

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 998**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14	(2006.01) A61K 31/5578	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01) A61K 31/5585	(2006.01)
A61K 31/137	(2006.01) A61K 31/56	(2006.01)
A61K 31/343	(2006.01) A61K 31/573	(2006.01)
A61K 31/4164	(2006.01) A61K 38/00	(2006.01)
A61K 31/4174	(2006.01) A61K 47/34	(2007.01)
A61K 31/4406	(2006.01) A61K 47/42	(2007.01)
A61K 31/46	(2006.01) A61K 47/44	(2007.01)
A61K 31/47	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61K 31/4965	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2013** **PCT/JP2013/079134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014** **WO14069401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013** **E 13851236 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2913047**

54 Título: **Agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar**

30 Prioridad:

29.10.2012 JP 2012238017

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

03.12.2019

73 Titular/es:

**CARDIO INCORPORATED (100.0%)
Business Support Center, For Biomedical
Research Activities (BMA), 2F, 1-5-5 Minatojima-
Minamimachi, Chuo-ku, Kobe-shi
Hyogo 650-0047, JP**

72 Inventor/es:

**SAWA, YOSHIKI;
MIYAGAWA, SHIGERU;
TAIRA, MASAKI y
SAKAI, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 733 998 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

Agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar.

10 **Antecedentes de la técnica**

Generalmente, se han desarrollado e investigado inhalantes (preparaciones para la administración transpulmonar) como un método para la administración específica pulmonar de agentes para el tratamiento de enfermedades pulmonares. Se han utilizado inhalantes como un método de administración que se espera que proporcione efectos locales en los pulmones, evitando simultáneamente los efectos secundarios sistémicos. En el desarrollo de un inhalante como método de administración específico de pulmón, siguen sin resolverse muchos problemas en términos de preparación farmacéutica, tamaño de partícula, efecto irritante, metabolismo del fármaco, propiedades físicas, etc., para administrar continuamente un compuesto farmacéutico en los pulmones y mantener su cantidad en los mismos.

Asimismo existen problemas para los pacientes diana, tales como la dificultad en la manipulación de inhaladores, la inhalación frecuente (persistencia), la reducción de la adherencia, la débil fuerza de inhalación de los pacientes de enfermedad pulmonar, la obstrucción de las vías respiratorias debido a esputo, la dificultad para administrar compuestos farmacéuticos en el sitio diana debido a la obstrucción de bronquiolos inducida por una lesión periférica, y la necesidad de eliminar el fármaco que queda en la cavidad oral mediante gargarismo o similar con el fin de evitar efectos secundarios.

Por lo tanto, un inhalante que resulta eficaz como método de administración específico de pulmón con frecuencia resulta difícil de desarrollar.

Anteriormente eran habituales los aerosoles como inhalantes. Sin embargo, desde la prohibición de los clorofluorocarbonos para la pulverización, se han utilizado principalmente inhalantes de polvos (inhalación de polvos secos, DPI) que no utilizan ningún gas. Debido a que unos polvos farmacéuticos solos se adhieren o quedan retenidos en instrumentos, deben formarse partículas secundarias con un portador inerte, tal como lactosa, para reducir la adhesión y facilitar la inhalación. Como inhalantes para tratar el asma, actualmente se utilizan principalmente corticoesteroides (esteroides), combinaciones de un corticoesteroide con un estimulante β_2 (LABA), etc. En el caso de que se utilice un esteroide inhalado, resulta necesario hacer gárgaras después de la inhalación para eliminar el fármaco innecesario que queda en la boca y garganta con el fin de evitar enfermedades infecciosas. Los inhaladores de disco, en los que se fija un comprimido o una cápsula que contiene unos polvos farmacéuticos, asimismo se utilizan con frecuencia. Sin embargo, con frecuencia resulta difícil para las personas de edad avanzada y los niños manipular los inhaladores de disco.

Por otra parte, las formas de administración sistémica, tales como las preparaciones orales, parches e inyecciones intravenosas adolecen del problema de la divergencia de la eficacia respecto de los efectos secundarios debido a que los niveles sanguíneos elevados de una sustancia farmacéutica pueden causar efectos secundarios sistémicos.

Entre los ejemplos de enfermedades pulmonares se incluyen neumonía aguda, fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquitis crónica, enfisema pulmonar, asma, asma refractario, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), sarcoidosis, tromboembolismo pulmonar idiopático crónico, panbronquiolitis difusa, fibrosis quística, alveolitis alérgica, cáncer de pulmón, síndrome de hipoventilación por obesidad, síndrome de hipoventilación alveolar y rechazo crónico en el trasplante pulmonar. Son enfermedades particularmente importantes, la fibrosis pulmonar, la neumonía intersticial, la hipertensión pulmonar, el asma, la COPD y la SIRS.

Para estas enfermedades, se han desarrollado inhalantes, parches, preparaciones orales, infusiones intravenosas, etc. Sin embargo, todavía no se han desarrollado preparaciones farmacéuticas suficientemente eficaces.

El estado y problemas actuales de los fármacos terapéuticos para enfermedad pulmonar típicos se indican a continuación.

1. Asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

El tamaño del mercado doméstico japonés de los agentes terapéuticos para enfermedades respiratorias fue de 302100 millones de yenes (2009), aproximadamente 60% de los cuales eran para agentes de tratamiento del asma. El tamaño del mercado de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es de 33200 millones de yenes.

Aunque el número de potenciales pacientes de COPD se cree que es de aproximadamente 5.3 millones, el número de pacientes que de hecho han recibido tratamiento actualmente es inferior al 10%. Se prevé una expansión del tamaño del mercado, con un número creciente de pacientes en el futuro.

- 5 El número de pacientes de asma en Japón es de 888,000. El número de pacientes de asma es de 69.88 por cada 10,000 en la población (2008) y está creciendo cada año. En las terapias del asma se utilizan esteroides, agonistas de receptor β_2 , antagonistas de receptor de leucotrieno (ARLT), fármacos anticolinérgicos, preparaciones de teofilina, etc. En la terapia del asma, se utilizan esteroides como fármaco de primera línea debido a que debe suprimirse la inflamación de las vías respiratorias. A partir de los efectos secundarios y similares, habitualmente se utilizan esteroides en forma de inhalantes (preparaciones de dosis pulmonar). Entre los ejemplos de esteroides inhalados se incluyen la fluticasona (nombre comercial: Flonase) y la beclometasona (nombre comercial: Qvar). Asimismo se utilizan inhalantes (nombres comerciales: Adoair, Symbicort, etc.) que comprenden un agonista β_2 de acción prolongada (LABA) (por ejemplo, salmeterol) y un fármaco esteroide. Sin embargo, los inhalantes asimismo provocan problemas, tales como la dificultad en la manipulación de inhaladores, la inhalación frecuente, la reducción del cumplimiento, la fuerza débil de inhalación de los pacientes de enfermedad pulmonar, la obstrucción de las vías respiratorias debido a esputo y la dificultad en la administración de compuestos farmacéuticos en el sitio diana debido a esputo. De esta manera, con frecuencia resulta difícil utilizar eficazmente los inhalantes.
- 10
- 15
- 20 Para niños y personas de edad avanzada que presentan dificultad para utilizar inhalantes, se utilizan antagonistas de receptor de leucotrieno (ARLT) como agentes orales para el tratamiento del asma. La utilización de ARLT se recomienda para la prevención y mejora del remodelado, el asma inducido por el ejercicio, el asma inducido por aspirina y similares. Entre los ejemplos de los ARLT típicos se incluyen pranlukast (nombre comercial: Onon) y montelukast (nombre comercial: Singulair). Sin embargo, debido a que existe asma que no está mediado por leucotrienos, los ARLT resultan ineficaces para aproximadamente 40% de los pacientes.
- 25

Además, entre los estimulantes β_2 -adrenérgicos, entre los ejemplos de inhalantes se incluye el salmeterol (nombre comercial: Serevent), parches tales como tulobuterol (nombre comercial: cinta Hokunalin), preparaciones orales, tales como procaterol (nombre comercial: Meptin), clenbuterol (nombre comercial: Spiropent), formoterol (nombre comercial: Atock) y similares. Entre otros ejemplos se incluyen teofilina (nombre comercial: Theo-Dur), que es un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) que provoca la relajación del músculo liso bronquial, y fármacos anticolinérgicos (antagonistas de receptor M3) que inhiben la contracción del músculo liso bronquial, tal como el ipratropio (nombre comercial: Atrovent). Sin embargo, no existe ningún compuesto terapéutico o fármaco que proporcione efectos mejores que los esteroides. Los fármacos anticolinérgicos están contraindicados en pacientes con glaucoma, hipertrofia prostática o similares.

30

35

La OMS estima que, aunque el número mundial de pacientes con niveles moderados a más severos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en 2005 era de 80 millones y la COPD provoca tres millones de muertes al año en todo el mundo y es la cuarta causa principal de muerte, las muertes relacionadas con COPD se incrementarán en 30% en los próximos 10 años. Según las estadísticas del Ministro de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social de Japón, el número de pacientes presentados en el hospital con COPD fue de 340,000 en 2001; el número de pacientes potenciales fue de 5,300,000 (en 2004) y la COPD causó 14,416 muertes (1.3% de la mortalidad total) (en 2005) y es la décima causa principal de muerte. En hombres, la COPD es la séptima causa principal de muerte.

40

45

La terapia farmacológica principal para la COPD son los broncodilatadores (por ejemplo, fármacos anticolinérgicos, estimulantes β_2 y fármacos de teofilina). Los inhalantes se recomiendan debido a la eficacia y efectos secundarios. Se utilizan principalmente fármacos anticolinérgicos inhalados de acción prolongada y los estimulantes β_2 inhalados. En el caso de que la obstrucción del flujo de aire sea severa y se produzcan múltiples exacerbaciones, se utiliza una combinación de un estimulante β_2 de acción prolongada y un esteroide inhalado.

50

Como fármaco anticolinérgico (antagonista M3), se utiliza tiotropio (nombre comercial: Spiriva), que es un inhalante de primera línea para el tratamiento de COPD. El tiotropio es superior a los estimulantes β_2 de acción prolongada en términos de broncodilatación y alivio de los síntomas. Sin embargo, el tiotropio está contraindicado en pacientes con disuria debido a hipertrofia prostática y en pacientes de glaucoma. Los efectos secundarios principales son boca seca, palpitaciones, náusea, disuria, íleo, etc.

55

Una cinta de tulobuterol (nombre comercial: cinta Hokunalin), que es un parche de un agonista β_2 , es inferior a los inhalantes en términos de broncodilatación, pero es una preparación farmacéutica que resulta fácilmente aplicable en personas de edad avanzada que presentan dificultades para inhalar. Entre los efectos secundarios se incluyen palpitaciones, temblores, cefalea, náusea y vómitos.

60

La teofilina, que es un inhibidor de PDE, es inferior a los inhalantes en términos de broncodilatación para la COPD. En los últimos años, han despertado interés los efectos antiinflamatorios de la teofilina sobre las vías respiratorias, y se espera que la teofilina resulte útil como fármaco terapéutico. Sin embargo, debido a que el intervalo de concentración eficaz en sangre es estrecho, debe monitorizarse la concentración apropiada en sangre.

65

Estos son todos compuestos o preparaciones farmacéuticas para dilatar los bronquiolos y mejorar transitoriamente la función pulmonar. No existen compuestos o preparaciones farmacéuticas que inhiben la destrucción de los alveolos pulmonares o regeneran los alveolos pulmonares.

2. Neumonía intersticial (fibrosis pulmonar)

La neumonía intersticial (fibrosis pulmonar) se ha considerado una enfermedad intratable y es una enfermedad con elevada mortalidad. Sin embargo, no existen compuestos o preparaciones farmacéuticas eficaces para la neumonía intersticial. Pirfenidona (nombre comercial: Pirespa) fue liberada en 2008, pero ha sido aprobada sólo en Japón y desarrolla efectos secundarios, tales como fotodermatosis y deterioro de la función hepática. Para la fibrosis pulmonar idiopática (neumonía intersticial usual en la clasificación de los tejidos histopatológicos), sólo ha estado en el mercado este fármaco. Sin embargo, se afirma que su eficacia resulta insuficiente.

3. Hipertensión pulmonar

La hipertensión arterial pulmonar se ha considerado una enfermedad intratable. Según las estadísticas recopiladas por el Ministro de Salud, Trabajo y Bienestar social japonés en 2009, el número de pacientes con hipertensión arterial pulmonar (hipertensión arterial pulmonar idiopática y hereditaria) en Japón crece cada año y se ha informado de que era de 1,140 en 2008. Aproximadamente 100 personas desarrollan hipertensión pulmonar cada año. Además, se informa de que la enfermedad del colágeno (por ejemplo, la artritis reumatoide) acompaña a la hipertensión pulmonar.

Se seleccionó un método terapéutico de acuerdo con la gravedad y condiciones patológicas de la hipertensión pulmonar. Entre los ejemplos de fármacos eficaces se incluyen infusiones intravenosas continuas, tales como epoprostenol sodio (PGI_2 sodio, nombre comercial: Flolan). El epoprostenol sodio se utiliza para la hipertensión pulmonar grave y es el más eficaz de los fármacos terapéuticos actualmente disponibles. Sin embargo, debido a que este fármaco presenta una semivida muy corta, de aproximadamente 6 minutos, la preparación farmacéutica debe administrarse en continuo en el cuerpo mediante un catéter venoso central. Otras preparaciones de derivado de PGI_2 (derivados de carbaciclina) en forma de inhalantes e inyecciones subcutáneas asimismo se encuentran disponibles fuera de Japón, aunque se desarrollan efectos secundarios, tales como reducción de la presión sanguínea, cefalea, episodios de acaloramiento, dolor maxilar, diarrea, náuseas y erupciones. Además, como preparaciones orales, asimismo se encuentran disponibles un inhibidor de PDEV (sildenafil), un antagonista de ET-1 (bozentán), beraprost, que es un derivado de PGI_2 , y similares, aunque estos están indicados en pacientes leves a moderados.

4. SIRS

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es una enfermedad crítica en el aspecto de que puede derivar en fallo orgánico múltiple (FOM). Sin embargo, actualmente no se encuentran disponibles agentes terapéuticos eficaces para SIRS. Pueden utilizarse esteroides glucocorticoides y un inhibidor de neutrófilo elastasa (sivelestat, nombre comercial: elaspol). Debido a que el FOM con frecuencia presenta un desenlace fatal, debe evitarse la derivación en fallo orgánico múltiple mediante la provisión de cuidados intensivos en la etapa de SIRS.

Se están desarrollando en todo el mundo nuevos fármacos con diana en estas enfermedades pulmonares intratables. Desde la prohibición de la utilización de clorofluorocarbonos, ha existido el deseo de desarrollar inhalantes e inhaladores de polvos, así como un método terapéutico específico de pulmón más eficaz debido a la débil fuerza de inhalación de los pacientes que presentan un trastorno respiratorio.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se han desarrollado preparaciones orales, inyecciones intravenosas y agentes de administración transdérmica. Sin embargo, estas preparaciones farmacéuticas con frecuencia presentan una divergencia insuficiente respecto a efectos secundarios sistémicos resultante de la administración sistémica.

En el contexto de la presente invención se han estudiado anteriormente los efectos farmacológicos de las prostaglandinas (PG). Durante el estudio, se han observado similitudes en la acción de las prostaglandinas y los factores de regeneración *in vivo*, y de esta manera, se han centrado e investigado la posibilidad de que estas PG puedan inducir la producción de diversos factores de regeneración *in vivo*. Como resultado de la investigación, en el contexto de la presente invención se ha encontrado que entre las prostaglandinas (PG), los agonistas de receptor IP (PGI_2), receptor de EP_2 y receptor de EP_4 , que estimulan la producción de AMPC cíclico (AMPC), estimulan la formación de lumen en el cocultivo de células endoteliales vasculares de vena umbilical humana normal (HUVEC) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Como resultado de investigación adicional, en el contexto de la presente invención se ha encontrado que estos agonistas inducen diversos factores de regeneración *in vivo* a partir de fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales vasculares y macrófagos. Como resultado de investigación adicional, en el contexto de la presente invención se han seleccionado, como inductor de un factor de regeneración *in vivo*, una prostaglandina (PG) tipo I (receptor IP) que se biosintetiza principalmente en las

células endoteliales vasculares y ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metiliden-aminooxi]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético (en adelante en ocasiones denominado "Compuesto 1") como agonista selectivo de receptor IP, que es un derivado de oxima (OX) que no presenta un esqueleto de prostaglandina (PG) y que asimismo presenta actividad inhibidora de tromboxano (TX) A₂ sintasa (referencia n° 2 de la literatura de patentes (LTP)).

Las prostaglandinas (PG) se clasifican como autacoides. Las prostaglandinas (PG) se sintetizan en una cantidad requerida en un sitio que requiere PG en caso de que se requieran, y son rápidamente desactivadas metabólicamente, tópicamente, tras manifestarse la acción. De acuerdo con lo anterior, al contrario que las hormonas, las prostaglandinas (PG) no se hacen circular sistémicamente. En la aplicación clínica, las prostaglandinas (PG) adolecen de problemas, tales como una corta semivida en sangre debido a inestabilidad científica. En la administración sistémica, las preparaciones inyectables de prostaglandinas (PG) adolecen de problemas tales como la acción hipotensora asociada a vasodilatación, cefaleas y episodios de acaloramiento, y las preparaciones orales de las mismas adolecen de problemas tales como la inducción de diarrea y la intususpección, además de la acción hipotensora. Para evitar dichos problemas, en el contexto de la presente invención se investigó la posibilidad de administrar directamente una preparación farmacéutica de acción prolongada en el sitio de la enfermedad.

En el contexto de la presente invención se considera que la liberación sostenida de compuesto 1 en un sitio isquémico que requiere angiogénesis o en un sitio lesionado que requiere la reparación de tejidos podría inducir en continuo la producción de diversos factores de regeneración *in vivo* en la periferia del sitio lesionado, además de vasodilatar los vasos sanguíneos restantes en el sitio isquémico e incrementar el flujo sanguíneo basándose en la acción inhibidora de la agregación plaquetaria, proporcionando de esta manera una preparación SAF (sistema de administración de fármaco) que presenta menos efectos secundarios que la administración sistémica. En el contexto de la presente invención se considera además que un medicamento con menos efectos secundarios que la administración sistémica y con un cumplimiento mejorado de la administración de menor frecuencia de administración podría crearse con una preparación farmacéutica que pudiese liberar Compuesto 1 de una manera sostenida durante el periodo hasta la angiogénesis (regeneración) o hasta producirse la reparación del tejido en el sitio isquémico o en la periferia del sitio de tejido lesionado.

En el contexto de la presente invención se llevaron a cabo amplias investigaciones y se llegó a la idea de producir una preparación de microesferas (ME) que comprendiese Compuesto 1 y un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) (en adelante en ocasiones denominado "Compuesto 1/ME") a partir de las características estructurales del compuesto 1. El compuesto 1/ME se formula y se diseña de tal manera que el PLGA se hidroliza en ácido láctico y ácido glicólico en el sitio de la administración y el compuesto 1 contenido en las microesferas es liberado de manera prácticamente lineal en el cuerpo vivo. Hasta el momento se han desarrollado preparaciones de liberación sostenida que pueden liberar el principio activo durante 1 semana a 6 meses mediante el ajuste del peso molecular de PLGA, la proporción de ácido láctico a ácido glicólico y el tamaño de partícula (referencias n° 1 y n° 2 de la literatura de patentes (LTP)).

Tal como se ha mencionado anteriormente, al administrar por vía subcutánea o inyectar por vía intramuscular Compuesto 1/EM, éste puede utilizarse como infusión intravenosa de largo plazo o preparación similar.

Una investigación de los efectos farmacológicos del compuesto 1 ha revelado que al cultivar fibroblastos o células musculares lisas con compuesto 1, éste estimula la producción de diversos factores de regeneración *in vivo* y repara los tejidos debido a la acción antiapoptótica, la acción estimulante de la neovascularización, la acción inductora de la diferenciación de las células madre, la acción antifibrótica, etc. Entre los ejemplos de factores de regeneración *in vivo* se incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor derivado de células estromales (SDF-1), diversos factores de crecimiento fibroblástico (a/b-FGF), el factor β de crecimiento transformante, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la angiopoyetina, el factor inducible por hipoxia (HIF-1), la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), el factor de células madre (SCF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento de condrocitos (GDF), el factor inhibidor de leucemia (LIF), HMGB1 y los factores de transcripción de tipo Kruppel (KLF) y los factores de crecimiento de sus familias.

Entre los ejemplos de factores de regeneración *in vivo* se incluyen además matrices extracelulares (por ejemplo, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos) y factores de adhesión celular (por ejemplo, cadherinas e integrinas).

