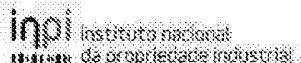

(11) Número de Publicação: **PT 2465537 T**



(51) Classificação Internacional:

A61K 9/50 (2016.01) **A61K 9/16** (2016.01)
A61K 31/4406 (2016.01) **A61P 9/04**
(2016.01)
A61P 9/10 (2016.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.10.09**

(30) Prioridade(s): **2002.10.10 JP 2002298079**
2002.10.31 JP 2002318830
2003.04.22 JP 2003117604

(43) Data de publicação do pedido: **2012.06.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.06.29**
149/2016

(73) Titular(es):

ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
1-5, DOSHOMACHI 2-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-8526

JP

(72) Inventor(es):

YOSHIKI SAKAI
AKIO NISHIURA
TEPPEI OGATA

JP

JP

JP

(74) Mandatário:

VASCO STILLWELL DE ANDRADE
RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **MICROSFERAS COMPREENDENDO ONO-1301**

(57) Resumo:

REFERE-SE A UM ACELERADOR DA PRODUÇÃO DE FATOR DE REPARAÇÃO ENDÓGENO QUE COMPREENDE UM OU PELO MENOS DOIS SELECIONADOS A PARTIR DE AGONISTA DE PROSTAGLANDINA (PG) 12, AGONISTA DE EP2 E AGONISTA DE EP4. JÁ QUE O AGONISTA DE PROSTAGLANDINA (PG) 12, AGONISTA DE EP2 E AGONISTA DE EP4 TÊM AÇÃO DE ACELERAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FATOR DE REPARAÇÃO ENDÓGENO, AÇÃO DE ACELERAÇÃO DA ANGIOGÉNESE E AÇÃO DE INDUÇÃO DA DIFERENCIACÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS VARIADAS, SÃO ÚTEIS COMO AGENTES PREVENTIVOS E/OU TERAPÊUTICOS PARA DOENÇAS ORGÂNICAS ISQUÉMICAS (POR EXEMPLO ARTERIOSCLEROSE OBLITERANTE, DOENÇA DE BUERGER, DOENÇA DE RAYNAUD, INFARTE DO MIOCÁRDIO, ANGINA DE PEITO, NEUROPATHIA DIABÉTICA, ESTENOSE DO CANAL ESPINAL, ACIDENTES CEREBROVASCULARES, INFARTE CEREBRAL, HIPERTENSÃO PULMONAR, FRATURA ÓSSEA, DOENÇA DE ALZHEIMER, ETC. E VÁRIAS DOENÇAS CELULARES E ORGÂNICAS.

RESUMO

MICROSFERAS COMPREENDENDO ONO-1301

Refere-se a um acelerador da produção de fator de reparação endógeno que compreende um ou pelo menos dois selecionados a partir de agonista de prostaglandina (PG) 12, agonista de EP2 e agonista de EP4. Já que o agonista de prostaglandina (PG) 12, agonista de EP2 e agonista de EP4 têm ação de aceleração da produção de fator de reparação endógeno, ação de aceleração da angiogénese e ação de indução da diferenciação de células estaminais variadas, são úteis como agentes preventivos e/ou terapêuticos para doenças orgânicas isquémicas (por exemplo arteriosclerose obliterante, doença de Buerger, doença de Raynaud, enfarte do miocárdio, angina de peito, neuropatia diabética, estenose do canal espinal, acidentes cerebrovasculares, enfarte cerebral, hipertensão pulmonar, fratura óssea, doença de Alzheimer, etc. e várias doenças celulares e orgânicas.

DESCRIÇÃO

MICROSFERAS COMPREENDENDO ONO-1301

Campo da Técnica

A presente invenção refere-se a um acelerador da produção de fator de reparação endógeno que compreende um agonista de prostaglandina (doravante referida como "PG") 12.

Técnica Anterior

O tratamento médico de regeneração está a atrair a atenção como a terapêutica de regeneração no momento de distúrbios de tecidos e células tais como vasos sanguíneos, fígado, rim, pulmão, pâncreas, osso, células musculares esqueléticas, célula do miocárdio, células nervosas periféricas e centrais e semelhantes. O sistema de auto reparação inclui um sistema que é obtido através da divisão celular de células maduras (sistema de duplicação simples) como a regeneração de vários órgãos parenquimáticos tais como o fígado e o rim e um sistema mediado através da indução da proliferação e diferenciação de células estaminais (células precursoras) (sistema celular estaminal) como a regeneração de células hematopoiéticas. Atualmente, é afirmado que estes dois sistemas se encontram presentes na regeneração de vários tecidos e órgãos. Por exemplo, é afirmado que estes dois sistemas se encontram presentes também na angiogénesis (regeneração), e existe um sistema de angiogénesis baseado no crescimento de células endoteliais vasculares, células musculares lisas vasculares adjacentes e semelhantes, efetuado através da libertação de vários fatores de reparação endógenos (por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), vários fatores de crescimento fibroblásticos (a/b FGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); angiopoietina, fator indutor de hipoxia (HIF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), proteína morfogénica

óssea (BMP), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), etc., fatores de crescimento das suas famílias, e semelhantes) a partir de células endoteliais (vasculares), células do músculo liso (vasculares), fibroblastos, células sinoviais, células epiteliais, plaquetas, monócitos, linfócitos, macrófagos e semelhantes da região (adjacente) lesionada, e um sistema de vasculogénesis no qual é formado um vaso sanguíneo através da indução da diferenciação de células estaminais endoteliais vasculares a partir de células de medula óssea de um indivíduo maduro, efetuado através da libertação de várias citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-4, IL-8, TNF α , IFN α/γ , G-CSF, GM-CSF, NO (monóxido nítrico), etc.), e vários fatores de reparação endógenos.

Relativamente à presença de células estaminais (células precursoras), estas estão presentes não só em vasos sanguíneos mas também em vários tecidos tais como hepatócito, célula (β) pancreática, célula do miocárdio, rim, pulmão, osso, articulação, nervo, gordura, pele e semelhantes, e são induzidas à proliferação e diferenciação através de vários fatores de reparação endógenos, várias citocinas inflamatórias e semelhantes.

Quando a produção destes fatores de reparação endógenos é acelerada, a formação de passagens de circulação secundária é acelerada através do efeito da angiogénesis sobre a região isquémica. Igualmente, é sabido que a prevenção e o tratamento (regeneração de reparação) de vários distúrbios de órgãos são acelerados através da ação de indução da diferenciação a partir de várias células estaminais teciduais. Por exemplo, é sabido que HGF tem uma ação de aceleração do crescimento celular, uma ação de indução da morfogénesis, uma ação de indução da diferenciação, uma ação de aceleração da migração, ação anti apoptose e semelhantes (por exemplo, veja-se Biochem. Biophys. Res. Comm., 239, 639-644 (1997), etc.). É sabido que estas acelerações da produção de fatores de reparação endógenos são

eficazes para a prevenção e/ou tratamento de, por exemplo, doenças hepáticas (por exemplo, hepatite fulminante, hepatite aguda, cirrose hepática, fígado gordo, transplante hepático, etc.), doenças renais (por exemplo, insuficiência renal aguda, insuficiência renal crónica, etc.), doenças pulmonares (por exemplo, pneumonia aguda, fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), asma, etc.), doenças pancreáticas (por exemplo, diabetes mellitus, pancreatite crónica, etc.), doenças ósseas (por exemplo, osteoartrite, reumatismo articular, osteoporose, fratura óssea, lesão do periosteio, etc.), doenças dos órgãos digestivos, úlcera gástrica, úlcera duodenal, colite ulcerativa, doença de Crohn, etc.), doenças de degeneração nervosa, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, estenose do canal espinal, acidentes cerebrovasculares, Doença de Moyamoya, etc.), complicações diabéticas (por exemplo, distúrbios nervosos, úlceras da pele, nefropatia, doença retinal, etc.), doenças celulares endoteliais vasculares (por exemplo, restenose após PTCA (angioplastia coronária transluminal percutânea), arteriosclerose, etc.), doenças cardíacas (por exemplo, taquiarritmia supraventricular, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronária, cardiomiopatia súbita, cardiomiopatia dilatada, etc.), doenças dentais (por exemplo, doença periodontal, lesão por extração dental, lesão oral, doença do tecido periodontal, etc.), decúbito, glaucoma, alopecia e semelhantes.

A terapêutica de regeneração mediada por fatores de reparação endógenos está a atrair a atenção como uma terapêutica de angiogénesis (reparação) e uma terapêutica de geração de tecidos no momento das doenças de órgãos e tecidos tais como fígado, pâncreas, rim, coração, nervos centrais/periféricos, vasos sanguíneos, dentes, olhos, periosteio, ossos e semelhantes. Isto atrai a atenção particularmente como uma terapêutica de regeneração de doenças

orgânicas isquémicas graves carecendo de métodos terapêuticos, e são examinados vários métodos em arteriosclerose obliterante (doravante referida como "ASO"), doença de Buerger, doença de Raynaud, doenças cardiovasculares (por exemplo, enfarte do miocárdio, angina de peito, etc.), neuropatia diabética, estenose do canal espinal, doença cerebral isquémica (por exemplo, acidentes cerebrovasculares, enfarte cerebral, etc.), hipertensão pulmonar, fratura óssea, ou doença de Alzheimer e semelhantes.

Por exemplo, pacientes de doenças vasculares sanguíneas periféricas obstrutivas tipificadas através de ASO e doença de Buerger mostram claudicação intermitente, dor durante o repouso e úlceras e necrose das pernas, e finalmente torna-se inevitável ser submetido a amputação das pernas. Contudo, atualmente, não existe método terapêutico eficaz para estes pacientes com ASO grave. Já que a injeção por via intravenosa de PGE1 e um vasodilatador ou inibidor da aglutinação de plaquetas como agente oral de cilostazol não mostram os seus efeitos sobre pacientes com ASO grave, não podem ser levados a cabo um tratamento intravasculares (dilatação por balão ou inserção de stent) e revascularização. Recentemente, foi aplicada clinicamente uma terapêutica génica na qual um plasmídeo de gene VEGF e um plasmídeo de gene HGF são administrados diretamente através de injeção intramuscular em músculos esqueléticos de regiões isquémicas das pernas destes pacientes (cf. *Circulation*, 97, 1114-1123 (1998) e *Gene Therapy*, 8, 181-189 (2001)), e o seu efeito está a atrair a atenção. Adicionalmente, preparações de libertação lenta de uma proteína de fator de crescimento (por exemplo, uma lâmina de inclusão de gelatina) foram também submetidas a exames basais (*Circulation*, 106, Supl. 2: II 350 (2002)).

Por outro lado, uma terapêutica de angiogéneses na qual são administradas células estaminais endoteliais vasculares separadas a partir de medula óssea ou sangue periférico de um paciente diretamente na região isquémica de uma perna através

de injeções intramuscular está a atrair a atenção e é levada a cabo em vários hospitais universitários, o que também está a atrair a atenção (cf. THE LANCET, 360, 427-435 (1002)).

A introdução destes genes e células estaminais diretamente em regiões isquémicas utilizando um cateter vascular equipado com uma agulha de baixa invasão também se tornou possível em enfarte do miocárdio e angina de peito, e encontra-se sob aplicação clínica como terapêutica de angiogénese. Por exemplo, foi relatado que a isquemia é melhorada para angina instável ao injetar um plasmídeo de gene VEGF diretamente no músculo cardíaco (Circulation, 98, 2800-2804 (1998)). Igualmente, foi considerado que PDGF está relacionado com a angiogénese após acidente vascular cerebral, já que foi observado aumento do mesmo em células nervosas da região de penumbra (o tecido não está morto por enfarte mas não pode desempenhar a sua função) do foco de enfarte de um paciente de enfarte cerebral (Stroke, 28, 564-573 (1997)). Foi também tentada terapêutica génica e semelhantes utilizando um vetor para o cérebro através de fluido cérebroespinal a partir da cisterna cerebromedular em acidentes cerebrovasculares isquémicos. Estes tratamentos são uma terapêutica de angiogénese (regeneração) que propicia o desenvolvimento de passagens de circulação secundária para a região isquémica e é uma terapêutica de regeneração tecidual através da indução da diferenciação de células estaminais teciduais. Contudo, a aplicação clínica destas terapêuticas génica e celular têm muitos problemas em termos de ética, segurança (imunidade, infecção, cancro, etc.), flexibilidade, economia e semelhantes.

Como terapêutica de reabertura no momento de obstrução de vasos sanguíneos em ASO, enfarte do miocárdio, angina de peito, arteriosclerose e semelhantes, foi levada a cabo PTCA (angioplastia coronária transluminal percutânea) com bons resultados. Contudo, é sabido que é induzida restenose através da lesão de células endoteliais vasculares à volta da obstrução devido a vasodilatação forçada por dilatação por balão,

permanência de *stent* e semelhantes. Como método para prevenir a restenose, é administrado um inibidor da aglutinação de plaquetas ou semelhante, mas este é um estado ainda insatisfatório. Recentemente, foram desenvolvidos fármacos tais como antibióticos e agentes carcinostáticos (rapamicina, sirolimo, etc.) e um *stent* revestido com uma preparação de radioisótopo tal como raios β com bons resultados sobre a prevenção da restenose (N. Eng. J. Med., 346(23), 1769-1771 (2002)). Contudo, estes métodos têm também muitos problemas desde um ponto de vista a longo prazo. Consequentemente, é dirigida preocupação a um medicamento que potencia a ação inibitória da aglutinação de plaquetas em regiões lesionadas tópicas de células endoteliais vasculares e ação de reparação do dano através de crescimento celular endotelial.

