprostínil	2	0,520
	639	310	Oral			
	640	319	Oral			
II	641	319	Oral	Bencil-éster de treprostínil	2	0,616
	642	309	Oral			
	643	320	Oral			
III	644	318	Oral	Treprostínil diglicina	2	0,646
	645	313	Oral			
	646	322	Oral			

\*Esta dosis de profármaco=0,500 mg/kg del compuesto activo, treprostínil

Los animales recibieron las dosis mediante administración oral. Las muestras de sangre se obtuvieron con una cánula en la vena yugular en los puntos temporales siguientes:

10 0 (predosis) 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos

Se extrajeron las muestras de sangre y se introdujeron en tubos que contenían 30 µl de una solución de 500 unidades por ml de heparina en solución salina, y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se extrajeron aproximadamente 200 µl de plasma y se dispensaron en tubos de polipropileno apropiadamente etiquetados que contenían 4 µl de ácido acético con el fin de estabilizar el profármaco remanente en las muestras. Las muestras de plasma se congelaron a -20°C y se transportaron sobre hielo a las instalaciones de Exton de Absorption Systems. Se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el análisis.

15

Análisis de muestras de plasma

20

Se analizaron las muestras de plasma tal como se indica en el ejemplo 1. Brevemente, se extrajo el treprostínil del plasma mediante extracción líquido-líquido y después se analizó mediante CL/EM/EM. Los resultados de validación analítica se han proporcionado anteriormente, en el ejemplo 1. El límite inferior de cuantificación (LIDC) del procedimiento analítico era 0,01 ng/ml. Las muestras no se sometieron a ensayo para detectar el profármaco no modificado.

25

Criterios de aceptación para las tandas analíticas

En cada tanda se utilizaron dos curvas patrón, con un mínimo de cinco puntos en cada curva, y un mínimo de dos muestras de control de calidad (CC). Cada vía de administración vino precedida y seguida de una curva patrón que se utilizó para el recálculo. Los patrones y muestras de CC debían presentar una exactitud y precisión igual o mejor que ± 15% (20% para el LIDC) para aceptar la tanda. Por lo menos el 75% de todos los patrones y las muestras de CC debían pasar los criterios de aceptación.

30

Análisis farmacocinético

Se llevó a cabo un análisis farmacocinético de la concentración plasmática de treprostínil para cada rata individual en cada punto temporal y de la concentración plasmática media para las tres ratas en el grupo para cada punto temporal. Los datos se sometieron a análisis no compartimental utilizando el programa farmacocinético WinNonlin v. 3.1 (2).

40

Resultados:

Observaciones del estudio

45

No se observaron reacciones adversas tras la administración oral de metil-éster de treprostínil, bencil-éster de treprostínil o treprostínil diglicina.

Estabilidad en plasma de los profármacos en plasma de rata acidificado

50

Con el fin de detener cualquier conversión de profármaco en compuesto activo tras extraer las muestras, se acidificó el plasma. Se añadió ácido acético (v/v) a cada muestra de plasma inmediatamente después de la centrifugación de los glóbulos rojos a una concentración de 2%. Se estimó la estabilidad en plasma *in vitro* de cada profármaco para

garantizar que el compuesto era estable en plasma acidificado. Para llevar a cabo dicho ensayo, se añadió ácido acético al 2% a plasma de rata de blanco obtenido de Lampire Biological. El plasma de rata acidificado se equilibró a 37°C durante tres minutos antes de la adición de profármaco. La concentración inicial de cada profármaco era de 1.000 ng/ml. Se extrajo una alícuota de 100 µl de plasma (n=3 por cada punto temporal) a los 0, 60 y 120 minutos. Se agrupó cada alícuota con 20 µl de HCl y se agitó con vórtex. A continuación, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido y se determinó la concentración de treprostínil en cada muestra. En la tabla 7 se proporciona la concentración de treprostínil en cada punto temporal en plasma de rata acidificado. Aparentemente se encuentran presentes cantidades pequeñas de treprostínil en la muestra de compuesto purificado de metil-éster de treprostínil y treprostínil diglicina. La concentración de treprostínil se mantuvo constante durante todo el curso del experimento, indicando que no se producía conversión de profármaco en compuesto activo en el plasma acidificado.

Tabla 7 - Estabilidad en plasma de los profármacos en plasma de perro acidificado

Tiempo (min.)	Concentración de treprostínil (ng/ml) ± SD (n=3)		
	Metil-éster de treprostínil	Bencil-éster de treprostínil	Treprostínil diglicina
0	56,8 ± 9,3	< 0,01	54,9 ± 4,3
60	55,1 ± 5,0	< 0,01	51,8 ± 5,9
120	53,8 ± 1,3	< 0,01	54,5 ± 0,8
% de treprostínil del total	5,7	< 0,01	5,5

En la tabla 8 se muestran las concentraciones plasmáticas medias de treprostínil tras la administración oral de metil-éster de treprostínil, bencil-éster de treprostínil o treprostínil diglicina.

Tabla 8 - Concentraciones de treprostínil (media ± SD) (n=3) Concentraciones en plasma (ng/ml)

Solución de administración oral	Predosis	5 (min)	15 (min)	30 (min)	60 (min)	120 (min)	240 (min)	360 (min)	480 (min)
Metil-éster de treprostínil	0	< 0,01	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,8	0,2 ± 0,7	< 0,01	0,1 ± 0,1
Bencil-éster de treprostínil	0	3,1 ± 2,8	1,9 ± 0,8	2,5 ± 1,5	3,2 ± 1,9	7,3 ± 4,9	1,6 ± 1,2	0,4 ± 0,40	0,6 ± 0,9
Treprostínil diglicina	0	< 0,01	1,1 ± 1,9	6,6 ± 10,7	0,5 ± 0,3*	40, ± 5,8	9,0 ± 13,5	2,1 ± 2,9	1,3 ± 0,8

\* Debido a la cantidad insuficiente de muestra recolectada en este punto temporal es la media de n=2 ratas.

Las figuras 4 a 7 contienen representaciones gráficas de las curvas de concentración plasmática frente al tiempo para el treprostínil en la rata tras la administración de cada profármaco. La tabla 9 lista cada figura y la información mostrada.

Tabla 9 - Listado de figuras

Figura	Descripción
4	Dosis oral de metil-éster de treprostínil
5	Dosis oral de bencil-éster de treprostínil
6	Dosis oral de treprostínil diglicina
7	Dosis oral de bencil-éster de treprostínil y treprostínil diglicina en comparación con treprostínil solo del ejemplo 1

#### Análisis farmacocinético

Se determinó la biodisponibilidad del profármaco respecto a la del compuesto activo basándose en el ejemplo 1 en el que se administró treprostínil en ratas. Se utilizó la fórmula a continuación para determinar la biodisponibilidad relativa (F):

$$F \text{ relativa} = \frac{(ABC_{(\text{Dosis profármaco})}) / (\text{Dosis})}{(ABC_{(\text{Dosis treprostínil})}) / (\text{Dosis})} * 100$$

En el ejemplo 1 también se determinó la biodisponibilidad respecto a una dosis intravenosa de treprostínil en ratas. Se presentan los resultados en la tabla 10.

Tabla 10 - Biodisponibilidad relativa media y parámetros farmacocinéticos del treprostínil en ratas

Compuesto de ensayo administrado	Dosis (mg/kg)	ABC <sub>0-t</sub> media (min.·ng/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (min.)	Biodisponibilidad relativa (%) ± SD (n=3)	Biodisponibilidad (%) ± SD (n=3)
Metil-éster de treprostínil	0,5	212	1,50	120	41,0 ± 16	3,8 ± 2
Bencil-éster de treprostínil	0,5	1.171	7,20	120	226 ± 155	20,8 ± 14
Treprostínil diglicina	0,5	2.242	9,04	240	433 ± 631	0,5 ± 58

Conclusiones

5 En el presente estudio, se determinaron en ratas las biodisponibilidades orales relativas de profármacos del treprostínil. El metil-éster de treprostínil resultó en un área de treprostínil bajo las curvas de concentración plasmática frente al tiempo (ABC) inferior a la de después de la administración del compuesto activo. Los profármacos bencil-éster de treprostínil y treprostínil diglicina presentaron ambos ABC medias del treprostínil superiores a la de después de la administración del compuesto activo. La treprostínil diglicina presentó la biodisponibilidad relativa más alta, de 433%, alcanzando la circulación sistémica 4 veces más treprostínil. La C<sub>max</sub> de 9 ng/ml del treprostínil tras la administración de treprostínil diglicina se observó 240 minutos después de la administración. La C<sub>max</sub> tras la administración de treprostínil era de 5 ng/ml y se observó tan sólo 5 minutos después de la administración. El bencil-éster de treprostínil presentó una biodisponibilidad relativa de 226 ±155 %, estimándose una C<sub>max</sub> de 7,2 ng/ml 120 minutos después de la administración. También debe indicarse que las ABC no se extrapolaron a infinito.

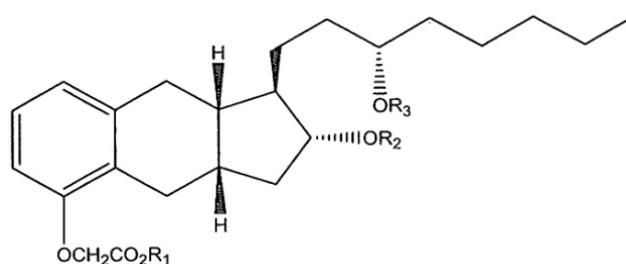
Referencias

1. Guía de usuario de WinNonlin, versión 3.1, 1998-1999, Pharsight Co., Mountain View, CA 94040.

Ejemplo 3

El presente ejemplo ilustra un estudio farmacocinético del treprostínil tras la administración de una única dosis duodenal de treprostínil y diversos profármacos.

En el presente estudio, se comparó el área bajo la curva del treprostínil en ratas Sprague-Dawley macho tras una única dosis intraduodenal de los profármacos del treprostínil monofosfato de treprostínil (anillo), treprostínil monovalina (anillo), treprostínil monoalanina (anillo) y treprostínil monoalanina (cadena). Los compuestos eran los siguientes:



que presentaban los sustituyentes siguientes:

Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Monofosfato de treprostínil (anillo)	H	-PO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	H
Treprostínil monovalina (anillo)	H	-COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H
treprostínil monoalanina (anillo)	H	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>	H
treprostínil monoalanina (cadena)	H	H	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>

Parte experimental

Preparación de solución de administración

40 Todos los vehículos de administración se prepararon menos de 2 horas antes de la administración.

1. Monofosfato de treprostinil (anillo)

Se preparó una solución de administración de monofosfato de treprostinil (anillo) mediante la disolución de 1,01 mg de monofosfato de treprostinil (anillo) en 0,167 ml de dimetilacetamida (DMA) hasta su disolución. Dicha solución se diluyó adicionalmente con 1,50 ml de PEG 400: polisorbato 80: agua, 40: 1: 49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,603 mg/ml de profármaco, equivalente a 0,5 mg/ml de treprostinil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

2. Treprostinil monoalana (anillo)

Se preparó una solución 50 mg/ml de treprostinil monoalana (anillo) en dimetilacetamida (DMA). A continuación, se diluyó una alícuota de 25 µl de la solución madre de 50 mg/ml, con 175 µl de DMA y 1,8 ml de PEG 400: polisorbato 80: agua, 40: 1: 49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,625 mg/ml de profármaco, equivalente a 0,5 mg/ml de treprostinil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

3. Treprostinil monoalanina (anillo)

Se preparó una solución de treprostinil monoalanina (anillo) mediante la disolución de 1,05 mg de treprostinil monoalanina (anillo) en 0,178 ml de dimetilacetamida (DMA) hasta su disolución. Dicha solución se diluyó adicionalmente con 1,60 ml de PEG 400: polisorbato 80: agua, 40: 1: 49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,590 mg/ml de treprostinil monoalanina (anillo), equivalente a 0,5 mg/ml de treprostinil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

4. Treprostinil monoalanina (cadena)

Se preparó una solución de treprostinil monoalanina (cadena) mediante la disolución de 0,83 mg de treprostinil monoalanina (anillo) en 0,14 ml de dimetilacetamida (DMA) hasta su disolución. Dicha solución se diluyó adicionalmente con 1,26 ml de PEG 400: polisorbato 80: agua, 40: 1: 49. La concentración final del vehículo de administración era de 0,591 mg/ml de treprostinil monoalanina (cadena), equivalente a 0,5 mg/ml de treprostinil. El vehículo de administración era una solución transparente en el momento de la administración.

Administración en animales

Se evaluaron las concentraciones plasmáticas de treprostinil tras la administración oral de cada profármaco en ratas Sprague-Dawley macho. Se obtuvieron doce ratas de Hilltop Lab Animals (Scottdale, PA). Los animales se trasladaron de Hilltop a las instalaciones de West Chester University de Absorption Systems (West Chester, PA). Se aclimataron durante como mínimo veinticuatro horas antes de utilizarse en el estudio. Los animales fueron sometidos a ayuno durante aproximadamente 16 horas antes de la administración. Las doce ratas utilizadas en el presente estudio se dividieron en cuatro grupos. Todos los grupos recibieron una administración el día 1 del estudio. En peso de los animales y el régimen de administración se proporcionan en la tabla 11.

Tabla 11

Nº de rata	Peso (g)	Compuesto	Volumen de dosis (ml/kg)	Dosis* (mg/kg)
130	327	Monofosfato de treprostinil (anillo)	1	0,603
131	321	Monofosfato de treprostinil (anillo)	1	0,603
132	310	Monofosfato de treprostinil (anillo)	1	0,603
133	328	Treprostinil monoalana (anillo)	1	0,625
134	326	Treprostinil monoalana (anillo)	1	0,625
135	346	Treprostinil monoalana (anillo)	1	0,625
136	321	treprostinil monoalanina (cadena)	1	0,591
137	319	treprostinil monoalanina (cadena)	1	0,591
138	330	treprostinil monoalanina (cadena)	1	0,591
139	316	treprostinil monoalanina (anillo)	1	0,590
140	330	treprostinil monoalanina (anillo)	1	0,590
141	339	treprostinil monoalanina (anillo)	1	0,590

\* Esta dosis de profármaco = 0,500 mg/kg de treprostinil

La administración en los animales se lleva a cabo mediante una cánula duodenal permanente. Se extrajeron muestras de sangre de una cánula en la vena yugular en los puntos temporales siguientes: 0 (predosis) 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos

Se extrajeron las muestras de sangre y se introdujeron en tubos que contenían 30 µl de una solución de 500

unidades por ml de heparina en solución salina, y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se extrajeron aproximadamente 200 µl de plasma y se dispensaron en tubos de polipropileno apropiadamente etiquetados que contenían 4 µl de ácido acético con el fin de estabilizar el profármaco remanente en las muestras. Las muestras de plasma se congelaron a -20°C y se transportaron sobre hielo a las instalaciones de Exton de Absorption Systems. Se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el análisis.