El factor de regeneración *in vivo* es preferentemente, por ejemplo, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en b-FGF, HGF, VEGF, EGF, SDF-1, IGF-1, LIF, HIF-1, HMGB-1, G-CSF, y matrices extracelulares.

Debido a dichas acciones farmacológicas, es conocido que el compuesto 1 resulta útil como un agente para prevenir y/o tratar diversas lesiones orgánicas, tales como enfermedades cardíacas (por ejemplo, infarto de

miocardio, angina, taquiarritmia ventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, disfunción diastólica, cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía dilatada, fibrilación auricular, miocarditis y rechazo crónico del trasplante cardíaco, enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatitis fulminante, hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis hepática, hígado graso y trasplante de hígado), enfermedades renales (por ejemplo, lesión renal aguda (AKI), enfermedad renal crónica (CKD), glomerulonefritis, nefroesclerosis, nefropatía en pacientes de diálisis, daño renal isquémico, anomalías en el transporte tubular, síndrome de Cushing y enfermedad tubulointersticial), enfermedades pulmonares (por ejemplo, neumonía aguda, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, asma refractario, síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), sarcoidosis, neumonía intersticial y alveolitis alérgica), enfermedades pancreáticas (por ejemplo, diabetes y pancreatitis crónica), enfermedades óseas (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, fractura ósea, osteonecrosis y daño periosteal), complicaciones diabéticas (por ejemplo, neuropatía, úlcera de la piel y nefropatía), enfermedades dentales (por ejemplo, enfermedad periodontal, heridas por extracción dental, heridas orales y trastornos del tejido periodontal), enfermedades neurológicas (por ejemplo, neuropatía diabética, estenosis espinal, lesión de la médula espinal y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)), úlceras en la piel, úlceras de decúbito, alopecia, etc., y trasplantes de órgano/tejido (por ejemplo, trasplantes de hígado, trasplantes de riñón, trasplantes de pulmón, trasplantes de islotes pancreáticos y trasplantes de páncreas). Lo anterior se da a conocer en detalle en, por ejemplo, los documentos nº WO2004/032965 y nº WO2008/0478631.

Se encontró además que el compuesto 1 activaba AMPc/PKA, inhibiendo la fosforilación de ERK1/2, que ha avanzado con las condiciones patológicas, e inhibe la migración, multiplicación y producción de colágeno de los fibroblastos (referencia nº de la literatura no de patentes (LNP)).

El compuesto 1 presenta efectos citoprotectores debido a la acción antiapoptótica y acción antinecrotica. Estos efectos protectores resultan atenuados por la administración de un anticuerpo neutralizante anti-HGF (referencia nº 2 de la literatura no de patentes (LNP)) Se dan a conocer diversos efectos farmacológicos del compuesto 1 en los documentos nº 3 (literatura no de patentes (LNP)) y nº 4 (literatura no de patentes (LNP))

En el contexto de la presente invención se han encontrado diversos efectos del compuesto 1 sobre enfermedades pulmonares intratables.

Nakamura *et al.* Encontraron HGF en 1984 (referencia nº 5 de la literatura no de patentes (LNP)). Posteriormente, muchos investigadores demostraron que HGF desempeña un papel importante no sólo en el hígado sino asimismo en los pulmones, en la reparación de tejidos como un factor de crecimiento para capilares alveolares pulmonares y células epiteliales alveolares después de la lesión pulmonar. Asimismo se ha demostrado que HGF presenta efectos sobre la construcción alveolar pulmonar en el periodo fetal y sobre células epiteliales de vías respiratorias pequeñas (referencia nº 6 de la literatura no de patentes (LNP)).

Estos resultados revelan que HGF puede prevenir o tratar la inflamación aguda o crónica de las células epiteliales bronquiales y la lesión de las células pulmonares causada por el estrés oxidativo. De esta manera, se sugiere que HGF resulta eficaz para el síndrome de dificultad respiratoria adulto (ARDS), que es una lesión pulmonar aguda (referencia nº 7 de la literatura no de patentes (LNP)), el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y la hipertensión pulmonar (referencia nº 8 de la literatura no de patentes (LNP)), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (referencias nº 9 y nº 10 de la literatura no de patentes (LNP)), el asma refractario (referencia nº 11 de la literatura no de patentes (LNP)).

Además, se ha demostrado que HGF ejerce potentes efectos antifibróticos mediante la inhibición de la expresión del factor β de crecimiento transformante (TGF- β) que resulta importante para la patogénesis de enfermedades fibróticas crónicas (referencia nº 12 de literatura no de patentes). Se ha sugerido que HGF asimismo resulta eficaz como un agente antifibrótico para la fibrosis pulmonar (referencia nº 13 de la literatura no de patentes (LNP)), etc.

Además, debido a que el compuesto 1 estimula la producción de HGF y similares a partir de fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales vasculares, macrófagos, etc., el compuesto 1 presenta un gran potencial para la aplicación clínica en la hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma (intratable), etc.

El fármaco de primera línea (WHO-FCIV) en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar severa (PAH) es un epoprostenol (infusión intravenosa de PGI₂ sódico). Sin embargo, el epoprostenol es una infusión intravenosa durante 24 horas, y la administración continua atenúa sus efectos (desarrolla tolerancia), requiriendo de esta manera un incremento de la dosis. La eficacia del compuesto 1, en términos de la inhibición del engrosamiento de la arteria pulmonar media, la supresión de la presión arterial pulmonar, la inhibición de la hipertrofia ventricular derecha y la prolongación de la supervivencia, así como la inhibición del desarrollo de tolerancia, se confirmó mediante administración subcutánea repetitiva de compuesto 1 (referencia nº 14 de la literatura no de patentes (LNP)), la administración oral repetitiva de compuesto 1 (referencia nº 15 de la literatura no de patentes (LNP)) y la administración subcutánea intermitente de compuesto 1/ME (referencia nº 16 de la literatura no de patentes (LNP)) en modelos de hipertensión de pulmonar en la rata inducida con monocrotalina.

Para la fibrosis pulmonar, sólo se ha aprobado la pirfenidona en Japón y su eficacia clínica todavía resulta insuficiente. La eficacia del compuesto 1 en términos de peso pulmonar, fibrosis pulmonar, contenido de hidroxiprolina pulmonar, prolongación de la supervivencia, etc., se ha confirmado mediante administración subcutánea repetitiva (referencia nº 17 de la literatura no de patentes (LNP)) y la administración oral repetitiva (referencia nº 18 de la literatura no de patentes (LNP)) de compuesto 1 no modificado y la administración subcutánea intermitente de compuesto 1/ME en modelos de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina.

Se confirmó la eficacia del compuesto 1 en términos de inhibición de la destrucción alveolar, mejora de la función respiratoria, etc., mediante la administración subcutánea única de compuesto 1/ME en modelos COPD inducida por solución de humo de cigarrillo (ver el Ensayo 4 de efecto farmacológico, posteriormente).

Con respecto al asma, la inhibición de la hipersensibilidad de las vías respiratorias, la hiperplasia de las células caliciformes, la fibrosis submucosa y la hiperplasia de las células musculares lisas bronquiales se ha confirmado mediante la utilización de modelos de asma aguda, crónica e intratable inducida con OVA (referencias nº 19 y nº 20 de la literatura no de patentes (LNP)) y modelos de asma inducida por ácaros (referencias nº 21 y nº 22 de la literatura no de patentes (LNP)).

Incluso al administrar el compuesto 1 terapéuticamente después de la aparición de síntomas, se mostraron estas eficacias, confirmando de esta manera los efectos de remodelado inverso. Dichos efectos se atenuaron o eliminaron mediante la administración de un anticuerpo neutralizante anti-HGF o un antagonista de receptor IP (CAY10449).

En el contexto de la presente invención se investiga una preparación de liberación sostenida (microesferas (ME)) de compuesto 1 y ya han desarrollado preparaciones de microesferas (compuesto 1/ME) utilizando Compuesto 1 y un polímero biodegradable seleccionado de diversos polímeros de ácido láctico (PLA), polímeros de ácido glicólico (PGA) y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) como preparaciones que muestran una cinética sanguínea de tipo infusión intravenosa a largo plazo mediante la administración subcutánea o la administración intramuscular de entre aproximadamente una vez a la semana y aproximadamente una vez cada seis semanas (LPT, solicitud de patente japonesa nº 2012-208799 (no publicada)). Entre los ejemplos de dichos polímeros se incluyen PLA0005, PLA0010, PLA0020, PLA0050, PGA0005, PGA0010, PGA0020, PGA0050, PLGA7520, PLGA7550, PLGA5020 y PLGA5050 (5-50) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., y Mitsui Chemicals, Inc.).

“PLA0005” se refiere a un polímero de ácido láctico que presenta un peso molecular medio en peso de 5,000. “PLA0010” se refiere a un polímero de ácido láctico que presenta un peso molecular medio en peso de 10,000. “PLA0050” se refiere a un polímero de ácido láctico que presenta un peso molecular medio en peso de 50,000.

De manera similar, “PGA0005” se refiere a un polímero de ácido glicólico que presenta un peso molecular medio en peso de 5,000. “PGA0050” se refiere a un polímero de ácido glicólico que presenta un peso molecular medio en peso de 50,000. “PLGA7520” se refiere a un copolímero que comprende 75% molar de ácido láctico y 25% molar de ácido glicólico y que presenta un peso molecular medio en peso de 20,000. “PLGA7550” se refiere a un copolímero que comprende 75% molar de ácido láctico y 25% molar de ácido glicólico y que presenta un peso molecular medio en peso de 50,000.

Una mezcla de uno a cinco tipos de preparaciones de microesferas (ME) preparadas mediante la utilización de un ácido poliláctico (PLA), un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) o un ácido poliglicólico (PGA) que presenta un peso molecular medio en peso de 1,000 a 50,000 puede resultar preferente como polímero biodegradable. Por ejemplo, en el caso de que el compuesto 1 se formule en una preparación de microesferas (ME) utilizando PLA0020, se obtiene una preparación de ME de liberación sostenida durante aproximadamente 16 semanas.

Por otra parte, diversos compuestos farmacéuticos que contienen Compuesto 1, preparaciones de proteína, tales como hormonas enzimáticamente inestables o factores de regeneración *in vivo*, y preparaciones de péptidos que contienen sus sitios activos en preparaciones de microesferas (ME) de liberación sostenida de diversos fármacos mediante la utilización de los polímeros biodegradables indicados anteriormente u otros materiales, tales como hidrogeles de gelatina (LPT 3 a 6), liposomas o lípidos (por ejemplo, LPT 7 y LNP 23). Entre los ejemplos de compuestos farmacéuticos se incluyen proteínas, tales como diversos factores de crecimiento, y entre los ejemplos específicos se incluyen factores de crecimiento fibroblástico básicos (b-FGF) y otros FGF, factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformante (TGF) y angiopoyetina y factores de crecimiento similares, factores inducibles por hipoxia (HIF), diversas citocinas, quimiocinas, adrenomedulina y matrices extracelulares.

Por ejemplo, la LPT 3 da a conocer la producción de una preparación de gelatina de liberación sostenida de b-FGF mediante el procedimiento siguiente. Tras reticular químicamente gelatina ácida al 10% en peso con

glutaraldehído, se inactivó el agente de reticulación, seguido de lavado con agua destilada varias veces para obtener un hidrogel de gelatina entrecruzada con un contenido de agua de 90.3%. A continuación, se añadió un tampón de fosfato 0.05 M que contenía 100 µg de b-FGF (pH 7.4, PBS, 500 µl) gota a gota para impregnar el hidrogel de gelatina con b-FGF, obteniendo de esta manera una preparación de microesferas (ME) de hidrogel de gelatina impregnada con b-FGF. Esta preparación de ME se da a conocer como una composición farmacéutica para el tratamiento del estrechamiento u obstrucción de arterias coronarias.

El tamaño de partícula medio de las partículas de hidrogel de gelatina obtenidas varía según la concentración de gelatina, la proporción en volumen de la solución acuosa de gelatina a aceite de oliva, y la velocidad de agitación, etc., durante la producción de las partículas. El tamaño de partícula es típicamente de 1 a 1,000 µm. Las partículas del tamaño requerido pueden cribarse apropiadamente y utilizarse según el propósito.

Este procedimiento puede producir preparaciones de liberación sostenida de diversos factores de crecimiento, citocinas, monocinas, linfocinas, otras sustancias bioactivas e hidrogeles de polímero bioabsorbible (referencias nº 24 a nº 26 de la literatura no de patentes (LNP)).

El "hidrogel de gelatina" se refiere a un hidrogel obtenido mediante la formación de una reticulación química entre cualquiera de entre una diversidad de agentes de reticulación química y una molécula de gelatina mediante la utilización de la gelatina mencionada anteriormente. Entre los ejemplos de agentes de reticulación químicos se incluyen glutaraldehído, carbodiimidas solubles en agua, tales como EDC, propilenoóxido, un compuesto diepoxi y agentes de condensación que forman un enlace químico entre un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo imidazol o similares. Resulta preferido el glutaraldehído. La gelatina asimismo puede reticularse químicamente mediante un tratamiento térmico o irradiación ultravioleta. Estos tratamientos de reticulación pueden utilizarse en combinación. Alternativamente, asimismo puede producirse un hidrogel mediante reticulación física utilizando la reticulación salina, la interacción electrostática, los enlaces de hidrógeno, la interacción hidrofóbica o similares.

Por ejemplo, al inmovilizar b-FGF sobre un hidrogel de gelatina, prácticamente no se libera nada de b-FGF a partir del hidrogel. A medida que se degrada el hidrogel *in vivo*, las moléculas de gelatina resultan solubles en agua y son liberadas del b-FGF inmovilizado sobre las moléculas de gelatina. Específicamente, la liberación sostenida de b-FGF puede controlarse mediante degradación del hidrogel. La degradabilidad del hidrogel puede modificarse mediante el ajuste del grado de entrecruzamiento durante la producción del hidrogel. La interacción de b-FGF con la gelatina potencia la estabilidad de b-FGF y de la gelatina *in vivo*, tal como la resistencia a la enzimólisis.

Una "preparación liposómica" se refiere a micropartículas de tipo celular que comprenden fosfolípidos y glucolípidos que construyen una biomembrana y se utiliza como un sistema de administración de fármaco (SAF) de liberación sostenida mediante encapsulado de un compuesto farmacéutico soluble en agua o soluble en lípido en micropartículas.

Entre los ejemplos de fosfolípidos que pueden utilizarse se incluyen glicerofosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, cardiolipina, lecitina de yema de huevo, lecitina de yema de huevo hidrogenada, lecitina de soja y lecitina de soja hidrogenada, esfingolípidos, tales como esfingomielina, ceramida fosforiletanolamina y ceramida fosforilglicerol, y plasmalógenos.

Entre los ejemplos de glucolípidos se incluyen glicerolípidos, tales como digalactosil diglicérido y sulfato de galactosil diglicérido, y esfingolípidos, tales como galactosilceramida, sulfato de galactosilceramida, lactosilceramida, gangliósido G7, gangliósido G6 y gangliósido G4.

Entre los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen genes que codifican factores de regeneración *in vivo* (por ejemplo, HGF, b-FGF, SDF-1, HMGB-1, LIF y HIF-1).

La referencia nº 8 de la literatura de patentes (LPT) y la referencia nº 27 de la literatura no de patentes (LNP) dan a conocer un método para producir una preparación de liberación sostenida de rapamicina o simvastatina, que son sustancias escasamente solubles en agua y dan a conocer que la preparación de liberación sostenida puede producirse mediante la utilización de un derivado de gelatina que presenta un grupo hidrófobo añadido al mismo. El "derivado de gelatina que presenta un grupo hidrófobo añadido al mismo" se refiere a un derivado de gelatina preparado mediante la unión covalente de un grupo hidrófobo a una molécula de gelatina. Entre los ejemplos de grupos hidrófobos se incluyen poliésteres, tales como ácidos polilácticos (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA) y poli-ε-caprolactona, lípidos tales como colesterol y fosfatidiletanolamina, grupos aromáticos o heteroaromáticos que contienen grupos alquilo y anillos de benceno, y mezclas de los mismos.

La referencia nº 9 de la literatura de patentes (LPT) da a conocer una infusión de inhalación o intravenosa de partículas biodegradables para enfermedades pulmonares que consiste principalmente en un fármaco de terapia anticáncer.

La LPT 9 no da a conocer una preparación de microesferas (ME) que presenta un tamaño de partícula medio en número de 20 µm (20,000 nm) a 50 µm (50,000 nm).

La literatura de patentes (LPT) 10 da a conocer que una preparación de liberación sostenida de proteína b-FGF y HGF se prepara mediante la utilización de un hidrogel de gelatina y que la administración oral o parenteral de la preparación de liberación sostenida resulta eficaz para la hipertensión pulmonar. Sin embargo, el tamaño de partícula medio de las partículas de hidrogel de gelatina es de 1 a 1,000 µm y el tamaño de partícula no se encuentra particularmente limitado. Como método de administración, sólo se da a conocer en los Ejemplos la administración intraperitoneal. Es decir, LPT 10 da a conocer meramente un método de utilización para la liberación sostenida de una proteína *in vivo* y no se refiere a un método para la administración específica (SAF) de tejido pulmonar.

La referencia nº 11 de la literatura de patentes (LPT) da a conocer que la administración transpulmonar de una preparación de hidrogel de gelatina de liberación sostenida preparada utilizando b-FGF, HGF o similares resulta eficaz para el enfisema pulmonar. La LPT 11 da a conocer que la preparación preferentemente presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 0.1 a 20 µm. La LPT 11 no da a conocer ningún ejemplo específico de un tamaño de partícula preferente (20 a 40 µm). La preparación dada a conocer en LPT 11 se utiliza para la administración transpulmonar.

La referencia nº 28 de la literatura no de patentes (LNP) da a conocer que la administración arterial pulmonar de microesferas de gelatina de bFGF de liberación sostenida resulta eficaz para el enfisema pulmonar. Sin embargo, la LNP 28 no da a conocer ninguna limitación del tamaño de partícula. Además, la administración arterial requiere profesionales médicos expertos.

Tal como se ha mostrado anteriormente, no ha aparecido ninguna patente o informe similar sobre la terapia selectiva de enfermedad pulmonar mediante la administración intravenosa intermitente de una preparación de microesferas (ME) de liberación sostenida (en particular, una preparación de ME de liberación sostenida con un tamaño de partícula medio en número de 20 a 40 µm).

En el contexto de la presente invención se ha preparado una preparación de microesferas (ME) utilizando un compuesto de bajo peso molecular, tal como el compuesto 1, y un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) y básicamente han informado de su eficacia en forma de una preparación para la administración tópica (para ASO, infarto de miocardio, cardiomiopatía dilatada, neuropatía diabética, etc.) y una preparación subcutánea (para enfermedad renal crónica, etapa crónica del infarto cerebral, asma, COPD, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar, etc.) que muestra una cinética sanguínea de tipo infusión intravenosa (LPT 2 y LPT 1). Sin embargo, no se da a conocer en estos documentos ningún método de administración intravenosa para la administración y mantenimiento específicos pulmonares.

Listado de referencias

LPT

LPT 1: documento nº WO2008/047863 (asimismo publicado como documento nº EP 2 087 890 A1).

LPT 2: documento nº WO2004/032965

LPT 3: JP2004-115413A

LPT 4: patente japonesa nº 4459543

LPT 5: patente japonesa nº 4685090

LPT 6: JP2008-137975A

LPT 7: JPH07-41432A

LPT 8: JP2008-137975A

LPT 9: JP2011-516443A

LPT 10: JP2004-91450A

LPT 11: JP2005-206491A

LNP

LNP 1: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177, pp.195-201, 2008

LNP 2: Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 302: G420-G429, 2012

LNP 3: Cell, 43 (10), pp. 26-35, 2011

LNP 4: Cell, 44 (2), pp. 34-40, 2012

LNP 5: Biochem. Biophys. Res. Comm., 122, pp.145-1459, 1984

LNP 6: Development, 125, pp.1315-1324, 1998

LNP 7: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162, pp.707-715, 2000

LNP 8: Circulation, 110, pp.2896-2902, 2004

LNP 9: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 26, pp.525-533, 2002

LNP 10: Circulation, 111, pp.1407-1414, 2005

- LNP 11: Am. J. Respir. Cell Med. Bio., 32, 268-280, 2005
 LNP 12: Nature Medicine, 5, pp. 226-230, 1999
 LNP 13: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156, pp.1937-1944, 1997
 LNP 14: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 172, pp.1575-1580, 2005
 LNP 15: Circ. J., 77, 2127-2133, 2013
 LNP 16: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177, pp.195-201, 2008
 LNP 17: Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 290, pp. L59-L65, 2006
 LNP 18: European Respiratory Society (ERS 2010), Barcelona 2010, Congreso anual, Spain
 LNP 19: Clinical & Experimental Allergy, 40, pp. 317-326, 2009
 LNP 20: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 47 (2), pp.170-177, 2012
 LNP 21: The 60th Fall Meeting of the Japanese Society of Allergology, 2010
 LNP 22: American Thoracic Society 2011 International Conference, Denver, Colorado
 LNP 23: Arch. Biochem. Biophys., 212, 196, 1981
 LNP 24: Adv. Drug Deliv. Rev., 31, 287-301, 1998
 LNP 25: JR Soc. Interface, 6 suppl. 3, S311-S324, 2009
 LNP 26: J. Biomater Sci. Polym. Edn., 12, 77-88, 2001
 LNP 27: Drug Deliv. Syst., 23 (3), p.394, 2008
 LNP 28: General Thoracic and Cardiovascular Surgery vol. 51, p. 281, 2003

Sumario de la invención

Problema técnico

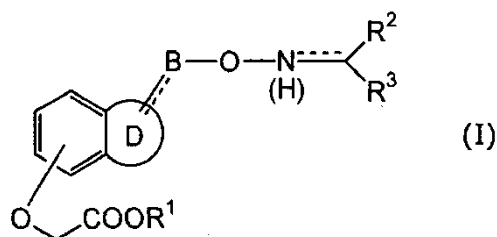
Tal como se ha indicado anteriormente, en el contexto de la presente invención se ha desarrollado una preparación de microesferas (ME) de un compuesto de bajo peso molecular y ya han informado de la aplicación clínica de la preparación de ME mediante administración subcutánea o administración intramuscular. Sin embargo, además, se ha desarrollado el desarrollo de un agente terapéutico específico de enfermedades pulmonares. De acuerdo con lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico específico de enfermedades pulmonares que pueden administrarse por vía intravenosa.