Por outro lado, a prostaglandina (PG) é uma substância fisiologicamente ativa natural biossintetizada a partir de PGH2 numa via metabólica no corpo vivo, que é denominada cascata de ácido araquistônico. As enzimas de biossíntese de ácido araquistônico a PGH2 são denominadas ciclooxygenase (COX), e são atualmente conhecidas COX-1, COX-2 e COX-3 (Proc. Nail. Acad. Sci., 99, 1371 (2002)). Adicionalmente, compostos que inibem estas enzimas são geralmente utilizados como agentes antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios e agente para prevenir doenças circulatórias de sistemas de órgãos, como fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Particularmente, COX-2 induzido em regiões de inflamação está relacionado com a biossíntese de PGI2, PGE2 e semelhantes. Estas PGs biossintetizadas estão relacionadas com o início de pirexia, dor e inflamação nas regiões de inflamação e com a cura das mesmas. Isto é, as PGs biossintetizadas nas regiões de inflamação atuam diretamente como agentes causantes de inflamação, induzem várias citocinas inflamatórias, evocam inflamação, e aceleram a cura da mesma.

Por outro lado, é sabido que pacientes que tomaram AINES durante um período prolongado de tempo têm taxa de mortalidade

por cancro do intestino grosso e cancro pulmonar significativamente baixa (N. Eng. J. Med., 328, 1313-1316 (1993)). É afirmado que esta ação tem uma ação inibitória do crescimento celular cancerígeno, já que a angiogéneses para o crescimento tecidual cancerígeno é inibida através da inibição da biossíntese de PGI2, PGE2 e semelhantes por parte de AINES. Isto é, uma terapêutica anti-angiogéneses que controla o crescimento e a metástase de tumores através da inibição da angiogéneses está a atrair a atenção como nova estratégia de tratamento do cancro. Igualmente, é sabido que um inibidor seletivo de COX-2 não induz úlceras gástricas quando é administrado, mas prolonga a cura de úlceras gástricas. Existe um relato afirmando que a sua causa é a inibição da ação de angiogéneses para a reparação de tecidos lesionados (Am. J. Med, 104, 43S-51S (1998)). Adicionalmente, inibidores seletivos de COX-2 controlam a angiogéneses acompanhada por inflamação (Jpn. J. Pharmacol., 75, 105-114 (1997)).

É sabido que PGI2 tem uma ação inibitória da aglutinação de plaquetas marcadamente forte, bem como ações tais como adesão de plaquetas, vasodilatação e inibição da secreção de ácido gástrico. Adicionalmente, a administração de PGE2 acelera a acumulação de células inflamatórias incluindo monócitos e a produção de citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1 (interleucina-1), IL-8, IL-6, IFN- α (interferão- α), TNF α (fator de necrose tumoral α), e NO (monóxido nítrico), etc., e atua como agente causante de inflamação.

O documento JP-A-6-87811 divulga na sua memória descritiva que o derivado de oximo representado pela fórmula (I) que é descrito mais tarde ou um sal não tóxico do mesmo, a ser utilizado na presente invenção como um agonista de PGI2 (agonista de IP), é útil para a prevenção e/ou tratamento de trombose, arteriosclerose, doença cardíaca isquémica, úlcera gástrica, hipertensão e semelhantes, já que tem ações de inibição da aglutinação de plaquetas, inibição da adesão de plaquetas, vasodilatação e inibição da secreção de ácido

gástrico, mas não descreve ou sugere ação sobre a angiogénesse através da exerção de ação de crescimento de células endoteliais vasculares e células do músculo liso vasculares com base na ação de aceleração da produção do fator de reparação endógeno, e sobre as várias doenças celulares e orgânicas (as doenças descritas acima a ser prevenidas e tratadas) (regeneração de reparação) por HGF) através de indução da diferenciação de várias células estaminais causada por esta ação de aceleração da produção de fator de reparação endógeno e semelhantes.

Igualmente, é relatado em Diabetologia., 40, 1053-1061 (1997) que um derivado de PGI2 Beraprost (sal de sódio de ácido (\pm)-(1R,2R,3aS,8bS)-2,3,3a,8b-tetraidro-2-hidroxi-1-[(E) -(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-1H-ciclopenta[b]benzofuran-3-butanoico) aumenta a produção de HGF em células endoteliais vasculares *in vitro* e mostra ação de crescimento de células endoteliais, mas não existem descrições sobre a ação de aceleração da angiogénesse através da administração tópica da preparação persistente de Beraprost e sobre a sua utilidade para a prevenção e tratamento de várias doenças orgânicas.

Adicionalmente, PGE2 é conhecido como um produto metabólico na cascata de ácido araquidónico, e é sabido que as suas ações têm várias funções tais como ação de proteção celular, ação de contração uterina, ação de produção de dor, ação de aceleração da peristalse de órgãos digestivos, ação de estimulação, ação de inibição da secreção de ácido gástrico, ação de redução da pressão sanguínea, ação diurética e semelhantes.

A partir dos estudos em anos recentes, foi revelado que estão presentes subtipos tendo papéis relativamente diferentes no receptor de PGE2. Os subtipos atualmente conhecidos são aproximadamente divididos em quatro, e são respetivamente denominados EP1, EP2, EP3 e EP4 (J. Lipid Mediators Cell Signaling, 12, 379-391 (1995)). Ao examinar a sua parte de papéis e como tal encontrar um composto que não liga a receptores

de outros subtipos, tornou-se possível obter um medicamento tendo menos efeitos secundários.

Por exemplo, o documento JP-A-11-193268 divulga na sua memória descritiva que um composto representado pela fórmula (I-a), um sal não tóxico do mesmo, ou um profármaco ou clatrato de ciclodextrina do mesmo, que é utilizado na presente invenção como agonista de EP2, é útil na prevenção e/ou tratamento de doenças imunes (por exemplo, doença autoimune, transplante de órgãos etc.), asma, anormalidade da osteogénesis, morte de células nervosas, hepatopatia, parto prematuro, aborto, doenças retinais nervosas tais como glaucoma, e semelhantes, mas não descreve ou sugere sobre a ação de libertação de fator de reparação endógeno, ação de indução da diferenciação de células estaminais e ação de aceleração da angiogénesis.

Por exemplo, o documento WO00/03980 divulga na sua memória descritiva que um composto representado pela fórmula (I-b), um sal não tóxico do mesmo, ou um clatrato de ciclodextrina do mesmo, que é utilizado na presente invenção como agonista de EP4, é útil na prevenção e/ou tratamento de doenças incluindo doenças imunes (esclerose lateral amiotrófica (ALS), esclerose múltipla, síndrome de Sjogren, artrite reumatoide, doenças autoimunes tais como lúpus eritematoso sistémico, rejeição após transplante de órgãos, etc.), asma, anormalidade da osteogénesis, morte de células nervosas, doença pulmonar, hepatopatia, hepatite aguda, glomerulonefrite, insuficiência renal, hipertensão, isquemia do miocárdio, síndrome de reação inflamatória sistémica, dor por queimadura, septicemia, síndrome de hemofagocitose, síndrome de ativação de macrófagos, doença de Still, doença de Kawasaki, lesão por queimadura, granuloma sistémico, colite neoplásica, doença de Crohn, hipercitocinemia no momento da diálise, insuficiência orgânica múltipla, choque, anormalidade do sono, aglutinação de plaquetas e semelhantes, mas não descreve ou sugere sobre a ação de libertação de fator de reparação endógeno, ação de indução da diferenciação de células estaminais e ação de

aceleração da angiogénesse.

Divulgação da Invenção

Foi dirigida grande preocupação ao desenvolvimento de um acelerador da produção de fator de reparação endógeno, um indutor da diferenciação de células estaminais (indutor da diferenciação de células precursoras) e um acelerador da angiogénesse, que são úteis como agentes preventivos e terapêuticos de doenças orgânicas (isquémicas) e têm menos efeitos secundários.

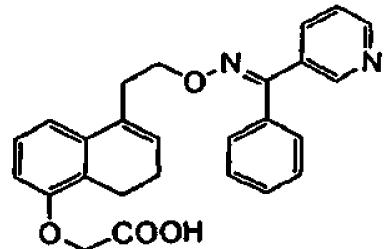
Com o objetivo de encontrar um acelerador da produção de fator de reparação endógeno, um indutor da diferenciação de células estaminais e um acelerador da angiogénesse, que sejam úteis como agentes preventivos e terapêuticos de doenças orgânicas (isquémicas), os presentes inventores levaram a cabo estudos intensivos e constataram como resultado que um agonista de PGI2 pode alcançar o objetivo.

Igualmente, os inventores consideraram que quando um agonista de PGI2, um agonista de EP2 ou um agonista de EP4 podem ser administrados por via tópica a um a região isquémica requerendo angiogénesse ou uma região lesionada requerendo reparação tecidual, tornar-se-á possível produzir um fator de reparação endógeno, uma citocina inflamatória e semelhantes na periferia da região tópica lesionada, para além da vasodilatação dos restantes vasos sanguíneos na região isquémica e ação inibitória da aglutinação de plaquetas, de tal forma que possa ser criado um medicamento tendo menos efeitos secundários na administração sistémica. Adicionalmente, foi considerado que quando é possível produzir uma preparação farmacêutica para libertação persistente durante um período até a angiogénesse (regeneração) ou reparação tecidual ser efetuada na região isquémica ou periferia da região tópica de lesão tecidual, poderia ser criado um medicamento tendo menos efeitos secundários na administração sistémica e com adesão de administração de frequência de administração baixa.

Por exemplo, a angiogénesse requer um período de geralmente

entre 1 semana e 6 meses, mais preferentemente entre 1 semana e 8 semanas, e é requerida libertação persistente do ingrediente ativo na região isquémica durante o período. Adicionalmente, já que os agonistas de PGI2, agonistas de EP2 e agonistas de EP4 mostram ação de vasodilatação e ação inibitória de aglutinação de plaquetas para além de ação de aceleração da angiogénesse e ação de indução da diferenciação celular estaminal vascular quando a produção de vários fatores de crescimento endógenos é acelerada, foi considerado que estes mostrarão efeito preventivo e/ou terapêutico adicionalmente forte sobre doenças orgânicas isquémicas quando estas ações forem adicionadas.

Consequentemente, os inventores constataram também como resultado de estudos intensivos que uma preparação persistente de um agonista de PGI2, isto é, ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil)etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi]acético (doravante referido ocasionalmente como "Composto 1") tendo a seguinte estrutura:



ou um sal do mesmo pode alcançar o objetivo descrito acima.

A presente invenção é dirigida a uma preparação de microesferas persistentes compreendendo um polímero biodegradável e ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil)etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi]acético ou sal do mesmo e uma composição farmacêutica e um agente compreendendo a preparação de microesferas.

De acordo com a presente invenção, a preparação de microesferas é utilizada como um acelerador da produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) na prevenção e/ou tratamento

de uma doença selecionada a partir de enfarte do miocárdio, angina de peito, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária.

Formas de realização preferidas da presente invenção são definidas nas subreivindicações.

Todos os sais farmaceuticamente aceitáveis são incluídos nos sais do ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil)etil]-7,8-didronaftalen-1-iloxi]acético. É preferível que os sais farmacologicamente aceitáveis não tenham toxicidade e sejam solúveis em água. Exemplos do sal adequado dos compostos acima incluem sais de metais alcalinos (potássio, sódio, lítio, etc.), sais de metais alcalinoterrosos (cálcio, magnésio, etc.), sais de amónio (sal de tetrametilamónio, sal de tetrabutilamónio, etc.), sais de aminas inorgânicas (trietilamina, metilamina, dimetilamina, ciclopentilamina, benzilamina, fenetilamina, piperidina, monoetanolamina, dietanolamina, tris(hidroximetil)metilamina, lisina, arginina, N-metil-D-glucamina, etc.), e sais de adição de ácido (saís de ácidos inorgânicos (cloridrato, bromidrato, iodato, sulfato, fosfato, nitrato, etc.), sais de ácidos orgânicos (acetato, trifluoroacetato, lactato, tartarato, oxalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, toluenossulfonato, isotionato, glucoronato, gluconato, etc.). Também se encontram incluídos nos sais dos compostos da presente invenção solvatos, ou solvatos de sais metálicos alcalinos (alcalinoterrosos), sais de amónio, sais de aminas orgânicas e sais de adição de ácido dos compostos da presente invenção. É preferível que os solvatos sejam não tóxicos e solúveis em água. Exemplos de solvatos adequados incluem solvatos de água, solventes de sistemas de álcool (etanol, etc.).

O composto utilizado na presente invenção é convertido em sais farmacologicamente aceitáveis através de métodos

convencionalmente conhecidos.

Métodos de produção do composto utilizado na presente invenção: O ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil)etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi]acético (Composto 1) é descrito no Exemplo 2(g) do documento JP-A-6-87811.

Toxicidade:

Já que a toxicidade do agente ativo utilizado na presente invenção é muito baixa, é suficientemente segura para utilização como medicamento.