Análisis de muestras de plasma

Se analizaron muestras de plasma utilizando los procedimientos indicados anteriormente. Brevemente, se extrajo treprostínil del plasma mediante extracción en fase sólida y después se analizó mediante CL/EM/EM. El límite inferior de cuantificación (LIDC) del procedimiento analítico era de 0,03 ng/ml.

Criterios de aceptación para las tandas analíticas

Durante cada tanda se dispersaron cuatro curvas estándares, con un mínimo de cinco puntos en cada curva, y un mínimo de dos muestras de control de calidad (CC) a las 3 concentraciones. Cada grupo de profármacos vino precedido y seguido de una curva patrón que se utilizó para el recálculo. Los patrones y muestras de CC debían encontrarse dentro de una exactitud y precisión de ± 15% (20% para el LIDC) para aceptar la tanda. Por lo menos el 75% de todos los patrones y las muestras de CC debían pasar los criterios de aceptación.

Análisis farmacocinético

Se llevó a cabo un análisis farmacocinético de la concentración plasmática de treprostínil para cada rata individual en cada punto temporal y de la concentración plasmática media para las tres ratas en el grupo para cada punto temporal.

Los datos se sometieron a análisis no compartimental utilizando el programa farmacocinético WinNonlin v. 3.1 (2).

Resultados:

Observaciones del estudio

No se observaron reacciones adversas tras la administración intraduodenal de monofosfato de treprostínil (anillo), treprostínil monoalánina (anillo), treprostínil monoalanina (cadena).

Estabilidad en plasma *ex vivo* de los profármacos en plasma de rata acidificado

Con el fin de detener cualquier conversión de profármaco en compuesto activo tras la extracción de las muestras, se acidificó el plasma. Se añadió ácido acético (v/v) a cada muestra de plasma inmediatamente después de la separación de los glóbulos rojos a una concentración de 2%. Se estimó la estabilidad en plasma *in vitro* de cada profármaco para garantizar que el compuesto era estable en plasma acidificado. Para llevar a cabo dicho ensayo, se añadió ácido acético al 2% a plasma de rata de blanco obtenido de Lampire Biological. El plasma de rata acidificado se llevó a la temperatura ambiente durante tres minutos antes de la adición de profármaco. La concentración inicial de cada profármaco era de 1.000 ng/ml. Se extrajo una alícuota de 100 µl de plasma (n=3 por cada punto temporal) a los 0, 60 y 120 minutos. Se preparó cada muestra de plasma tal como se ha indicado anteriormente y se realizó un seguimiento de la concentración de treprostínil.

No se incrementaron las concentraciones de treprostínil en ninguna de las muestras de plasma acidificado con adición de profármaco durante el periodo de dos horas del experimento.

Análisis de las muestras

En la tabla 12 se muestran las concentraciones plasmáticas medias de treprostínil tras la administración de monofosfato de treprostínil (anillo), treprostínil monoalánina (anillo), treprostínil monoalanina (anillo) o treprostínil monoalanina (cadena).

Tabla 12: MEDIA ± SD (N=3)

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE TREPROSTINIL (ng/ml)									
Solución de administración oral	Predosis	5 (min.)	15 (min.)	30 (min.)	60 (min.)	120 (min.)	240 (min.)	360 (min.)	480 (min.)
Monofosfato de treprostínil (anillo)	0	8,62± 3,0	6,57± 1,7	3,31± 1,2	4,31± 0,8	2,07± 0,4	0,91± 0,5	0,26± 0,08	0,3± 0,08
Treprostínil monoalánina (anillo)	0	0,76± 0,2	0,91± 0,7	1,52± 0,6	1,53± 0,6	1,65± 0,7	0,66± 0,1	0,15± 0,03	0,05± 0,02

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE TREPROSTINIL (ng/ml)									
Solución de administración oral	Predosis	5 (min.)	15 (min.)	30 (min.)	60 (min.)	120 (min.)	240 (min.)	360 (min.)	480 (min.)
treprostínil monoalanina (anillo)	0	2,42± 0,6	2,52± 0,4	2,91± 0,6	3,25± 1,5	1,69± 0,4	0,55± 0,2	0,20± 0,1	0,22± 0,2
treprostínil monoalanina (cadena)	0	9,53± 2,6	3,92± 0,6	3,83± 0,7	2,74± 0,9	0,86± 0,4	0,29± 0,2	0,08± 0,04	0,19± 0,3

Las figuras 8 a 12 contienen representaciones gráficas de las curvas de concentración plasmática frente al tiempo para el treprostínil en ratas tras la administración de cada profármaco. La tabla 13 lista cada figura y la información mostrada.

5

Tabla 13

Figura	Descripción
8	Dosis intraduodenal de monofosfato de treprostínil (anillo)
9	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (anillo)
10	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (anillo)
11	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (cadena)
12	Dosis intraduodenal de cada profármaco en comparación con treprostínil solo del ejemplo 1

Análisis farmacocinético

10 Se determinó la biodisponibilidad del profármaco respecto a la del compuesto activo basándose en un estudio anterior en el que se había administrado treprostínil en ratas. Se utilizó la fórmula a continuación para determinar la biodisponibilidad relativa (F):

$$F \text{ relativa} = \frac{(ABC_{(\text{Dosis profármaco})} / \text{Dosis})}{(ABC_{(\text{Dosis treprostínil})} / \text{Dosis})} * 100$$

15

También se estimó la biodisponibilidad absoluta utilizando datos de una dosis intravenosa de treprostínil en ratas determinada en el ejemplo 1. Se presentan los resultados en la tabla 14.

20

Tabla 14

Listado de figuras	
Figura	Descripción
8	Dosis intraduodenal de monofosfato de treprostínil (anillo)
9	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (anillo)
10	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (anillo)
11	Dosis intraduodenal de treprostínil monoalanina (cadena)
12	Dosis intraduodenal de cada profármaco en comparación con treprostínil solo del ejemplo 1

Conclusiones

25 Se determinaron en las ratas las biodisponibilidades intraduodenales relativas de cuatro profármacos del treprostínil. Todos los compuestos presentaban biodisponibilidades intraduodenales relativas inferiores a las del compuesto activo. El monofosfato de treprostínil (anillo) y la treprostínil monoalanina (anillo) presentaron la biodisponibilidad intraduodenal relativa más elevada, de 56% y 38%, respectivamente. La T<sub>max</sub> del monofosfato de treprostínil (anillo) y la treprostínil monoalanina (cadena) se produjo 5 minutos después de la administración. La treprostínil monoalanina (anillo) y la treprostínil monoalanina (anillo) presentaron tiempos de absorción más prolongados, con valores de T<sub>max</sub> de 120 y 60 minutos, respectivamente. Las concentraciones de treprostínil máximas fueron más elevadas tras la administración de monofosfato de treprostínil (anillo) y de treprostínil monoalanina (cadena). Alcanzaron aproximadamente 9 ng/ml 5 minutos después de la administración. Las biodisponibilidades fueron mucho más elevadas al administrarse por vía intraduodenal que al administrarse por vía oral, según mediciones de los niveles plasmáticos de treprostínil.

35

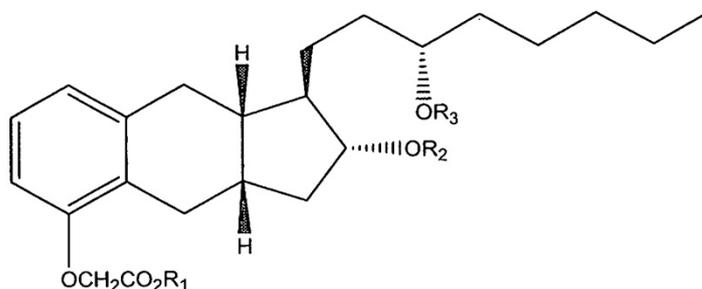
Referencias

1. Guía de usuario de WinNonlin, versión 3.1, 1998-1999, Pharsight Co., Mountain View, CA 94040.

**Ejemplo 4**

En el presente ejemplo, se determinaron las concentraciones de treprostínil en ratas Sprague-Dawley macho tras una única dosis oral o intraduodenal de los compuestos de estructura II a continuación:

5

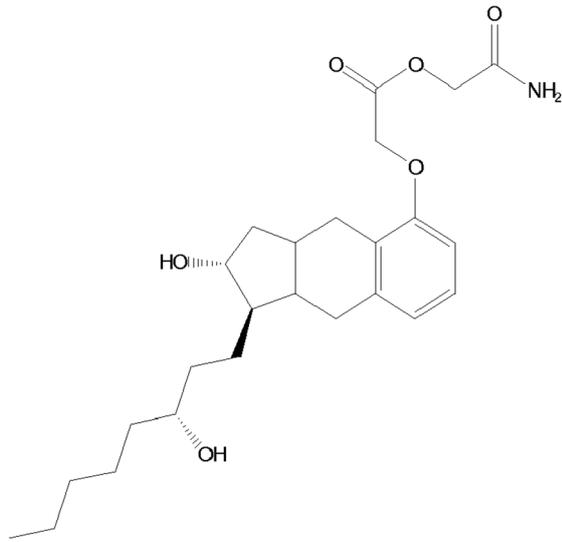


que presentan los sustituyentes siguientes:

Cpd.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
A	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	H	H
B	-CH <sub>2</sub> CON(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	H	H
C	-CH <sub>2</sub> CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
D	-CH <sub>2</sub> CONHOH	H	H
E	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> (p)*	H	H
F	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> (p)*	H	H
G	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl (o)*	H	H
H	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (o,p)*	H	H
I	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> F (p)*	H	H
J	H	-PO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	H
K	H	H	-PO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>
L	H	-COCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H
M	H	H	-COCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
N	H	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>	H
O	H	H	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>
P	H	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>	-COCH(CH <sub>3</sub> )NH <sub>2</sub>

10 \* - o indica sustitución en orto, m indica sustitución en meta y p indica sustitución en para

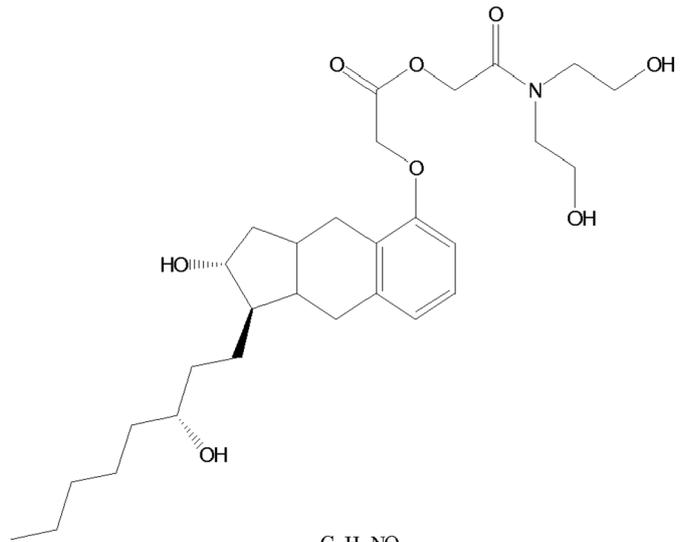
Los ejemplos de estos compuestos incluyen:



$C_{25}H_{37}NO_6$   
 Masa exacta: 447.26  
 Peso molecular: 447.56  
 C, 67.09; H, 8.33; N, 3.13; O, 21.45

glicolamida éster de treprostínil

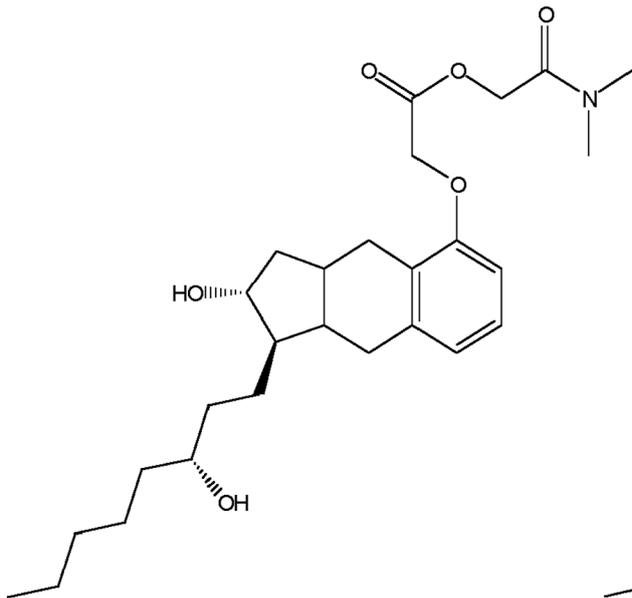
A



$C_{29}H_{45}NO_8$   
 Masa exacta: 535.31  
 Peso molecular: 535.67  
 C, 65.02; H, 8.47; N, 2.61; O, 23.89

N,N-dietanol glicolamida éster de treprostínil

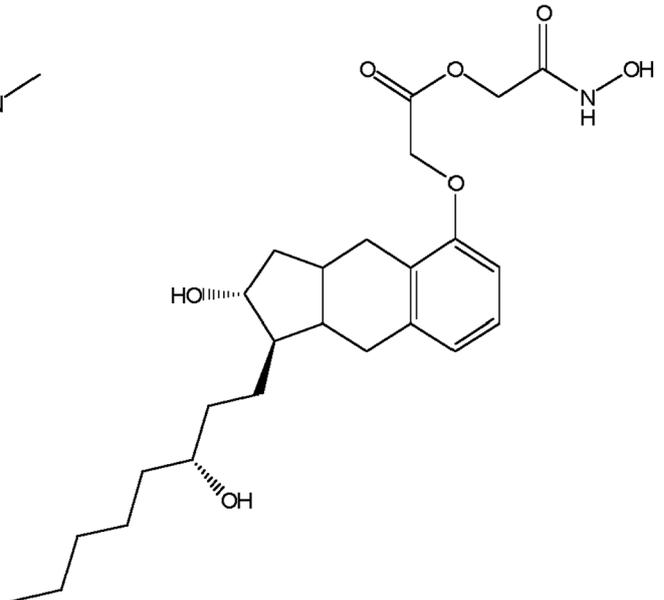
B



$C_{27}H_{41}NO_6$   
 Masa exacta: 475.29  
 Peso molecular: 475.62  
 C, 68.18; H, 8.69; N, 2.94; O, 20.18

N,N-dimetil glicolamida de treprostínil

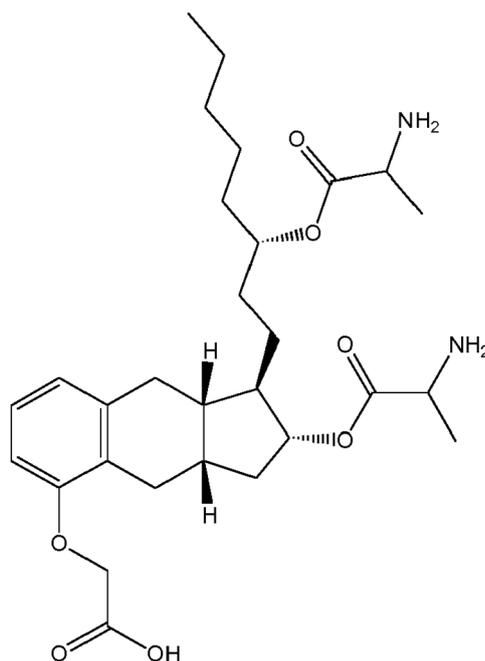
C



$C_{25}H_{37}NO_7$   
 Masa exacta: 463.26  
 Peso molecular: 463.56  
 C, 64.77; H, 8.05; N, 3.02; O, 24.16

N-hidroxil glicolamida éster de treprostínil

D



$C_{29}H_{44}N_2O_7$   
 Masa exacta: 532.31  
 Peso molecular: 532.67  
 C, 65.39; H, 8.33; N, 5.26; O, 21.03

**P**

La preparación de profármaco y el análisis tienen lugar como se describe en los ejemplos 1 y 2 anteriormente. Adicionalmente, la biodisponibilidad oral de treprostinil, el sodio de treprostinil y los compuestos presentados en el ejemplo 2 y este ejemplo se administran en estrecha proximidad a o simultáneamente con diversos compuestos que inhiben la p-glucoproteína diferentes a diferentes concentraciones y se someten a prueba para determinar el efecto de los inhibidores de p-glucoproteína sobre la biodisponibilidad oral de los compuestos. Los inhibidores de p-glucoproteína se administran intravenosa y oralmente.