Solución al problema

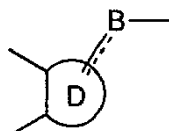
En el contexto de la presente invención se descubrió que la administración intravenosa de una preparación de ME resulta en la acumulación específica del tejido pulmonar y la medicina muestra un efecto específico para una enfermedad pulmonar al liberarse gradualmente la medicina en los pulmones. Como resultado de la repetición de un estudio adicional, en el contexto de la presente invención se ha conseguido desarrollar un agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar.

La presente invención incluye los ítems 1 a 11 a continuación.

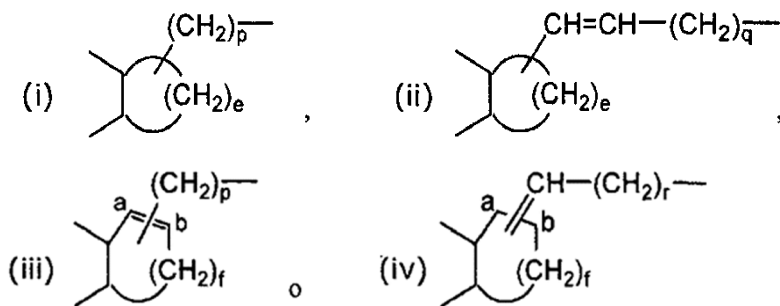
1. Agente terapéutico específico de pulmón en la terapia de una enfermedad pulmonar, en el que el agente terapéutico comprende microesferas de liberación sostenida que contienen un compuesto farmacéutico, en las que las microesferas presentan un tamaño de partícula medio en número de 20 a 40 μm , y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior, en el que el agente terapéutico debe administrarse por vía intravenosa, en el que el compuesto farmacéutico es un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar.
2. El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol y sales de los mismos.
3. El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un factor de regeneración *in vivo* seleccionado de entre el grupo que consiste en b-FGF, HGF, EGF, SDF-1, IGF-1, LIF, HMBG1, G-CSF y matrices extracelulares.
4. El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es un compuesto representado por la fórmula (I):



en la que:



representa



en el que R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄,

R² representa (i) hidrógeno, (ii) alquilo C₁₋₈, (iii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇, (iv) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno, (v) un anillo de benceno o de cicloalquilo C₄₋₇ o un grupo alquilo C₁₋₄, o (vi) un grupo alquilo C₁₋₄ sustituido con un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno,

R³ representa (i) alquilo C₁₋₈, (ii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇, (iii) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno, (iv) un anillo de benceno o de cicloalquilo C₄₋₇ o un grupo alquilo C₁₋₄, o (v) un grupo alquilo C₁₋₄ sustituido con un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno,

e representa un número entero entre 3 y 5,

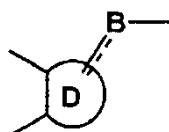
f representa un número entero entre 1 y 3,

p representa un número entero entre 1 y 4,

q representa 1 o 2, y

r representa un número entero entre 1 y 3,

con la condición de que, en el caso de que



sea un grupo definido en (iii) o (iv), cada uno de -(CH₂)_p- y =CH-(CH₂)_e- se une a la posición a o b en el anillo, y los anillos en R² y R³ pueden sustituirse con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo C₁₋₄, grupos alcoxi C₁₋₄, átomos de halógeno, átomos de nitrógeno y grupos trihalometilo, o una sal de los mismos.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 4, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido (±)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoico (beraprost), ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}acético (MRE-269), carbaciclina, y sales de los mismos.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, en el que las microesferas de liberación sostenida contienen un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos, polidioxanos y mezclas de los mismos.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, que es una preparación de microesferas de liberación sostenida que comprende un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol y sales de los mismos, y por lo menos un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos, copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos, polidioxanos y mezclas de los mismos.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, que comprende dicha preparación de microesferas de liberación sostenida que contiene por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético, ácido (±)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoico (beraprost), ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}acético (MRE-269), y sales de los mismos, y un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y mezclas de los mismos.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según el ítem 1, que comprende microesferas de liberación sostenida que contienen por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol; ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético, ácido (±)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoico (beraprost), ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}acético (MRE-269), y sales de los mismos, el agente terapéutico que debe administrarse a una dosis de 6 mg/kg o menos en términos de las microesferas de liberación sostenida.

El agente terapéutico específico de pulmón para la utilización según cualquiera de los ítems 1 a 10, en el que la enfermedad pulmonar es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en neumonía aguda, fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquitis crónica, enfisema pulmonar, asma, asma intratable, síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), sarcoidosis, tromboembolismo pulmonar idiopático crónico, panbronquiolitis difusa, fibrosis quística, alveolitis alérgica, cáncer de pulmón, síndrome de hipoventilación por obesidad, síndrome de hipoventilación alveolar y rechazo crónico del trasplante de pulmón.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona un agente terapéutico específico de pulmón que debe administrarse por vía intravenosa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de un ensayo de liberación *in vitro* utilizando la preparación del ejemplo de preparación 1.

La figura 2 es un gráfico de un ensayo de liberación *in vitro* utilizando la preparación del ejemplo de preparación 3.

La figura 3 es un gráfico de un ensayo de liberación *in vitro* utilizando la preparación del ejemplo de preparación 4.

La figura 4 es un gráfico de un ensayo de cinética sanguínea mediante la administración subcutánea *in vivo* de la preparación del ejemplo de preparación 1 en ratas.

La figura 5 es un gráfico de curvas de tasa de supervivencia tras la administración intravenosa del ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME (control negativo)) en modelos de hipertensión pulmonar.

La figura 6 es un gráfico del beneficio de supervivencia por la administración intravenosa del ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME).

La figura 7 es un gráfico de la presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha).

La figura 8 es un gráfico de la proporción de presión ventricular derecha a presión ventricular izquierda.

La figura 9 es un gráfico de la proporción de peso ventricular derecho a peso ventricular izquierdo más peso septal.

La figura 10 es un gráfico que muestra el efecto conseguido por la potenciación mediante la administración del inhibidor de TXA₂ sintetasa ozagrel en combinación con Compuesto 3 o 7.

Descripción de formas de realización

Son características del agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención que el agente terapéutico comprende microesferas de liberación sostenida que contienen un compuesto farmacéutico y se administran por vía intravenosa.

Microesferas de liberación sostenida

El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención contiene microesferas de liberación sostenida.

Generalmente, las microesferas (o microcápsulas) se refieren a una forma de dosis de partículas esféricas pequeñas (con un tamaño de partícula de 1 a 999 µm) que comprenden un compuesto farmacéutico encapsulado en una cubierta formada de un polímero.

En la presente descripción, la expresión “específico de pulmón” se refiere a la transferencia selectiva a los pulmones. La transferencia selectiva a los pulmones se considera que se basa en el mecanismo de que el agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención resulta selectivamente atrapado en los pulmones. Sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a dicho mecanismo. La transferencia selectiva a los pulmones puede confirmarse directamente, por ejemplo, mediante la medición de la concentración en los pulmones del agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención o un compuesto farmacéutico contenido en el agente, o puede confirmarse indirectamente por la eficacia potenciada que se consigue mediante la selección de la forma de dosis de la presente invención.

Compuesto farmacéutico

El “compuesto farmacéutico” de la presente invención es un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar, tal como agentes antitrombóticos, agentes mejoradores de la circulación, dilatadores de músculo liso, analgésicos o agentes antiinflamatorios, anestésicos locales, mejoradores del metabolismo, inhibidores de elastasa, prostaglandinas, factores de regeneración *in vivo* e inductores de factor de regeneración *in vivo*. El compuesto farmacéutico utilizado en la presente invención incluye no sólo los que se han encontrado hasta el momento, sino asimismo los que se encontrarán en el futuro.

El compuesto farmacéutico utilizado en la presente invención puede ser, por ejemplo, cualquiera de diversas sustancias, tales como compuestos de bajo peso molecular, proteínas o polipéptidos, o glucoproteínas (por ejemplo, matrices extracelulares y factores de adhesión celular), polinucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de sentido, nucleótidos antisentido y nucleótidos señuelo), vacunas y anticuerpos.

El compuesto farmacéutico utilizado en la presente invención puede encontrarse en diversas formas, tales como formas libres, sales, solvatos (por ejemplo, hidratos) y complejos.

El compuesto farmacéutico utilizado en la presente invención es un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar.

El fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar puede ser por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en fármacos esteroides (por ejemplo, beclometasona y fluticasona), antagonistas de receptor de leucotrieno (LTRA) (por ejemplo, montelukast), antagonistas de receptor M3 (por ejemplo, tiotropio e imidafenacina), agonistas de PGI₂ (por ejemplo, beraprost y carbaciclina), agonistas de EP₂, agonistas de EP₄,

inhibidores de elastasa (por ejemplo, sivelestat), agonistas de adrenorreceptores β_2 (por ejemplo, tulobuterol y salmeterol), factores de regeneración *in vivo* e inductores de factor de regeneración *in vivo*.

5 Entre los ejemplos de enfermedades pulmonares se incluyen neumonía aguda, fibrosis pulmonar, neumonía intersticial (por ejemplo, neumonía intersticial aguda, neumonía intersticial difusa y neumonía intersticial linfóide), hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquitis crónica, enfisema pulmonar, asma, asma intratable, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI),
10 síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), sarcoidosis (por ejemplo, sarcoidosis pulmonar, sarcoidosis ocular, sarcoidosis cardíaca y sarcoidosis cutánea), tromboembolismo pulmonar idiopático crónico, panbronquiolitis difusa, fibrosis quística, neumonía por hipersensibilidad, síndrome de hipoventilación por obesidad, síndrome de hipoventilación alveolar, cáncer pulmonar y rechazo crónico del trasplante de pulmón. La presente invención resulta adecuada para la aplicación en por lo menos una enfermedad seleccionada de fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hipertensión pulmonar, asma, COPD, SIRS y similares.

15 El fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es preferentemente, por ejemplo, por lo menos un agente seleccionado de entre el grupo que consiste en esteroides, agonistas β_2 , antagonistas de LT, antagonista M3, prostaglandinas, inhibidores de elastasa, factores de regeneración *in vivo* e inductores de producción de factor de regeneración *in vivo*.

20 El fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar puede ser preferentemente, por ejemplo, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol y sales de los mismos.

25 Entre los ejemplos de los agentes antitrombóticos se incluyen preparaciones de heparina (por ejemplo, heparina sódica, heparina calcio y dalteparina sodio), anticoagulantes orales (por ejemplo, warfarina potasio), agentes antitrombóticos (por ejemplo, mesilato de gabexato, mesilato de nafamostat y argatroban), inhibidores de la agregación plaquetaria (por ejemplo, aspirina, dipiridamol, hidrocloruro de ticlopidina, beraprost sodio, cilostazol, ozagrel sodio, hidrocloruro de ozagrel, hidrocloruro de sarpogrelato y eicosapentanoato de etilo), agentes trombolíticos (por ejemplo, urocinasa, tisocinasa, alteplasa, nateplasa, monteplasa y pamiteplasa), inhibidores del factor Xa e inhibidores del factor VIIa.
30

Entre los ejemplos de los agentes mejoradores de la circulación se incluyen tartrato de ifenprodilo, aniracetam, hidrocloruro de donepezilo, hidrocloruro de amantadina, nicergolina, ibudilast, compuestos papaverina, compuestos de nicotina, antagonistas del calcio (por ejemplo, nifedipina, amlodipina, diltiazem y azelnidipina),
35 agonistas de receptor β (por ejemplo, efedrina, salbutamol, procaterol, salmeterol y mabuterol), antagonistas de receptor α (por ejemplo, uradipilo, terazosina, doxazosina, bunazosina y prazosina), antagonistas de receptor de angiotensina II, ARB (por ejemplo, losartán, candesartán, valsartán y telmisartán) e inhibidores de PDE (por ejemplo, teofilina, milrinona, tadalafilo, dipiridamol y sildenafil).

40 Entre los ejemplos de los analgésicos o agentes antiinflamatorios se incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina, indometacina, diclofenac, meloxicam y celecoxib; analgésicos opioides, tales como codeína y morfina, y pentazocina, hidrocloruro de buprenorfina e hidrobromuro de eptazocina.

45 Entre los ejemplos de los anestésicos locales se incluyen esteroides, procaína, hidrocloruro de cocaína, hidrocloruro de lidocaína e hidrocloruro de ropivacaína.

Entre los ejemplos de los mejoradores del metabolismo se incluyen agentes antihiperlipidémicos, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, simvastatina y pravastatina) y fármacos antidiabéticos, tales como agonistas de PPAR- γ (por ejemplo, derivados de tiazolidina, tales como pioglitazina y rosiglitazona, adiponectina y leptina), inhibidores de DPP-IV (por ejemplo, sitagliptina, vildagliptina y alogliptina) y agonistas de GLP-1.
50

Entre los ejemplos de los inhibidores de elastasa se incluyen el sivelestat. Entre los ejemplos de prostaglandinas se incluyen PGE₁, PGE₂, PGI₂, y derivados de los mismos, lipoPGE₁, 6-oxi-PGE₁, derivados 6-oxi-PGE₁, ornoprostilo, limaprost, enprostilo y misoprostol.
55

Entre los ejemplos de los factores de regeneración *in vivo* se incluyen factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos factores de crecimiento fibroblástico (a/b FGF), factor β de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietina, factor inducible por hipoxia (HIF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), proteína morfogenética ósea (BMP), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), factor de células madre (SCF), factor derivado de células estromales (SDF-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de condrocitos (GDF),
60 factor inhibidor de leucemia (LIF), HMGB1 y factores de transcripción de tipo Kruppel (KLF), y factores de crecimiento de sus familias.
65

Entre los ejemplos de factores de regeneración *in vivo* se incluyen además matrices extracelulares (por ejemplo, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos) y factores de adhesión celular (por ejemplo, cadherinas e integrinas).

- 5 El factor de regeneración *in vivo* puede ser, preferentemente, por ejemplo, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en b-FGF, HGF, EGF, SDF-1, HMGB1, IGF-1, LIF, G-CSF, y matrices extracelulares.

- 10 El inductor de factor de regeneración *in vivo* es un agente para inducir la producción de un factor de regeneración *in vivo*. Entre los ejemplos se incluyen agonistas de PGI₂, agonistas de EP₂, agonistas de EP₄, toxina del cólera, 8-bromo-AMPC, dibutilil-AMPC, forskolina, antagonista de receptor de AT1 (ARB), agonista de receptor gamma activador por proliferador de peroxisomas (PPAR-γ), inhibidores de fosfodiesterasa (PDE), IL-1, TNF-α e INF.

- 15 Entre los ejemplos de compuestos farmacéuticos del agente terapéutico de enfermedad pulmonar de la presente invención y otros fármacos de combinación para complementar y/o potenciar los efectos preventivos y/o terapéuticos se incluyen no sólo los encontrados hasta el momento sino asimismo los que se encontrarán en el futuro, basándose en el mecanismo mencionado anteriormente.

- 20 Entre los ejemplos de inductores de factor de regeneración *in vivo* preferidos se incluyen por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en agonistas de PGI₂, agonistas de EP₂, agonistas de EP₄, antagonistas de receptor de AT1 (antagonistas de tipo 1 de angiotensina II, ARB), agonistas de receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-γ) e inhibidores de fosfodiesterasa (PDE). Más preferentemente, el inductor de factor de regeneración *in vivo* puede ser, por ejemplo, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en agonistas de PGI₂, agonistas de EP₂ y agonistas de EP₄. Más preferentemente, el inductor del factor de regeneración *in vivo* puede ser un agonista de PGI₂.

- 25 Entre los ejemplos de agonistas PGI₂ que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen los derivados de PGE₁ y PGI₂, derivados de los mismos (por ejemplo, 6-oxi-PGI₁, ornoprostilo, limaprost, enprostilo y misoprostol), profármacos de los mismos, preparaciones de depósito, preparaciones persistentes (preparaciones de liberación sostenida) de los mismos (por ejemplo, lipoPGE₁). Entre los ejemplos de agonistas de EP₂ y EP₄ se incluyen diversos derivados de PGE, profármacos de los mismos y formulaciones de depósito (preparaciones de liberación sostenida) de los mismos.

- 30 El agonista de EP₂ tal como se denomina en la presente memoria incluye la totalidad de los agonistas de EP₂ que se encontrarán en el futuro. Entre los ejemplos de agonistas de EP₂ preferentes se incluyen compuestos indicados en el documento n° EP 0 860 430 A, patente US n° 6.110.969, documentos n° WO99/33794, n° EP 974 580 A, n° WO95/19964, n° WO98/28264, n° WO99/19300, n° EP 0 911 321 A, n° WO98/58911, patentes US n° 5.698.598, n° 6.376.533, n° 4.132.738 y n° 3.965.143. Son agonistas de EP₂ particularmente preferentes, ácido (5Z,9ß,11α,13E)-17,17-propano-11,16-dihidroxi-9-cloro-20-norprost-5,13-dienoico y sales de los mismos.

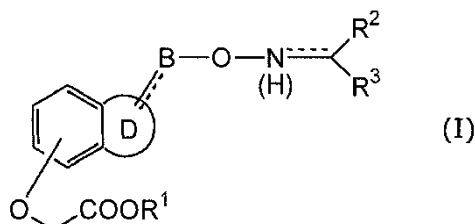
- 40 El agonista de EP₄ tal como se denomina en la presente memoria incluye la totalidad de los agonistas de EP₄ que se encontrarán en el futuro. Entre los ejemplos de agonistas de EP₄ preferentes se incluyen los compuestos dados a conocer en los documentos n° WO00/03980, WO99/02164, WO00/16760, WO00/18744, WO00/21542, WO00/38663, WO00/38690, WO00/38667, WO00/40248, WO00/54808, WO00/54809, WO01/10426, EP 1 110 949 A, EP 1 121 939 A, EP 1 132 086 A, WO2001/72268, JP2002-104939A, WO02/42268, JP2002-179595A, WO02/47669, WO02/64564, WO03/035064, WO03053923 y la patente US n° 6.552.067. Entre los ejemplos de agonistas de EP₄ particularmente preferentes se incluyen el ácido (11α, 13E, 15α)-9-oxo-11,15-dihidroxi-16-{3-metoximetilfenil}-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico y ésteres del mismo.

- 50 En el caso de que el factor de regeneración *in vivo* sea una proteína, el inductor del factor de regeneración *in vivo* puede ser un gen codificante de la proteína.

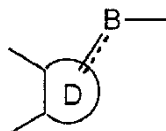
El agonista de PGI₂ (agonista de receptor IP) tal como se denomina en la presente memoria incluye la totalidad de los agonistas de PGI₂ conocidos hasta hoy los agonistas de PGI₂ que se encontrarán en el futuro.

- 55 Por ejemplo, el agonista de PGI₂ es preferentemente un compuesto representado por la fórmula (I) o una sal del mismo.