Aplicabilidade Industrial

Aplicação a preparações farmacêuticas:

Já que o Composto 1 utilizado na presente invenção tem a ação de aceleração da angiogénesse, é por exemplo útil como agente preventivo e/ou terapêutico para doenças orgânicas isquémicas (por exemplo, arteriosclerose obliterante, doença de Buerger, doença de Raynaud, doenças cardiovasculares (por exemplo, enfarte do miocárdio, angina de peito), neuropatia diabética, estenose do canal espinal, doença cerebral isquémica (por exemplo, acidentes cerebrovasculares, enfarte cerebral), hipertensão pulmonar, fratura óssea, doença de Alzheimer). Adicionalmente, já que o Composto 1 utilizado na presente invenção tem a ação de aceleração da produção de fator de reparação endógeno, com base na sua ação de indução da diferenciação a partir das respetivas células estaminais para reparação de tecidos, é útil como agente preventivo e/ou terapêutico para várias doenças orgânicas (por exemplo, doenças hepáticas (por exemplo, hepatite fulminante, hepatite aguda, cirrose hepática, fígado gordo, transplante hepático), doenças renais (por exemplo, insuficiência renal aguda, insuficiência renal crónica), doenças pulmonares (por exemplo, pneumonia aguda, fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), asma), doenças pancreáticas (por exemplo, diabetes mellitus, pancreatite crónica), doenças ósseas (por exemplo, osteoartrite,

reumatismo articular, osteoporose, fratura óssea, lesão do periósteo), doenças dos órgãos digestivos, úlcera gástrica, úlcera duodenal, colite ulcerativa, doença de Crohn), doenças de degeneração nervosa, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, estenose do canal espinal, acidentes cerebrovasculares, Doença de Moyamoya), complicações diabéticas (por exemplo, distúrbios nervosos, úlceras da pele, nefropatia, doença retinal), doenças celulares endoteliais vasculares (por exemplo, restenose após PTCA (angioplastia coronária transluminal percutânea), arteriosclerose), doenças cardíacas (por exemplo, taquiarritmia supraventricular, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronária, cardiomiopatia súbita, cardiomiopatia dilatada), doenças dentais (por exemplo, doença periodontal, lesão por extração dental, lesão oral, doença do tecido periodontal), decúbito, glaucoma, alopecia).

O agente da presente invenção pode ser administrado como um fármaco concomitante em combinação com outro agente para (1) complementar e/ou reforçar o efeito preventivo e/ou terapêutico do agente da presente invenção, (2) melhorar a cinética e a absorção do agente da presente invenção e reduzir a sua dose, e/ou (3) aliviar efeitos secundários do agente da presente invenção.

O fármaco concomitante do agente da presente invenção com outro agente pode ser administrado na forma de um fármaco de combinação no qual ambos componentes são formulados numa preparação farmacêutica, ou administrados como preparações farmacêuticas separadas. Quando administrados como as preparações farmacêuticas separadas, inclui administração simultânea e administração em tempos diferentes. Adicionalmente, a administração em tempos diferentes pode ser levada a cabo ao administrar primeiramente o agente da presente invenção e posteriormente administrar o outro agente, ou ao administrar primeiramente o outro agente e posteriormente administrar o agente da presente invenção, e os respetivos

métodos de administração podem ser os mesmos ou diferentes entre si.

O outro agente pode ser um composto de baixa massa molecular, uma proteína, polipéptido, polinucleótido (ADN, ARN ou um gene) de massa molecular elevada, anti sentido, chamariz ou anticorpo, ou uma vacina ou uma célula estaminal ou semelhantes separados a partir de um tecido. A dose do outro agente pode ser opcionalmente selecionada com base na dose utilizada clinicamente. Adicionalmente, a razão de mistura do agente da presente invenção com o outro agente pode ser opcionalmente selecionada dependendo por exemplo da idade e massa corporal do indivíduo a ser administrado, método de administração, período de administração, doença a ser tratada, sintomas e combinação. Por exemplo, podem ser utilizadas de 0,01 a 100 partes em massa do outro agente com base em 1 parte em massa do agente da presente invenção. O outro agente pode ser administrado como uma razão opcional da combinação de uma ou duas ou mais espécies opcionalmente selecionadas a partir do grupo homólogo e grupo heterogéneo mostrados a seguir.

A doença na qual o seu efeito preventivo e/ou terapêutico é exercido por parte do fármaco concomitante descrito acima não é particularmente limitada, e pode ser qualquer doença na qual o efeito preventivo e/ou terapêutico do agente da presente invenção possa ser complementado e/ou reforçado.

Exemplos dos outros agentes incluem um agente anti trombo, um agente de melhoria da circulação, um dilatador do músculo liso brônquico, um fármaco anti inflamatório, um anestésico local, um analgésico, um cimento ósseo, um lubrificante articular, um derivado de prostaglandina, uma proteína de fator de reparação endógeno, um gene de fator de reparação endógeno, várias células estaminais de órgãos.

Exemplos do agente anti trombo incluem preparações de heparina (heparina de sódio, heparina de cálcio, dalteparina de sódio, anticoagulante oral (warfarina de potássio), agente antitrombina (por exemplo mesilato de gabexato, mesilato de

mafamosat, argatroban), inibidores de aglutinação antiplaquetas (por exemplo aspirina, dipiridamol, cloridrato de ticlopidina, beraprost de sódio, cilostazol, ozagrel de sódio, cloridrato de sarpogrelato, eicosapentanoato de etilo), agentes trombolíticos (por exemplo uroquinase, tisoquinase, alteplase, nateplase, monteplase, pamiteplase), inibidores de fator Xa, inibidores de fator VIIa.

Exemplos dos agentes de melhoria da circulação incluem tartarato de ifenprodilo, aniracetam, cloridrato de donepezil, cloridrato de amantadina, nicergolina, ibudilast, um sistema de papaverina, um sistema de nicotina, um antagonista de cálcio, um agonista de recetor β , um antagonista de recetor α .

Exemplos do dilatador do músculo liso brônquico incluem estimulantes β 2 (por exemplo, cloridrato de efedrina, sulfato de isiprenali, sulfato de salbutamol, cloridrato de tulobuterol), fármacos de teofilina (por exemplo, diprofilina, aminofilina, teofilina colina), ou fármacos anti colina (por exemplo, brometo de ipratrópico, brometo de flutrópico, brometo de oxitrópico).

Exemplos do anestésico local incluem uma preparação de esteroides, procaina, cloridrato de cocaína, cloridrato de lidocaína, cloridrato de ropivacaína e semelhantes.

Exemplos de um analgésico incluem fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINE) tais como aspirina, indometacina, diclofenaco, meloxicam e celecoxib, analgésicos opiáceos tais como codeína e morfina, pentazocina, cloridrato de buprenorfina, bromidrato de eptazocina.

Exemplos do cimento ósseo incluem fosfato de cálcio.

Exemplos do lubrificante articular incluem suvenilo.

Exemplos do derivado de prostaglandina incluem PGE1, PGE2 e PGI2 ou profármacos dos mesmos, lipoPGE1, 6-oxoPGE1, derivados de 6-oxoPGE1, omoprostil, limaprostil, enptostil, misoprostol.

Exemplos do fator de reparação endógeno de acordo com a "proteína de fator de reparação endógeno e gene de fator de

reparação endógeno" incluem fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), vários fatores de crescimento fibroblásticos (a/b FGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); angiopoietina, fator indutor de hipoxia (HIF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), proteína morfogénica óssea (BMP), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento das suas famílias.

Adicionalmente, não só os compostos até agora encontrados mas também aqueles que serão descobertos no futuro são incluídos também nos outros agentes capazes de complementar e/ou reforçar os agentes preventivos e/ou terapêuticos da presente invenção, com base no mecanismo descrito acima.

Quando o agente da presente invenção, ou o fármaco concomitante do agente da presente invenção com outro agente, é utilizado para o propósito descrito acima, é geralmente administrado por via sistémica ou tópica na forma oral ou parentérica.

A sua dose varia dependendo por exemplo da idade, peso corporal, sintomas, efeito terapêutico, método de administração, período de tratamento, mas encontra-se habitualmente no intervalo de desde 1 ng até 100 mg por adulto por dose, desde uma até várias vezes por dia através de administração oral, ou no intervalo de desde 0,1 ng até 50 mg por adulto por dose, desde uma até várias vezes por dia, desde uma até várias vezes por semana, ou desde uma até várias vezes em 3 meses através de administração parentérica na forma de uma preparação persistente, ou administrado de forma contínua numa veia dentro do intervalo de desde 1 hora até 24 horas por dia. Já que a dose varia sob várias condições por rotina conforme descrito acima, existe um caso no qual é suficiente uma dose menor do que o intervalo acima ou um caso que requer que a administração exceda o intervalo.

Quando o agente da presente invenção, ou o fármaco

concomitante do agente da presente invenção com outro agente, é administrado, é utilizado como preparações sólidas para utilização interna ou preparações líquidas para utilização interna para administração oral, ou como injeções, injeções subcutâneas ou intramusculares, preparações externas, supositórios, gotas oculares, inalações, preparações contendo dispositivos médicos e semelhantes para administração parentérica.

A preparação sólida para utilização interna na administração oral inclui comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, grânulos. São incluídas cápsulas duras e cápsulas moles nas cápsulas.

Numa tal preparação sólida para utilização interna, são utilizadas uma ou mais substâncias ativas como tal, ou misturadas por exemplo com um agente de carga (por exemplo lactose, manitol, glucose, celulose microcristalina, amido), um aglutinante (por exemplo hidroxipropilcelulose, polivinilpirrolidona, aluminometasilicato de magnésio), um agente desintegrante (por exemplo glicolato de celulose de cálcio), um lubrificante (por exemplo estearato de magnésio), um agente estabilizante, um agente auxiliar de solubilização (por exemplo ácido glutâmico, ácido aspártico) e utilizado ao tornar a mistura numa preparação farmacêutica. Se for necessário, isto pode ser revestido com um agente de revestimento (por exemplo sacarose, gelatina, hidroxipropilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetylcelulose), ou revestido com duas ou mais camadas. São incluídas cápsulas adicionais de uma substância absorvente tal como gelatina.

A preparação líquida para utilização interna na administração oral inclui soluções, suspensões, emulsões, xaropes, elixires farmaceuticamente aceitáveis. Numa tal preparação, um ou mais ingredientes são dissolvidos, suspensos ou emulsificados num diluente geralmente utilizado (por exemplo água purificada, etanol, uma solução mista dos mesmos).

Adicionalmente, esta preparação líquida pode conter um agente humidificador, um agente de suspensão, um agente emulsificante, um edulcorante, um aroma, um aromatizante, um conservante.

Formas farmacêuticas para utilização externa para utilização em administração parentérica incluem, por exemplo, pomadas, géis, cremes, fomentações, preparações adesivas, linimentos, pulverizações, inalações, pulverizações, aerossóis, gotas oculares, gotas nasais. Adicionalmente, estes podem ser selados com um polímero biodegradável e utilizados como dispositivos médicos (por exemplo sutura cirúrgica, um parafuso para utilização no tratamento de fraturas ósseas). Contém um ou mais ingredientes ativos e são preparados através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente.

As pomadas são produzidas através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparadas através de suspensão ou fundição de um ou mais ingredientes ativos numa base. A base da pomada é selecionada a partir daquelas que são convencionalmente conhecidas ou utilizadas geralmente. Por exemplo, é utilizada uma substância única ou uma mistura de duas ou mais substâncias, que são selecionadas a partir de ácidos gordos de cadeia longa ou ésteres de ácidos gordos de cadeia longa (por exemplo, ácido adípico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, éster de ácido adípico, éster de ácido mirístico, éster de ácido palmítico, éster de ácido esteárico, éster de ácido oleico), ceras (por exemplo cera de abelha, cera de baleia, ceresina), tensioativos (por exemplo éter alquílico de polioxietileno, éster de ácido fosfórico), álcoois de cadeia longa (por exemplo cetanol, álcool estearílico, álcool cetoestearílico), óleo de silicone (por exemplo polisiloxano de dimetilo), hidrocarbonetos (por exemplo, vaselina hidrofílica, vaselina branca, lanolina purificada, parafina líquida), glicóis (por exemplo,

etilenoglicol, dietilenoglicol, propilenoglicol, polietilenoglicol, macrogol), óleo vegetal (por exemplo óleo de rícino, azeite, óleo de sésamo, óleo de terebentina), óleo animal (por exemplo óleo de marta, óleo de gema de ovo, esqualano, esqualeno), água, aceleradores de absorção e agentes de prevenção de prurido. Adicionalmente, podem estar contidos agentes de manutenção da humidade, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, aromas.

Os géis são produzidos através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparados através de fundição de um ou mais ingredientes ativos numa base. A base do gel é selecionada a partir daquelas que são convencionalmente conhecidas ou utilizadas geralmente. Por exemplo, é utilizada uma substância única ou uma mistura de duas ou mais substâncias, que são selecionados a partir de álcoois de cadeia curta (por exemplo etanol, álcool isopropílico), agentes gelificantes (por exemplo carboximetil celulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, etilcelulose), agentes neutralizantes (por exemplo trietanolamina, diisopropanolamina), tensioativos (por exemplo monoestearato de polietilenoglicol), gomas, água, aceleradores de absorção e agentes de prevenção de prurido. Adicionalmente, podem estar contidos por exemplo conservantes, antioxidantes, aromas.

Os cremes são produzidos através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparados através de fundição ou emulsificação de um ou mais ingredientes ativos numa base. A base do creme é selecionada a partir daquelas que são convencionalmente conhecidas ou utilizadas geralmente. Por exemplo, é utilizada uma substância única ou uma mistura de duas ou mais substâncias, que são selecionadas a partir de ésteres de ácidos gordos de cadeia longa, álcoois de cadeia curta, hidrocarbonetos, álcoois poliídricos (por exemplo propilenoglicol), 1,3 butilenoglicol), álcoois de cadeia longa

(por exemplo 2-hexildecanol, cetanol), emulsificantes (por exemplo ésteres alquilaicos de polioxietileno, ésteres de ácidos gordos), água, aceleradores de absorção e agentes de prevenção de erupções cutâneas. Adicionalmente, podem estar contidos conservantes, antioxidantes, aromas e semelhantes.