## 10 Ejemplo 5

Estudios clínicos con treprostinil dietanolamina

Introducción

Antes de proceder directamente en los estudios clínicos con una forma de dosificación sólida de liberación sostenida (SR) de UT-15C (treprostinil dietanolamina), se determina la farmacocinética de una disolución de "liberación inmediata" oral. El primer estudio clínico (01-101) evalúa la capacidad de los aumentos de dosis escalonados de una disolución oral de UT-15C para alcanzar unos niveles detectables en plasma, una relación de concentración en plasma-dosis potencial, una biodisponibilidad y la seguridad global de UT-15C. Se dosifica a los voluntarios con las disoluciones de una manera que se simula una formulación de liberación sostenida que libera fármaco durante aproximadamente 8 horas.

El segundo estudio clínico (01-102) evalúa la capacidad de dos prototipos de formas de dosificación sólidas de SR (es decir, 1. microesferas de micropartículas en una cápsula y, 2. Comprimido) para alcanzar unos niveles detectables en plasma y la influencia potencial del alimento sobre estas concentraciones de fármaco en plasma. Los prototipos de SR son concebidos para liberar UT-15C a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 8 horas.

A continuación se describen los detalles de dos estudios clínicos.

Estudio clínico 01-101

*Un estudio de la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de los aumentos de dosis escalonados múltiples de UT-15C (treprostinil dietanolamina) administrada como una disolución oral en voluntarios adultos sanos (que incluye el estudio de biodisponibilidad).*

Se administra la disolución oral de UT-15C a 24 voluntarios sanos para evaluar el perfil farmacocinético y de seguridad de UT-15C así como su biodisponibilidad. Para imitar el perfil de liberación de SR, se administran unas dosis cada dos horas para cuatro dosis a 0,05 mg por dosis (total= 0,2 mg), 0,125 mg por dosis (total= 0,5 mg), 0,25 mg por dosis (total= 1,0 mg), o 0,5 mg por dosis (total=2,0 mg). Los criterios de valoración del estudio incluyen evaluaciones de seguridad estándares (episodios adversos, constantes vitales, parámetros de laboratorio, exámenes físicos y electrocardiogramas) así como los parámetros farmacocinéticos.

Todos los sujetos reciben la totalidad de las cuatro dosis programadas y completan el estudio en su totalidad. Las concentraciones en plasma de treprostinil son detectables en todos los sujetos tras la administración de una dosis de disolución oral de UT-15C. La  $AUC_{inf}$  y la  $C_{máx}$  aumentan de una manera lineal con la dosis para cada una de las cuatro partes alícuotas de dosis. La concentración superior observada en este estudio es de 5,51 ng/ml tras la tercera parte alícuota de dosis de disolución de 0,25 mg de la dosis total de UT-15C de 2,0 mg. Sobre la base de los datos de sodio de treprostinil intravenoso históricos, los valores de biodisponibilidad absolutos medios para las dosis de 0,2 mg, 0,5 mg, 1,0 mg y 2,0 mg de UT-15C se estima que son de 21%, 23%, 24% y 25%, respectivamente. Los resultados de este estudio se representan respectivamente en las figuras 13A-13D.

La UT-15C es bien tolerado por la mayoría de los sujetos a la totalidad de las dosis dadas. No existen cambios urgentes de tratamiento, significativos, en hematología, química clínica, análisis de orina, constantes vitales, exámenes físicos, y ECG. Los episodios adversos de los que se informa con mayor frecuencia son eritema, dolor de cabeza, mareo. El perfil de seguridad con UT-15C (treprostinil dietanolamina) es congruente con el perfil de seguridad del que informa y el etiquetado de producto de remodulin (sodio de treprostinil) y otros análogos de prostaciclina. Por lo tanto, cambiar la forma de sal del treprostinil no da como resultado problemas de seguridad inesperados que siguen al régimen de dosificación especificada de protocolo (es decir, una dosis única cada 2 horas para cuatro dosis totales en un día).

#### Estudio clínico 01-102

*Un estudio de seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética que compara una dosis única de una formulación de comprimido y cápsula de liberación sostenida de UT-15C (treprostinil dietanolamina) administradas a unos voluntarios adultos sanos en el estado de ayuno y alimentado.*

El estudio 01-102 es concebido para evaluar y comparar los perfiles de seguridad y farmacocinético de un prototipo de comprimido de SR de UT-15C y, (2) un prototipo de cápsula de SR de UT-15C (microesferas de micropartículas en una cápsula) en el estado de ayuno y alimentado. Cada una de las formas de dosificación de SR son concebidas para liberar UT-15C (1 mg) a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 8 horas. Se asignan catorce voluntarios adultos sanos para recibir la formulación de comprimido de SR mientras que catorce voluntarios adicionales son asignados para recibir la formulación de cápsula de SR. Los sujetos son distribuidos al azar para recibir una dosis única (1 mg) de su prototipo de SR asignado en el estado de ayuno y alimentado. Se utiliza un diseño con grupos cruzados con un periodo de lavado de siete días que separa los estados de ayuno/alimentado. Para la parte alimentada del estudio, los sujetos reciben una comida elevada en calorías y elevada en grasas. Los criterios de valoración del estudio incluyen valoraciones de seguridad estándares (episodios adversos, constantes vitales, parámetros de laboratorio, exámenes físicos y electrocardiogramas) así como parámetros farmacocinéticos.

Todos los sujetos a los que se administran comprimidos y cápsulas de UT-15C presentan unas concentraciones en plasma de treprostinil detectables. Los cálculos del área bajo la curva desde cero a veinticuatro horas ( $AUC_{0-24}$ ) indican que la exposición total a SR de UT-15C se produce en el orden siguiente: alimentado con comprimido > en ayunas con cápsula > en ayunas con comprimido > alimentado con cápsula. La figura 14 presenta los perfiles farmacocinéticos de las dos formulaciones en los estados alimentado y en ayunas.

Las cápsulas y comprimidos de SR de UT-15C son bien toleradas por la mayoría de sujetos. La totalidad de los episodios adversos son de leves a moderados en gravedad y son similares a los descritos en el estudio 01-101 y en el etiquetado de producto de remodulin. Además, no existen cambios urgentes de tratamiento en constantes vitales, parámetros de laboratorio, exámenes físicos o electrocardiogramas a lo largo del estudio.

Estos resultados demuestran que pueden obtenerse unas concentraciones de fármaco potencialmente terapéuticas y detectables a partir de la forma de dosificación sólida de UT-15C y que estas concentraciones pueden mantenerse a lo largo de un periodo de tiempo extendido a través de la tecnología de formulación de liberación sostenida.

#### Polimorfos de treprostinil dietanolamina

Se identifican dos formas cristalinas de UT-15C así como una forma amorfa. La primera, que es metaestable, se denomina forma A. La segunda, que es más estable termodinámicamente, es la forma B. Cada forma es caracterizada y se realizan los estudios de interconversión para demostrar qué forma es estable termodinámicamente. La forma A se realiza según los procedimientos en la tabla 15. La forma B se realiza a partir de la forma A, según los procedimientos de la tabla 16.

Tabla 15

Disolvente	Condiciones <sup>a</sup>	Hábito/descripción	XRPD Resultado <sup>b</sup>	Muestra ID
tetrahidrofurano	FE	Sólidos blancos opacos; morfología desconocida, birrefringente	A	1440-72-02
	SE	Sólidos transparentes vítreos	A (PO)	1440-72-03
	SC (60°C)	Traslúcido, láminas vítreas sin color de material, birrefringente	A	1440-72-16
Tolueno	Lechada (RT), 6d	Sólidos blancos; masas opacas de partículas más pequeñas	A + B	1440-72-01
Tolueno:IPA (11,4:1)	SC (60°C)	Sólidos blancos; grupos esféricos de fibras, birrefringente	A	1440-72-03
Agua	FE	Sólidos blancos opacos; morfología desconocida; birrefringente	A	1440-72-07
	SE	Anillo opaco de sólidos, birrefringente	A + B	1440-72-08
	liofilizado	Sólidos transparentes vítreos, blancos	A + B	1480-58-02
Agua:etanol (1:1)	FE	Sólidos blancos opacos; morfología desconocida; birrefringente	A + 11,5 pk	1440-72-09
	FE	Sustancia oleosa y clara con sólidos algo opacos	B	1480-79-02
	SE	Anillo opaco vítreo de sólido	A	1440-72-10

a. FE = evaporación rápida; SE = evaporación lenta; SC = enfriamiento lento

b. IS = muestra insuficiente; PO = orientación preferida; LC = cristalinidad baja; pk = pico

c. XRPD = difracción de polvo de rayos X

5

tabla 16

Disolvente	Condiciones	Hábito/descripción	XRPD Resultado	Muestra ID
Etanol/agua (1:1)	FE	Sólidos que parecen vítreos de morfología desconocida, birrefringente	- <sup>b</sup>	1519-68-01
1,4-dioxano	Lechada (50°C), 6d	Sólidos blancos; masas opacas de material; morfología desconocida	B	1519-73-02 <sup>a</sup>
	Lechada (50°C), 2d	Sólidos granulares pequeños; con birrefringente	B	1557-12-01
	Submuestra de 1557-12-01	-	B	1557-15-01
	Submuestra de	Sólidos blancos	B	1557-15-02

	1557-12-01			
	Lechada (50°C), 2d	-	B	1557-17-01
Isopropanol	Lechada (RT), 1d	Sólidos blancos	<sup>-b</sup>	1519-96-03
tetrahidrofurano	Lechada (RT), 1d	-	<sup>-b</sup>	1519-96-02
tolueno	Lechada (50°C), 6d	Sólidos blancos	B	1519-73-01

- a. simientes de muestra #1480-58-01 (A+B) añadidas  
b. Muestras no analizadas

5 Caracterización de las formas de cristal:

Forma A

10 El material inicial sintetizado (denominado forma A) es caracterizado utilizando una difracción de polvo de rayos X (XRPD), calorimetría de barrido diferencial (DSC), termogravimetría (TG), microscopía de etapa calefactora, espectroscopia Raman e infrarroja (IR), y sorción de humedad. La XRPD representativa de la forma A se representa en la figura 15. Los espectros Raman e IR para la forma A se representan en las figuras 16 y 17, respectivamente. Los datos térmicos para la forma A se representan en la figura 18. El termograma de la DSC presenta una endoterma a 103°C que es congruente con la fusión (a partir de microscopía de etapa calefactora). La muestra se observa que recristaliza en agujas al enfriar a partir de la fusión. Los datos de TG no presentan pérdida de peso mensurable hasta 100°C, indicando que el material no está solvatado. Los datos de sorción de humedad son representados gráficamente en la figura 19. El material de la forma A presenta un aumento de peso significativo (>33%) durante el curso del experimento (que empieza entre 65 a 75% de RH), indicando que el material es higroscópico. Además, la higroscopicidad de la treprostínil dietanolamina se evalúa en cámaras de humedad a aproximadamente 52% de RH y 65% de RH. Se observa que los materiales aumentan 4,9% y 28% de peso tras 23 días en las cámaras de ~52% de RH y de ~68% de RH, respectivamente.

15 Sobre la base de los datos de caracterización anteriores, la forma A es un material anhidro, cristalino que es higroscópico y funde a 103°C.

25 Forma B

30 La forma B de treprostínil dietanolamina se prepara a partir de lechadas calentadas (50°C) de la forma A en 1,4 dioxano y tolueno, como se representa en la tabla 16. Se utiliza el material aislado a partir de 1,4-dioxano para caracterizar completamente la forma B. Se representa un patrón de XRPD representativo de la forma B en la figura 20. Los patrones de XRPD de la forma A y la forma B son similares, sin embargo, se observan unas diferencias significativas en el intervalo de aproximadamente 12 – 17° 2θ (figura 20).

35 Los datos térmicos para la forma B son representados en la figura 21. El termograma de DSC (muestra ID 1557-17-01) presenta una endoterma única a 107°C que es congruente con un episodio de fusión (como se determina mediante microscopía de etapa calefactora). La TG presenta una pérdida de peso mínima hasta 100°C.

40 Los datos de sorción/desorción de humedad para la forma B son representados en la figura 22. Existe una pérdida de peso mínima a 5% de RH y el material absorbe aproximadamente 49% de agua a 95% de RH. Tras la desorción desde 95% a 5% de RH, la muestra pierde aproximadamente 47%.

La forma A y la forma B pueden detectarse fácilmente en la curva de DSC. Sobre la base de los datos de caracterización anteriores, la forma B parece ser un material cristalino que funde a 107°C.