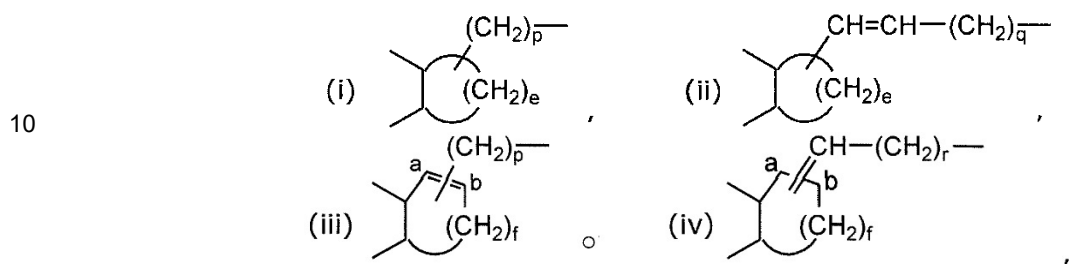
Fórmula (I):



5 En la fórmula (I),



es preferentemente



y más preferentemente



En la fórmula (I), R² es preferentemente

- 20
- (iii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇,
 - (iv) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno,
 - (v) un anillo de benceno o un grupo alquilo sustituido con cicloalquilo C₄₋₇, o
 - (vi) un grupo alquilo C₁₋₄ sustituido con un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno.

R² es más preferentemente

- 25
- (iii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇, o
 - (iv) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno.

En la fórmula (I), R³ es preferentemente

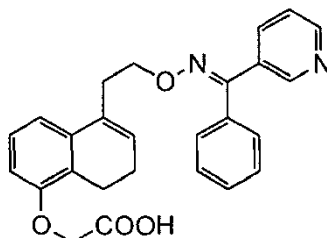
- 30
- (ii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇,
 - (iii) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno,
 - (iv) un anillo benceno o alquilo C₁₋₄ sustituido con cicloalquilo C₄₋₇,
 - (v) un grupo alquilo C₁₋₄ sustituido con un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno.
- 35

R³ es más preferentemente

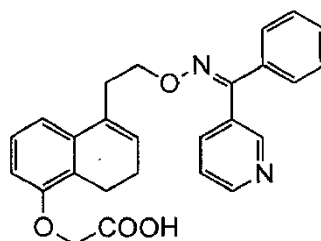
- 40
- (ii) fenilo o cicloalquilo C₄₋₇, o
 - (iii) un monociclo de 4 a 7 elementos que contiene un átomo de nitrógeno.

El compuesto representado mediante la fórmula (I) o una sal del mismo es preferentemente uno de los compuestos siguientes que son derivados de oxima.

Compuesto 1: ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminooxi]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-ilo]acético



5 Compuesto 2: ácido (Z)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminooxi]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-ilo]acético



Entre los ejemplos de otros agonistas de PIG_2 se incluyen beraprost sodio (compuesto 3): ((±)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahydro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoate) sodio, OP-2507 (compuesto 4): metil-éster de ácido (5-((3aR,4R,6aS)-5-hidroxi-4-[(1E,3S)-3-hidroxi-3-(cis-4-propilciclohexil)prop-1-enil-3,3a,4,5,6,6a-hexahidrociclopenta[b]pirrol-2-il]pentanoico), MRE-269 (compuesto 5): ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butoxi}acético, Compuesto 6 (NS-304) que es un derivado del compuesto 5: 2-{4-[(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butoxi}-N-(metilsulfonyl)acetamida, 15 ornoprostilo (compuesto 7) que es un derivado de PGE_1 : metil-éster de 17S,20-dimetil-6-oxo-prostaglandina E1, limaprost que es un derivado de PGE_1 : ácido (E)-7-[(1R,2R,3R)-3-hidroxi-2-[(3S,5S)-E-3-hidroxi-5-metil-1-nonenil]-5-oxociclopentil]-2-heptanoico y derivados de carbaciclina que son derivados de PGI_2 .

Entre los derivados representados por la fórmula (I) y sales de los mismos, se utilizan preferentemente para producir preparaciones de microesferas (ME) el compuesto 1, 3 o 5, los cuales presentan estabilidad química.

Los presentes inventores ahora han descubierto que la adición de compuesto 1 a fibroblastos estimula la producción de HMGB1 (grupo de alta movilidad B1) (ver el ensayo farmacológico 6, a continuación). Basándose en la acción estimuladora de la producción de citocinas mencionada anteriormente, el compuesto 1 produce nuevamente factores movilizados de células de médula ósea (por ejemplo, HMGB1) a partir de fibroblastos, etc., y los factores son liberados a la sangre para suministrar células madre mesenquimales de médula ósea (CMM), células progenitoras endoteliales (CPE) vasculares, etc., a partir de médula ósea a sangre, y las CMM suministradas se acumulan en el sitio de la lesión por factores de acumulación celular de la médula ósea (por ejemplo, SDF-1). Se sugiere que las CMM acumuladas producen efectos de regeneración de vasos sanguíneos/tejidos con factores efectores que diferencian y hacen proliferar las células necesarias para cada regeneración de tejido. Por ejemplo, se ha confirmado que el efecto antiinsuficiencia cardíaca del compuesto 1 se ve atenuado por un antagonista de receptor de SDF-1 (CXCR4) (PLoS ONE 8(7):e69302, 103), un anticuerpo neutralizante anti-HGF (Biomedicine & Aging Pathology 1: 90-96, 2011), un anticuerpo neutralizante anti-VEGF (Clinical Science 112; 607-616, 2007), etc.

Además, el compuesto 1, que asimismo presenta un efecto inhibidor de la TXA_2 sintasa, se ha confirmado que estimula la producción endógena de PGI_2 y PGE_2 (descritos en el Ensayo farmacológico 6, posteriormente).

Los resultados confirman que el compuesto 1, que asimismo presenta un efecto inhibidor de la TXA_2 sintasa, actúa no solamente como un agonista de receptor IP sino asimismo acciones de PGE_2 (agonistas de receptor de EP_2 y EP_4). Como otro efecto farmacológico del compuesto 1, se han encontrado por primera vez efectos de estimulación de la producción de HMGB1 y PGE_2 endógeno. Lo anterior revela la potencial eficacia del compuesto 1 para nuevas enfermedades diana.

Entre dichas nuevas enfermedades se incluyen, por ejemplo, enfermedades específicas consideradas enfermedades intratables diana en el campo de la investigación clínica del Research Project on Measures for Intractable Diseases financiado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar social japonés (aproximadamente 130 enfermedades en 2012).

De dichas enfermedades específicas, se espera que el compuesto 1 resulte eficaz para, por ejemplo, las

enfermedades siguientes: Enfermedad de Behcet, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, atrofia muscular bulboespinal, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, lupus eritematoso sistémico, cardiomiopatía hipertrófica, mielo-óptico-neuropatía subaguda, cardiomiopatía restrictiva, anemia aplásica, enfermedades mitocondriales, linfangioleiomiomatosis (LAM), eritema exudativo multiforme severo (etapa aguda), escleroderma/dermatomiositis, polimiositis, osificación del ligamento amarillo, púrpura trombocitopénica idiopática, disfunción diencefalohipofisaria, periarteritis nodosa, síndrome de secreción de gonadotropina inapropiada, poliangitis microscópica, síndrome de secreción de ADH inapropiada, colitis ulcerosa, síndrome de aortitis, enfermedad de Cushing, enfermedad de Buerger (enfermedad de Buerger), acromegalia, pénfigo, hipopituitarismo, degeneración espinocerebelar, enfermedad de Crohn, hepatitis fulminante, artritis reumatoide maligna, enfermedad de Parkinson y enfermedades relacionadas, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, amiloidosis, osificación del ligamento longitudinal posterior, enfermedad de Huntington, enfermedad moyamoya (oclusión espontánea del círculo de Willis), cardiomiopatía dilatada (congestiva) idiopática, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, atrofia olivopontocerebelar, síndrome de Shy-Drager, epidemolisis bullosa (epidemolisis bullosa juntural y epidemolisis bullosa distrófica), soriasis pustular, estenosis de canal vertebral extensiva, cirrosis biliar primaria, pancreatitis aguda severa, osteonecrosis idiopática de la cabeza femoral, enfermedad del tejido conectivo mixta, síndrome de inmunodeficiencia primaria, neumonía intersticial idiopática, retinitis pigmentosa, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, hipotensión arterial pulmonar, neurofibromatosis de tipo I/neurofibromatosis de tipo II, panencefalitis esclerosante subaguda, síndrome de Budd-Chiari, hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, enfermedad lisosómica, enfermedad de Fabry y adrenoleucodistrofia.

La patente US nº 5.480.998 da a conocer que un Compuesto 1 que es un derivado de oxima (OX) representado por la fórmula (1) y utilizado como un agonista de PGI₂ (agonista de IP) en la presente invención, o una sal no tóxica del mismo, presenta las actividades de inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión plaquetaria, la vasodilatación y la inhibición de la secreción de ácidos gástricos; por lo tanto, el compuesto 1 o una sal no tóxica del mismo resulta útil para prevenir y/o tratar trombosis, arterioesclerosis, enfermedad cardíaca isquémica, úlcera gástrica, hipertensión y similares.

Además, los documentos nº WO2004/032965 y nº WO2008/047863 dan a conocer la acción de neovascularización, la acción inductora e diferenciación en diversas células madre, la acción antiapoptosis, la acción antifibrosis, etc., basadas en la inducción de la producción de factor de regeneración *in vivo* para la reparación de diversas disfunciones celulares u orgánicas.

Métodos para producir los compuestos representados mediante la fórmula (I)

Entre los agonistas de PGI₂ que pueden utilizarse en la presente invención, por ejemplo, los compuestos representados por la fórmula (I) pueden producirse mediante la utilización del método dado a conocer en la patente US nº 5.480.998.

Por ejemplo, el ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-amino]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-il]oxi]acético (compuesto 1) se da a conocer en el ejemplo 2(g) de la patente US nº 5.480.998.

Un método para producir (±)-{(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(1E,3S)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-yn-1-il]-1H-benzo[b]ciclopenta[d]furan-5-il}butanoato sódico (beraprost sodio; Compuesto 3) se da a conocer en el documento nº WO1996/026721.

Un método para producir el ácido 2-[4-[N-(5,6-Difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butil]oxi]acético (MRE-269; Compuesto 5) y un derivado del mismo (compuesto 6) se da a conocer en el documento nº WO02/088084.

En la presente invención, diversos inductores de factor de regeneración *in vivo* que contienen Compuesto 1, proteínas y péptidos de factor de regeneración *in vivo* que comprenden los sitios activos de las proteínas de factor de regeneración *in vivo*, genes de los mismos, y diversos compuestos farmacéuticos, pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más. Estos pueden encontrarse en forma de preparaciones de microesferas que comprenden polímeros biodegradables indicados posteriormente, tales como diversos copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, polímeros de ácido láctico, hidrogeles de gelatina y liposomas. Estos medios pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más.

Polímeros

Las microesferas de liberación sostenida que se utilizan en la presente invención preferentemente comprenden un polímero biodegradable como polímero para formar una cubierta. Basándose en esta característica, las microesferas de liberación sostenida utilizadas en la presente invención presentan la propiedad de liberar un compuesto farmacéutico de una manera sostenida.

El mecanismo para controlar la tasa de liberación sostenida a partir de un polímero biodegradable puede ser, por ejemplo, un mecanismo de control de la degradación, un mecanismo de control de la difusión o un mecanismo de

control de la permeación membranal.

El polímero biodegradable puede ser un polímero natural o un polímero sintético.

- 5 Entre los ejemplos del polímero biodegradable se incluyen polímeros naturales o polímeros sintéticos, tales como polímeros de éster de ácido graso o copolímeros de los mismos, ésteres de ácido poliácrico, ácidos polihidroxibutírico, oxalatos de polialquileño, poliortoésteres, policarbonato y poliaminoácidos.

- 10 Entre los ejemplos de los polímeros de éster de ácido graso o copolímeros de los mismos se incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polidioxano (PDS), ácido policítrico, ácido polimálico, succinato de polietileno, succinato de polibutileno, poli-s-caprolactona, adipato de tereftalato de polibutileno, gelatina, hidrogel de gelatina, colágeno, atelocolágeno, fibrina, ácido hialurónico o copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA), éster de ácido poli- α -cianoacrílico, ácido poli-p-hidroxibutírico, oxalato de politrimetileno, poliortoéster, poliortocarbonato, carbonato de polietileno, ácido poli- γ -bencil-L-glutámico, alcohol polivinílico, carbonato de poliéster, anhídrido de poliácido, policianoacrilato, polifosfaceno, liposomas y poli-L-alanina.

El copolímero de ácido láctico-ácido glicólico preferentemente presenta una proporción composicional de ácido láctico a ácido glicólico en el intervalo de entre aproximadamente 100/0 y aproximadamente 50/50 (p/p).

- 20 Dichos polímeros biodegradables pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más.

- 25 El polímero biodegradable es preferentemente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos (PLA), un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos (PLGA), ácidos poliglicólicos o copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) y polidioxano. El polímero biodegradable es más preferentemente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA). El polímero biodegradable es todavía más preferentemente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, ácidos poliglicólicos y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA).

- 30 Desde el punto de vista de la liberación sostenida apropiada, la preparación de microesferas de liberación sostenida preferentemente comprende un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos, polidioxano y mezclas de los mismos.

- 35 El polímero biodegradable utilizado en la presente invención preferentemente presenta un peso molecular medio en peso de 1,000 a 50,000, aunque puede variar según el tipo de polímero biodegradable, etc.

- 40 Más específicamente, el copolímero de ácido láctico-ácido glicólico preferentemente presenta un peso molecular medio en peso de aproximadamente 1,000 a 800,000 y más preferentemente de aproximadamente 1,000 a 100,000.

- 45 El ácido poliláctico preferentemente presenta un peso molecular medio en peso de aproximadamente 1,000 a 100,000 y más preferentemente de aproximadamente 1,000 a 50,000.

- El copolímero de ácido láctico-ácido glicólico preferentemente presenta un peso molecular medio en peso de aproximadamente 1,000 a 100,000 y más preferentemente de aproximadamente 1,000 a 50,000.

- 50 En la presente memoria, la expresión "peso molecular medio en peso" se refiere a un valor en términos de poliestireno medido mediante cromatografía de permeación en gel (CPG).

Estos polímeros biodegradables pueden sintetizarse de acuerdo con métodos de producción conocidos.

- 55 Con el fin de controlar el estallido inicial, etc., las microesferas de liberación sostenida utilizadas en la presente invención pueden comprender quitosano, dibutilhidroxitolueno (BHT), tocoferol (vitamina E) o aminoácidos (por ejemplo, ácido algínico).

- 60 Los eritrocitos presentan un diámetro de 7 a 8 μm y un grosor de aproximadamente 2 μm . En el caso de que la preparación de microesferas (ME) presente un tamaño de partícula medio en número de aproximadamente 10 μm o menos, que resulta equivalente o más pequeño que el tamaño de los eritrocitos, es improbable que se produzca un atrapado a largo plazo eficiente de una preparación de microesferas (ME) en los pulmones. De acuerdo con lo anterior, para atrapar la preparación de ME de la presente invención en los pulmones con elevada eficiencia, la preparación de ME preferentemente presenta un tamaño de partícula medio en número de 10 μm o superior, y más preferentemente de 20 μm o superior.

- 65 Según el cálculo de Weibel, los pulmones humanos normales presentan 100,000 a 200,000 arterias pequeñas con

- un diámetro de 300 a 500 μm y cada arteria pequeña se considera que incluye 100 ramificaciones de la misma con un diámetro de 50 a 300 μm , 2,000 arteriolas con un diámetro de 10 a 50 μm y 200,000 capilares con un diámetro de 10 μm o menos (Nuclear Medicine 16: 927-931, 1979). De acuerdo con lo anterior, con el fin de evitar el embolismo pulmonar con elevada eficiencia, la preparación de microesferas (ME) de la presente invención preferentemente presenta un tamaño de partícula máximo inferior a 300 μm . (En otras palabras, la preparación de microesferas no presenta partículas con un tamaño de partícula de 300 μm o superior). La preparación de microesferas (EM) de la presente invención más preferentemente presenta un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior, y más preferentemente de 50 μm o inferior.
- En una forma de realización preferida de la invención, el tamaño medio de partícula en número de las microesferas de liberación sostenida se encuentra dentro del intervalo de 10 a 50 μm , y preferentemente dentro del intervalo de 20 a 50 μm , y el tamaño de partícula máximo es de 100 μm o inferior.
- Con las microesferas de liberación sostenida que presentan dicho tamaño de partícula, el agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención se atrapa selectivamente en los pulmones y puede ser específicamente pulmonar.
- El tamaño de partícula medio en número y el tamaño de partícula máximo de las microesferas de liberación sostenida utilizadas en la presente invención pueden ajustarse mediante la utilización de métodos conocidos, tales como el tamizado para seleccionar las microesferas de liberación sostenida con un tamaño de partícula medio en número deseado y el tamaño de partícula máximo.
- Por ejemplo, el tamaño de partícula de las microesferas de liberación sostenida puede ajustarse a partir de la concentración de la sustancia de ensayo en el tiempo de producción, la velocidad de agitación, etc.
- Con la condición de que se consiga el objetivo de la presente invención, la cantidad del polímero biodegradable puede modificarse convenientemente según la potencia de la actividad farmacológica del principio activo, la tasa de liberación de fármaco deseada, etc. Por ejemplo, la cantidad de polímero biodegradable puede ser aproximadamente 0.2 a 10,000 veces (proporción en masa), preferentemente aproximadamente 1 a 1,000 veces (proporción en masa), más preferentemente de aproximadamente 1 a 100 veces (proporción en masa) la cantidad de la sustancia fisiológicamente activa.
- Las microesferas de liberación sostenida de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, mediante la utilización de métodos conocidos, tales como el secado dentro de agua (por ejemplo, o/a, a/o y a/o/a), separación de fases, secado por pulverización y granulación en fluido supercrítico.
- Por ejemplo, se dan a conocer métodos para producir microesferas de liberación sostenida que contienen un agonista de PGI en el documento n° WO2004/032965, patente n° 4.497.320 y documento n° WO2008/047863.
- Las microesferas de liberación sostenida utilizadas en la presente invención pueden producirse mediante o de acuerdo con dichos métodos de producción.
- Las microesferas de liberación sostenida utilizadas en la presente invención presentan una toxicidad muy baja y, de esta manera, altamente segura para la utilización como medicina.
- El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención comprende las microesferas de liberación sostenida. En el caso de que las microesferas sean lipófilas, preferentemente es una emulsión o/a. En el caso de que las microesferas sean hidrófilas, preferentemente es una emulsión a/o, o una emulsión a/o/a.
- El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención puede producirse, por ejemplo, mediante dispersión de las microesferas de liberación sostenida en un medio de dispersión acuoso.
- Entre los ejemplos del medio de dispersión acuoso se incluyen soluciones obtenidas mediante disolución en agua destilada de por lo menos un aditivo seleccionado de entre el grupo que consiste en agentes isotónicos (por ejemplo, cloruro sódico, glucosa, manitol, sorbitol y glicerol), dispersantes (por ejemplo, Tween-80, carboximetilcelulosa y alginato sódico), conservantes (por ejemplo, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio y fenol) y agentes calmantes (por ejemplo, glucosa, gluconato cálcico e hidrocloreto de procaina).
- El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención se administra mediante inyección intravenosa. El agente terapéutico puede administrarse una vez o múltiples veces. El periodo de administración puede ser, por ejemplo, de 1 semana a 6 meses, y preferentemente de 1 a 4 semanas. La frecuencia de administración puede ser de aproximadamente entre una vez a la semana y una vez al mes. En el caso de que la administración se repita múltiples veces, la administración intravenosa se lleva a cabo después del periodo de liberación sostenida de la primera administración.
- El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención se atrapa selectivamente en los pulmones y

el compuesto farmacéutico se libera gradualmente en el tejido pulmonar, ejerciendo efectos terapéuticos.

De acuerdo con lo anterior, la administración intravenosa puede llevarse a cabo intermitentemente (por ejemplo, a intervalos semanales) múltiples veces, confirmando simultáneamente la eficacia y la seguridad.

Aunque incluso una administración de baja frecuencia, por ejemplo, entre aproximadamente de una vez a la semana y de una vez al mes tal como se ha mencionado anteriormente, con menor carga sobre el paciente, puede proporcionar efectos terapéuticos prolongados, puede mejorarse el cumplimiento de la administración.

Como compuestos farmacéuticos, en lugar de los compuestos 1, 3 y 5, por ejemplo, asimismo pueden utilizarse fármacos esteroides (beclometasona: 400 µg/día, inhalación; fluticasona: 200 µg/día, inhalación), un antagonistas de receptor de leucotrieno (LTRA) (montelukast: 10 mg/día, administración oral), bloqueantes de receptor M_3 (tiotropio: 5 µg/día, inhalación, imidafenacina: 200 µg/día, administración oral), un derivado de PGI_2 (beraprost: 180 µg/día, administración oral) y estimulantes de β_2 -adrenoceptores (tulobuterol: 2 mg/día, parche; salmeterol: 100 µg/día, inhalación) para la preparación de preparaciones de microesferas (ME) con copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA), ácidos polilácticos, hidrogeles de gelatina y/o liposomas. Entre paréntesis se muestran los fármacos terapéuticos típicos utilizados en la práctica clínica, así como las dosis típicas y métodos de administración.