As fomentações são produzidas através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparadas através de fundição de um ou mais ingredientes ativos numa base e posteriormente dispersão e revestimento do material amassado resultante num suporte. A base da fomentação é selecionada a partir daquelas que são convencionalmente conhecidas ou utilizadas geralmente. Por exemplo, é utilizada uma substância única ou uma mistura de duas ou mais substâncias, que são selecionadas a partir de espessantes (por exemplo ácido poliacrítico, polivinilpirrolidona, acácia, amido, gelatina, metilcelulose), agentes humidificantes (por exemplo ureia, glicerol, propilenoglicol), agentes de carga (por exemplo caulim, óxido de zinco, talco, cálcio, magnésio), água, agentes solubilizantes, espessantes e agentes de prevenção de erupções cutâneas. Adicionalmente, podem estar contidos por exemplo conservantes, antioxidantes, aromas.

As preparações adesivas são produzidas através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparadas através de fundição de um ou mais ingredientes ativos numa base e posteriormente dispersão e revestimento do material resultante num suporte. A base da preparação adesiva é selecionada a partir daquelas que são convencionalmente conhecidas ou utilizadas geralmente. Por exemplo, é utilizada uma substância única ou uma mistura de duas ou mais substâncias, que são selecionadas a partir de bases poliméricas, óleos e gorduras, ácidos gordos de cadeia longa, espessantes e agentes de prevenção de erupções cutâneas. Adicionalmente, podem estar contidos por exemplo conservantes, antioxidantes, aromas.

Os linimentos são produzidos através de um método convencionalmente conhecido ou baseado numa fórmula utilizada geralmente. Por exemplo, são preparados através de dissolução, suspensão ou emulsificação de um ou mais ingredientes ativos numa substância única ou duas ou mais substâncias selecionadas a partir de por exemplo água, álcoois (por exemplo etanol, polietilenoglicol), ácidos gordos de cadeia longa, glicerol, sabão, emulsificantes, agentes de suspensão. Adicionalmente, podem estar contidos por exemplo conservantes, antioxidantes, aromas.

Para além dos diluentes utilizados geralmente, as pulverizações e inalações podem conter estabilizantes tais como hidrogenossulfito de sódio e agentes tamponantes capazes de proporcionar tonicidade, por exemplo, agentes de tonicidade tais como cloreto de sódio, citrato de sódio e ácido cítrico. São descritos ilustrativamente métodos de produção de pulverizações em, por exemplo, Patente U.S. N.º 2.868.691 e Patente U.S. N.º. 3.095.355.

São incluídas soluções, suspensões, emulsões e injeções sólidas que são utilizadas através de dissolução ou suspensão num solvente anteriormente à utilização nas injeções para administração parentérica. As injeções são utilizadas através de dissolução, suspensão ou emulsificação de um ou mais ingredientes ativos num solvente. Estas injeções podem ser injetadas por exemplo numa veia, uma artéria, músculo, sob a pele, no cérebro, numa articulação, num osso e outras regiões tópicas de órgãos, ou administradas diretamente utilizando um cateter vascular sanguíneo equipado com agulha. Como o solvente, são utilizados por exemplo, água destilada para injeção, solução salina fisiológica, óleo vegetal, álcoois tais como propilenoglicol, polietilenoglicol e etanol, e uma combinação dos mesmos. Adicionalmente, tais injeções podem conter por exemplo um estabilizante, um agente auxiliar de solubilização (por exemplo ácido glutâmico, ácido aspártico, Polysorbate 80 (marca comercial registada)), um agente de

suspensão, um agente emulsificante, um agente suavizante, um agente tamponante, um conservante. Estes são produzidos através de esterilização na etapa final ou através de uma operação asséptica. Adicionalmente, é possível preparar uma preparação sólida asséptica, tal como uma preparação seca por congelamento, e utilizar a mesma através de dissolução em água destilada esterilizada ou asséptica para injeção ou outro solvente anteriormente à sua utilização.

As gotas oculares para administração parentérica incluem um líquido de gotas oculares, um líquido de gotas oculares de tipo suspensão, um líquido de gotas oculares de tipo emulsão, um líquido de gotas oculares de tipo dissolução anterior à utilização e uma pomada ocular.

Estas gotas oculares são produzidas de acordo com um método convencionalmente conhecido. Por exemplo, são utilizadas através de dissolução, suspensão ou emulsificação de um ou mais ingredientes ativos num solvente. Como solvente de gotas oculares, são utilizados por exemplo água purificada esterilizada, solução salina fisiológica, outros solventes aquosos ou solventes não aquosos para injeção (por exemplo, óleo vegetal) e combinações dos mesmos. Se necessário, as gotas oculares podem conter adicionalmente substâncias opcionalmente selecionadas a partir de por exemplo agentes de tonicidade (por exemplo cloreto de sódio, glicerol concentrado), agentes tamponantes (por exemplo fosfato de sódio, acetato de sódio), tensioativos (por exemplo Polysorbate 80 (marca comercial registada), estearato de polioxílio 40, óleo de rícino endurecido com polioxietíleno), estabilizantes (por exemplo citrato de sódio, edetato de sódio), antissépticos (por exemplo cloreto de benzalcónio, parabeno).

Estes são produzidos através de esterilização na etapa final ou através de uma operação asséptica. Adicionalmente, é possível preparar uma preparação sólida asséptica, tal como uma preparação seca por congelamento, e utilizar a mesma através

de dissolução em água purificada destilada esterilizada ou asséptica ou outro solvente anteriormente à sua utilização.

Como inalações para administração parentérica, são incluídos aerossóis, pós para inalação ou soluções para inalação, e as ditas soluções para inalação podem estar numa forma que é utilizada através de dissolução ou suspensão em água ou outro solvente adequado anteriormente à sua utilização.

Estas inalações são produzidas de acordo com métodos convencionalmente conhecidos.

Por exemplo, No caso de soluções para inalação, estas são preparadas ao selecionar opcionalmente por exemplo antissépticos (por exemplo cloreto de benzalcónio, parabeno), agentes corantes, agentes tamponantes (por exemplo fosfato de sódio, acetato de sódio), agentes de tonicidade (por exemplo cloreto de sódio, glicerol concentrado), espessantes (por exemplo polímero de carboxivinilo), aceleradores de absorção se necessário.

No caso de pós para inalação, estes são preparados ao selecionar opcionalmente por exemplo lubrificantes (por exemplo ácido esteárico e um sal do mesmo), aglutinantes (por exemplo, hidroxipropilcelulose, dextrina), agentes de carga (por exemplo lactose), agentes de carga (por exemplo lactose, agentes corantes, antissépticos (por exemplo cloreto de benzalcónio, parabeno), aceleradores de absorção, se necessário.

Quando são administradas soluções para inalação, é geralmente utilizado um pulverizador (atomizador ou nebulizador), e é geralmente utilizado um dispositivo de administração por inalação para pós quando são utilizados pós para inalação.

Relativamente a outras composições para administração parentérica, estão incluídos por exemplo supositórios para administração retal, pessários para administração vaginal, que contêm um ou mais ingredientes ativos e são formulados da forma habitual.

Aplicação às regiões tópicas:

Relativamente à administração tópica de acordo com a presente invenção, o método de administração não é particularmente limitado, contanto que possa ser fornecido o agente da presente invenção ou um fármaco concomitante do agente da presente invenção com outro agente a regiões de uma doença. Os seus exemplos incluem injeções e agentes de embebimento a ser utilizados em músculo, sob a pele, e na pele, vasos sanguíneos, músculo cardíaco, alvéolos, partes de articulações, vértebras, partes ósseas, partes da raiz dental, órgãos lesionados, preparações contendo dispositivos médicos nas quais o agente da presente invenção ou um fármaco concomitante do agente da presente invenção com outro agente esteja contido num dispositivo médico (por exemplo *stent*, parafuso de fixação, fixador, linha), ou agentes de revestimento revestidos com os mesmos, preparações sólidas tais como grânulos e pós, preparações adesivas, géis, pomadas, películas, preparações encerradas num polímero biodegradável, ou dispositivos médicos encerrados.

Relativamente à preparação persistente da presente invenção, a preparação farmacêutica não é limitada, contanto que o ingrediente ativo possa ser fornecido de forma persistente a uma região de uma doença. Os seus exemplos incluem injeções de liberação sustentada (por exemplo, preparações de microcápsulas, preparações de microesferas, preparações de nanoesferas), preparações de embebimento (por exemplo, preparações de película), pomadas, revestimentos nos quais o ingrediente ativo está contido ou revestido num dispositivo médico (por exemplo *stent*, parafuso de fixação, fixador, sutura).

As preparações de microesferas da presente invenção são composições farmacêuticas de partículas finas com um polímero biodegradável, que contêm um ingrediente ativo como ingrediente ativo.

Está presente um polímero bioabsorvível no sistema de

libertação de fármaco sustentada da presente invenção, que é alcançado através de um polímero natural ou um polímero sintético. O mecanismo para controlar a taxa de libertação sustentada a partir do mesmo inclui um tipo de controlo da degradação, um tipo de controlo da dispersão, um tipo de controlo da permeação da membrana.

Exemplos do polímero natural como o polímero bioabsorvível da presente invenção incluem polissacarídeos produzidos por plantas (por exemplo, celulose, amido, ácido algínico), polissacarídeos e proteínas produzidos por animais (por exemplo, quitina, quitosano, colagénio, gelatina, albumina, glicosaminoglucano) e poliésteres e polissacarídeos produzidos por microorganismos (por exemplo, poli-3-hidroxialcanoato, ácido hialurónico).

Igualmente, exemplos do polímero biodegradável incluem polímeros de ésteres de ácidos gordos ou copolímeros dos mesmos, ésteres de ácido poliacrílico, ácidos polihidroxibutíricos, oxalatos de polialquíleno, poliorthoésteres, ácidos de policarbonato e poliamino, que podem ser utilizados por si sós ou como uma mistura dos mesmos. Exemplos dos polímeros de éster de ácidos gordos ou copolímeros dos mesmos incluem ácido polilárico, ácido poliglicólico, ácido policítrico, ácido polimálico, succinato de polietileno, succinato de polibutileno, poli- ϵ -caprolactona, adipato de tereftalato de polibutileno ou copolímero de ácido lático-ácido glicólico, que podem ser utilizados por si sós ou como uma mistura dos mesmos. Adicionalmente a estes, podem ser utilizados éster de ácido poli α -cianoacrílico, ácido poli- β -hidroxibutírico, oxato de politrimetileno, poliorthoéster, poliortocarbonato, carbonato de polietileno, ácido poli- γ -benzil-glutâmico, álcool polivinílico, carbonato de poliéster, anidrido de poliácido, policianoacrilato, polifosfazina ou poli-L-alanina por si sós ou como uma mistura dos mesmos. É preferido ácido polilático, ácido poliglicólico ou um copolímero de ácido lático-ácido glicólico, e é mais

preferido um copolímero de ácido lático-ácido glicólico.

A massa molecular média destes polímeros biodegradáveis de massa molecular elevada a ser utilizados na presente invenção é preferentemente desde cerca de 2.000 até cerca de 800.000, mais preferentemente desde cerca de 5.000 até cerca de 200.000. Por exemplo, no caso de ácido polilático, a sua massa molecular média ponderada é preferentemente desde cerca de 5.000 até cerca de 100.000. É mais preferentemente desde cerca de 6.000 até cerca de 50.000. O ácido polilático pode ser sintetizado de acordo com o método de produção convencionalmente conhecido. No caso de copolímero de ácido lático-ácido glicólico, a sua razão de composição de ácido lático e ácido glicólico preferentemente desde cerca de 100/0 até cerca de 50/50 (p/p), particularmente preferentemente desde cerca de 90/10 até cerca de 50/50 (p/p). A massa molecular média ponderada do copolímero de ácido lático-ácido glicólico é preferentemente desde cerca de 5.000 até cerca de 100.000. É mais preferentemente desde cerca de 10.000 até cerca de 80.000. O Copolímero de ácido lático-ácido glicólico pode ser sintetizado de acordo com o método de produção convencionalmente conhecido. Adicionalmente, de forma a controlar o rebentamento inicial, podem ser utilizados aminoácidos básicos (por exemplo, ácido algínico).

De acordo com a descrição, a massa molecular média ponderada é uma massa molecular à base de poliestireno medida através de uma cromatografia de permeação de gel (GPC).

O polímero biodegradável de massa molecular elevada descrito acima pode ser alterado dependendo da força da atividade farmacológica do ingrediente ativo e da libertação de fármaco de interesse, contanto que o objetivo da presente invenção seja alcançado, e por exemplo, é utilizado numa quantidade de desde cerca de 0,2 até cerca de 10.000 vezes (razão de massa), preferentemente desde cerca de 1 até cerca de 1.000 vezes (razão de massa), mais preferentemente desde cerca de 1 até cerca de 100 vezes (razão de massa), com base

na dita substância fisiologicamente ativa.

As microesferas da presente invenção podem ser produzidas por exemplo através de um método de secagem por submersão (por exemplo, método o/a, método a/o, método a/o/a), um método de separação de fases, um método de secagem por pulverização, um método de granulação de fluido supercrítico ou um método correspondente aos mesmos.