45 Propiedades termodinámicas:

50 Se realizan los experimentos de interconversión para determinar la forma más estable termodinámicamente a varias temperaturas. Estos estudios se realizan en dos disolventes diferentes, que utilizan el material de las formas A y B, y los datos se resumen en la tabla 17. Los experimentos en isopropanol presentan una conversión completa a la forma B a ambiente, 15°C y 30°C tras 7 días, 11 días y 1 día, respectivamente. Los experimentos en tetrahidrofurano presentan asimismo una conversión a la forma B a las condiciones de ambiente, 15°C y 30°C. Se obtiene la conversión completa tras 11 días a 15°C y 1 día a 30°C. En las condiciones ambientales, sin embargo, permanece una cantidad menor de la forma A tras 7 días sobre la base de los datos de XRPD obtenidos. La conversión completa es probable que ocurra a lo largo de un tiempo de lechada prolongado. Sobre la base de estos experimentos de interconversión de lechada, la forma B parece ser la forma más estable termodinámicamente. La forma A y la forma B parecen estar relacionadas monotrópicamente con la forma B siendo más estable termodinámicamente

Tabla 17

Estudios de interconversión de treprostinil dietanolamina					
Muestra nº	Formas	Disolvente	Experimento/materiales de partida	Temperatura	tiempo
1557-22-01	A vs B	isopropanol	Mezcla sólida #1557-20-01 <sup>a</sup>	Ambiente	7 días
1557-47-02	A vs B		Mezcla sólida #1557-35-01 <sup>d</sup>	15°C	11 días
1557-33-02	A vs B		Mezcla sólida #1557-35-01 <sup>d</sup>	30°C	1 día
1557-21-02 <sup>e</sup>	A vs B		Mezcla sólida #1557-20-01 <sup>b</sup>	50°C	-
1557-20-03	A vs B	tetrahidrofurano	Mezcla sólida #1557-20-01 <sup>c</sup>	Ambiente	7 días
1557-47-01	A vs B		Mezcla sólida #1557-35-01 <sup>d</sup>	15°C	11 días
1557-33-01	A vs B		Mezcla sólida #1557-35-01 <sup>d</sup>	30°C	1 día
1557-21-01 <sup>e</sup>	A vs B		Mezcla sólida #1557-20-01 <sup>a</sup>	50°C	-

a. muestra de disolución saturada ID 1557-21-03  
b. muestra de disolución saturada ID 1519-96-03  
c. muestra de disolución saturada ID 1519-96-02  
d. disolución saturada preparada justo antes de añadir los sólidos  
e. muestras sin analizar ya que la solubilidad (a 50°C) de treprostinil dietanolamina resulta muy elevada y las disoluciones devienen decoloradas.

**REIVINDICACIONES**

1. Polimorfo de una sal de dietanolamina de treprostnil que funde a 103°C.

FIGURA 1A

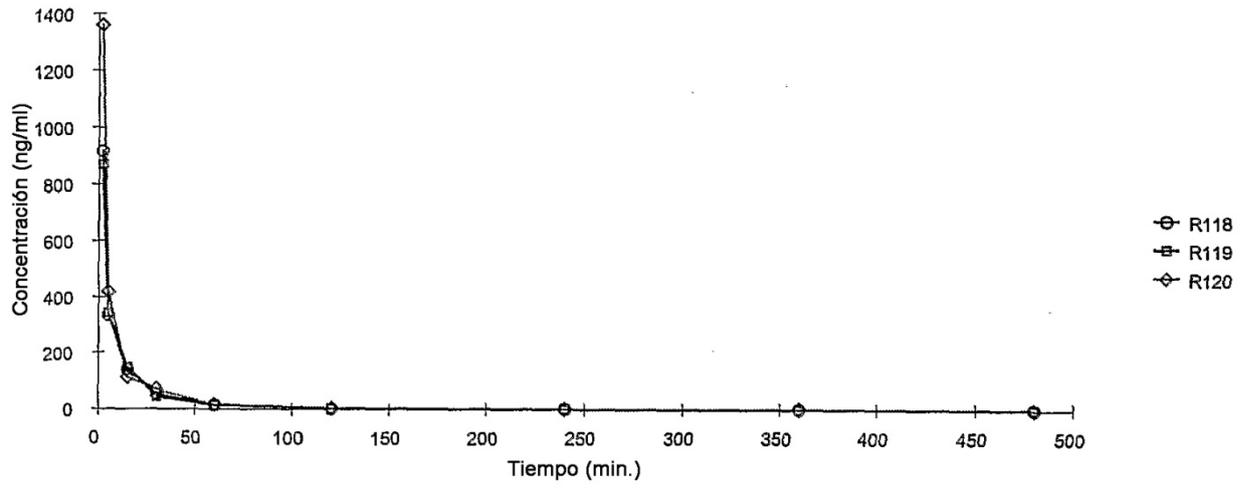


FIGURA 1B

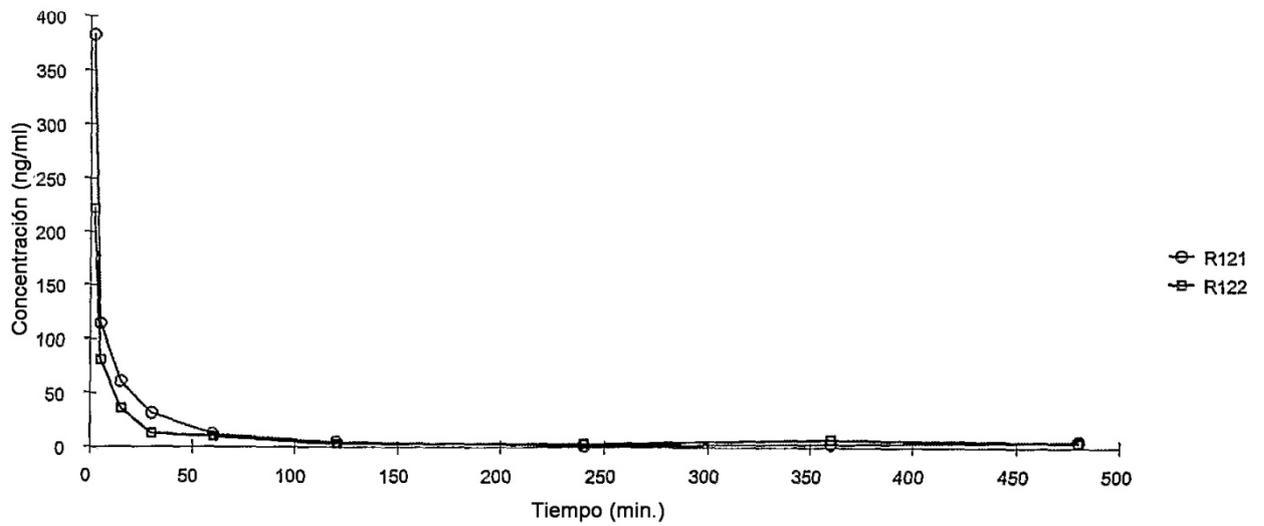


FIGURA 2A

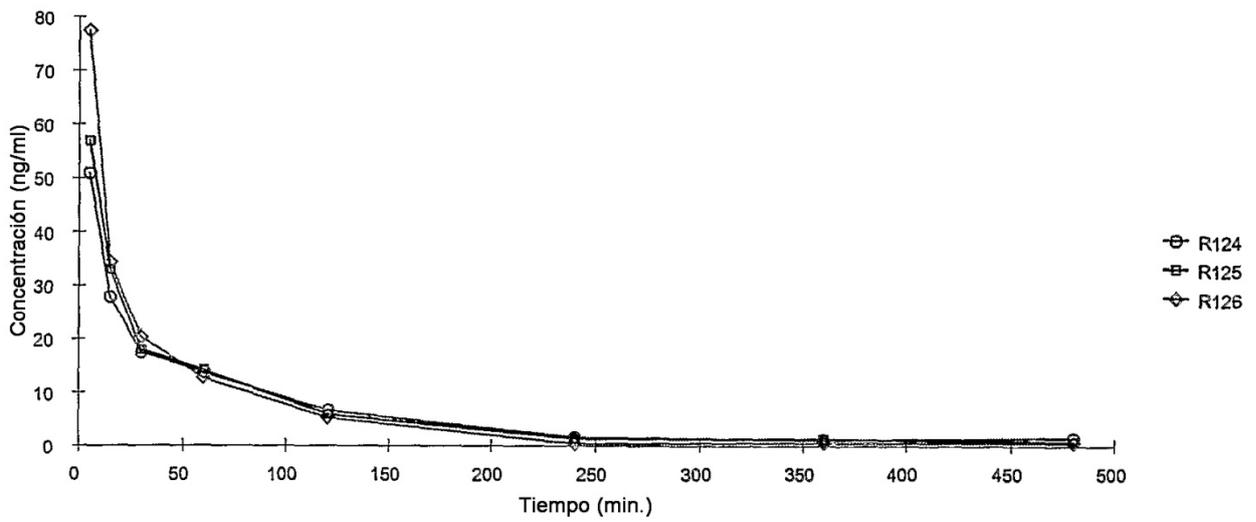


FIGURA 2B

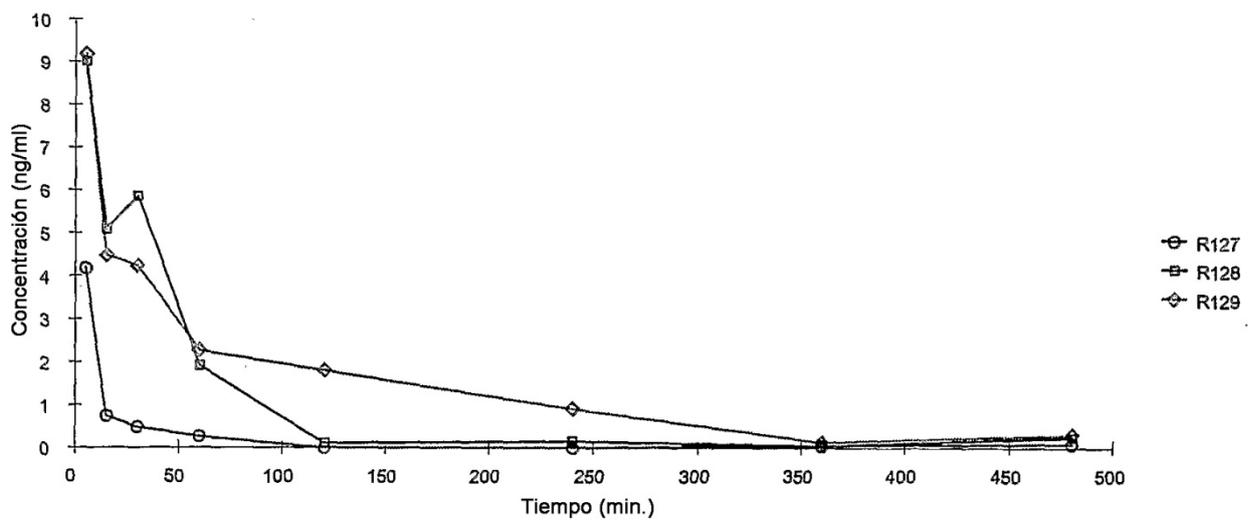


FIGURA 2C

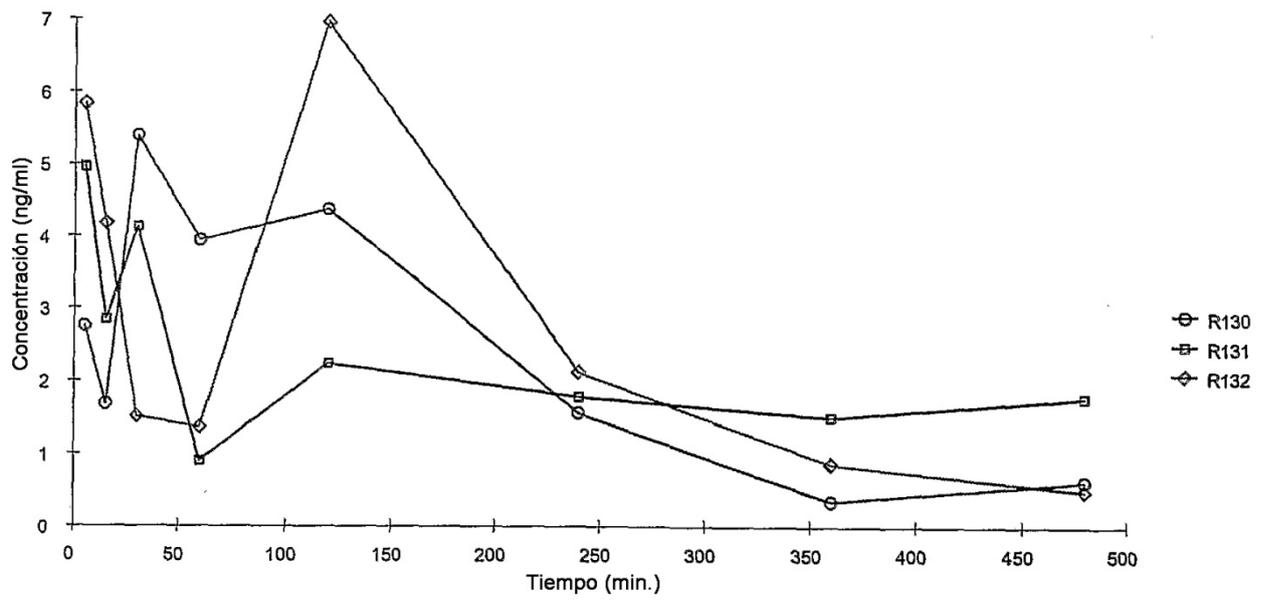
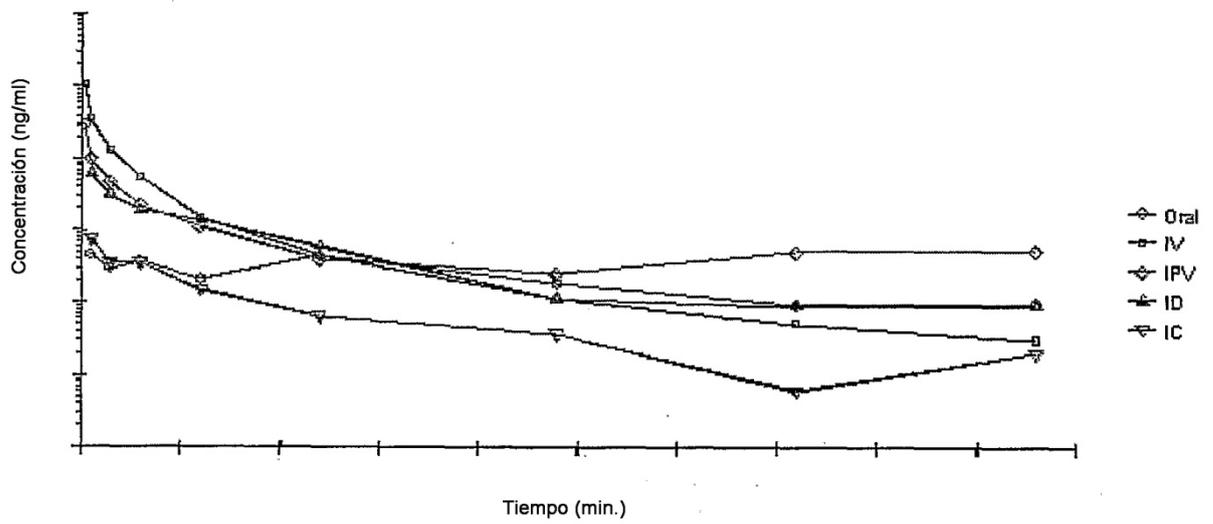
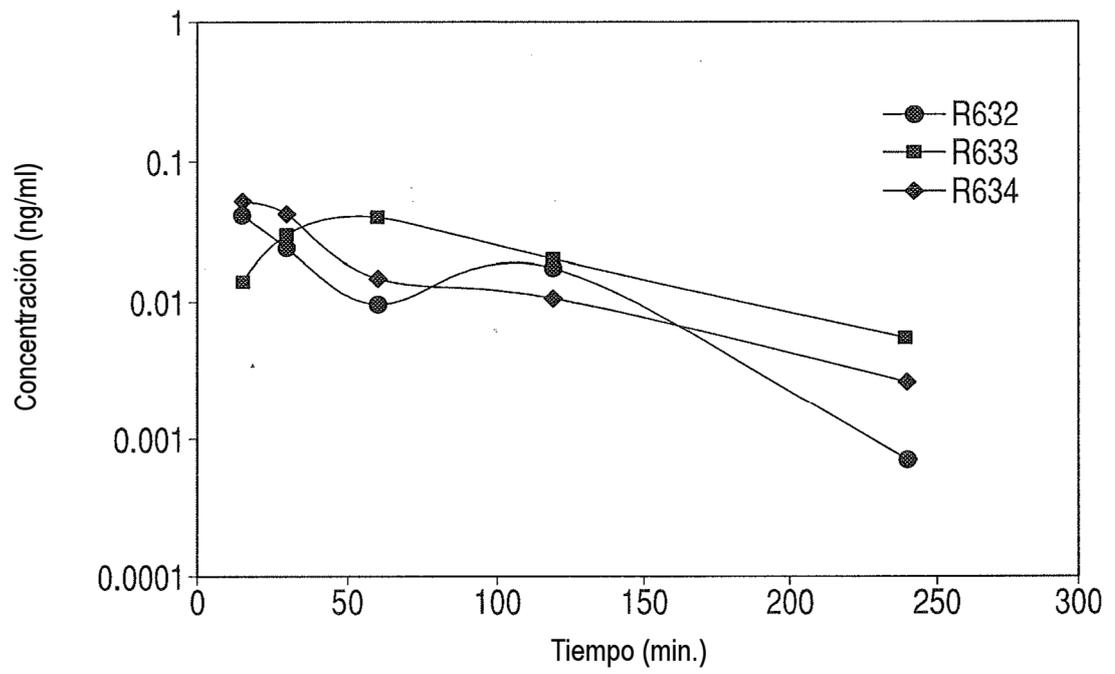