La dosis clínica del inhalante que comprende dicho compuesto farmacéutico es de 5 a 400 µg/día en términos del principio activo. El inhalante se administra varias veces al día. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo en el caso de que se administren 400 µg, es decir, la dosis máxima en términos de principio activo, durante 4 semanas, la dosis total del principio activo será de 11.2 mg. En el caso de que se utilicen microesferas de liberación sostenida que contienen 10% del principio activo, la dosis total en términos de las microesferas será de 112 mg. Esta dosis en términos de las microesferas de liberación sostenida es tan baja, o más baja, que el nivel de efecto no observado mostrado en el ejemplo (Ensayo de efecto farmacológico 1), es decir, 5.8 mg/kg (348 mg/persona). Dicho valor se considera que es una dosis segura que no desarrolla un embolismo pulmonar pequeño en el caso de que se administren por vía intravenosa microesferas de liberación sostenida con un tamaño de partícula de 20 a 40 µm.

Específicamente, el agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención puede administrarse con seguridad, ya que incluso la administración intravenosa única del compuesto farmacéutico en una dosis equivalente de 4 semanas no desarrolla un embolismo pulmonar pequeño.

Además, el agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar de la presente invención administrado por vía intravenosa presenta una elevada selectividad del tejido pulmonar que es preferentemente por lo menos 10 veces más elevada que las preparaciones para la administración sistémica, tal como las preparaciones orales y los parches.

En este caso, los resultados del cálculo de prueba de un compuesto farmacéutico cuya administración se requiere en una dosis relativamente grande de 10 mg/día (dosis total a las 4 semanas: 280 mg) en términos del principio activo indican que, por ejemplo, la dosis del agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención que comprende las microesferas de liberación sostenida de la presente invención (suponiendo una selectividad pulmonar de 10 veces respecto a preparaciones convencionales y que comprende 10% de principio activo) es de 280 mg/persona en términos de las microesferas de liberación sostenida. Dicho valor asimismo es tan bajo, o más bajo, que el nivel de efecto no observado mostrado en el ejemplo (Efecto farmacológico 1) mencionado anteriormente, es decir, 348 mg/persona. De acuerdo con lo anterior, asimismo en este caso, el agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención puede administrarse con seguridad ya que incluso una única administración intravenosa del compuesto farmacéutico a una dosis equivalente de 4 semanas, respecto a la dosis de una preparación convencional, no desarrollar un embolismo pulmonar pequeño.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que una concentración de TXA_2 sanguínea incrementada (medida en términos de la concentración de 11-deshidro- TXB_2 , que es un metabolito de TXA_2) en modelos de rata de hipertensión pulmonar inducida con monocrotalina, en comparación con animales normales, es la causa de la exacerbación. En el contexto de la presente invención se ha encontrado además que la administración de PGI_2 (epoprostenol) incrementa adicionalmente la concentración sanguínea de TXA_2 . La administración repetida de compuesto 1 con actividad agonista de PGI_2 y actividad inhibidora de TXA_2 sintetasa inhibe un incremento de la concentración sanguínea de TXA_2 , sugiriendo de esta manera que la administración repetida de compuesto 1 no resulta en la atenuación de (la resistencia a) los efectos y confirma su eficacia en la tasa de supervivencia, presión arterial pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, engrosamiento de la arteria pulmonar media, etc. (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 172, 1575-1580, 2005).

La administración repetida de un agonista de PGI_2 (por ejemplo, PGI_2 y Compuesto 3) que presenta actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y actividad vasodilatadora incrementa la producción de TXA_2 que presenta actividad inhibidora de la agregación plaquetaria y actividad vasodilatadora en el cuerpo vivo para mantener un equilibrio biológico, resultando de esta manera en la atenuación de (la resistencia de) la actividad agonista de PGI_2 .

En el contexto de la presente invención se ha encontrado que la administración repetida de un agonista de PGI₂ en combinación con un inhibidor de la TXA₂ sintetasa (por ejemplo, ozagrel o una sal del mismo) inhibe la producción de TXA₂ para inhibir la atenuación de (o la resistencia a) la actividad agonista de PGI₂ y mantiene su efecto, y que un fármaco de combinación de un agonista de PGI₂ y un inhibidor de TXA₂ sintetasa resulta, de esta manera, útil como preparación.

El Ensayo de efecto farmacológico 5 muestra los efectos del compuesto 3 y el compuesto 7 el hidrocloreto de ozagrel administrados solos o en combinación en modelos de hipertensión pulmonar y compara estos efectos individuales o combinados con el efecto del compuesto 1.

Específicamente, en el contexto de la presente invención se ha encontrado por primera vez que, la administración de una inyección de un agonista de PGI₂, tal como epoprostenol, PGE₁ (alprostadilo) o un derivado de carbaciclina, la administración de una inyección del inhibidor de TXA₂ sintetasa ozagrel sódico (nombre comercial: cataclot) en combinación con el agonista de PGI₂ o un fármaco de combinación de los mismos, resulta útil. De manera similar, en el contexto de la presente invención se ha encontrado por primera vez que, la administración de un agente oral de un agonista de PGI₂, tal como beraprost sodio (compuesto 3) o un derivado de PGE (por ejemplo, ornoprostilo (compuesto 7), limaprost, enprostilo y misoprostol), la administración de una preparación oral de un inhibidor de TXA₂ sintetasa, tal como hidrocloreto de ozagrel (Vega), o un antagonista de receptor de TXA₂ en combinación con el agonista de PGI₂, o un fármaco de combinación de los mismos, resulta útil.

La dosis del agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar de la presente invención varía según la edad, peso corporal, síntomas, efecto terapéutico, método de administración, período de tratamiento, etc. En general, el agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar se administra por vía intravenosa una vez a la semana, una vez cada cuatro semanas, una vez cada tres meses o una a varias veces cada seis meses, a una dosis de 1 ng a 1,000 mg por adulto en términos de la sustancia activa.

Evidentemente, debido a que la dosis depende de diversas condiciones, tal como se ha indicado anteriormente, la dosis puede ser inferior a la cantidad anteriormente indicada o puede resultar necesario exceder el intervalo anteriormente indicado.

La dosis del agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención varía según el tipo y contenido de compuesto farmacéutico como principio activo, enfermedad diana, etc. La dosis es típicamente de 10 mg/kg de peso corporal (600 mg/persona) o menos. Desde el punto de vista de un grado elevado de prevención de un embolismo pulmonar pequeño, el agente terapéutico específico de pulmón es preferentemente 6 mg/kg de peso corporal (o 360 mg/persona) o inferior.

Entre los ejemplos de indicaciones de terapia intravenosa utilizando la preparación de liberación sostenida de la presente invención se incluyen enfermedades pulmonares, tales como neumonía aguda, fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), bronquitis crónica, enfisema pulmonar, asma, asma intratable, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), sarcoidosis, tromboembolia pulmonar idiopático crónico, panbronquiolitis difusa, neumonía por hipersensibilidad, cáncer de pulmón, síndrome de hipoventilación por obesidad, síndrome de hipoventilación alveolar y rechazo crónico del trasplante pulmonar.

El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención puede utilizarse en combinación con otros medicamentos o métodos terapéuticos con el fin de complementar o potenciar efectos terapéuticos, mejorar la cinética y absorción, reducir la dosis, aliviar efectos secundarios, etc. Los otros fármacos o métodos terapéuticos incluyen no sólo aquellos que se han encontrado hasta el momento, sino asimismo los que se encontrarán en el futuro.

El agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención y otro u otros componentes o fármacos pueden administrarse como preparación de combinación que comprende dichos componentes, o pueden administrarse por separado. En el caso de que el agente terapéutico específico de pulmón de la presente invención y otro u otros fármacos se administren por separado como preparaciones independientes, pueden administrarse simultáneamente o con un retardo temporal. La administración con retardo temporal incluye el método de administración de la preparación de liberación sostenida de la presente invención antes de otra u otras preparaciones, y viceversa, y cada método de administración puede ser el mismo o uno diferente.

Los otros fármacos pueden ser, por ejemplo, compuestos de bajo peso molecular o compuestos de alto peso molecular, tales como proteínas, polipéptidos, polinucleótidos (ADN, ARN y genes), cadenas antisentido, señuelos, anticuerpos, vacunas, células madre aisladas a partir de tejido, células iPS o células somáticas, etc. Como otros fármacos, puede administrarse repetidamente una preparación oral de compuesto 1, 3 o 5 o una preparación de liberación sostenida de compuesto 1, 3 o 5 puede administrar intermitentemente por vía subcutánea o intramuscular. La dosis de los demás fármacos puede seleccionarse apropiadamente basándose en la dosis utilizada clínicamente como referencia. La proporción de mezcla del agente terapéutico de la presente invención con otro u otros fármacos puede seleccionarse apropiadamente según la edad y el peso corporal del sujeto en el

que se administre el agente terapéutico, el método de administración, el tiempo de administración, la enfermedad que debe tratarse, los síntomas, la combinación y similares. Por ejemplo, el otro u otros fármacos pueden utilizarse en una cantidad de 0.01 a 100 partes en masa por cada parte en masa del agente terapéutico utilizado concurrentemente en la presente invención. Pueden administrarse uno o más tipos de fármaco seleccionados del mismo grupo o de grupos diferentes indicados posteriormente, individualmente o en combinación en una proporción adecuada.

En el caso de que se administre la preparación de microesferas de liberación sostenida por vía intravenosa repetidamente, o se administren dos o más tipos de preparación múltiples veces, la administración posterior se lleva a cabo después de acabar el periodo de liberación sostenida de la preparación administrada en primer lugar.

No existe ninguna limitación a las enfermedades sobre las que las preparaciones de combinación del agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar de la presente invención y otro u otros fármacos presentan efectos preventivos y/o de tratamiento, con la condición de que el efecto preventivo y/o terapéutico del agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar de la presente invención sobre la enfermedad sea complementado y/o potenciado por los demás fármacos.

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, el agente terapéutico específico de pulmón comprende microesferas de liberación sostenida que contienen por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminooxijetil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético (compuesto 1), ($\pm$)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoico (beraprost), ácido 2-[4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi]acético (MRE-269) (compuesto 5) y sales de los mismos, y un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y mezclas de los mismos.

Según otra forma de realización preferida de la presente invención, el agente terapéutico específico de enfermedad pulmonar comprende microesferas de liberación sostenida que contienen por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol, ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidén-aminooxijetil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético (compuesto 1); ácido ($\pm$)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofurán-5-butanoico (Beraprost), ácido 2-[4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi]acético (compuesto 5), derivados de carbaciclina que son derivados de PGI₂ y sales de los mismos, presentando las microesferas de liberación sostenida que presentan un tamaño de partícula medio en número de 20 a 40 μ m y un tamaño de partícula máximo de 100 μ m o inferior, y se administra a una dosis de 6 mg/kg o inferior en términos de las microesferas de liberación sostenida.

Además, el agente terapéutico de la invención, que es específico de pulmón, puede esperarse que, por ejemplo, reduzca la dosis total, potencia los efectos terapéuticos, alivia los efectos secundarios, mejora el cumplimiento de la administración y consigue efectos económicos.

Ejemplos

Los métodos para producir preparaciones y ensayos farmacológicos se describen posteriormente a título de ejemplo de la presente invención con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la presente invención y no deben entenderse como limitativos de la presente invención.

1. Producción de ME de liberación sostenida

Ejemplo de preparación 1: ME de liberación sostenida de compuesto 1

Se preparó una solución de diclorometano/metanol (9.4 ml) que contenía 670 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico ("PLGA") (ácido poliláctico:ácido glicólico=1:1 (% molar), peso molecular medio en peso: 50,000, PLGA5-50, Mitsui Chemicals, Inc.) y Compuesto 1 (170 mg, Sigma Co., n° 02264). Se preparó una emulsión de O/A mediante la adición de la solución preparada anteriormente a 2 l de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0.1% (Nacalai Tesque, Inc.) (pH 3.0, ajustado con ácido clorhídrico 1 N) que había sido agitada a 3,500 rpm utilizando un homogeneizador (T.K. Homomixer, Primix Corporation) y la agitación de la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 minuto. Dicha emulsión de O/A se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas para evaporar el diclorometano y la fase aceite se solidificó y después se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando una centrífuga (O5PR-22, Hitachi Ltd.). Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en solución de Tween-80 al 0.2% (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y el precipitado se dispersó nuevamente con una cantidad

pequeña de agua destilada, la dispersión se liofilizó utilizando un liofilizador (FZ-6PV, Labconco Corporation) para producir una preparación de microesferas (ME) de compuesto 1.

Al igual que las ME del ejemplo de preparación 1, se obtuvieron de esta manera microesferas (ME) (compuesto 1-ME) con un contenido de compuesto 1 de 14.9%, un tamaño de partícula medio en número de 30.3 μm y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior. El contenido de compuesto 1 y el tamaño de partícula de las ME se determinaron mediante la utilización de los métodos descritos posteriormente. Lo mismo se aplica a los ejemplos de preparación siguientes.

Ejemplo de preparación 2: control negativo

Se preparó una solución de diclorometano/metanol (9.4 ml) de 670 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico ("PLGA") (ácido poliláctico:ácido glicólico=1: 1 (% molar), peso molecular medio en peso de 50,000, PLGA5-50, Mitsui Chemicals, Inc.). Se siguió el mismo procedimiento que en el ejemplo de preparación 1 para producir microesferas (ME) de PLGA.

Al igual que las ME del ejemplo de preparación 2 (un control negativo), se obtuvieron de esta manera microesferas (ME) (PLGA-ME (control negativo)) que no contenían compuesto farmacéutico y que presentaban un tamaño de partícula medio en número de 33.8 μm y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior.

Ejemplo de preparación 3: ME de liberación sostenida de compuesto 3

Se preparó una solución de diclorometano/metanol (4 ml) que contenía 40 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (en adelante denominado "PLGA") (ácido poliláctico:ácido glicólico=1:1 (% molar), peso molecular medio en peso: 50,000, PLGA5-50, Mitsui Chemicals, Inc.) y Compuesto 3 (10 mg, Cayman Chemical Co., nº 18230). Se preparó una emulsión de O/A mediante la adición de la solución preparada anteriormente a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0.1% (Nacalai Tesque, Inc.) (pH 3.0, ajustado con ácido clorhídrico 1 N) que había sido agitado a 3,000 rpm utilizando un TK Robomix (modelo MARK II 2.5, Tokushu Kiki Co., Ltd.) y la agitación de la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 0.5 minutos. Dicha emulsión de O/A se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas para evaporar el diclorometano y la fase aceite se solidificó y después se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando una centrífuga (O5PR-22, Hitachi Ltd.). Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en solución de Tween-80 al 0.2% (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (35 ml), la dispersión se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se impregnó en hielo seco-metanol, se congeló y después se secó bajo presión reducida, produciendo microesferas (ME) de compuesto 3.

Como ME del ejemplo de preparación 3, se obtuvieron de esta manera microesferas (ME) (compuesto 3-ME) con un contenido de compuesto 3 de 8.9%, un tamaño de partícula medio en número de 24.9 μm y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior.

Ejemplo de preparación 4: ME de liberación sostenida de compuesto 5

Se preparó una solución de diclorometano/metanol (4 ml) que contenía 40 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (en adelante denominado "PLGA") (ácido poliláctico:ácido glicólico=1:1 (% molar), peso molecular medio en peso: 50,000, PLGA5-50, Mitsui Chemicals, Inc.) y Compuesto 5 (10 mg, Cayman Chemical Co., nº 10010412). Se preparó una emulsión de O/A mediante la adición de la solución preparada anteriormente a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0.1% (Nacalai Tesque, Inc.) (pH 3.0, ajustado con ácido clorhídrico 1 N) que había sido agitado a 3,000 rpm utilizando un TK Robomix (modelo MARK II 2.5, Tokushu Kiki Co., Ltd.) y la agitación de la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 0.5 minutos. Dicha emulsión de O/A se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para evaporar el diclorometano y la fase aceite se solidificó y después se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando una centrífuga (O5PR-22, Hitachi Ltd.). Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (2 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en solución de Tween-80 al 0.2% (35 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Tras eliminar el sobrenadante y dispersar el residuo en agua destilada para inyección (2 ml), la dispersión se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos utilizando la centrífuga. Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se impregnó en hielo seco-metanol, se congeló y después se secó bajo presión reducida, produciendo microesferas (ME) de compuesto 5.

Al igual que las ME del ejemplo de preparación 4, se obtuvieron de esta manera microesferas (ME) (compuesto 5-ME) con un contenido de compuesto 5 de 16.3%, un tamaño de partícula medio en número de 35.3 μm y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o inferior.

Ejemplo de ensayo de preparación 1: medición de la eficiencia de encapsulado

Se añadió una solución de acetonitrilo que contenía un estándar interno apropiado a las microesferas producidas en los ejemplos de preparación 1, 3 y 4 (aproximadamente 10 mg cada uno) y cada una de las mezclas resultantes se sometió a sonicación para disolver las microesferas. El contenido de compuesto 1 de cada una de las soluciones se midió mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se calculó la eficiencia de encapsulado de los compuestos 1, 3 y 5 en las microesferas mediante la fórmula siguiente.

$$\text{Eficiencia de encapsulado (\%)} = (\text{Contenido medido} / \text{Contenido teórico}) \times 100$$

Como resultado, la totalidad de las microesferas de los ejemplos de preparación 1, 3 y 4 presentaban una eficiencia de encapsulado de 70% o superior, un contenido de los compuestos de 8% a 18% y un tamaño de partícula medio en número de 24 a 36 μm . Estas preparaciones no contenían microesferas con un tamaño de partícula medio en número de 100 μm o superior.

Ejemplo de ensayo de preparación 2: ensayo de liberación *in vitro* y medición del tamaño de partícula

Se pesaron 3 mg de cada una de las microesferas (ME) producidas en los ejemplos de preparación 1, 3 y 4 para cada punto de muestreo ($n=3$). Tras la adición a lo anterior de 10 ml de tampón de fosfato 1/15 M que contenía Tween-80 al 0.2% (p/v) (pH 7), las microesferas se dispersaron uniformemente mediante vórtex (10 segundos) y sonicación (20 segundos) y se dejó la dispersión en reposo en un baño de agua a 37°C. Cada recipiente globalmente se muestreó durante el tiempo y se centrifugó (a 2,000 rpm durante 5 minutos) y 4 ml de sobrenadante y el sedimento obtenido mediante el descarte del resto del sobrenadante se almacenaron congelados.

Tras añadir 10 ml de DMSO a dicho pellet, las microesferas (ME) se disolvieron por completo mediante agitación con vórtex (10 segundos). A 300 μl de dicha solución se añadieron 200 μl de solución IS B y 500 μl de solución de fase móvil (pH 3). Se mezcló bien la mezcla resultante. De manera similar, a 300 μl del sobrenadante se añadieron 200 μl de solución IS B y 500 μl de solución de fase móvil (pH igual a 3). Se mezcló bien la mezcla resultante. Tras centrifugar la mezcla (12,000 rpm durante 3 minutos), se inyectaron en la HPLC 10 μl del sobrenadante.

Condiciones de HPLC

Dispositivos: cromatógrafo (Shimazu LC-10AT), detector de UV (Shimazu SPD-10A), analizador de datos (Shimazu C-R7A)

Detección: UV 265 nm

Columna: SHISEIDO CAPCELLPACK C18 UG120 (4,6 mm d.i. x 150 mm)

Temperatura de la columna: una temperatura constante de aproximadamente 25°C

Fase móvil: acetonitrilo:agua:trietilamina=1000:900:3 (una solución acuosa de trietilamina en una proporción de agua:trietilamina de 900:3) se ajustó a un pH de 3 con ácido fosfórico

Caudal: 1.0 ml/min

Estándar interno (EI): n-propilparabeno

• Medición del tamaño de partícula

Se midió el tamaño de partícula con un contador Coulter (Multisizer III, Beckman Coulter, Inc., EE.UU.).

La figura 1 muestra los resultados de liberación de compuesto 1 a partir de las microesferas (ME) producidas en el ejemplo de preparación 1. La figura 2 muestra los resultados de liberación de compuesto 3 a partir de las microesferas (ME) producidas en el ejemplo de preparación 3. La figura 3 muestra los resultados de liberación de compuesto 5 a partir de las microesferas (ME) producidas en el ejemplo de preparación 4.