São descritos a seguir métodos de produção específicos de secagem por submersão (método o/a) e secagem por pulverização.

(1) No método de secagem por submersão (método o/a), é primeiramente preparada uma solução de solvente orgânico de um polímero biodegradável. É preferível que o solvente orgânico a ser utilizado na produção das microesferas da presente invenção tenha um ponto de ebulação de 120 °C ou menos. Exemplos do solvente orgânico incluem hidrocarbonetos hidrogenados (por exemplo, diclorometano, clorofórmio), ésteres alifáticos (por exemplo, acetato de etilo), éteres, hidrocarbonetos aromáticos, cetonas (por exemplo acetona). Podem ser utilizados dois ou mais dos mesmos misturando numa razão opcional. Um solvente orgânico desejável é diclorometano ou acetonitrilo. O solvente orgânico é preferentemente diclorometano. A concentração do polímero biodegradável na solução de solvente orgânico varia dependendo por exemplo da massa molecular do polímero biodegradável, do tipo de solvente orgânico, mas é geralmente selecionada dentro do intervalo de desde cerca de 0,01 até cerca de 80% (v/p). É mais preferentemente desde cerca de 0,1 até cerca de 70% (v/p), mais preferentemente desde cerca de 1 até cerca de 60% (v/p).

É adicionado um ingrediente ativo e dissolvido na solução de solvente orgânico como tal obtida de polímero biodegradável. A quantidade deste ingrediente ativo a ser adicionado varia dependendo por exemplo do tipo de agente, ação de angiogénesse, período de tempo de efeito persistente, mas é desde cerca de 0,001% até cerca de 90% (p/p), preferentemente

desde cerca de 0,01% até cerca de 80% (p/p), mais preferentemente desde cerca de 0,3% até cerca de 30% (p/p), como concentração do polímero biodegradável de massa molecular elevada na solução de solvente orgânico.

A seguir, a solução de solvente orgânico consequentemente preparada é adicionalmente adicionada a uma fase de água para formar uma emulsão o/w utilizando por exemplo um agitador como emulsificador. O volume da fase de água neste caso é selecionado geralmente a partir de cerca de 1 vez até 10.000 vezes do volume da fase de óleo. Isto é selecionado mais preferentemente desde cerca de 2 vezes até cerca de 5.000 vezes. Isto é selecionado particularmente preferentemente a partir de desde cerca de 5 vezes até cerca de 2.000 vezes. Pode ser adicionado um agente emulsificante à fase de água da fase exterior descrita acima. O agente emulsificante pode ser qualquer agente que possa geralmente formar uma emulsão o/a estável. Exemplos do agente emulsificante incluem um tensioativo aniónico, um tensioativo não iónico, um derivado de óleo de rícino de polioxietileno, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, carboximetilcelulose, lecitina, gelatina. Estes podem ser utilizados numa combinação opcional. A concentração do agente emulsificante na fase de água exterior é preferentemente desde cerca de 0,001% até cerca de 20% (p/p). É mais preferentemente desde cerca de 0,01% até cerca de 10% (p/p), particularmente preferentemente desde cerca de 0,05% até cerca de 5% (p/p). É empregue um método geralmente utilizado para a evaporação de solvente na fase de óleo. O método é levado a cabo sob pressão vulgar ou reduzindo gradualmente a pressão enquanto agitando utilizando por exemplo um agitador ou agitador magnético, ou utilizando por exemplo um evaporador rotativo enquanto ajustando o grau de vácuo. Após fracionamento das microesferas consequentemente obtidas através de centrifugação ou filtração, o ingrediente ativo livre, agente emulsificante e semelhantes aderidos à superfície das

microesferas são lavados várias vezes repetidamente com, por exemplo, uma solução de tensioativo ou um álcool, e as microesferas resultantes são novamente dispersas em por exemplo água destilada ou um meio de dispersão contendo um agente de carga (por exemplo manitol, sorbitol, lactose, etc) e secas por congelamento. Relativamente ao método o/a descrito acima, podem ser produzidas microesferas através de um método no qual um ingrediente ativo é disperso numa solução de solvente orgânico de polímero biodegradável, nomeadamente um método e/o/a.

(2) Quando são produzidas microesferas através de um método de secagem por pulverização, é pulverizado um solvente orgânico no qual são dissolvidos um polímero biodegradável e um ingrediente ativo, ou uma emulsão dos mesmos, numa câmara de secagem de um dispositivo de secagem por pulverização (secador por pulverização) utilizando, um bocal, e o solvente orgânico ou água nas gotículas de partículas final é evaporada num período de tempo extremamente curto para preparar microesferas. Relativamente ao bocal, existem por exemplo um tipo de bocal de fluido duplo, um tipo de bocal por pressão ou um tipo de disco rotativo.

Neste caso, para o propósito de prevenir agregação de microesferas, se necessário, é eficaz pulverizar um solvente orgânico ou solução aquosa de um agente de prevenção da agregação (por exemplo manitol, lactose, gelatina) através de outro bocal, simultaneamente com a pulverização da emulsão o/a. Relativamente às microesferas consequentemente obtidas, é levada a cabo remoção mais completa de água e solvente nas microesferas sob uma pressão reduzida, com aquecimento, se necessário.

As microesferas da presente invenção podem ser fabricadas em várias formas farmacêuticas de preparação farmacêutica, por exemplo, como tal, ou utilizando uma composição farmacêutica esférica, em canas, em agulhas, em parafusos, filamentosa, em sedimento, em película ou em forma de creme como a substância

do material.

Adicionalmente, ao utilizar esta preparação farmacêutica, esta pode ser administrada como preparações parentéricas para administração tópica (por exemplo, injeções e agentes de embebimento a ser utilizados por exemplo em músculo, sob a pele, e na pele, músculo cardíaco, cavidade abdominal, brônquios, vasos sanguíneos, alvéolos, região lesionada do endotélio vascular, cérebro, medula, interior da dura mater, exterior da dura mater, partes de articulações, vértebras, partes ósseas, partes periodontais, vários órgãos, preparações sólidas tais como grânulos e pós, preparações líquidas tais como suspensões, preparações adesivas, preparações de película, pomadas, preparações contendo dispositivos médicos nas quais o ingrediente ativo está contido num dispositivo médico (por exemplo stent, parafuso, fio de sutura), agentes de revestimento revestidos com os mesmos. Adicionalmente, pode ser diretamente administrada em, por exemplo, uma região isquémica de músculo cardíaco utilizando por exemplo cateter vascular sanguíneo.

Por exemplo, quando as microesferas são formadas em injeções, podem ser obtidas preparações farmacêuticas práticas ao formar as microesferas em suspensões aquosas em conjunto com por exemplo um agente dispersante, um conservante, um agente de tonicidade, um agente tamponante, um agente de ajuste do pH. Igualmente, são formadas em injeções que podem ser utilizadas de maneira prática como suspensões oleosas através de dispersão em conjunto com um óleo vegetal ou a sua mistura com fosfolípidos tais como lecitina, ou um triglicerídeo de ácidos gordos de cadeia média (por exemplo, Migliol 812).

O tamanho de partícula das microesferas, por exemplo quando utilizadas como injeções de suspensão, pode estar num tal intervalo que o seu grau de dispersão e propriedades de atravessamento de agulha sejam satisfeitos, e pode ser exemplificado um intervalo de desde cerca de 0,1 até cerca de 300 300 μm como tamanho de partículas médio. Está

preferentemente no intervalo de desde cerca de 1 até cerca de 150 μm , mais preferentemente um tamanho de partículas no intervalo de desde cerca de 2 até cerca de 100 μm . Conforme descrito anteriormente, é preferível que a composição farmacêutica da presente invenção seja uma suspensão. É preferível que a composição farmacêutica da presente invenção esteja na forma de partículas finas. Isto é devido a que a composição farmacêutica não confere aos pacientes excesso de dor quando administrada através de uma agulha que é utilizada para injeção subcutânea ou intramuscular habitual. A composição farmacêutica da presente invenção é particularmente preferível como injeções. Quando as microesferas são formadas em preparações estéreis, pode ser empregue por exemplo um método no qual todas as etapas de produção são levadas a cabo sob condições assépticas, um método no qual são esterilizadas com raios gama, um método no qual é adicionado um antisséptico, embora não esteja particularmente limitado.

A ação do ingrediente ativo da composição farmacêutica da presente invenção tem uma propriedade de libertação sustentada, e o período de libertação sustentada varia dependendo do tipo, quantidade de mistura e semelhantes do polímero biodegradável, tem um período de libertação sustentada de geralmente entre 1 semana e 3 meses, de tal forma a poder ser utilizada como um acelerador da indução da diferenciação de células estaminais ou um acelerador da angiogénesis ao acelerar a produção de vários fatores de reparação endógenos em regiões de doença orgânica (isquémica).

Embora a dose da composição farmacêutica da presente invenção varie dependendo por exemplo do tipo e teor do ingrediente ativo, formas farmacêuticas, período de tempo persistente da libertação do fármaco, do animal a ser administrado, pode ser uma quantidade eficaz do ingrediente ativo. Por exemplo, quando a composição é utilizada como microesferas numa região isquémica, pode ser administrada a uma dose de desde cerca de 0,001 mg até 500 mg, preferentemente

desde cerca de 0,01 mg até 50 mg, por dose, como o componente ativo por adulto (50 kg de massa corporal), desde uma vez por dia até uma vez cada 3 meses.

Adicionalmente, para por exemplo frio, dormência, claudicação intermitente, dor no repouso, úlceras da pele nos membros no caso de por exemplo ASO, doença de Buerger, neuropatia diabética, é preferível levar a cabo administração intramuscular do agente da presente invenção ou da sua preparação persistente, por exemplo, na região doente ou na proximidade da mesma continuamente durante um período de aproximadamente desde uma vez por dia até 4 semanas.

Para por exemplo enfarte do miocárdio, angina de peito, é preferível levar a cabo diretamente administração intramuscular do agente da presente invenção ou da sua preparação persistente, por exemplo, na região do músculo cardíaco isquémico ou na proximidade do mesmo, e é preferível levar a cabo a administração diretamente sob toracotomia ou utilizando por exemplo um cateter vascular sanguíneo equipado com agulha. Relativamente ao período de administração, é preferível levar a cabo a administração intramuscular continuamente, por exemplo, durante um período de aproximadamente desde uma vez por dia até 4 semanas.

No caso de por exemplo osteoporose, dano do tecido periodontal, fratura óssea, osteoartrite, é preferível administrar o agente da presente invenção ou a sua preparação persistente por si só, ou através de mistura com por exemplo um cimento ósseo, um lubrificante articular, uma ferramenta protésica topicamente na região doente ou na proximidade da mesma.

No caso por exemplo de hipertensão pulmonar ou COPD, é preferível levar a cabo inalação do agente da presente invenção ou da sua preparação persistente como soluções para inalação ou pós para inalação.

Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1 mostra um resultado medido de ação de aceleração da

formação de órgãos ocos do Composto 1 (ácido (E)-(5-(2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil]etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi)acético).

A Fig. 2 mostra um resultado de teste de libertação da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 1.

A Fig. 3 mostra um resultado de teste de libertação da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2.

A Fig. 4 mostra um resultado de teste de libertação da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 3.

A Fig. 5 mostra um resultado medido de ações de aceleração da formação de órgãos ocos do Composto de Referência 3 (ácido (5Z,9β,11α,13E)-17,17-propano-11,16-diidroxi-9-cloro-20-n orprost-5,13-dienoico) e Composto de Referência 4 (ácido (11α,13E,15α)-9-oxo-11,15-diidroxi-16-(3-metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico).

Melhor Modo para Levar a Cabo a Invenção

São mostrados a seguir testes farmacológicos como exemplos da presente invenção, mas estes destinam-se ao entendimento minucioso da presente invenção e não limitam o âmbito da presente invenção. A este respeito, foram aplicadas melhoria da precisão da medição e modificação da sensibilidade de medição conforme segue aos métodos de medição para avaliar os compostos da presente invenção.

Exemplo 1

Medição da ação de aceleração da angiogénesis (*in vitro*):

Método de teste:

Um *kit* de angiogénesis (fabricado pela Kurabo; constituído a partir de células endoteliais vasculares de veia de cordão umbilical humano normal e fibroblastos de pele humana normal) foi cultivado durante 3 horas, e posteriormente o meio de cultura (o meio para utilização em angiogénesis unido ao *kit* de angiogénesis foi utilizado como o meio de cultura e cultivado

a 37 °C sob um ambiente húmido de dióxido de carbono a 5% - ar a 95%, e foi utilizada uma incubadora de dióxido de carbono BNA-121D como a incubadora) foi mudado e foi adicionado um agente a ser testado a cada poço (0,5 ml/poço). Foi levada a cabo permuta do meio também no 3°, 6° e 8° dias após o início da cultura e foi adicionado o agente fresco a ser testado, O tipo e concentração do agente a ser testado foram não tratado, solvente (DMSO) a 0,1%, Composto 1 a 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} mol/l, VEGF-A a 0,1, 1 e 10 ng/ml e HGF a 0,1, 1 e 10 ng/ml, e a cultura foi levada a cabo utilizando 3 poços para cada concentração. Foi levada a cabo fixação 10 dias após o início da cultura, e foi levada a cabo coloração de órgãos ocos com um antícorpo anti-CD31 utilizando um kit de coloração de órgãos ocos (fabricado pela Kurabo). Relativamente à avaliação, foi montada uma lente Chalkley Grid (uma lente de grade, fabricada pela Kurabo) no ocular de um microscópio, e a formação de órgãos ocos foi avaliada através da contagem de intersecções dos pontos de disposição aleatória da Chalkley Grid com o órgão oco formado (referindo o método de avaliação de J. Pathol., 177, 275-283 (1995)). A contagem foi levada a cabo a 12 posições por poço, e o total foi calculado.