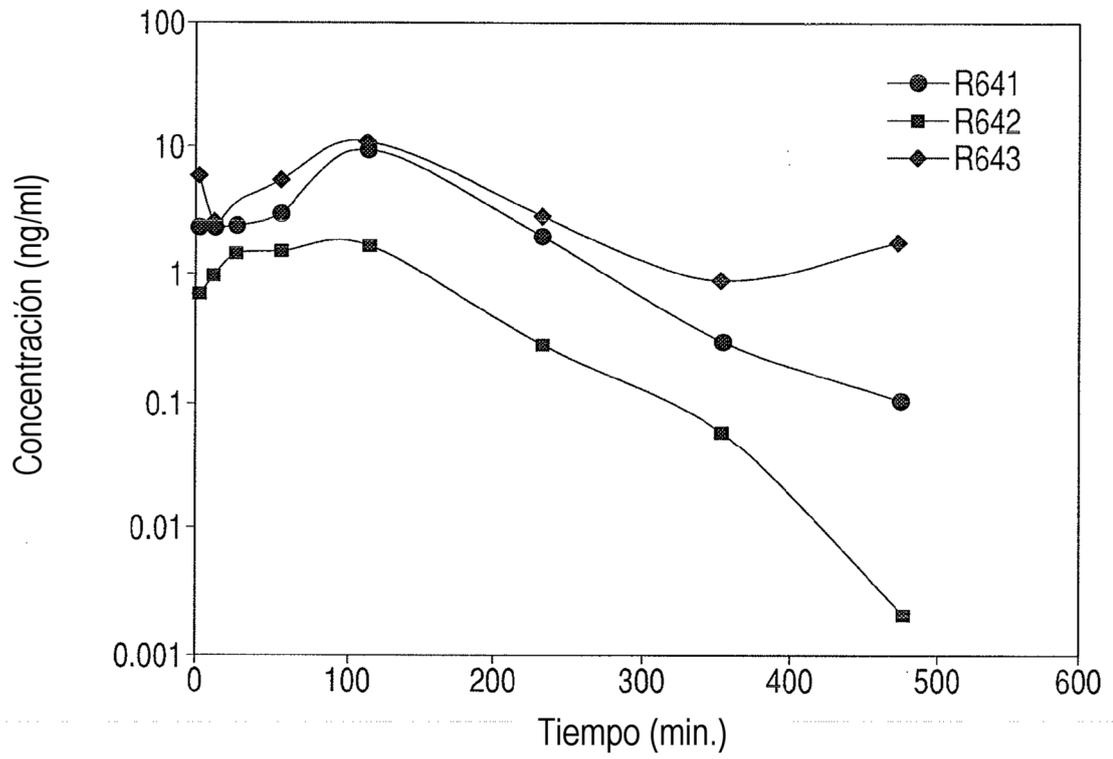
FIGURA 3



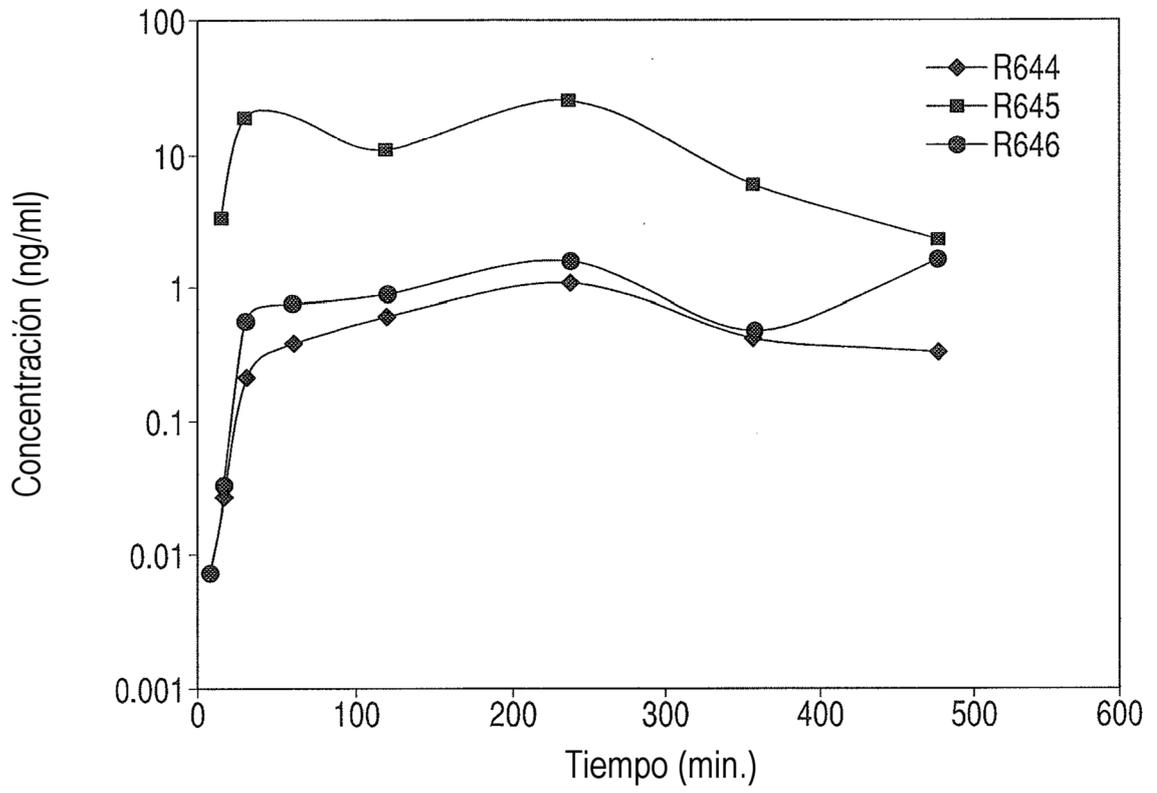
**FIGURA 4**



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

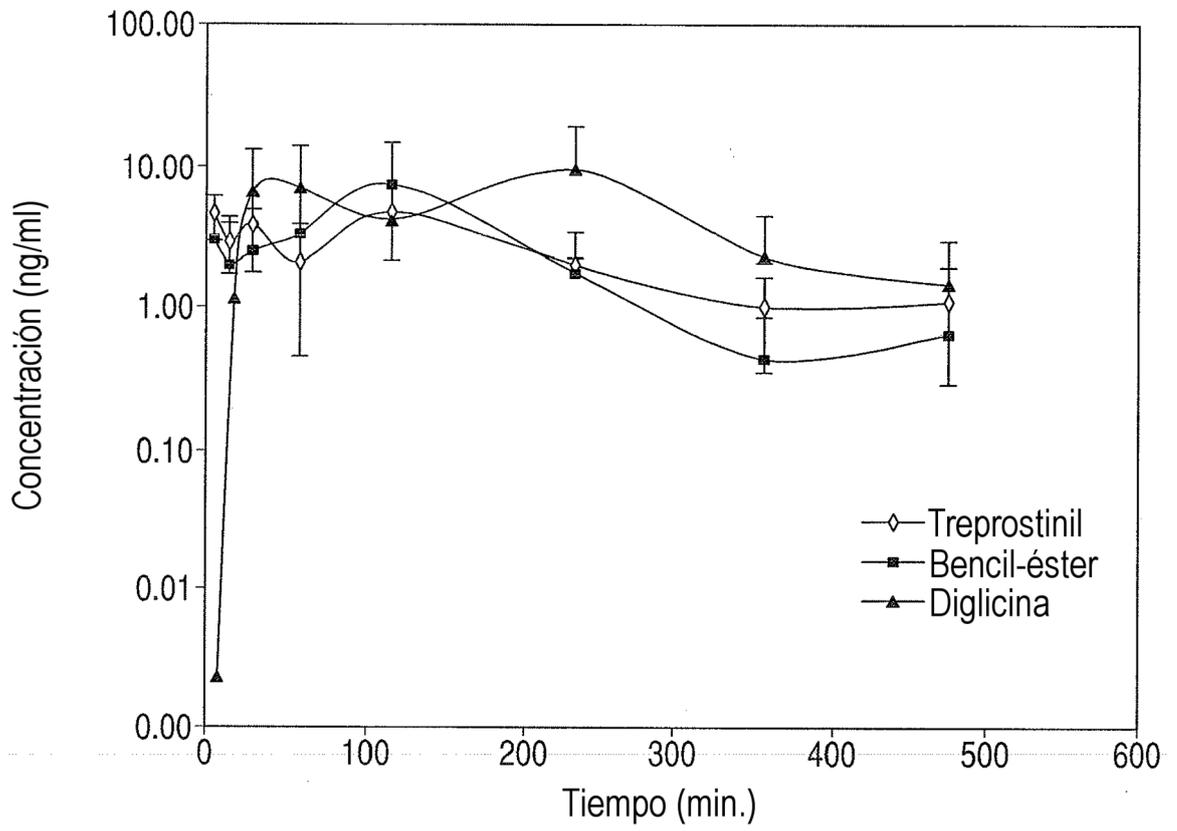


FIG. 8