Los resultados muestran que las ME (compuesto 1-ME) de ejemplo de preparación 1 liberaron 90% o más en aproximadamente 4 semanas, las ME (compuesto 3-EM) de ejemplo de preparación 3 liberaron 90% o más en aproximadamente 2 semanas y las ME (compuesto 5-ME) de ejemplo de preparación 4 liberaron 85% o más en aproximadamente 2 semanas.

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

Se determinó la cinética sanguínea utilizando ratas macho SD (SPF) proporcionadas por Japan SLC, Inc. (Hamamatsu). Utilizando una aguja de inyección desechable 23G (Terumo Corporation) y una jeringa para

inyección desechable con una capacidad de 2.5 ml (Terumo Corporation), la suspensión se administró por vía subcutánea una vez en la región dorsal de cada rata a una dosis de 10 mg/kg en términos de compuesto 1. La cantidad administrada era de 5 ml/kg. El número de ratones en cada grupo era de cinco.

- 5 Utilizando una jeringa heparinizada desechable con una aguja de inyección 23G, se recogieron 0.5 ml de sangre de la vena yugular en cada punto de muestreo de sangre. Tras centrifugar la muestra (12,000 rpm, 10 minutos, 4°C), el plasma se mantuvo congelado (-30°C). Después del ensayo, la concentración sanguínea de compuesto 1 se determinó mediante CL/EM/EM.

10 Ensayo de CL/EM/EM

Condiciones de EM/EM
EM/EM: API 4000
Modo de ionización: IEP
15 Modo de polaridad iónica: positivo
Ion monitorizado: (ver la tabla 1)

Tabla 1

Compuesto	Ion precursor* (m/z)	Ion producto* (m/z)
Compuesto 1	429.2	79.1
Estándar interno (EI)	445.4	168.1

*: Se seleccionó convenientemente el valor de fuerza iónica más alta en m/z ± 0.5 m/z respecto al valor diana.

Resultados: La figura 4 muestra la cinética sanguínea tras la administración subcutánea del ejemplo de preparación 1 en las ratas. La cinética sanguínea del ejemplo de preparación 1 se prolongó durante aproximadamente 4 semanas.

25 Ensayo de efecto farmacológico 1: ensayo sobre seguridad de la administración intravenosa del ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME (control negativo))

Tras someter a anestesia de inhalación de isoflurano ratas macho Slc:Wistar (5 semanas de edad), se administró por vía subcutánea una solución acuosa de monocrotalina (MCT) en la región dorsal de cada rata a una dosis de 60 mg/kg (volumen de inyección de 3 ml/kg) utilizando una jeringa de inyección desechable y una aguja de inyección desechable 27G para preparar modelos de hipertensión pulmonar. El día de la preparación del modelo se definió como día 0. Inmediatamente después de la administración de MCT, se administró por vía subcutánea PLGA-ME del ejemplo de preparación 2 (control negativo) a diversas dosis para evaluar la tasa de supervivencia a los 42 días.

Las sustancias de ensayo de los grupos 2 a 6 se suspendieron en el mismo medio que el utilizado en el grupo 1 (solución salina fisiológica Tween-80 al 0.2% p/v) y se administraron por vía intravenosa a razón de 10 ml/kg.

En los ensayos posteriormente, las sustancias de ensayo se suspendieron en el medio y se administraron por vía intravenosa o subcutánea de la misma manera.

La tabla 2 muestra la constitución del grupo de ensayo.

Tabla 2

Grupo	Sustancia administrada	Dosis*	Número de animales
1	Tween-80 al 0.2% p/v solución salina fisiológica	10 ml/kg	10
2	PLGA-ME (control negativo)	0.3 mg equivalentes/kg (1.74 mg/kg)	10
3	PLGA-ME (control negativo)	1 mg equivalentes/kg (5.8 mg/kg)	10
4	PLGA-ME (control negativo)	3 mg equivalentes/kg (17.4 mg/kg)	10
5	PLGA-ME (control negativo)	10 mg equivalentes/kg (58 mg/kg)	10
6	PLGA-ME (control negativo)	0.1 mg equivalentes/kg (0.58 mg/kg)	10

*: Las dosis indican las cantidades (equivalentes) de compuesto 1, suponiendo que el ejemplo de preparación 2 contiene compuesto 1 en la misma cantidad (17.4%) que el ejemplo de preparación 1. Las cantidades entre paréntesis indican las dosis de PLGA-ME realmente administradas.

Grupo 1: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró por vía intravenosa solución salina fisiológica Tween-80 al 0.2% p/v (medio) intermitentemente a una dosis de 10 ml/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 2: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente PLGA-ME por vía intravenosa a una dosis de 1.74 mg/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 3: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente PLGA-ME por vía intravenosa a una dosis de 5.8 mg/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 4: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente PLGA-ME por vía intravenosa a una dosis de 17.4 mg/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 5: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente PLGA-ME por vía intravenosa a una dosis de 58 mg/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 6: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente PLGA-ME por vía intravenosa a una dosis de 0.58 mg/kg (administrada dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

La figura 5 muestra las curvas de tasa de supervivencia.

La tasa de supervivencia del grupo de administración de medio (grupo 1) era de 20%.

Las tasas de supervivencia de algunos grupos de control negativo que recibieron PLGA-ME, es decir, el grupo de 0.58 mg/kg (grupo 6), el grupo de 1.74 mg/kg (grupo 2) y el grupo de 5.8 mg/kg (grupo 3), eran equivalentes a la del grupo de administración de medio (grupo 1).

En contraste, el grupo de 17.4 mg/kg (grupo 4) y el grupo de 58 mg/kg (grupo 5) que recibieron PLGA-ME mostraron una tendencia a una tasa de supervivencia más corta que el grupo de administración de medio (grupo 1), el grupo de 0.58 mg/kg (grupo 6), el grupo de 1.74 mg/kg (grupo 2) y el grupo de 5.8 mg/kg (grupo 3).

Los resultados anteriores confirmaron que la dosis no tóxica de PLGA/ME administrada por vía intravenosa era de 5.8 mg/kg (1 mg/kg en términos de compuesto 1) o inferior. La dosis de 5.8 mg/kg corresponde a 348 mg/kg de una persona, la cual es una dosis difícil para la administración intravenosa.

Este modelo de hipertensión pulmonar muere debido a insuficiencia cardíaca derecha que se desarrolla mediante el incremento de la resistencia al flujo sanguíneo pulmonar y la elevación de la presión arterial pulmonar asociada a la obstrucción de microarterias pulmonares en el tejido pulmonar. De esta manera, este modelo de hipertensión pulmonar es altamente sensible al embolismo pulmonar. La fibrosis pulmonar, el asma, la COPD y similares son enfermedades de los bronquios y del tejido alveolar pulmonar. Los pacientes con dichas enfermedades son menos sensibles al (micro)embolismo pulmonar y más seguros, en comparación con pacientes con hipertensión pulmonar y enfermedades del colágeno que presentan resistencia al flujo sanguíneo pulmonar.

Ensayo de efecto farmacológico 2: investigación sobre la relación entre el beneficio de supervivencia y la dosis en la administración intravenosa del ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME)

Se llevó a cabo una evaluación utilizando el mismo sistema modelo que en el ensayo de efecto farmacológico 1. La tabla 3 muestra la constitución del grupo de ensayo.

Tabla 3

Grupo	Sustancia administrada	Dosis*	Número de animales
1	PLGA-ME (control negativo)	1 mg equivalente/kg	10
2	Compuesto 1-ME	0.03 mg/kg	10
3	Compuesto 1-ME	0.1 mg/kg	10
4	Compuesto 1-ME	0.3 mg/kg	10
5	Compuesto 1-ME	1 mg/kg	10

*: La dosis de PLGA-ME (control negativo) (ejemplo de preparación 2) en el grupo 1 se determinó a partir

de los resultados del ensayo de efecto farmacológico 1. Se administró PLGA-ME en el grupo 1 en una cantidad equivalente a la cantidad administrada en el grupo 5. Las dosis en los grupos 2 a 5 se indican en términos de compuesto 1.

Grupo 1: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente por vía intravenosa ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME) a una dosis de 5.8 mg/kg (1 mg/kg de equivalente de compuesto 1) (administrado dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 2: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 0.03 mg/kg (en términos de compuesto 1) (administrado dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 3: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 0.1 mg/kg (en términos de compuesto 1) (administrado dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 4: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 0.3 mg/kg (en términos de compuesto 1) (administrado dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

Grupo 5: Inmediatamente después de la preparación del modelo y 21 días después de la preparación del modelo, se administró intermitentemente por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) (administrado dos veces en total). Se evaluó la tasa de supervivencia durante el periodo de 42 días después de la preparación del modelo.

La figura 6 muestra los resultados de la curva de tasa de supervivencia.

La tasa de supervivencia del grupo de control negativo (grupo 1), que recibió 5.8 mg/kg (1 mg/kg de equivalente de compuesto 1) de PLGA-ME, era de 20%.

Las tasas de supervivencia del grupo de 0.03 mg/kg (grupo 2) y del grupo de 0.1 mg/kg (grupo 3), cada una de las cuales recibió ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME), era de 40%. Estos grupos mostraron una tendencia a una tasa de supervivencia prolongada, en comparación con el grupo (grupo 1) que había recibido 5.8 mg/kg (1 mg/kg de equivalente de compuesto 1) de PLGA-ME.

Además, el grupo de 0.3 mg/kg (grupo 4) y el grupo de 1 mg/kg (grupo 5) que recibieron ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) mostraron una tasa de supervivencia prolongada, en comparación con el grupo (grupo 1) que había recibido 5.8 mg/kg (1 mg/kg de equivalente de compuesto 1) de ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME).

De esta manera, los resultados muestran que, al administrar intermitentemente por vía intravenosa compuesto 1 del ejemplo de preparación 1 a una dosis de 0.03 mg/kg a 1 mg/kg, se proporcionaba un efecto de prolongación de la supervivencia dependiente de la dosis.

Ensayo de efecto farmacológico 3: ensayo de comparación analítica entre la administración intravenosa y subcutánea de ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) utilizando animales sacrificados durante el periodo experimental

Se llevó a cabo una evaluación utilizando el mismo sistema modelo que en el Ensayo de efecto farmacológico 1. La tabla 4 muestra la constitución del grupo de ensayo.

Tabla 4

Grupo	Sustancia administrada	Dosis*	Número de animales
1	Tween-80 al 0.2% p/v solución salina fisiológica (normal); administración intravenosa	10 ml/kg	10
2	PLGA-ME (control negativo); administración intravenosa	1 mg equivalente/kg	15
3	Ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME);	1 mg/kg	15

Grupo	Sustancia administrada	Dosis*	Número de animales
	administración intravenosa		
4	Ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME); administración subcutánea	1 mg/kg	15
5	Ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME); administración subcutánea	10 mg/kg	15
*: La dosis de ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME) en el grupo 2 se determinó a partir de los resultados de los ensayos de efecto farmacológico 1 y 2.			

Las dosis en los grupos 3 a 5 se indican en términos de compuesto 1 contenido en las preparaciones.

- 5 Grupo 1: grupo de control normal. Se administró agua para inyección (Farmacopea japonesa) en lugar de la administración de monocrotalina. Inmediatamente después de la preparación del modelo normal, se administró por vía intravenosa de una sola vez Tween-80/solución salina fisiológica al 0.2% p/v. La evaluación se realizó 21 a 25 días después de la preparación del modelo.
- 10 Grupo 2: control negativo. Inmediatamente después de la preparación del modelo, se administró por vía intravenosa ejemplo de preparación 2 (PLGA-ME) a una dosis de 5.8 mg/kg (1 mg/kg de equivalente de compuesto 1) de una sola vez. La evaluación se realizó 21 a 25 días después de la preparación del modelo.
- 15 Grupo 3: inmediatamente después de la preparación del modelo, se administró por vía intravenosa el ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez. La evaluación se realizó 21 a 25 días después de la preparación del modelo.
- 20 Grupo 4: inmediatamente después de la preparación del modelo, se administró por vía subcutánea el ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez. La evaluación se realizó 21 a 25 días después de la preparación del modelo.
- 25 Grupo 5: grupo de control positivo. Inmediatamente después de la preparación del modelo, se administró por vía subcutánea el ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 10 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez. La evaluación se realizó 21 a 25 días después de la preparación del modelo.

30 La presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha), la proporción de presión ventricular derecha a presión ventricular izquierda, la proporción de peso ventricular derecho a peso ventricular izquierdo más septal (VD/ peso ventricular derecho más peso septal) de todos los animales vivos se determinaron 21 a 25 días después de la administración de MCT.

Además, se midió el contenido de compuesto 1 de los pulmones en los grupos 3 y 4.

35 Métodos de medición: métodos para determinar la presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha) y presión ventricular izquierda.

40 Tras anestesiarse cada animal de ensayo con pentobarbital sódico (64.8 mg/kg i.p.), se intubó endotraquealmente el animal y se conectó a un ventilador. Se abrió el tórax mediante esternotomía media y se insertó un catéter (Miller, catéter de micropunta, tamaño de transductor, 1.4 Fr) intraventricularmente desde los ápices de los ventrículos derecho e izquierdo para medir directamente la presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha) y la presión ventricular izquierda. Se midió la presión sanguínea mediante conexión del catéter y un transductor de presión sanguínea y utilizando un amplificador para la medición de la presión sanguínea.

45 Las figuras 7, 8 y 9 representan los resultados.

50 En comparación con el grupo normal (grupo 1), el grupo con ejemplo de preparación 2 de administración intravenosa de (PLGA-ME) en animales en los que se había administrado MCT (control negativo, Grupo 2) presentaba una presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha), proporción de presión ventricular derecha a presión ventricular izquierda y proporción de peso ventricular derecho a peso ventricular izquierdo más peso septal significativamente elevados, y mostraba síntomas de hipertensión pulmonar, mientras que el grupo en el que se había administrado por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) (grupo 3) una sola vez presentaba una presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha), proporción de presión ventricular a presión ventricular izquierda y proporción de peso ventricular derecho a peso ventricular izquierdo más peso septal significativamente bajos. En contraste, el grupo en el que se había administrado por vía subcutánea ejemplo de preparación 1 (compuesto-ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez (grupo 4) no mostró efectos y era prácticamente equivalente al grupo 2 (grupo de

control negativo) en presión arterial pulmonar (presión ventricular derecha), proporción de presión ventricular derecha y presión ventricular izquierda, y proporción de peso ventricular derecho a peso ventricular izquierdo más peso septal, mientras que el grupo en el que se había administrado por vía subcutánea ejemplo de preparación 1 (compuesto 1-ME) a una dosis de 10 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez (grupo 5) mostraba efectos prácticamente equivalentes a los conseguidos por el grupo en el que se había administrado por vía intravenosa ejemplo de preparación 1 (compuesto 1/ME) a una dosis de 1 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez (grupo 3).

El efecto terapéutico específico de enfermedad pulmonar conseguido mediante la administración intravenosa de la preparación de microesferas (ME) era por lo menos 10 veces más potente que el de la administración subcutánea.

Método para determinar el contenido de compuesto 1 en los pulmones en el ensayo de efecto farmacológico 3

Se añadió una cantidad cuatro veces superior de una mezcla de agua destilada y etanol respecto al peso pulmonar para formar un homogenado. Se añadió acetonitrilo a una parte del homogenado y la mezcla resultante se sometió a agitación. El sobrenadante centrifugado se recogió y se concentró. Tras disolver el concentrado en un solvente, se llevó a cabo la medición mediante CL/EM/EM bajo las mismas condiciones que en el ejemplo de ensayo de preparación 2 para determinar el contenido de compuesto 1 en los pulmones.

Los resultados (tabla 5) muestran que no se detectó concentración de compuesto 1 en ninguna muestra en el grupo 2 (control), mientras que la concentración media en tejido pulmonar era de 76.35 ng/g en el grupo 3 y la concentración media en tejido pulmonar era de 0.659 ng/g en el grupo 4, y que la proporción de grupo 3 a grupo 4 era de 115.9. Más específicamente, en comparación con la inyección subcutánea, la administración intravenosa consiguió una concentración de aproximadamente 120 veces del tejido pulmonar y se confirmó de esta manera la selectividad pulmonar.

Tabla 5

Grupo	Concentración de compuesto 1 en el tejido (ng/g)
Grupo 2 (control)	0
	0
	0
	0
Grupo 3 (administración intravenosa; 1 mg/kg)	111
	50.0
	99.2
	45.2
Grupo 4 (administración subcutánea; 1 mg/kg)	1.06
	0.258

Ensayo de efecto farmacológico 4: eficacia de la administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 sobre la COPD

Se prepararon modelos de COPD a corto plazo mediante la administración endotraqueal de una solución de humo de cigarrillo y LPS (lipopolisacárido) en cobayas, y se investigaron utilizando los modelos los efectos del ejemplo de preparación 1 sobre las funciones respiratorias, las funciones pulmonares y los cambios en el tejido pulmonar.

De acuerdo con Biol. Pharm. Bull. 2009, 32(9): 1559-1564, se administró una solución de humo de cigarrillo por vía endotraqueal en cobayas durante 16 días y se administró por vía endotraqueal LPS durante 3 días (días 1 a 19) para preparar modelos de COPD. El día 1, se administró por vía subcutánea ejemplo de preparación 1 a una dosis de 10 mg/kg en términos de compuesto 1, una sola vez.

Específicamente, se preparó la solución de humo de cigarrillo mediante burbujeo de la corriente principal de humo de un cigarrillo (nombre comercial: Hi-lite, Japan Tobacco Inc.) por ml de solución salina fisiológica. Se disolvió LPS (lipopolisacárido, Wako Pure Chemical Industries) mediante la adición de solución salina fisiológica para preparar una solución a una concentración de 500 µg/ml. Cada uno de la solución de humo de cigarrillo obtenida de esta manera y LPS se criopreservó. Como cobayas, se utilizaron cobayas Std:Hartley (macho) (siete semanas de edad) (Japan SLC, Inc.).

Los días 1 a 4, días 6 a 9, días 11 a 14 y días 16 a 19, se administró por vía intratraqueal la solución de humo de cigarrillo en los cobayas a una dosis de 200 µl/animal mediante la utilización de un dispositivo para la administración intratraqueal. Los días 5, 10 y 15, se administró por vía intratraqueal la solución de LPS (500 µg/ml) en los cobayas a una dosis de 200 µl/animal.

Los días 1 a 19, se administró por vía intratraqueal solución fisiológica en un grupo normal a una dosis de 200 µl/animal una vez al día. El grupo normal, el grupo de control y el grupo en que se había administrado ejemplo de preparación 1 recibieron una única administración subcutánea el día 1 y se evaluaron el día 20. El medio solo se administró por vía subcutánea en el grupo normal y en el grupo de control una sola vez, mientras que el ejemplo de preparación 1 se administró por vía subcutánea a una dosis de 10 mg/kg (en términos de compuesto 1) una sola vez en el grupo que había recibido ejemplo de preparación 1.

Se midieron las funciones respiratorias (resistencia de las vías respiratorias, volumen tidal) en vigilia mediante pletismografía de doble flujo utilizando un sistema de análisis de la función respiratoria general (Pulmos-I, MIPS, Inc.). Se midieron cien respiraciones tidales de cada cobaya y se definió la media como el valor de medición de cada fecha de medición.

La resistencia de las vías respiratorias es principalmente un indicador de broncoconstricción y de obstrucción de las vías respiratorias. El volumen tidal indica la cantidad de aire inhalado en ventilación en reposo y es un indicador del intercambio de gases y de la obstrucción de las vías respiratorias.

La medición de las funciones pulmonares se llevó a cabo mediante la inserción y fijación de un tubo intratraqueal de los cobayas bajo anestesia de uretano (1.2 g/kg de peso corporal, i.p.) y la medición de las funciones pulmonares (volumen residual, capacidad residual funcional) de los cobayas.

La "capacidad residual funcional" se refiere al volumen de aire remanente en los pulmones bajo eupnea y es un indicador de sobredistensión. El "volumen residual" se refiere al volumen de aire presente en los pulmones a exhalación máxima y es un indicador de que presenta COPD, al igual que la capacidad residual funcional.

Medición de las intersecciones lineales medias de los alveolos pulmonares y evaluación de la patología Se infundió formalina al 10% tamponada neutra por un tubo insertado intratraquealmente, a una presión de 25 cm de H₂O durante 4 horas. A continuación, se sumergió el tejido en formalina tamponada neutra al 10% y se fijó durante 24 horas, seguido de la tinción de HE de la manera habitual, preparando de esta manera una muestra de tejido. La muestra de tejido se sometió a un examen histológico bajo un microscopio.

Se fotografiaron con una cámara digital imágenes de alveolos pulmonares de la muestra de tejido teñida con HE. Las imágenes fotografiadas se capturaron en un analizador de imágenes Olympus (DP 70, Olympus Corporation) para medir las intersecciones lineales medias (ILM) de los alveolos pulmonares. Se superpuso una cuadrícula de cincuenta líneas de espaciado y longitudes iguales sobre cada imagen. La longitud de cuadrícula que debía analizarse se definió como una extensión total de 10 mm (constante).