Relativamente ao agente a ser testado, o Composto 1 (ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxi]etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi]acético) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções a 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

Relativamente a VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), a solução de VEGF a 2 µg/ml contida no kit de reagente de controlo da angiogénesis da Kurabo foi diluída com o meio de cultura e utilizada.

Relativamente a HGF (fator de crescimento de hepatócitos humanos), a solução de HGF a 5 µg/ml adquirida a partir da R & D System-Funakoshi foi diluída com o meio de cultura e utilizada.

Método de análise estatística:

As contagens de formação de órgãos ocos nos poços não tratados foram comparadas com as dos poços tratados com concentrações respetivas de amostras de teste através de teste de Dunnett (teste bilateral). O nível de significância foi ajustado a 5%.

A este respeito, os dados foram mostrados através do valor médio de 3 poços e desvio padrão.

Os resultados do teste são mostrados na Fig. 1.

Resultados:

O Composto 1 acelerou a formação de órgãos ocos estatisticamente significativamente por 10^{-8} e 10^{-7} mol/l. Adicionalmente, o VEGF-A e HGF aceleraram a formação de órgãos ocos a uma concentração de 10 ng/ml. Com base nos resultados acima, foi revelado que o Composto 1 tem um efeito de aceleração da angiogénesis tendo uma força equivalente aos agentes de controlo positivo VEGF-A e HGF num sistema de co cultura de células endoteliais vasculares humanas e fibroblastos humanos.

Exemplo 2

Medição da ação de produção de proteínas de fator de reparação endógeno (HGF, VEGF) (*in vitro*):

Método de teste:

Um *kit* de angiogénesis (fabricado pela Kurabo; constituído a partir de células endoteliais vasculares de veia de cordão umbilical humano normal e fibroblastos de pele humana normal) foi cultivado durante 3 horas, e posteriormente o meio de cultura (o meio para utilização em angiogénesis unido ao *kit* de angiogénesis foi utilizado como o meio de cultura e cultivado a 37 °C sob um ambiente húmido de dióxido de carbono a 5% - ar a 95%, e foi utilizada uma incubadora de dióxido de carbono BNA-121D como a incubadora) foi mudado e foi adicionado um agente a ser testado a cada poço (0,5 ml/poço). O agente a ser testado foi solvente (DMSO) a 0,1% e Composto 1 a 10^{-7} mol/l, e a cultura foi levada a cabo utilizando 3 poços para cada um. Foram recolhidos sobrenadantes da cultura antes do início da

cultura e 1, 2, 6, 24, 48 e 72 horas após o início. As concentrações proteicas de VEGF e HGF nos sobrenadantes da cultura foram medidas utilizando um kit ELISA (R & D system-Funakoshi).

Relativamente ao agente a ser testado, o Composto 1 (ácido (E)-[5-[2-[1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxil]etil]-7,8-diidronaftalen-1-iloxi]acético) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções a 10^{-4} que foram então utilizadas ao diluir 1/1000 vezes com o meio de cultura.

Método de análise estatística:

Os resultados dos poços de controlo de solvente foram comparados com os dos poços tratados com o agente a ser testado através de teste de Dunnett (teste bilateral). O nível de significância foi ajustado a 5%.

A este respeito, os dados foram mostrados através do valor médio de 3 poços e desvio padrão.

Os resultados de teste após 72 horas de cultura são mostrados no Quadro 1.

QUADRO 1

Agente testado	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
Controlo de solvente (DMSO)	110 \pm 16	2004 \pm 76
Composto 1	518 \pm 15***	3034 \pm 30***

***: $p < 0,001$ contra controlo de solvente

Resultados:

O Composto 1 acelerou a produção de proteína de HGF e proteína VEGF estatisticamente significativamente em comparação com o controlo de solvente, através de 72 horas de cultura a uma concentração de 10^{-7} mol/l.

Exemplo 3

Produção de preparações persistentes:

Exemplo de Preparação 1

Foi preparada uma solução de diclorometano (1 ml) de 100 mg de um copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico

(doravante referido como "PLGA") (ácido polilático:ácido glicólico = 1:1 (% em mol), massa molecular ponderal média 40.000, PLGA5-1, fabricado pela Mitsui Kagaku) e Composto 1 (5 mg). Foi preparada uma emulsão O/A através da adição da solução preparada acima a 300 ml de solução aquosa de álcool polivinílico a 0,1% (Nacalai Tesque) (pH 3,0, ajustada com ácido clorídrico a 1 N) que foi agitada a 5.000 rpm utilizando TK Robomix (Tokushu Kiki, tipo MARK II 2,5), e agitando a mistura à temperatura ambiente durante 3 minutos. Esta emulsão O/A foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas para evaporar o diclorometano, e a fase de óleo foi solidificada e posteriormente centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos utilizando uma centrifugadora (Hitachi, O5PR-22). O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi disperso em água destilada para injeção (35 ml) e posteriormente centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos utilizando a centrifugadora. O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi disperso em solução de Tween 80 a 0,2% (35 ml) e posteriormente centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos utilizando a centrifugadora. O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi disperso em água destilada para injeção (35 ml) e posteriormente centrifugado novamente a 3.000 rpm durante 10 minutos utilizando a centrifugadora. Descartando finalmente o sobrenadante, o precipitado foi embebido em gelo seco-metanol, congelado e posteriormente seco sob uma pressão reduzida, produzindo desta forma uma preparação de microesferas do Composto 1.

Exemplo de Preparação 2

Foi preparada uma solução de diclorometano (1 ml) de 100 mg de um copolímero de ácido polilático-ácido glicólico (doravante referido como "PLGA") (ácido polilático:ácido glicólico = 1:1 (% em mol), massa molecular ponderal média 20.000, PLGA5020, Wako Pure Chemical Industries) e Composto 1 (5 mg). Posteriormente, foi levada a cabo a mesma operação do Exemplo de Preparação 1 para produzir uma preparação de microesferas do Composto 1.

Exemplo de Preparação 3

Foi preparada uma solução de diclorometano (3 ml) de 100 mg de um copolímero de ácido polilático-ácido glicólico (a ser doravante referido como "PLGA") (ácido polilático:ácido glicólico = 1:1 (% em mol), massa molecular ponderal média 40.000, PLGA5-1, fabricado pela Mitsui Kagaku) e Composto 1 (5 mg). Posteriormente, foi levada a cabo a mesma operação do Exemplo de Preparação 1 para produzir uma preparação de microesferas do Composto 1.

Exemplo de Teste de Preparação 1

Medição da eficácia de inclusão:

As microesferas produzidas nos Exemplos de Preparação 1, 2 e 3 (respetivamente cerca de 10 mg) foram misturadas com uma solução de acetonitrilo contendo um padrão interno adequado e dissolvidas ao levar a cabo um tratamento ultrassónico. O teor de Composto 1 de cada uma das soluções foi medido através de uma cromatografia líquida de alto desempenho, e a eficácia de inclusão do Composto 1 na microesfera foi calculada através da seguinte fórmula.

$$\text{Eficácia de inclusão (\%)} = (\text{teor encontrado/teor calculado}) \times 100$$

Como resultado, a preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 1 mostrou uma eficácia de inclusão de 70,9%, a preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 2 mostrou uma eficácia de inclusão de 100% e a preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 3 mostrou uma eficácia de inclusão de 74,3%.

Exemplo de Teste de Preparação 2: Teste de libertação *in vitro*:

Cada uma das preparações de microesferas produzidas nos Exemplos de Preparação 1, 2 e 3 foi adicionada a Tween 80 a 0,2% 1/15 M tampão fosfato pH 6,8 até uma concentração de 100 µg/ml como agente e dispersa uniformemente através de tratamento ultrassónico utilizando vórtice. Isto foi distribuído a 1 ml em recipientes e colocado num forno a temperatura constante de 37 °C. Os recipientes foram periodicamente amostrados e centrifugados a 12.000 rpm durante 5 minutos, e a quantidade

residual de Composto 1 em microesferas do sedimento foi medida através de uma cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

Os resultados da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 1 são mostrados na Fig. 2, e os resultados da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 na Fig. 3, e os resultados da preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 3 na Fig. 4.

A este respeito, a razão residual das Figs. 2, 3 e 4 significa uma razão de Composto 1 restante nas microesferas para a inicial.

Como resultado, a preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 1 libertou cerca de 40% do agente durante 14 dias, e a preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 2 libertou a quantidade total durante cerca de 10 dias. A preparação de microesferas do Exemplo de Preparação 3 libertou cerca de 60% durante 28 dias.

Exemplo 4

Teste de angiogénesse (teste *in vivo*) utilizando modelo de isquemia de pata de rato (arteriosclerose obliterante (ASO)):

O modelo de isquemia da pata foi preparado ligando a artéria femoral da pata de ratos. O fluxo sanguíneo das patas traseiras foi medido utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments) 2 semanas após a preparação, e os animais foram divididos em 6 grupo ($n = 5$) de tal forma que o valor médio de fluxo sanguíneo se tornou quase uniforme.

Com início no dia a seguir ao agrupamento, foram administrados 0,1 ml/sítio, 2 sítios, do agente a ser testado através de injeção intramuscular no adutor femoral esquerdo, uma vez por semana, 4 vezes em total como uma solução a ser testada. Uma semana após a conclusão da administração final, os fluxos sanguíneos das patas traseiras foram medidos utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments), e os fluxos sanguíneos da pata tratada (pata esquerda) e pata não tratada (pata direita) foram comparados e examinados. Os resultados de pata tratada/pata não tratada (%) são mostrados no Quadro 2.

A este respeito, a construção da solução a ser testada é conforme segue. Grupo de solvente (controlo): solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

Grupo de Polímero:

O copolímero de ácido polilático-ácido glicólico utilizado no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do Composto 1 foi suspenso em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml). A este respeito, a quantidade de copolímero de ácido polilático/ácido glicólico é idêntica à quantidade contida no Composto 1 MS (1 mg).

Grupo de Composto 1 (1 mg):

Foi suspenso Composto 1 em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,1 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

Grupo de Composto 1 MS (mg):

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 1 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

QUADRO 2

Solução a ser testada	Razão de fluxo sanguíneo de pata tratada/pata não tratada (%)
Controlo	67,3 ± 5,1
Polímero, Composto 1 (mg)	68,7 ± 4,1
Composto 1 MS (0,01 mg)	76,2 ± 2,8***#
Composto 1 MS (0,1 mg)	74,0 ± 7,1
Composto 1 MS (mg)	78,3 ± 4,6***#
	89,0 ± 4,4***##\$

**: diferença significativa do Controlo a $p<0,01$ (teste t de Student)
#: diferença significativa do Polímero a $p<0,01$ (teste t de Student)
\$: diferença significativa do Composto 1 a $p<0,01$ (teste t de Student)

Resultados:

Embora tenha sido constatada recuperação significativa de fluxo sanguíneo contra o Controlo inclusive através da administração de Composto 1 (1 mg) por si só, foi observado efeito de melhoria do fluxo sanguíneo adicionalmente mais forte do que o Composto 1 (1 mg) através da administração da preparação de microesferas (MS) (Exemplo de Preparação 2) do Composto 1.

Em comparação com o grupo de polímero, foi constatado efeito de melhoria do fluxo sanguíneo correlacionado com a dose na preparação de Composto 1 MS, e foi constatada ação significativa de efeito de melhoria do fluxo sanguíneo no Composto 1 MS (0,1 mg) e Composto 1 MS (1 mg).

Exemplo 5

Teste de angiogénesse utilizando modelo de isquemia de pata de rato (arteriosclerose obliterante (ASO)); determinação da dose mínima eficaz (teste *in vivo*):

O modelo de isquemia da pata foi preparado ligando a artéria femoral da pata de ratos. O fluxo sanguíneo das patas traseiras foi medido utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments) 1 semana após a preparação, e os animais foram divididos em 4 grupo ($n = 5$) de tal forma que o valor médio de fluxo sanguíneo se tornou quase uniforme.

Com início no dia a seguir ao agrupamento, 0,1 ml/sítio, 2 sítios, do agente a ser testado através de injeção intramuscular no adutor femoral esquerdo (grupo de polímero, grupo de Composto 1 MS), uma vez por semana, 4 vezes em total como uma solução a ser testada. Uma semana após a conclusão da

administração final, os fluxos sanguíneos das patas traseiras foram medidos utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments), e os fluxos sanguíneos da para tratada (pata esquerda) e pata não tratada (pata direita) foram comparados e examinados. Os resultados de pata tratada/pata não tratada (%) são mostrados no Quadro 3.

A este respeito, a construção da solução a ser testada é conforme segue.

Grupo de Polímero:

O copolímero de ácido polilático-ácido glicólico utilizado no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do Composto 1 foi suspenso em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml). A este respeito, a quantidade de copolímero de ácido polilático/ácido glicólico é idêntica à quantidade contida no Composto 1 MS (0,1 mg).