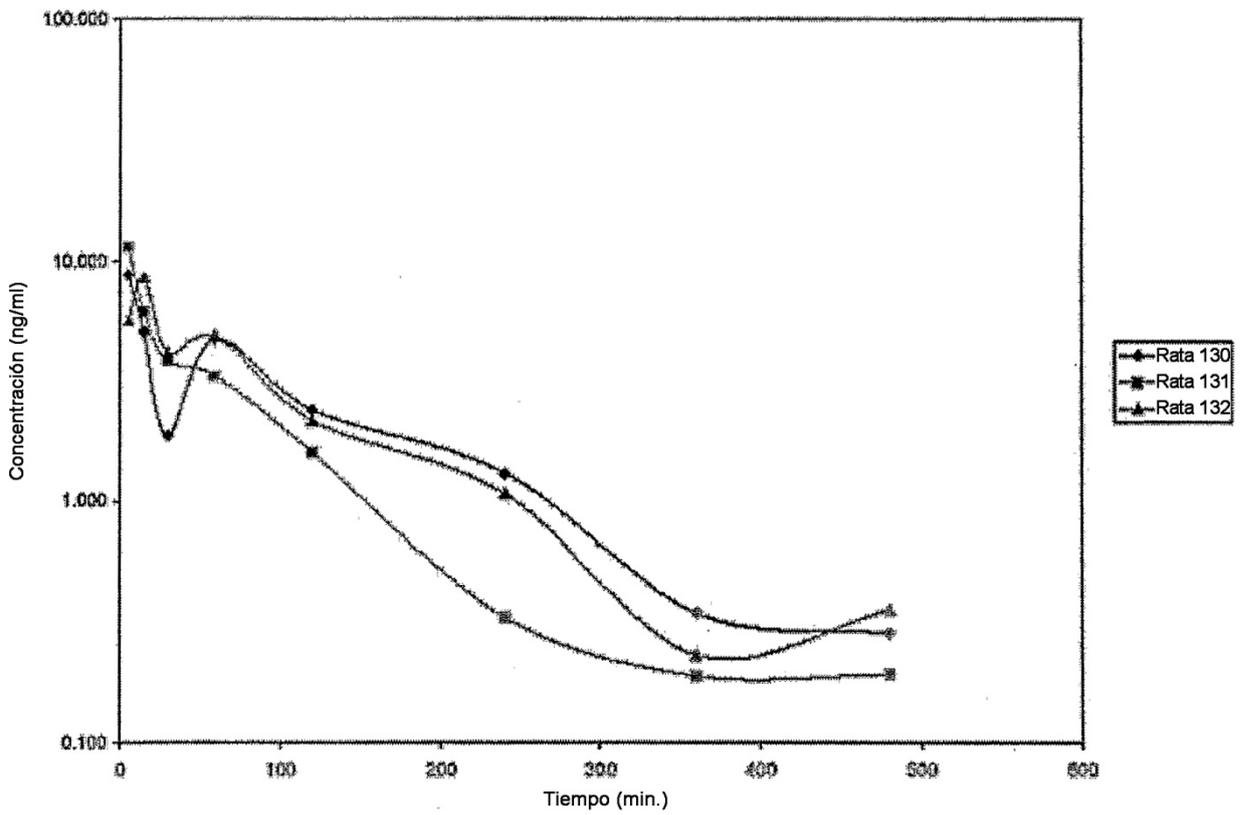


FIGURA 9

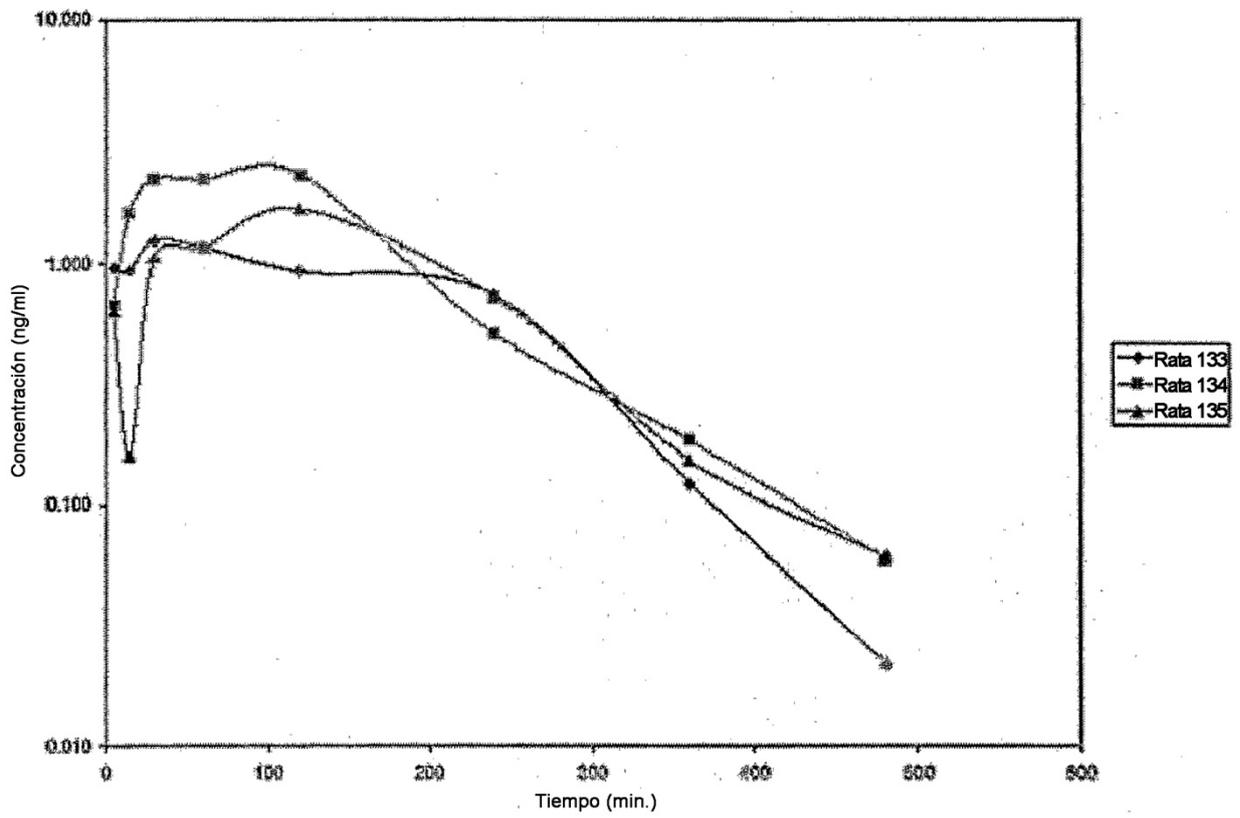


FIGURA 10

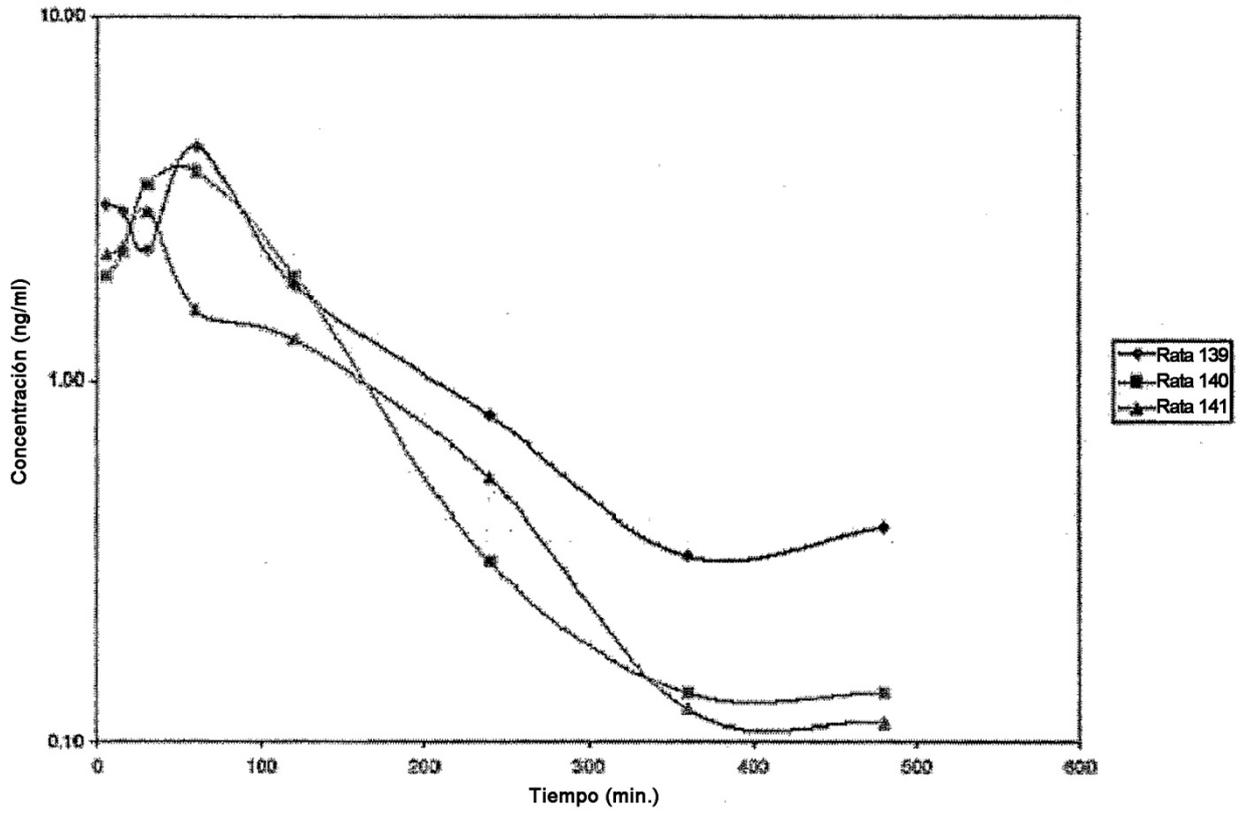


FIGURA 11

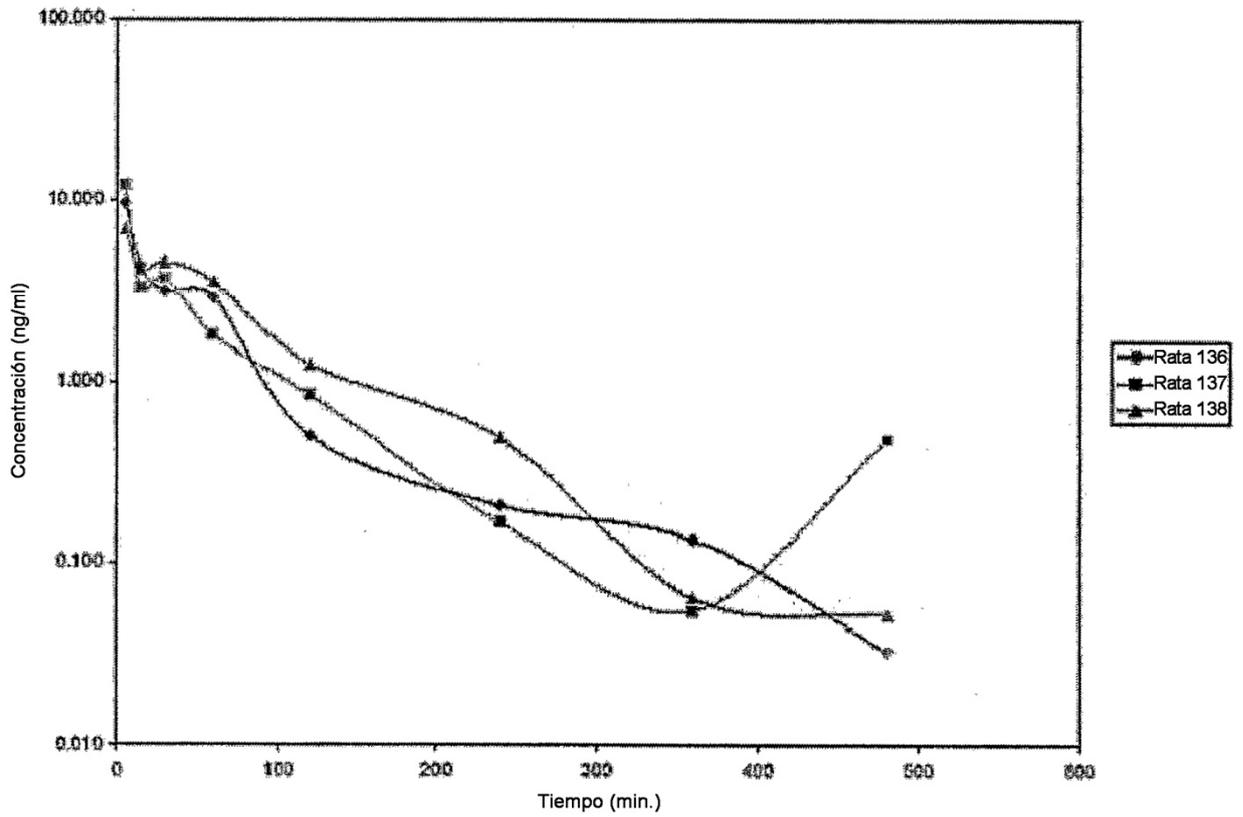
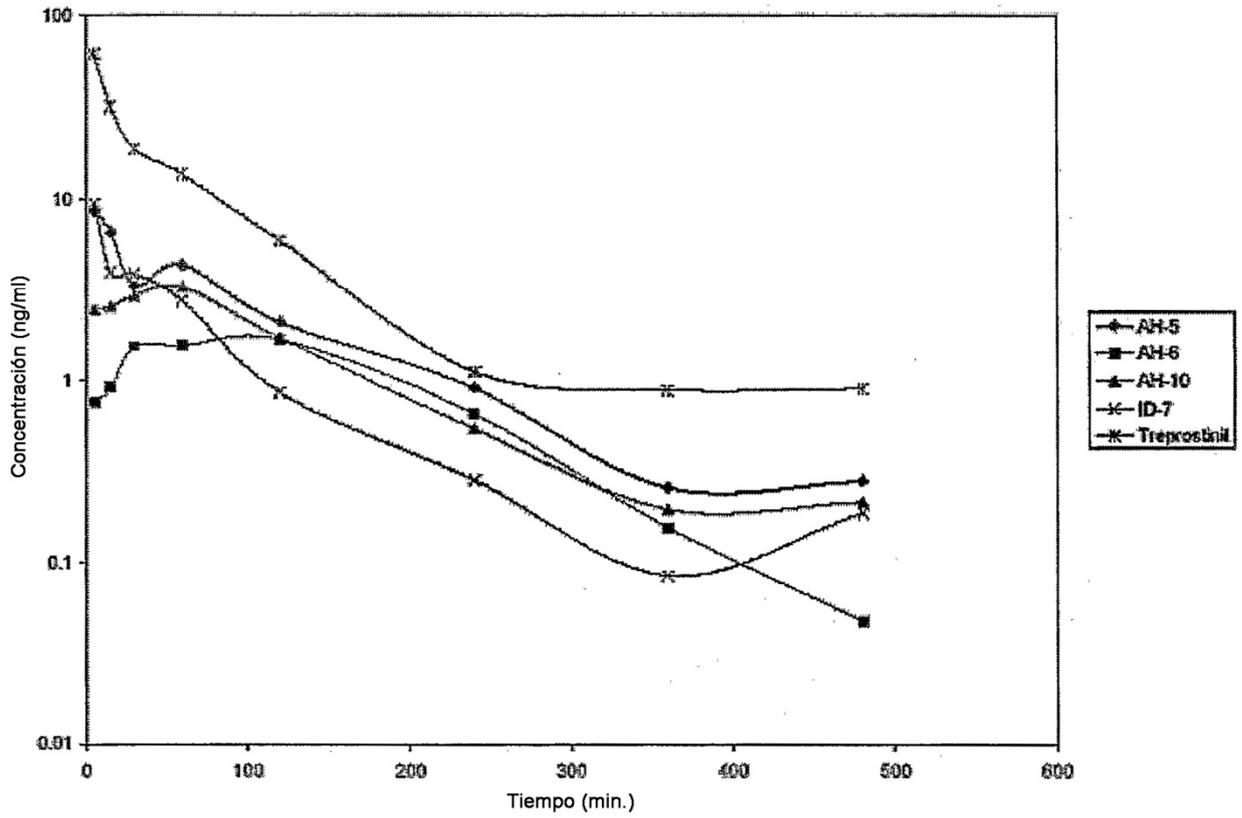