En la parte dentro del campo de visión de la que se había excluido la parte pleural, los vasos sanguíneos y las vías respiratorias periféricas, se contó el número de paredes alveolares pulmonares que cruzaba un cuadrado de la cuadrícula. Se dividió la longitud de la cuadrícula por el número de paredes alveolares pulmonares que cruzaba un cuadrado de la cuadrícula a fin de calcular la ILM. Se determinó la ILM de diez campos de visión en cada muestra y se definió la media como la ILM de la muestra.

La tabla 1 muestra los resultados de medición el día 20.

Tabla 6

	Grupo normal	Grupo de control	Ejemplo de preparación 1 (administración subcutánea única)
Resistencia de las vías respiratorias (cmH ₂ O·s)	1.367 ± 0.084	2.114 ± 0.141	1.501 ± 0.110
Volumen tidal (ml)	3.165 ± 0.186	2.897 ± 0.107	3.544 ± 0.230
Volumen residual (ml)	3.527 ± 0.280	5.683 ± 0.510	3.969 ± 0.418
Capacidad residual funcional (ml)	7.274 ± 0.189	8.768 ± 0.246	7.572 ± 0.405
Intersección lineal media de alveolos pulmonares (µm)	45.5 ± 0.9	51.9 ± 0.8	47.0 ± 1.1

El grupo normal presentaba una resistencia de las vías respiratorias (sRaw) de aproximadamente 1.367 cmH₂O·s el día 20.

El grupo de control presentaba una sRaw de 2.114 cmH₂O·s el día 20, que es un valor significativamente elevado el día 20 en comparación con el grupo normal.

En contraste, el grupo en que se había administrado la preparación 1 presentaba una sRaw de 1.501 cmH₂O·s el día 20, que es un valor significativamente bajo en comparación con el grupo de control.

El grupo normal presentaba un volumen tidal (VT) de aproximadamente 3.165 ml. El VT del grupo de control se redujo a 2.897 ml, pero no se observó ninguna diferencia significativa con el grupo normal. Por otra parte, el grupo de administración subcutánea única de ejemplo de preparación 1 presentaba una VT de 3.544 ml, que es un valor significativamente más elevado que en el grupo de control.

El grupo normal presentaba un volumen residual (VR) de 3.527 ml, mientras que el grupo de control presentaba un VR de 5.683 ml, que es un valor significativamente más elevado que en el grupo normal. En contraste, en el grupo de una sola administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 era de 3.969 ml, que es un valor significativamente más bajo que en el grupo de control.

El grupo normal presentaba una capacidad residual funcional (CRF) de 7.274 ml. El grupo de control presentaba una CRF de 8.768 ml, que es un valor significativamente más elevado que en el grupo normal. En contraste, el grupo de una sola administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 presentaba una CRF de 7.572 ml, que es un valor significativamente más bajo que en el grupo de control.

El grupo normal presentaba intersecciones lineales medias (ILM) de los alveolos pulmonares de 45.5 μm .

El grupo de control presentaba una ILM de 51.9 μm , que es un valor significativamente más elevado que en el grupo normal. En contraste, el grupo de una sola administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 presentaba una ILM de 47.0 μm , que es un valor significativamente más bajo que el del grupo de control, confirmando de esta manera la inhibición de la destrucción de los alveolos pulmonares (enfisema pulmonar).

Un examen histológico muestra que, en los pulmones del grupo de control, se observa infiltración de macrófagos alveolares pulmonares en alveolos pulmonares del lóbulo frontal derecho, lóbulo intermedio y lóbulo posterior, infiltración de células inflamatorias, infiltración de células mononucleares en las paredes alveolares pulmonares, vasos sanguíneos y regiones peribronquiales, engrosamiento de las paredes alveolares pulmonares e inflamación por granuloma de cuerpo extraño. Estos resultados confirman que el grupo de control ha desarrollado los síntomas de la COPD. Por otra parte, una sola administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 suprimió los cambios tisulares del lóbulo intermedio y lóbulo posterior pulmonares.

Estos resultados confirman la eficacia de la administración subcutánea única de ejemplo de preparación 1 (10 mg/kg en términos de compuesto 1) sobre la resistencia de las vías respiratorias, capacidad residual funcional, incremento del volumen residual, examen histológico y destrucción de los alveolos pulmonares en modelos de cobaya de COPD en los que se había administrado por vía endotraqueal solución de humo de cigarrillo y solución de LPS. Los resultados de este ensayo de eficacia revelan que una sola administración intravenosa de ejemplo de preparación 1 a una dosis de 1 mg/kg en términos de compuesto 1 presenta una eficacia equivalente o superior a la conseguida mediante una sola administración subcutánea de ejemplo de preparación 1 a una dosis de 10 mg/kg en términos de compuesto 1.

Ensayo de efecto farmacológico 5: investigación del efecto combinado de hidrocloreuro de ozagrel con los compuestos 3 y 7 en modelos de hipertensión pulmonar

Tras anestesiar ratas Slc:Wister hembra (5 semanas de edad) con isoflurano inhalado, se administró por vía subcutánea una solución acuosa de monocrotalina (MCT) en la región dorsal de cada rata a una dosis de 60 mg/kg (volumen de inyección: 3 ml/kg) utilizando una jeringa desechable y una aguja de inyección desechable 27G para preparar modelos de hipertensión pulmonar.

Desde inmediatamente después de la administración de MCR hasta el día 42, se administraron repetidamente por vía oral sustancias de ensayo dos veces al día, tal como se muestra en la tabla a continuación.

Las sustancias de ensayo se suspendieron en soluciones acuosas al 0.5% de CMC-Na y las soluciones acuosas se administraron por vía oral repetidamente a una dosis de 5 ml/kg.

Tabla 7

Grupo	Sustancia administrada	Dosis	Número de animales
1	Solución acuosa 0.5 CMC-Na	5 ml/kg	20
2	Compuesto 3	0.1 mg/kg x 2/día	20
3	Hidrocloreuro de ozagrel	100 mg/kg x 2/día	20
4	Compuesto 3 + Hidrocloreuro de ozagrel	0.1 mg/kg + 100 mg/kg/día	20
5	Compuesto 7	0.1 mg/kg x 2/día	20
6	Compuesto 7 + Hidrocloreuro de ozagrel	0.1 mg/kg + 100 mg/kg/día	20

Una dosis de 0.1 mg/kg, que es la dosis oral de compuesto 3 (agonista de PGI_2) y compuesto 7 (derivado de PGE_1),

es la dosis máxima tolerada que no muestra un efecto de reducción de la presión sanguínea. La dosis de hidrocloreuro de ozagrel (inhibidor de la TXA₂ sintetasa, nº 09702, LKT Laboratories, Inc.), 100 mg/kg, es la cantidad que inhibe por completo la TXA₂ sintetasa.

5 La tabla 10 muestra los cambios de tasa de supervivencia.

Resultados: Al administrar compuesto 3 (grupo 2), compuesto 7 (grupo 5) u ozagrel (grupo 3) en los modelos de hipertensión pulmonar, las curvas de tasa de supervivencia de estos grupos eran similares a los del grupo de administración de medio (grupo 1). De esta manera, no se observó efecto de prolongación de la supervivencia.

10 Se ha informado de que el compuesto 3 administrado solo en un modelo de hipertensión pulmonar leve inducida por MCT resultaba eficaz y proporcionaba un efecto sinérgico con un inhibidor de PDEV (sildenafil) (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 169: 34-38-2004). Sin embargo, al contrario que el modelo de hipertensión pulmonar severa inducida con MCT en la presente invención, se informa de una evaluación utilizando un modelo de enfermedad leve. Además, el efecto sinérgico informado es un efecto combinado con un inhibidor de PDEV, que presenta un mecanismo de acción diferente del ozagrel.

15 En contraste, la administración combinada de compuesto 3 con ozagrel (grupo 4) y la administración combinada de compuesto 7 con ozagrel (grupo 6) proporcionó tasas de supervivencia prolongada en comparación con la administración de medio (grupo 1) y la administración de cada uno de los compuestos por sí solo (grupos 2, 3 y 5). De esta manera, los resultados muestran que la administración combinada resulta eficaz.

20 Se llevó a cabo un ensayo de doble ciego aleatorizado utilizando compuesto 3 en Europa y en los Estados Unidos. Se mejoró la tolerancia al ejercicio después de un tiempo relativamente corto (después de 12 semanas) (J. Am. Coll. Cardiol. 39: 1496-1502, 2002), aunque no se observó ninguna diferencia significativa en los efectos a largo plazo (después de 1 año) (J. Am. Coll. Cardiol. 41: 2119-2125, 2003). Estos resultados revelan que la administración a largo plazo de beraprost (compuesto 3) incrementa la capacidad de producción de TXA₂ en la sangre, mostrando de esta manera tolerancia.

25 Estos resultados revelan eficacia de una infusión intravenosa (fármaco de combinación) de PGI₂ combinada (epoprostenol) con ozagrel sodio y una preparación oral (fármaco de combinación) de hidrocloreuro de ozagrel combinado con compuesto 3 (beraprost) o compuesto 7 (ornoprostol), que es un derivado de PGE₁.

35 **Ensayo de efecto farmacológico 6: actividad del compuesto 1 en la estimulación de la producción de diversas citocinas y PG**

Se cultivaron fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato humano normal (Fibrocell NHDF (NB)) proporcionados por Kurabo Industries, Ltd., hasta la confluencia a razón de 5×10^6 células/ml/placa de 48 pocillos (DMEM, FBS al 10%). Veinticuatro horas después de sustituir el medio por DMEM (libre de suero), se sustituyó el medio por DMEM (FBS al 0.2%) y Compuesto 1 (1 µM) y se añadió un solvente (DMSO). Se cultivaron las células durante 72 horas (n=3).

Las citocinas en el cultivo se midieron mediante ELISA y las prostaglandinas se midieron mediante EIA.

45 La tabla 8 muestra los resultados. Estos resultados confirman una nueva actividad de estimulación de la producción de HMGB1 y PG (PGI₂ y PGE₂) además de SDF-1, HGF, VEGF y G-CSF.

Tabla 8

Citocina/PG	Grupo de control (solvente); M ± S.E.	Compuesto 1 (1 µM); M ± S.E.
SDF-1α (pg/ml)	1307.16 ± 29.665	2457.46 ± 231.884
HGF (pg/ml)	12.60 ± 0.508	102.60 ± 15.658
HMGB1 (ng/ml)	0.743 ± 0.096	1.480 ± 0.147
VEGF (pg/ml)	N.D. (10 pg/ml o menos)	38.44 ± 11.857
G-CSF (pg/ml)	N.D. (20 pg/ml o menos)	28.71 ± 6.110
6-keto-PGF ₁ α (PGI ₂) pg/ml	16.3 ± 0.471	44.5 ± 4.014
PGE ₂	15.6 ± 1.825	38.1 ± 6.392

50 Se midió PGI₂ mediante la utilización de un producto de degradación de PGI₂ (6-keto-PGF₁α).

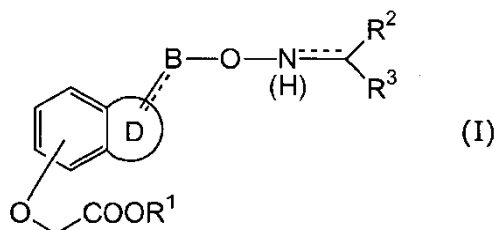
REIVINDICACIONES

1. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización en la terapia de una enfermedad pulmonar, en el que el agente terapéutico comprende microesferas de liberación sostenida que contienen un compuesto farmacéutico, en el que las microesferas presentan un tamaño de partícula medio en número de 20 a 40 μm , y un tamaño de partícula máximo de 100 μm o menos, en el que el agente terapéutico debe administrarse por vía intravenosa, en el que el compuesto farmacéutico es un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar.

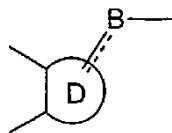
2. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol y sales de los mismos.

3. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un factor de regeneración *in vivo* seleccionado de entre el grupo que consiste en b-FGF, HGF, EGF, SDF-1, IGF-1, LIF, HMBG1, G-CSF y matrices extracelulares.

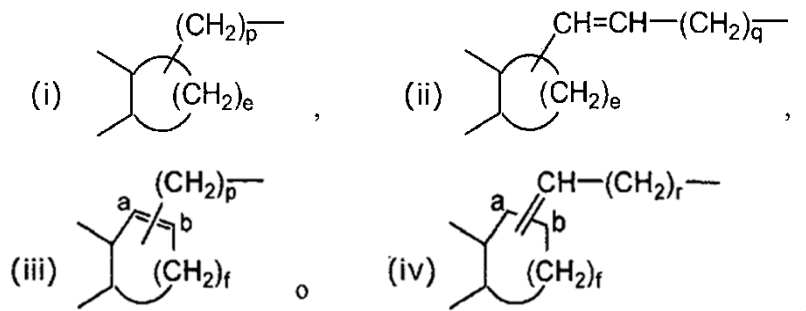
4. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es un compuesto representado por la fórmula (I)



en el que



representa



en la que R^1 representa hidrógeno o alquilo C_{1-4} ,

R^2 representa (i) hidrógeno, (ii) alquilo C_{1-8} , (iii) fenilo o cicloalquilo C_{4-7} , (iv) un monociclo de 4 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno, (v) un grupo alquilo C_{1-4} sustituido por un anillo de benceno o cicloalquilo C_{4-7} , o (vi) un grupo alquilo C_{1-4} sustituido con un monociclo de 4 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno,

R^3 representa (i) alquilo C_{1-8} , (ii) fenilo o cicloalquilo C_{4-7} , (iii) un monociclo de 4 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno, (iv) un grupo alquilo C_{1-4} sustituido por un anillo de benceno o cicloalquilo C_{4-7} , o (v) un grupo alquilo C_{1-4} sustituido con un monociclo de 4 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno,

e representa un número entero de 3 a 5,

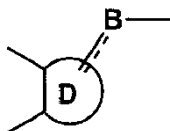
f representa un número entero de 1 a 3,

p representa un número entero de 1 a 4,

q representa 1 o 2, y

r representa un número entero de 1 a 3;

con la condición de que cuando



sea un grupo definido en (iii) o (iv), cada uno de $-(CH_2)_p-$ y $=CH-(CH_2)_s-$ se une a la posición a o b en el anillo, y los anillos en R^2 y R^3 pueden sustituirse con uno a tres sustituyentes seleccionados de entre el grupo que consiste en grupos alquilo C_{1-4} , grupos alcoxi C_{1-4} , átomos de halógeno, átomos de nitrógeno y grupos trihalometilo, o su sal.

5. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 4, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es el ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenaminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético.

6. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, en el que el fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar es por lo menos un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido $(\pm)$ -(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofuran-5-butanoico (beraprost), ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi]acético (MRE-269), carbaciclina, y sales de los mismos.

7. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, en el que las microesferas de liberación sostenida contienen un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos, polidioxanos y mezclas de los mismos.

8. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, que es una preparación de microesferas de liberación sostenida que comprende un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol y sales de los mismos; y por lo menos un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en hidrogeles de gelatina, liposomas, lípidos, ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, ácidos poliglicólicos, polidioxanos y mezclas de los mismos.

9. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, que comprende dicha preparación de microesferas de liberación sostenida que contiene por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenaminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético, ácido $(\pm)$ -(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén 6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofuran-5-butanoico (beraprost), ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi]acético (MRE-269), y sales de los mismos; y un polímero biodegradable seleccionado de entre el grupo que consiste en ácidos polilácticos, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y mezclas de los mismos.

10. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según la reivindicación 1, que comprende microesferas de liberación sostenida que contienen por lo menos un fármaco terapéutico de enfermedad pulmonar seleccionado de entre el grupo que consiste en beclometasona, fluticasona, montelukast, tiotropio, imidafenacina, beraprost, carbaciclina, sivelestat, tulobuterol, salmeterol; ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenaminoxil]etil]-7,8-dihidronaftalén-1-iloxi]acético; ácido $(\pm)$ -(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetrahidro-2-hidroxi-1-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octén-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofuran-5-butanoico (beraprost); ácido 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazín-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi]acético (MRE-269); y sales de los mismos, el agente terapéutico debe administrarse a una dosis de 6 mg/kg o menos en términos de las microesferas de liberación sostenida.

11. Agente terapéutico específico de pulmón para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la enfermedad pulmonar es por lo menos un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en neumonía aguda, fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (COPD), bronquitis crónica, enfisema pulmonar, asma, asma intratable, síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), sarcoidosis, tromboembolismo pulmonar idiopático crónico, panbronquiolitis difusa, fibrosis quística, alveolitis

alérgica, cáncer de pulmón, síndrome de hipoventilación por obesidad, síndrome de hipoventilación alveolar y rechazo crónico en el trasplante de pulmón.