Grupo de Composto 1 MS (0,03 mg):

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,03 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,1 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,3 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

QUADRO 3

Solução a ser testada	Razão de fluxo sanguíneo de pata tratada/pata não tratada (%)
Polímero	57,3 ± 4,5
Composto 1 MS (0,03 mg)	65,1 ± 3,7*
Composto 1 MS (0,1 mg)	68,4 ± 3,2**
Composto 1 MS (0,3 mg)	72,7 ± 4,6**

*: $p < 0,05$ contra. Polímero (teste t de Student)

**: $p < 0,01$ contra. Polímero (teste t de Student)

Resultados:

Em comparação com o grupo de polímero, foi constatado efeito de melhoria do fluxo sanguíneo correlacionado com a dose na preparação de microesferas (MS) do Composto 1, e foi constatada ação significativa de efeito de melhoria do fluxo sanguíneo no Composto 1 MS (0,03 mg). Isto, já que não foi constatada ação significativa de efeito de melhoria do fluxo sanguíneo no Composto 1 MS (0,01 mg) no Exemplo 4, foi sugerido que a dose mínima eficaz é 0,03 mg.

Exemplo 6

Teste de angiogénesis utilizando modelo de isquemia de pata de rato (arteriosclerose obliterante (ASO)); utilidade da administração tópica

(teste *in vivo*):

O modelo de isquemia da pata foi preparado ligando a artéria femoral da pata de ratos. O fluxo sanguíneo das patas traseiras foi medido utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments) 1 semana após a preparação, e os animais foram divididos em 4 grupo ($n = 5$) de tal forma que o valor médio de fluxo sanguíneo se tornou quase uniforme.

Com início no dia a seguir ao agrupamento, foram administrados 0,1 ml/sítio, 2 sítios, do agente a ser testado através de injeção intramuscular em regiões isquémicas do adutor femoral esquerdo (grupo de polímero, grupo de Composto 1, grupo de Composto 1 MS) e na região normal do ombro e parte superior do braço direito (grupo de Composto 1 MS), uma vez por semana, 4 vezes em total como uma solução a ser testada. Uma semana após a conclusão da administração final, os fluxos sanguíneos das patas traseiras foram medidos utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments), e os fluxos sanguíneos da pata tratada (pata esquerda) e pata não tratada (pata direita)

foram comparados e examinados. Os resultados de pata tratada/pata não tratada (%) são mostrados no Quadro 4.

A este respeito, a construção da solução a ser testada é conforme segue.

Grupo de Polímero:

O copolímero de ácido polilático-ácido glicólico utilizado no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do Composto 1 foi suspenso em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml). A este respeito, a quantidade de copolímero de ácido polilático/ácido glicólico é idêntica à quantidade contida no Composto 1 MS (1 mg).

Grupo de Composto 1 (0,1 mg):

Foi suspenso Composto 1 em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,1 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

QUADRO 4

Solução a ser testada	Razão de fluxo sanguíneo de pata tratada/pata não tratada (%)
Polímero ^{a)}	57,3 ± 4,5
Composto 1 (0,1 mg) ^{a)}	60,5 ± 3,1
Composto 1 MS (0,1 mg) ^{b)}	56,9 ± 5,6
Composto 1 MS (0,1 mg) ^{a)}	68,4 ± 3,2*

a): Administração intramuscular na parte femoral esquerda isquémica
 b): Administração intramuscular na parte superior do braço direito normal
 **: p<0,01 contra. Polímero (teste t de Student)

Resultados:

Embora não tenha sido constatado aumento significativo do fluxo sanguíneo através da administração intramuscular de Composto 1 MS (0,1 mg) na parte superior do braço direito

normal, foi constatado aumento significativo do fluxo sanguíneo através da administração intramuscular da mesma dose na parte femoral esquerda isquémica. Com base nisto, foi sugerido que a eficácia do Composto 1 não é mediada pelo fluxo sanguíneo, mas a sua administração tópica em regiões isquémicas é importante. Adicionalmente, já que não foi constatada ação de aumento do fluxo sanguíneo significativa através da administração tópica de Composto 1 na região isquémica, foi sugerida eficácia da preparação persistente (MS).

Exemplo 7

Teste de angiogénesis utilizando modelo de isquemia de pata de rato (arterioscleroze obliterante (ASO)); ação de vasodilatação e ação de aceleração da angiogénesis (teste *in vivo*):

O modelo de isquemia da pata foi preparado ligando a artéria femoral da pata de ratos. O fluxo sanguíneo das patas traseiras foi medido utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments) 1 semana após a preparação, e os animais foram divididos em 2 grupo ($n = 5$) de tal forma que o valor médio de fluxo sanguíneo se tornou quase uniforme.

Com início no dia a seguir ao agrupamento, a solução a ser testada foi administrada através de injeção intramuscular no adutor femoral esquerdo (grupo de polímero, grupo de Composto 1 MS) uma vez por semana, 4 vezes em total. Os fluxos sanguíneos das patas traseiras foram medidos 3 dias após a segunda administração (no 10º dia após o agrupamento) e após 1 semana e 2 semanas desde a conclusão da administração final, utilizando Laser Doppler Imager (Moor Instruments), e os fluxos sanguíneos da pata tratada (pata esquerda) e pata não tratada (pata direita) foram comparados e examinados. Os resultados de pata tratada/pata não tratada (%) são mostrados no Quadro 5.

A este respeito, a construção da solução a ser testada é conforme segue.

Grupo de Polímero:

O copolímero de ácido polilático-ácido glicólico

utilizado no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do Composto 1 foi suspenso em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml). A este respeito, a quantidade de copolímero de ácido polilático/ácido glicólico é idêntica à quantidade contida no Composto 1 MS (0,3 mg).

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

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,3 mg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,2 ml).

QUADRO 5

Solução a ser testada	Razão de fluxo sanguíneo de pata tratada/pata não tratada (%)			
	Antes da 1 ^a administração	Após 3 dias a partir da 2 ^a administração	Após 1 semana a partir da 4 ^a administração	Após 2 semanas a partir da 4 ^a administração
Polímero	36,7 ± 4,2	49,8 ± 5,8	57,3 ± 4,5	61,3 ± 2,5
Composto 1 MS (0,3 mg)	36,6 ± 4,3	59,9 ± 3,7*	72,7 ± 4,6*	72,4 ± 5,7**

*: p<0,05 contra Polímero (teste t de Student)
**: p<0,01 contra Polímero (teste t de Student)

Resultados:

Em comparação com o grupo administrado com polímero, foi observado um aumento significativo do fluxo sanguíneo de cerca de 10% na região isquémica através do Composto 1 MS (0,3 mg) inclusive no 10º dia após a administração (3 dias após a 2ª administração). Já que é necessário um período de 4 semanas para a angiogénesse e o Composto 1 está sob libertação na região tópica isquémica 3 dias após a 2ª administração, foi sugerido que este efeito de melhoria é um efeito de aumento do fluxo sanguíneo através de ações diretas tais como ação de vasodilatação e ação inibitória da aglutinação de plaquetas do

Composto 1 de libertação lenta. Adicionalmente, foi também observada uma ação de aumento do fluxo sanguíneo significativa de cerca de 11% após 1 semana e 2 semanas a partir da administração final. Foi considerado com base nisto que a libertação do Composto 1 a partir da preparação de microesferas desapareceu completamente após uma semana da administração final, e foi sugerido que este efeito não são as ações diretas do Composto 1 (ação de vasodilatação, ação inibitória da aglutinação de plaquetas, etc.), mas um efeito por parte da ação de angiogénesse.

Exemplo 8

Teste de angiogénesse (teste *in vivo*) utilizando modelo de transplante de esponja de ratinho:

Sob anestesia, a parte dorsal de um ratinho foi incisada e foi incorporada uma esponja de uretano em disco (cerca de 5 mm de espessura e 13 mm de diâmetro) na mesma. A administração do agente foi levada a cabo através de administração tópica do mesmo diretamente na esponja uma vez por dia durante um total de 14 vezes iniciando no dia da preparação do modelo de transplante de esponja, ou no dia de conclusão da operação e 7º dia após a mesma. No 15º dia após o transplante de esponja, a esponja contendo tecido de granulação foi extraída e observada a olho nu, e posteriormente a sua massa húmida foi medida. Adicionalmente, isto foi misturado com água destilada de quantidade 4 vezes maior do que a massa húmida, homogeneizado e centrifugado, e posteriormente o sobrenadante foi submetido à medição do teor de hemoglobina utilizando Hemoglobin β -Test Wako (fabricado pela Wako Pure Chemical Industries). Os resultados da medição do teor total de hemoglobina nas esponjas extraídas são mostrados no Quadro 6.

A este respeito, a construção da solução a ser testada é conforme segue.

Grupo de Polímero:

O copolímero de ácido polilático-ácido glicólico utilizado no Exemplo de Preparação 2 contendo 0,01 mg do

Composto 1 foi suspenso em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml). A este respeito, a quantidade de copolímero de ácido polilático/ácido glicólico é idêntica à quantidade contida no Composto 1 MS (200 µg).

Grupo de Composto 1 (20 µg):

Foi suspenso Composto 1 (20 µg) em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

Grupo de Composto 1 (40 µg):

Foi suspenso Composto 1 (40 µg) em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

Grupo de Composto 1 (200 µg):

Foi suspenso Composto 1 (200 µg) em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

Grupo de Composto 1 MS (200 µg):

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 200 µg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

Grupo de Composto 1 MS (400 µg):

A preparação de microesferas produzida no Exemplo de Preparação 2 contendo 400 µg do Composto 1 foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

Grupo de Composto de Referência 3 (20 µg):

Foi suspenso Composto de Referência 3 (20 µg) em solução de Tween 80 a 0,2% p/v (0,05 ml).

QUADRO 6

Solução a ser testada	Peso húmido da esponja (g)	Teor de hemoglobina (mg/g tecido húmido)
Polímero ^{b)}	0,4542 ± 0,0303	1,973 ± 0,564
Composto 1 (20 µg) ^{a)}	0,3843 ± 0,0681	2,403 ± 0,533
Composto 1 (40 µg) ^{a)}	0,5136 ± 0,0938	3,010 ± 0,808
Composto 1 (200 µg) ^{b)}	0,4123 ± 0,0320	1,964 ± 0,289
Composto 1 MS (200 µg) ^{b)}	0,5317 ± 0,1413	3,523 ± 0,482**
Composto 1 MS (400 µg) ^{b)}	0,5655 ± 0,1130	4,822 ± 1,218**

Composto de Referência 3 (20 µg) ^{a)}	0,5193 ± 0,0792	4,588 ± 0,488**
a) uma vez ao dia, 14 dias de administração repetida		
b) duas administrações em intervalos de 7 dias		
**: p<0,01 contra Polímero (teste de Dunnett)		

Resultados:

Foi constatada formação de granulação nas esponjas administradas com Composto 1 MS (200 µg) (duas administrações em intervalos de 7 dias) e Composto 1 MS (400 µg) (duas administrações em intervalos de 7 dias), e estas tornaram-se vermelhas pálidas, vermelhas ou castanhas escuras. Adicionalmente, quando a concentração de hemoglobina no tecido de granulação formado em cada esponja foi medida, foi observado aumento significativo da concentração de hemoglobina em comparação com o grupo de polímero de tal forma que foi confirmado o efeito de angiogénesse. Por outro lado, no caso do Composto 1 (20 µg) (14 dias de administração repetida) e Composto 1 (40 µg) (14 dias de administração repetida), a concentração de hemoglobina no tecido de granulação formado em cada esponja mostrou uma tendência em aumento, mas não um aumento significativo. Igualmente, a concentração de hemoglobina no tecido de granulação formado na esponja não aumentou no caso do Composto 1 (200 µg) (duas administrações em intervalos de 7 dias). Com base nisto, foi constatado que a preparação de libertação lenta do Composto 1 (Composto 1 MS) é particularmente útil na indução da angiogénesse. Igualmente, foi constatada formação de granulação na esponja administrada com Composto de Referência 3 (20 µg) (14 dias de administração repetida), e estas tornaram-se vermelhas pálidas, vermelhas ou castanhas escuras. Adicionalmente, quando a concentração de hemoglobina no tecido de granulação formada na esponja foi medida, foi observado aumento significativo da concentração de hemoglobina em comparação com o grupo de polímero de tal forma que foi confirmado o efeito de angiogénesse.

Exemplo 9 (Referência)

Medição da ação de aceleração da angiogénesis (*in vitro*):

Método de teste:

Um *kit* de angiogénesis (fabricado pela Kurabo; constituído a partir de células endoteliais vasculares de veia de cordão umbilical humano normal e fibroblastos de pele humana normal) foi cultivado durante 3 horas, e posteriormente o meio de cultura (o meio para utilização em angiogénesis unido ao *kit* de angiogénesis foi utilizado como o meio de cultura e cultivado a 37 °C sob um ambiente húmido de dióxido de carbono a 5% - ar a 95%, e foi utilizada uma incubadora de dióxido de carbono BNA-121D como a incubadora) foi mudado e foi adicionado um agente a ser testado a cada poço (0,5 ml/poço). Foi levada a cabo permuta do meio também no 3°, 6° e 8° dias após o início da cultura e foi adicionado o agente fresco a ser testado, O tipo e concentração do agente a ser testado foram não tratado; DMSO: 0,1%; α -CD: 0,0118, 0,118 e 1,18 mg/ml; PGE2-aCD: 1, 10 e 100 nmol/l; Composto de Referência 3 (agonista de EP2), Composto de Referência 4 (agonista de EP4), agonista de EP1 e agonista de EP3: 1, 10 e 100 nmol/l, VEGF: 0,1, 1 e 10 ng/ml; e HGF: 0,1, 1 e 10 ng/ml, e foi levada a cabo cultura utilizando 3 poços para cada concentração. Foi levada a cabo fixação 10 dias após o inicio da cultura, e foi levada a cabo coloração de órgãos ocos com um anticorpo anti-CD31 utilizando um *kit* de coloração de órgãos ocos (fabricado pela Kurabo). Relativamente à avaliação, foi montada uma lente Chalkley Grid (uma lente de grade, Kurabo) no ocular de um microscópio, e a formação de órgãos ocos foi avaliada através da contagem de intersecções dos pontos de disposição aleatória da Chalkley Grid com o órgão oco formado (referindo o método de avaliação de J. Pathol., 177, 275-283 (1995)). A contagem foi levada a cabo a 12 posições por poço, e o total foi calculado.