FIGURA 12



Figuras 13A - 13D

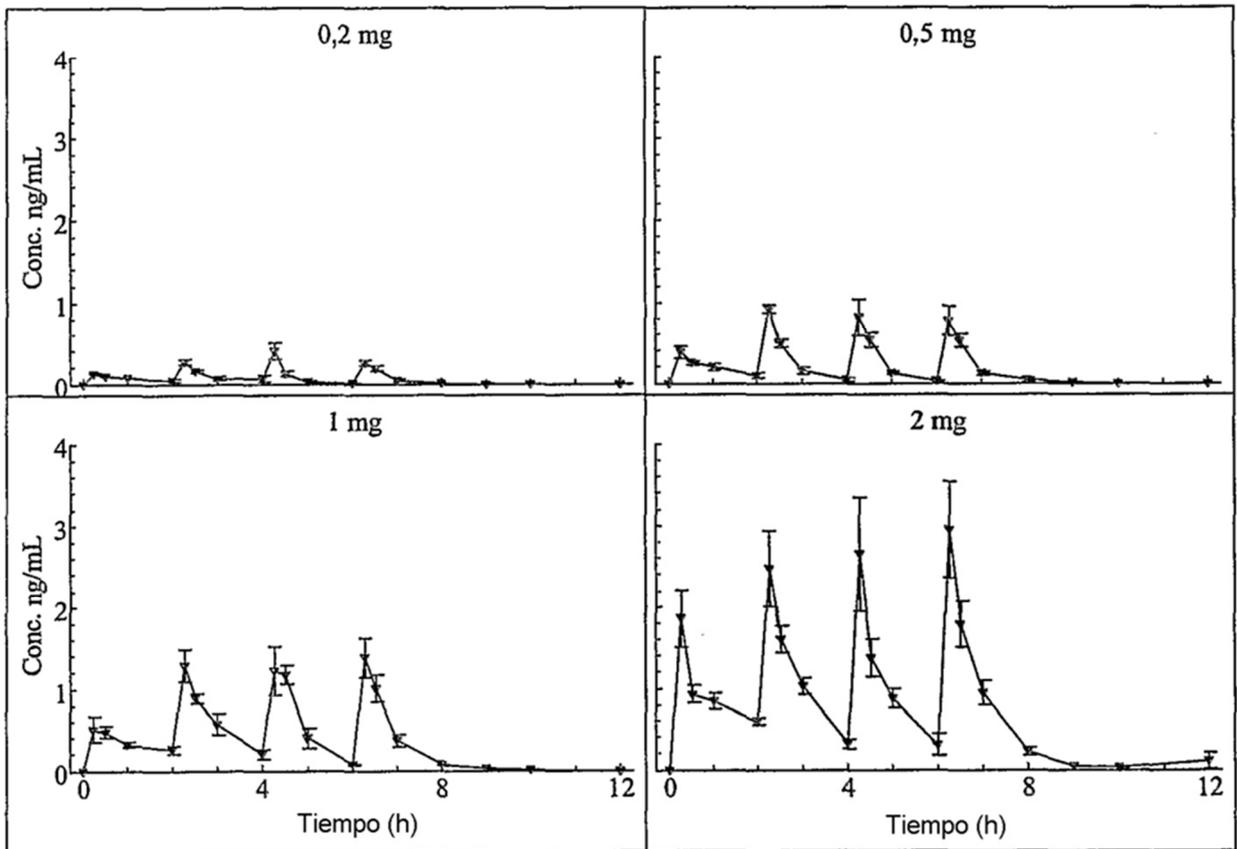


Figura 14

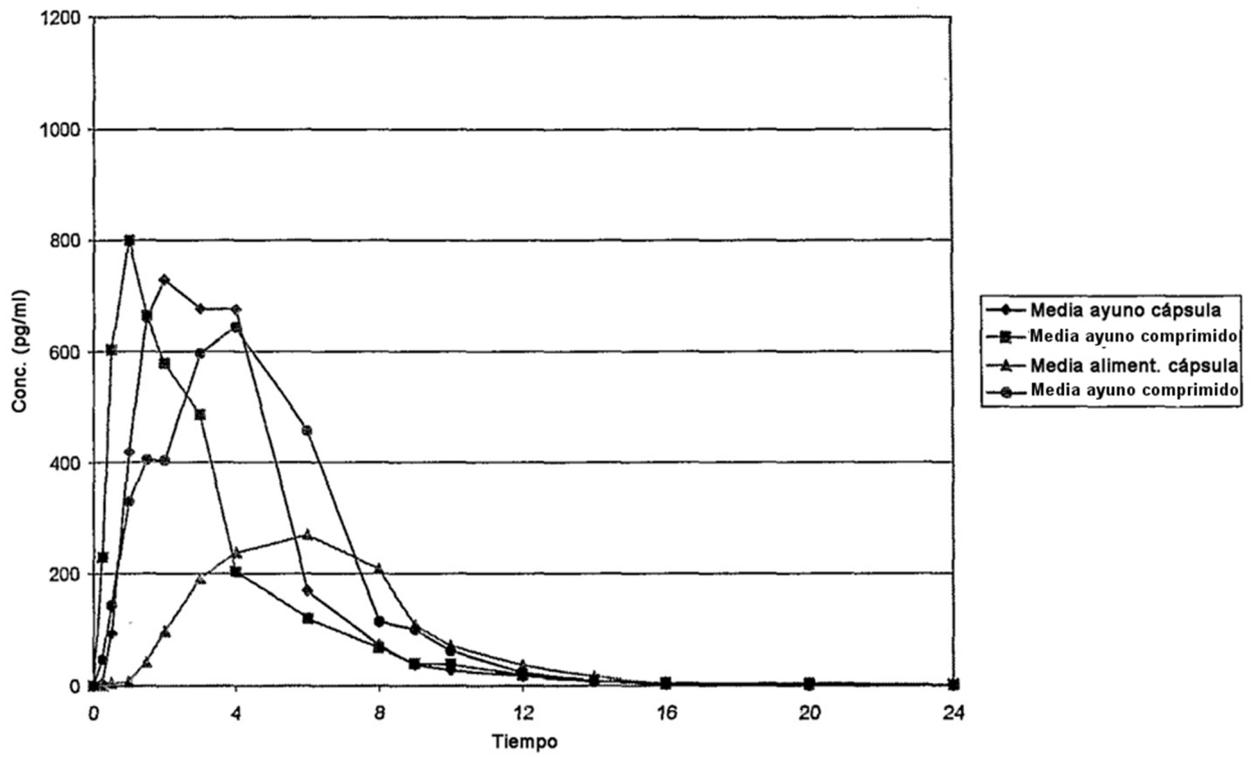


FIGURA 15

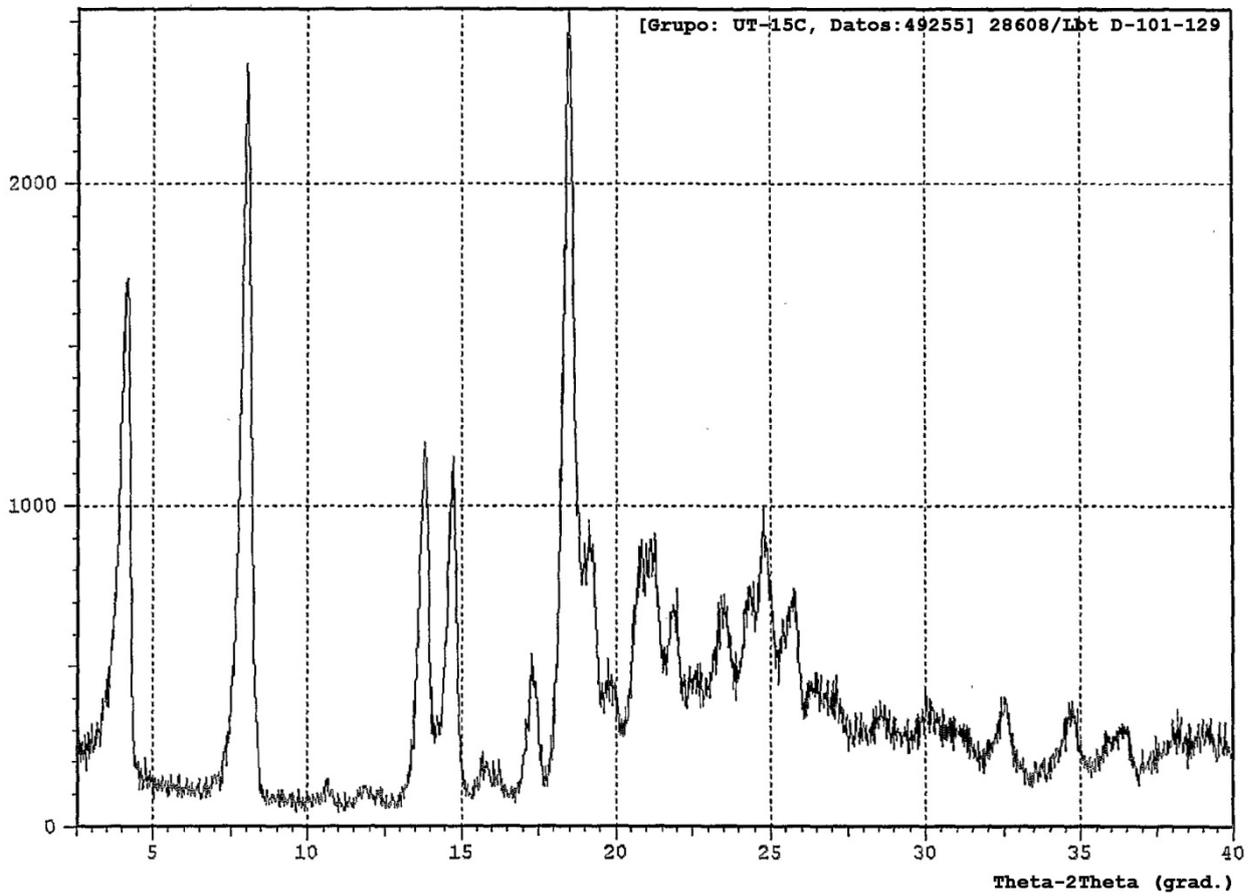


FIGURA 16

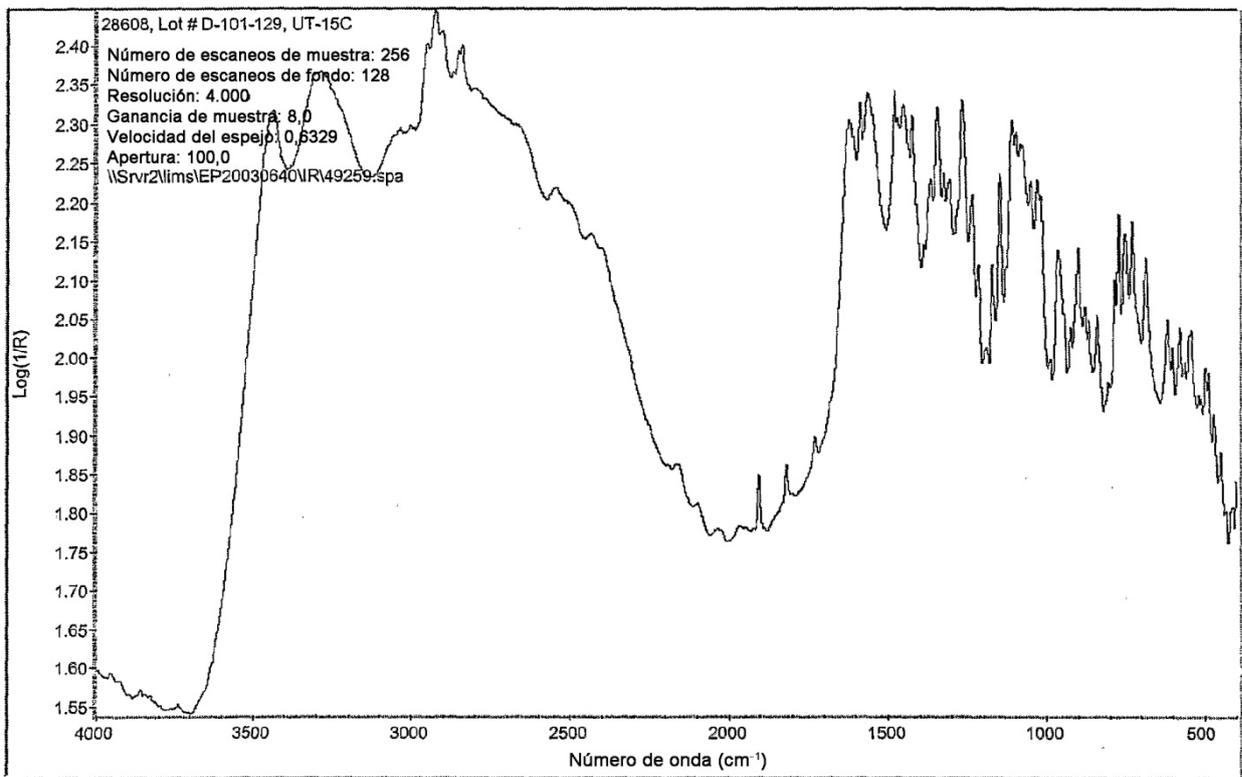


FIGURA 17

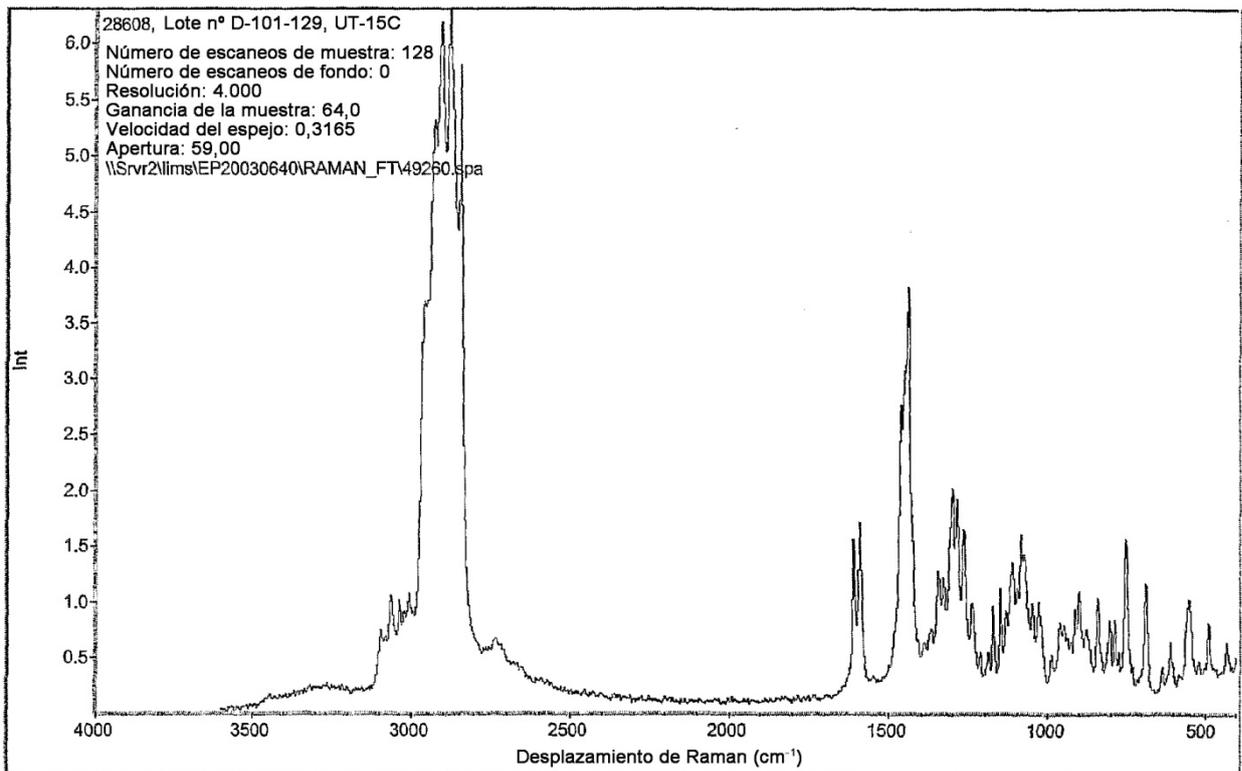