Fig. 1

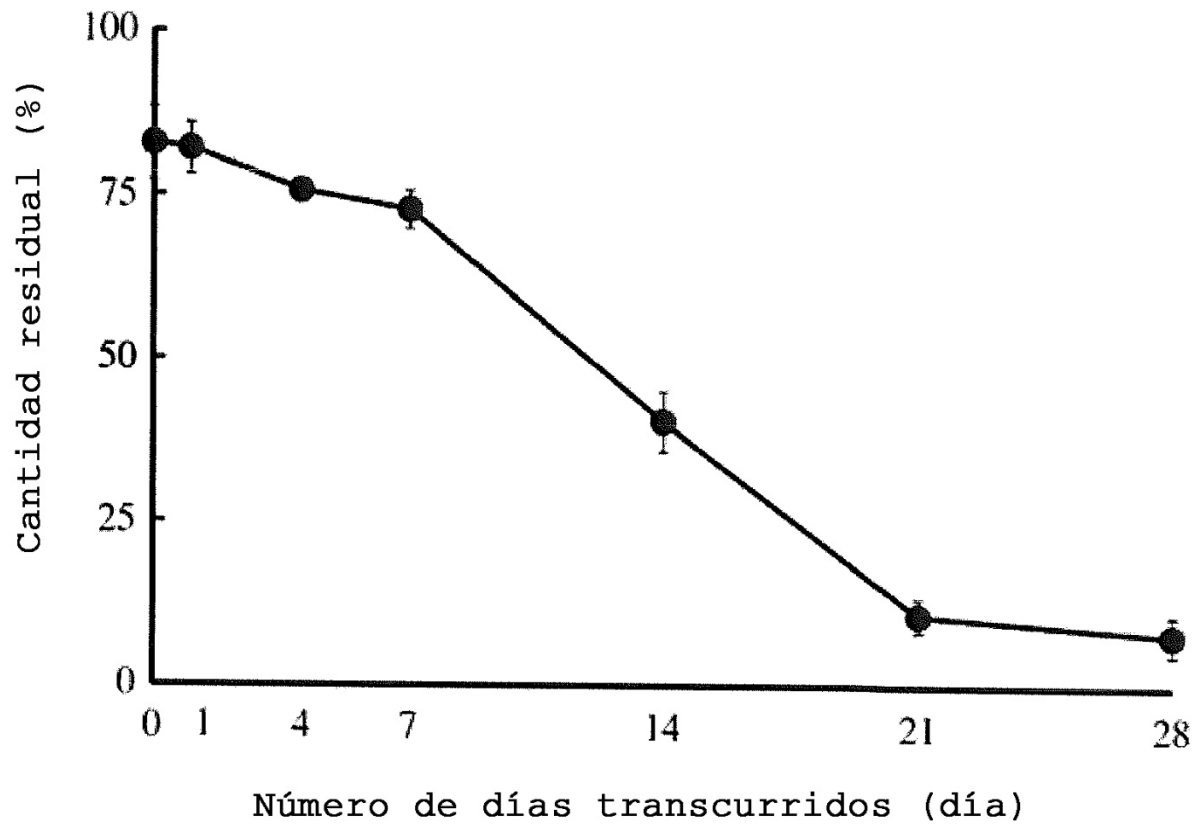


Fig. 2

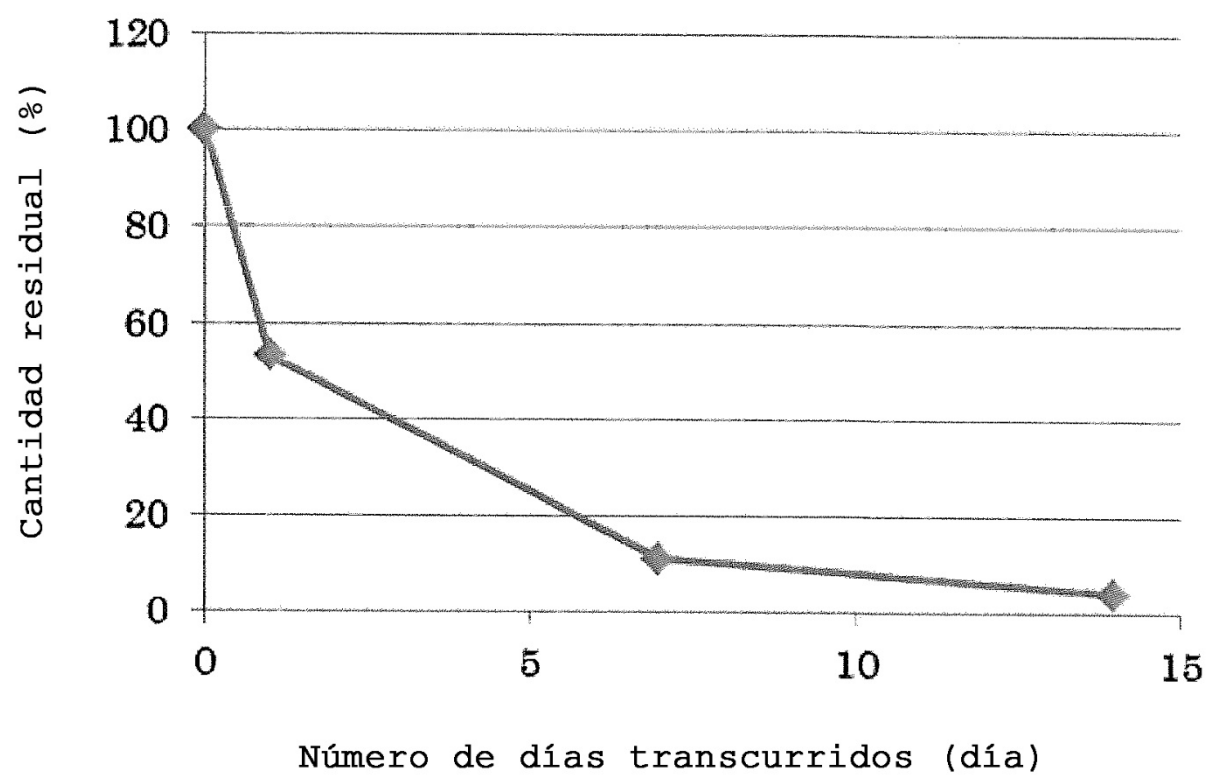


Fig. 3

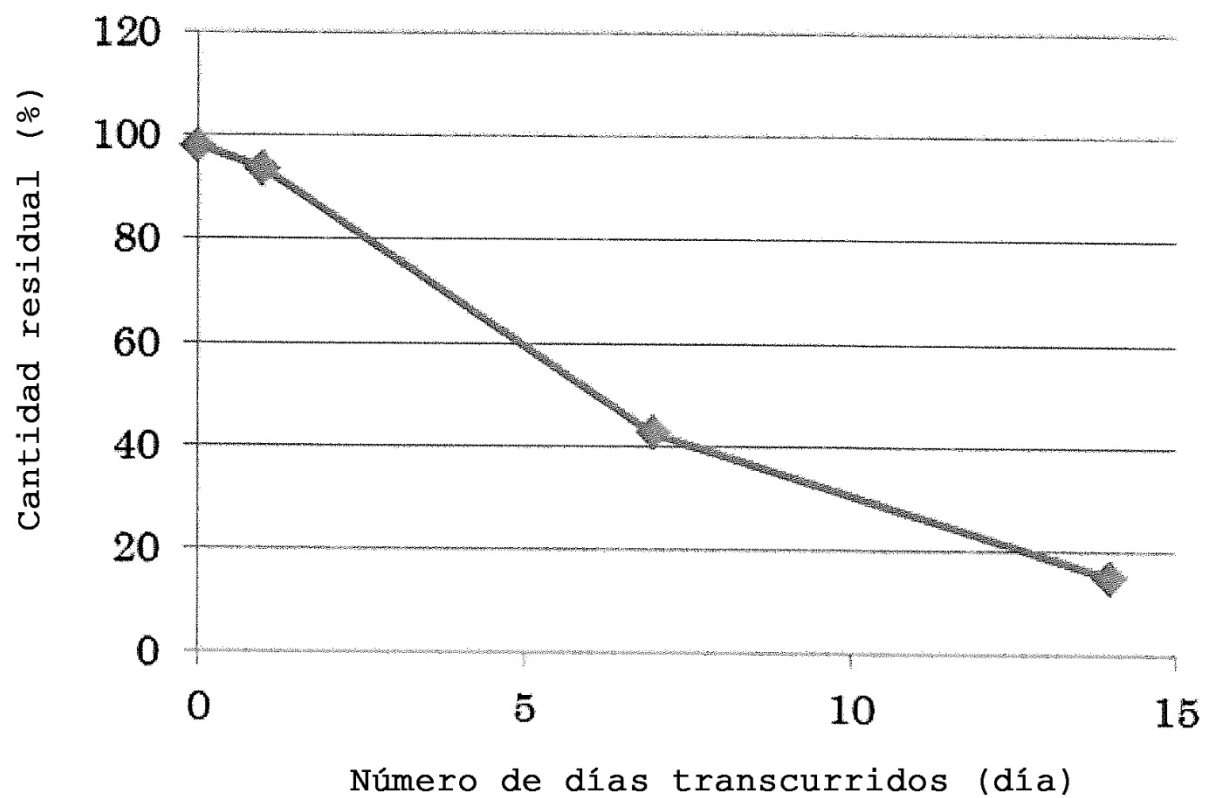


Fig. 4

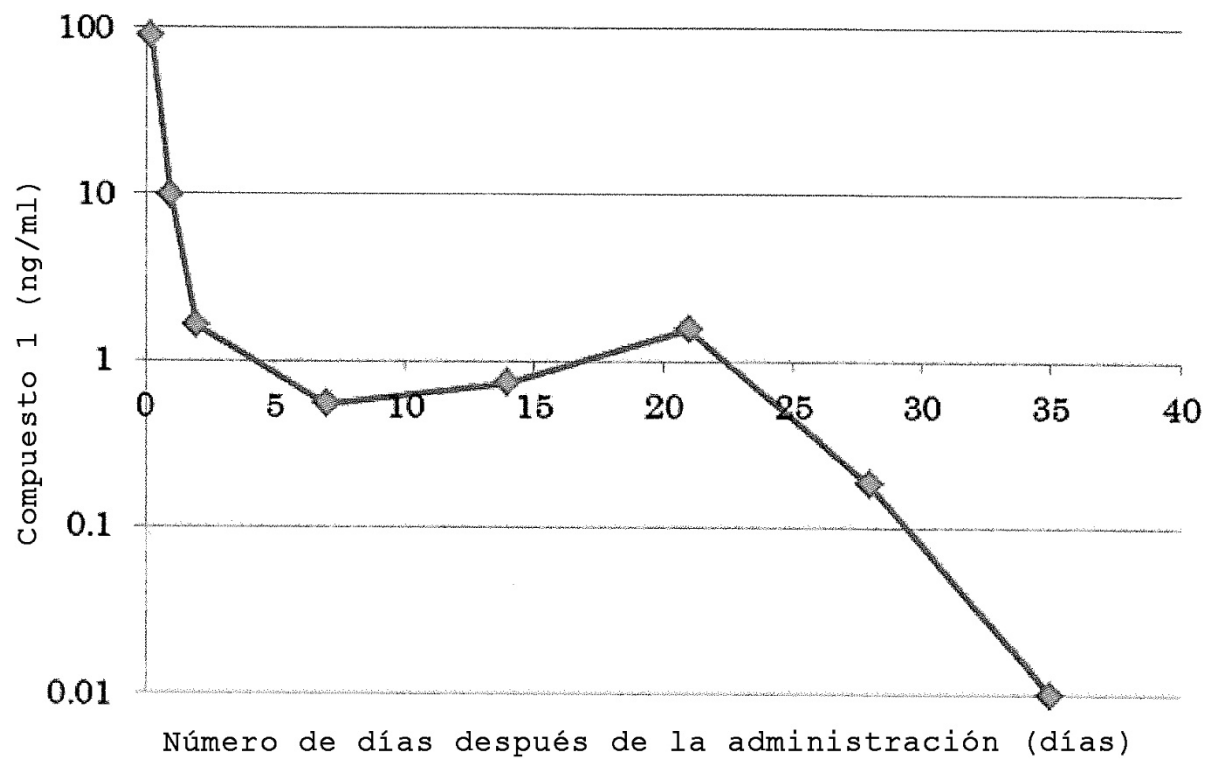


Fig. 5

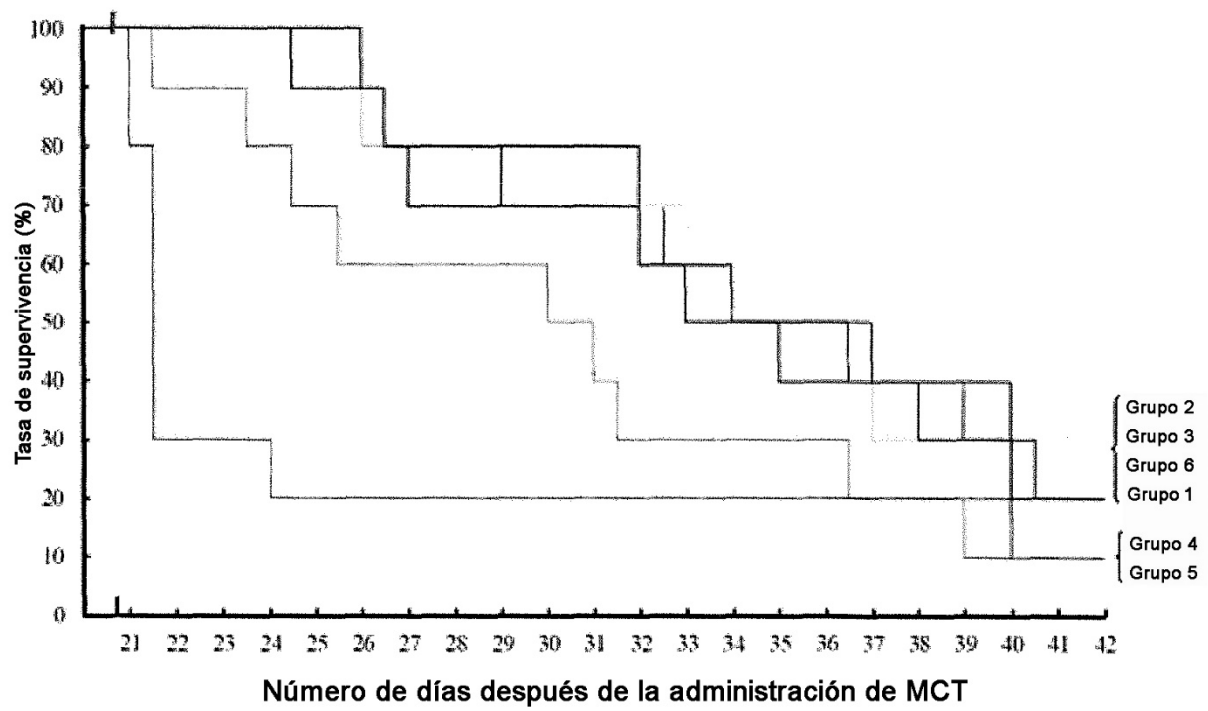


Fig. 6

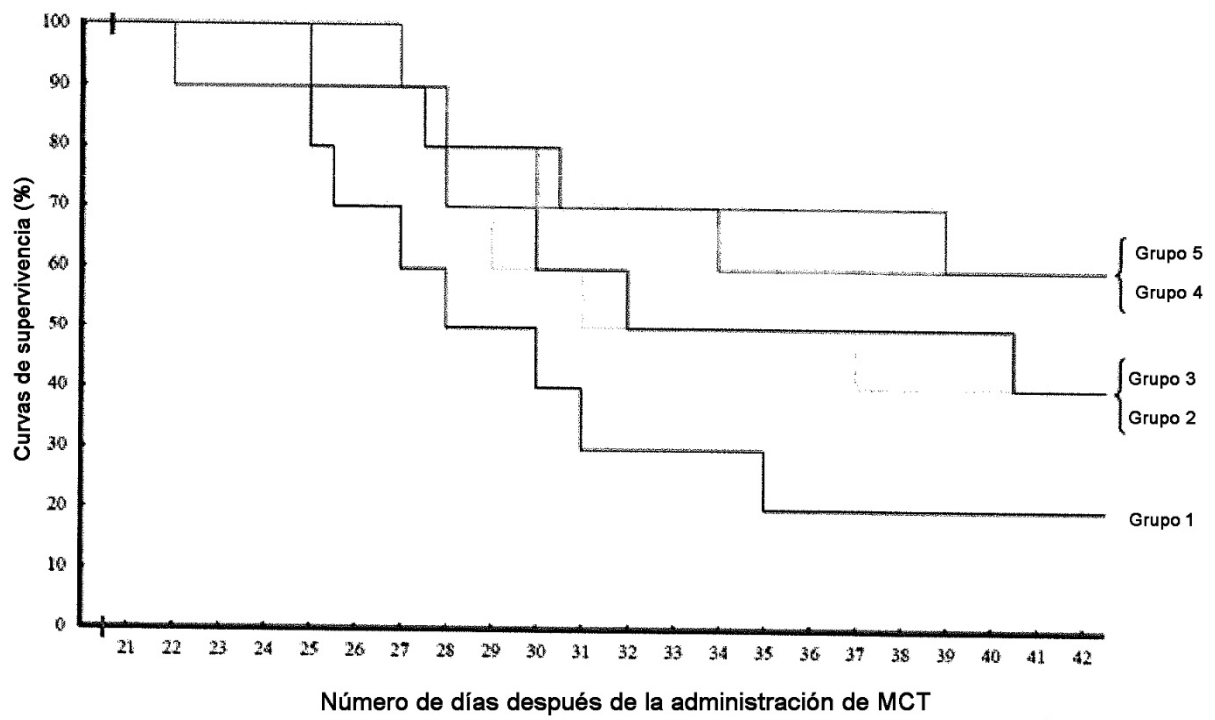


Fig. 7

Presión arterial pulmonar
(presión ventricular derecha)

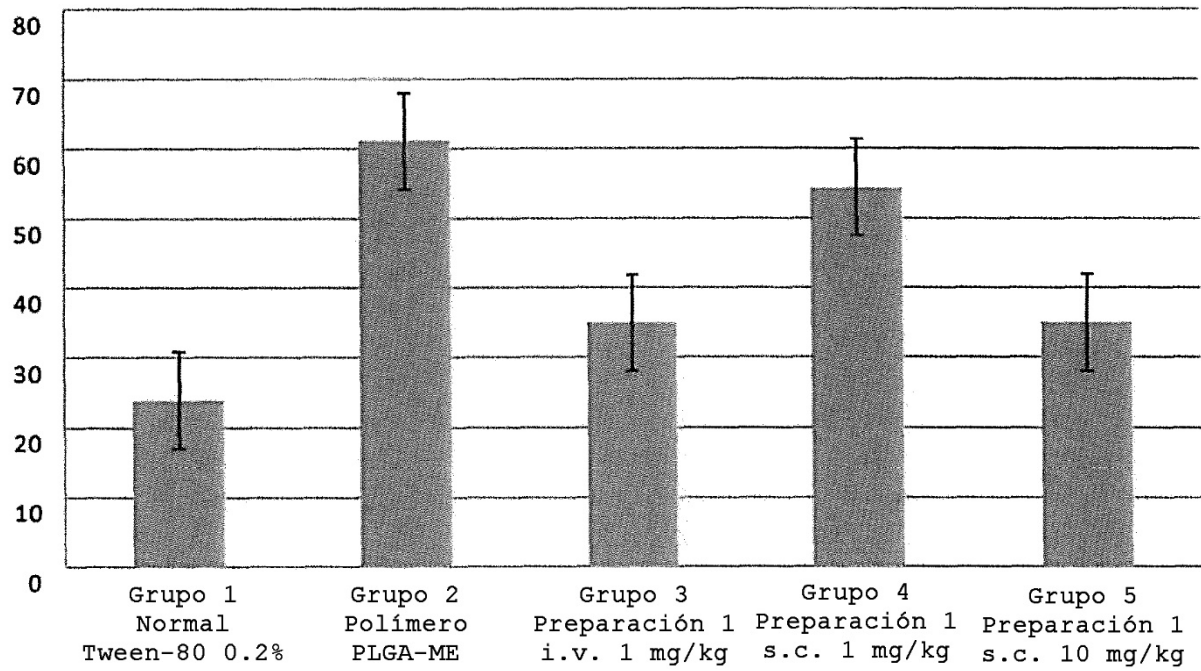


Fig. 8

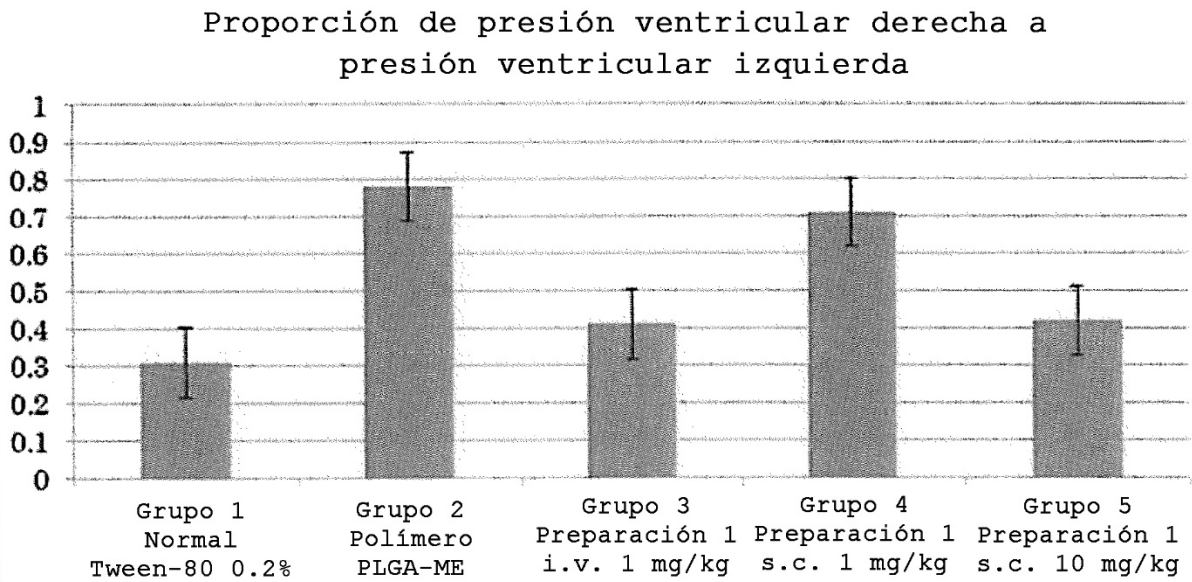


Fig. 9

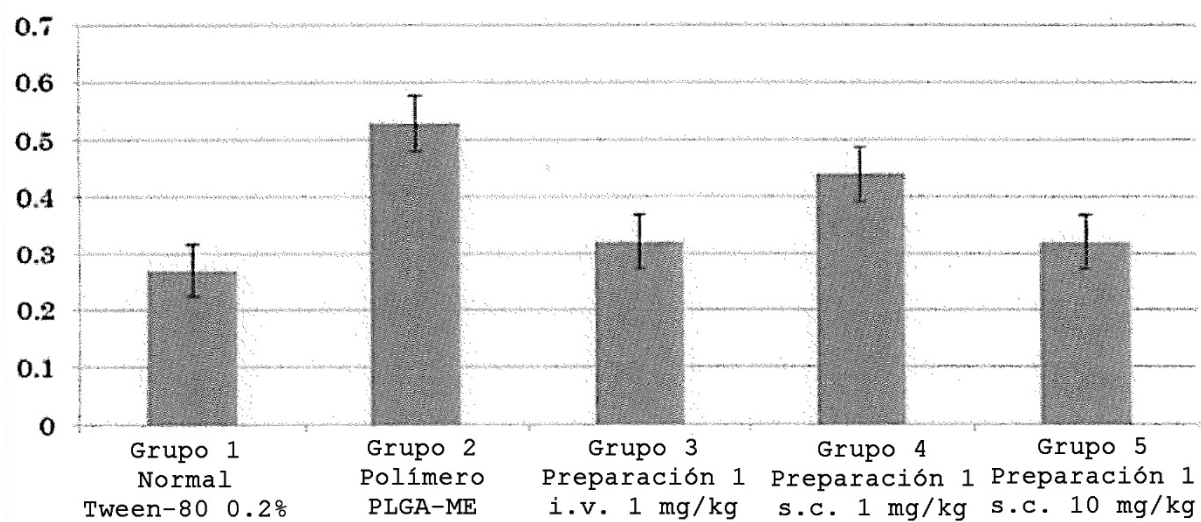


Fig. 10