FIGURA 18

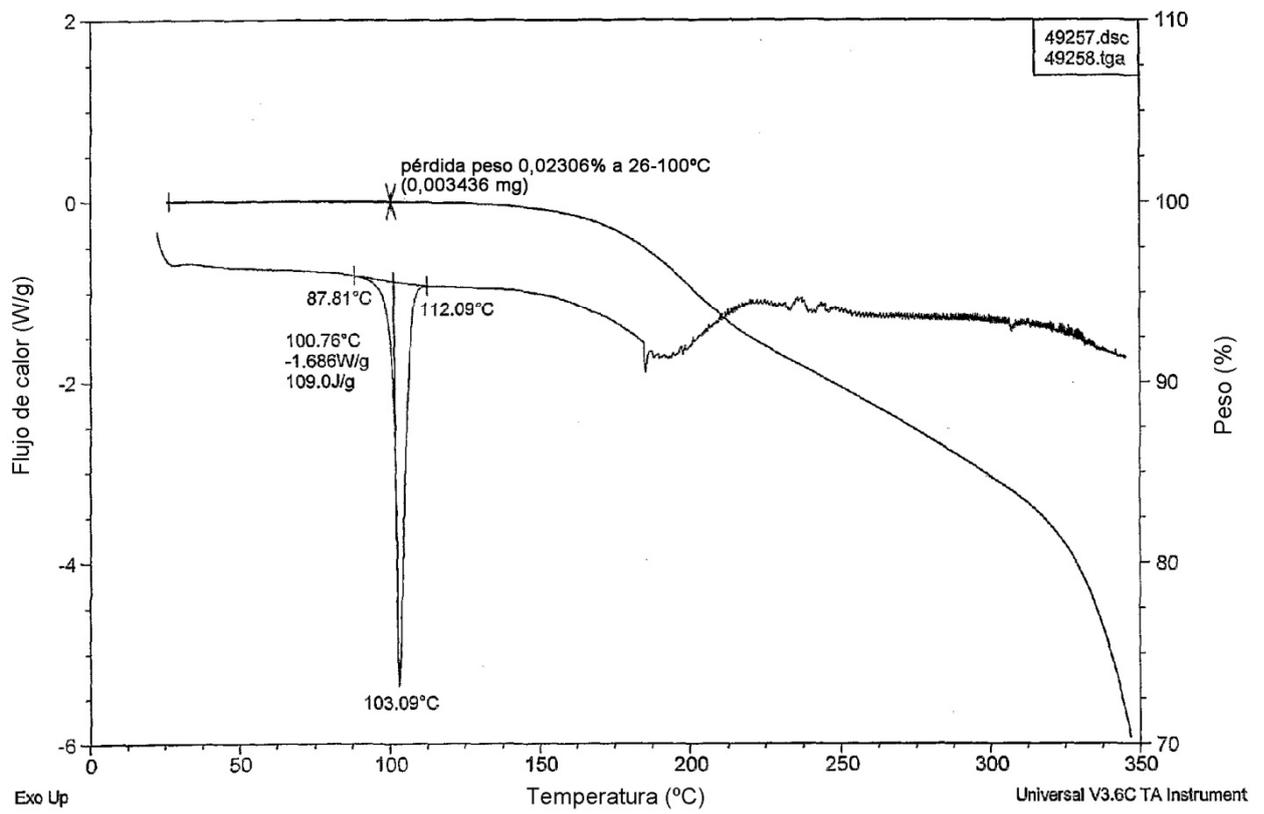


FIGURA 19

Treprostinil dietanolamina (UT-15C), 28608, D-101-129  
Archivo 49261

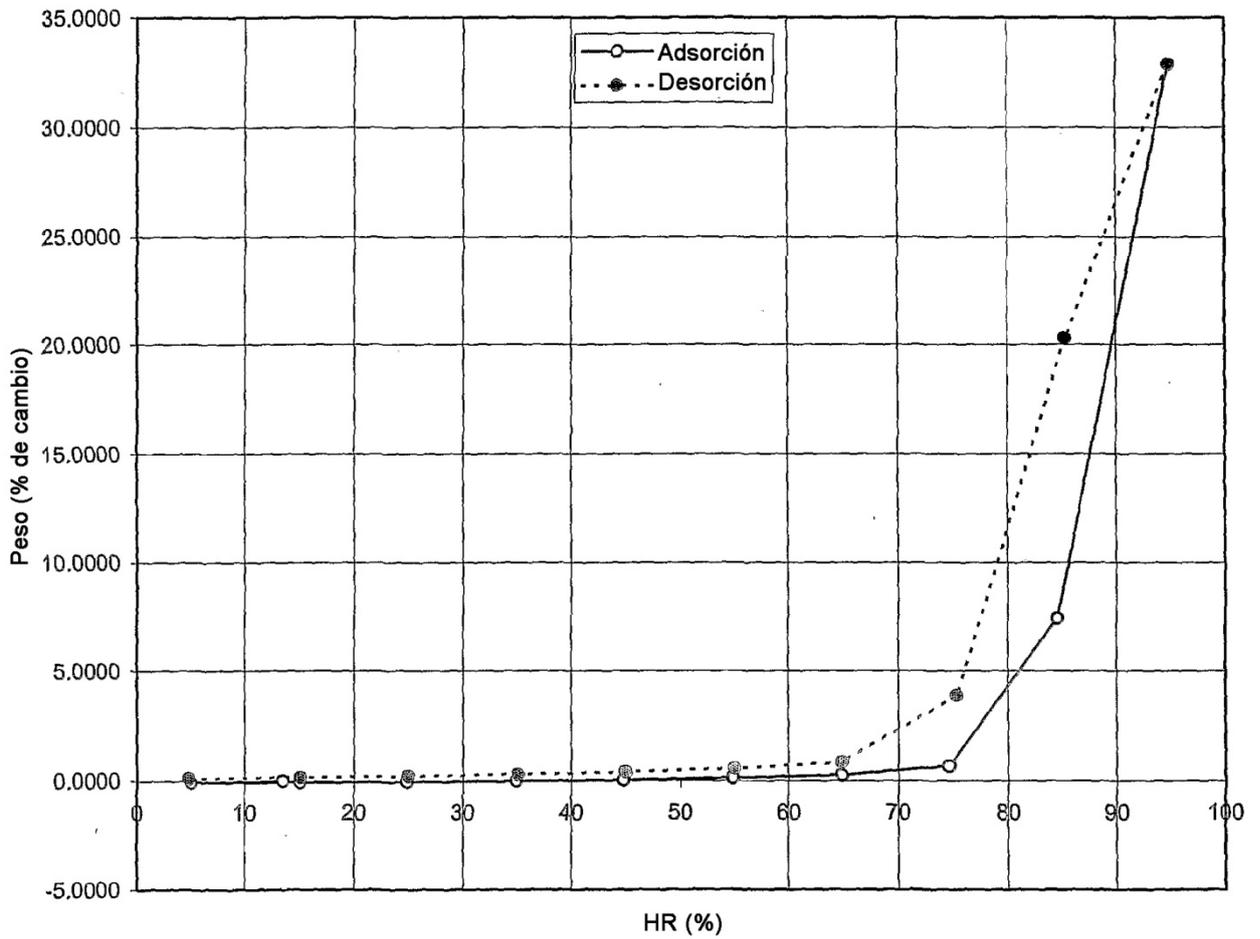


FIGURA 20

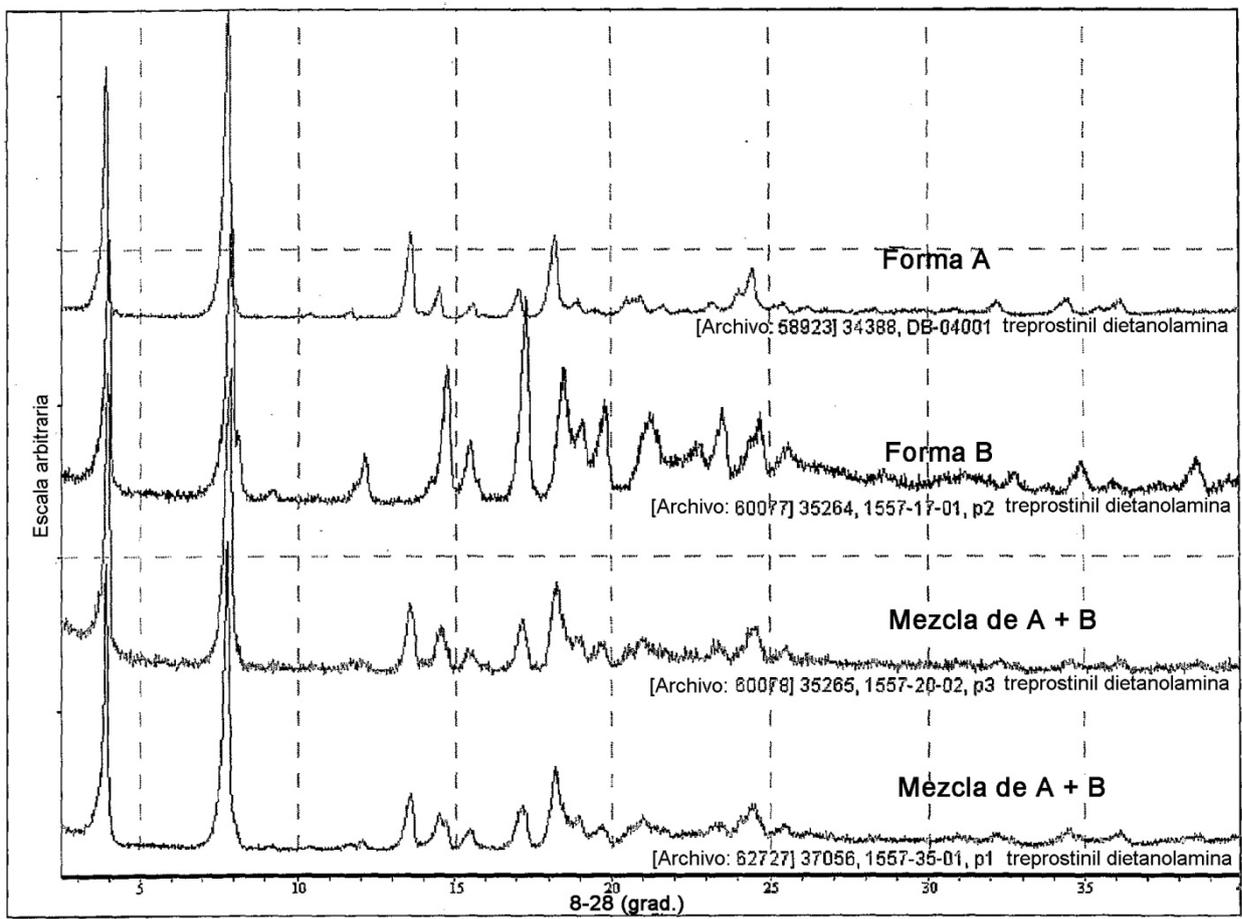


FIGURA 21

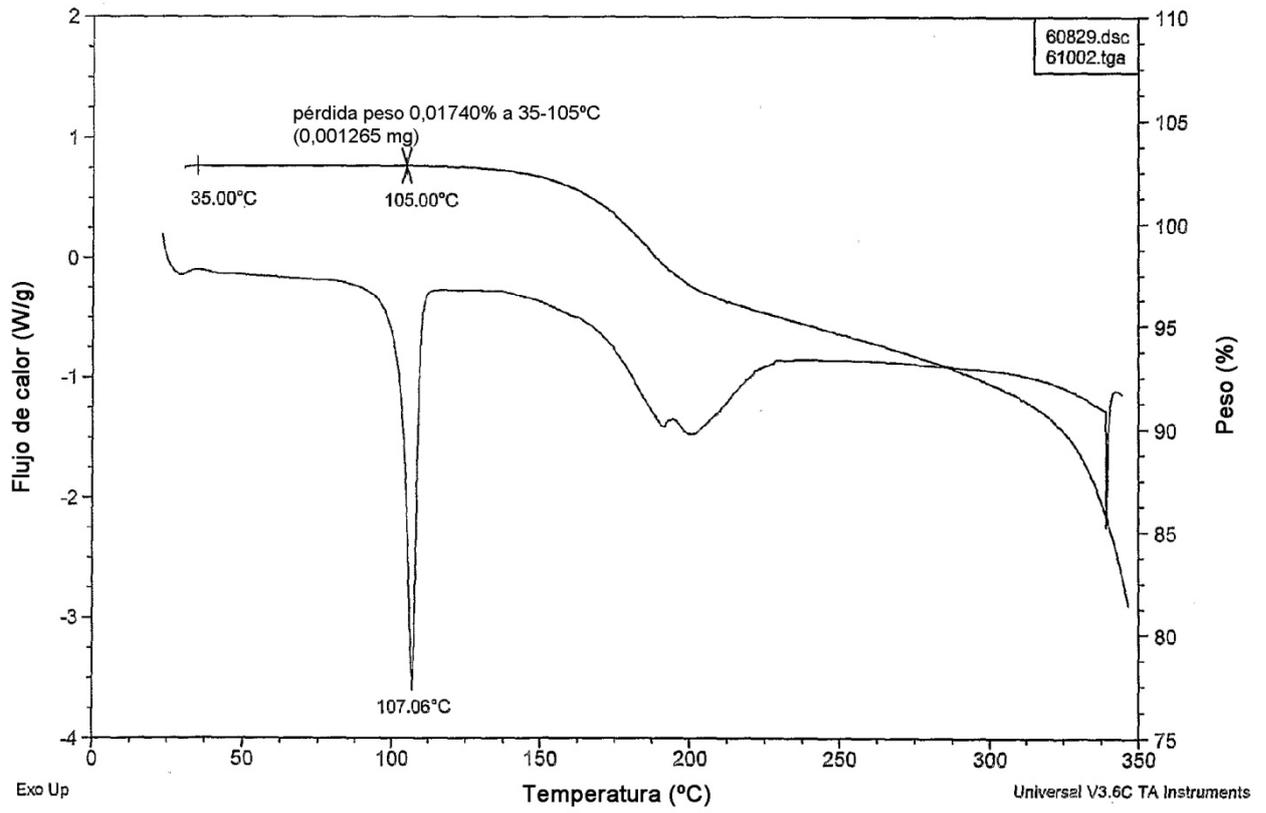


FIGURA 22