A este respeito, foi dissolvido Composto de Referência 3 como um agonista de EP2 (ácido (5 α ,9 β ,11 α ,13E)-17,17-propano-11,16-diidroxi-9-cloro-20-nor

prost-5,13-dienoico) em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

Foi dissolvido Composto de Referência 4 como um agonista de EP2 (ácido (11 α ,13E,15 α)-9-oxo-11,15-diidroxi-16-(3-metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico) em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

O agonista de EP1 (ácido (13E)-(11 α ,15S,17S)-2,5-etano-6,9-dioxo-11,15-diidroxi-17,20-dimetilprost-13-enoico; o composto descrito no Exemplo 1 na memória descritiva do documento JP-A-11-322709) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

O agonista de EP3 (ácido 11 α ,15 α -dimetoxi-9-oxoprost-5Z,13E-dienoico; o composto descrito no Exemplo 1 na memória descritiva do documento WO98/34916) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar soluções de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

PGE2-aCD foi dissolvido em água destilada para injeção para preparar soluções de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/l que foram então utilizadas diluindo 1/1000 vezes com o meio de cultura.

Relativamente a VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), a solução de VEGF a 2 μ g/ml contida no kit de reagente de controlo da angiogénesis da Kurabo foi diluída com o meio de cultura e utilizada.

Relativamente ao HGF (fator de crescimento de hepatócitos humanos), a solução de HGF a 5 μ g/ml adquirida a partir da R & D System-Funakoshi foi diluída com o meio de cultura e utilizada.

Método de análise estatística:

As contagens de formação de órgãos ocos nos poços não tratados foram comparadas com as dos poços tratados com concentrações respetivas de amostras de teste através de teste de Dunnett (teste bilateral). O nível de significância foi ajustado a 5%.

A este respeito, os dados foram mostrados através do valor médio de 3 poços e desvio padrão.

Os resultados de teste são mostrados na Fig. 5.

Resultados:

PGE2-aCD, o Composto de Referência 3 (agonista de EP2) e o Composto de Referência 4 (agonista de EP4) aceleraram significativamente a formação de órgãos ocos a concentrações de 10 nmol/l e 100 nmol/l. Adicionalmente, VEGF e HGF aceleraram a formação de órgãos ocos a uma concentração de 10 ng/ml. Contudo, o agonista de EP1, agonista de EP3 e α -CD não exerceram influência sobre a formação de órgãos ocos.

Exemplo 10 (Referência)

Medição da ação de libertação de fator de reparação endógeno (*in vitro*):

Método de teste:

Um *kit* de angiogénesse (fabricado pela Kurabo; constituído a partir de células endoteliais vasculares de veia de cordão umbilical humano normal e fibroblastos de pele humana normal) foi cultivado durante 3 horas, e posteriormente o meio de cultura (o meio para utilização em angiogénesse unido ao *kit* de angiogénesse foi utilizado como o meio de cultura e cultivado a 37 °C sob um ambiente húmido de dióxido de carbono a 5% - ar a 95%, e foi utilizada uma incubadora de dióxido de carbono BNA-121D como a incubadora) foi mudado e foi adicionado um agente a ser testado a cada poço (0,5 ml/poço). As concentrações de HGF e VEGF nos sobrenadantes de cultura foram medidas 3 dias após o início da cultura. Os tipos e concentrações do agente a ser testado foram não tratado; DMSO: 0,1%; PGE1-aCD: 100 nmol/l; PGE2-aCD: 100 nmol/l; e Composto de Referência 3

(agonista de EP2) e Composto de Referência 4 (agonista de EP4) : 100 nmol/l, e a cultura foi levada a cabo utilizando 3 poços para cada concentração. As concentrações de HGF e VEGF foram medidas utilizando um *kit* de ELISA (R & D system-Funakoshi).

A este respeito, O Composto de Referência 3 como agonista de EP2 (ácido (5Z,9β,11α,13E)-17,17-propano-11,16-diidroxi-9-cloro-20-norprost-5,13-dienoico) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar uma solução a 10⁻⁴ que foi então utilizada ao diluir 1/1000 vezes com o meio de cultura.

O Composto de Referência 4 como agonista de EP4 (ácido (11α,13E,15α)-9-oxo-11,15-diidroxi-16-(3-metoximetilfenil)-17,18,19,20-tetranor-5-tiaprost-13-enoico) foi dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO) para preparar uma solução a 10⁻⁴ que foi então utilizada ao diluir 1/1000 vezes com o meio de cultura.

PGE1-aCD e PGE2-aCD foram dissolvidos em água destilada para injeção para preparar soluções a 10⁻⁴ que foram então utilizadas ao diluir 1/1000 vezes com o meio de cultura.

Método de análise estatística:

As concentrações de HGF e VEGF nos sobrenadantes do grupo de controlo de solvente foram comparados com os dos grupos tratados com agente através de teste de Dunnett (teste bilateral). O nível de significância foi ajustado a 5%.

A este respeito, os dados foram mostrados através do valor médio de 3 poços e desvio padrão.

Os resultados de teste após 72 horas de cultura são mostrados no Quadro 7.

QUADRO 7

Agente testado	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
Não Tratado	110 ± 16	2004 ± 76
PGE1-a CD	2043 ± 77***	2710 ± 50***
PGE2-a CD	1735 ± 95***	3032 ± 165****
Agonista de EP2 (Composto de Referência 3)	1865 ± 48***	2762 ± 51***

Agonista de EP4 (Composto de Referência 4)	379 ± 12***	2936 ± 69***
***: p<0,001 contra não tratado (teste de Dunnett)		

Resultados:

PGE1- α CD, PGE2- α CD, o Composto de Referência 3 (agonista de EP2) e o Composto de Referência 4 (agonista de EP4) aumentaram significativamente as concentrações de HGF e VEGF em sobrenadantes a uma concentração de 100 nmol/l.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- JP 6087811 A [0013] [0029]
- JP 11193268 A [0017]
- WO 0003980 A [0018]
- US 2868691 A [0060]
- US 3095355 A [0060]
- JP 11322709 A [0162]
- WO 9834916 A [0163]

Documentos de não patente citados na descrição

- *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997, vol. 239, 639-644 [0004]
- *Circulation*, 1998, vol. 97, 1114-1123 [0006]
- *Gene Therapy*, 2001, vol. 8, 181-189 [0006]
- *circulation*, 2002, vol. 106 (2), II 350 [0006]
- *THE LANCET*, vol. 360, 427-435 [0007]
- *Circulation*, 1998, vol. 98, 2800-2804 [0008]
- *Stroke*, 1997, vol. 28, 564-573 [0008]
- *N. Eng. J. Med*, 2002, vol. 346 (23), 1769-1771 [0009]
- *Proc. Nail. Acad Sci.*, 2002, vol. 99, 1371 [0010]
- *N. Eng. J. Med.*, 1993, vol. 328, 1313-1316 [0011]
- *Am. J. Med*, 1998, vol. 104, 43S-51S [0011]
- *Jpn. J. Pharmacol.*, 1997, vol. 75, 105-114 [0011]
- *Diabetologia.*, 1997, vol. 40, 1053-1061 [0014]
- *J. Lipid Mediators Cell Signaling*, 1995, vol. 12, 379-391 [0016]
- *J. Pathol.*, 1995, vol. 177, 275-283 [0095] [0159]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma preparação de microesferas persistente compreendendo um polímero biodegradável e ácido (E)-[5-[2-(1-fenil-1-(3-piridil)metilidenoaminoxi)etil]-7,8-didronaftalen-1-iloxi]-acético ou sal do mesmo.
2. A preparação de microesferas persistentes de acordo com a reivindicação 1, em que o polímero biodegradável é um copolímero de ácido lático-ácido glicólico.
3. A preparação de microesferas persistente de acordo com a reivindicação 1 ou 2, para utilização como um acelerador da produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) na prevenção e/ou tratamento de uma doença selecionada a partir de enfarte do miocárdio, angina de peito, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária.
4. A preparação de microesferas persistentes para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a doença é enfarte do miocárdio.
5. A preparação de microesferas persistentes para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a doença é insuficiência cardíaca congénita.
6. Uma composição farmacêutica que compreende a preparação de microesferas persistente de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
7. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 6 para utilização na prevenção e/ou tratamento de uma doença selecionada a partir de enfarte do miocárdio, angina de peito, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária.

8. A composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a doença é enfarte do miocárdio.

9. A composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a doença é insuficiência cardíaca congénita.

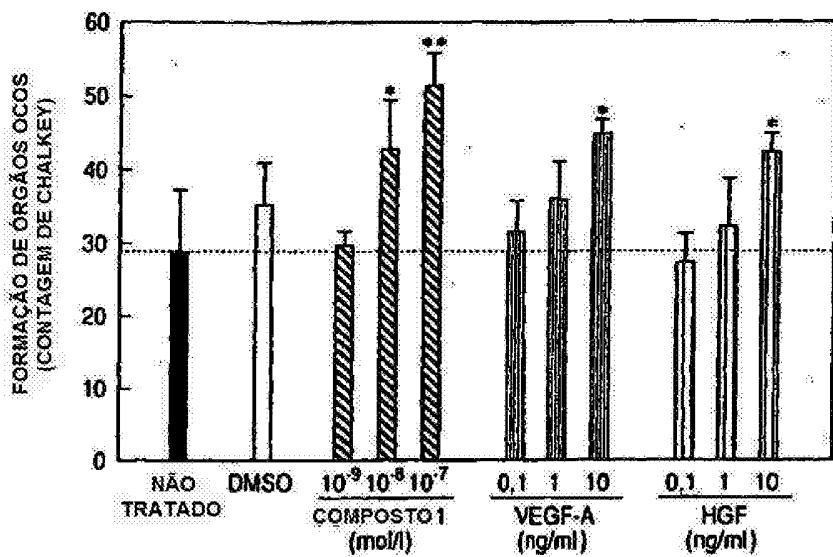
10. Um agente compreendendo a preparação de microesferas persistente de acordo com a reivindicação 1 ou 2.

11. O agente de acordo com a reivindicação 10 para utilização na prevenção e/ou tratamento de uma doença selecionada a partir de enfarte do miocárdio, angina de peito, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária.

12. O agente para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que a doença é enfarte do miocárdio.

13. O agente para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que a doença é insuficiência cardíaca congénita.

FIG. 1



*p<0,05 E **p<0,01 CONTRA COMPOSTO NÃO TRATADO (TESTE DE DUNNETT)

FIG. 2

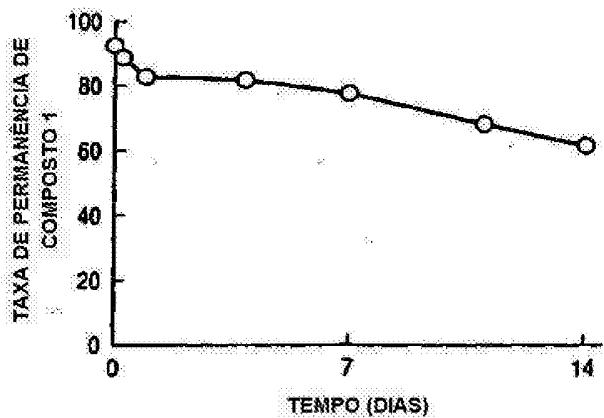


FIG. 3

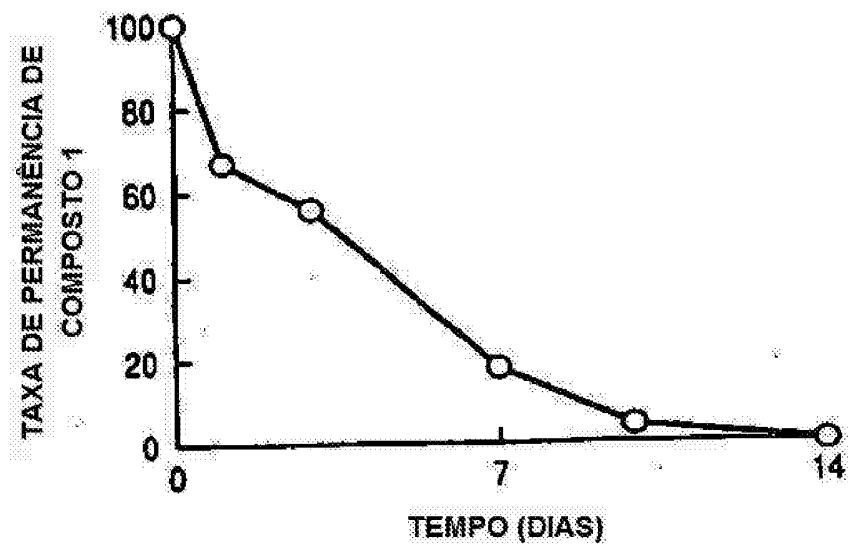


FIG. 4

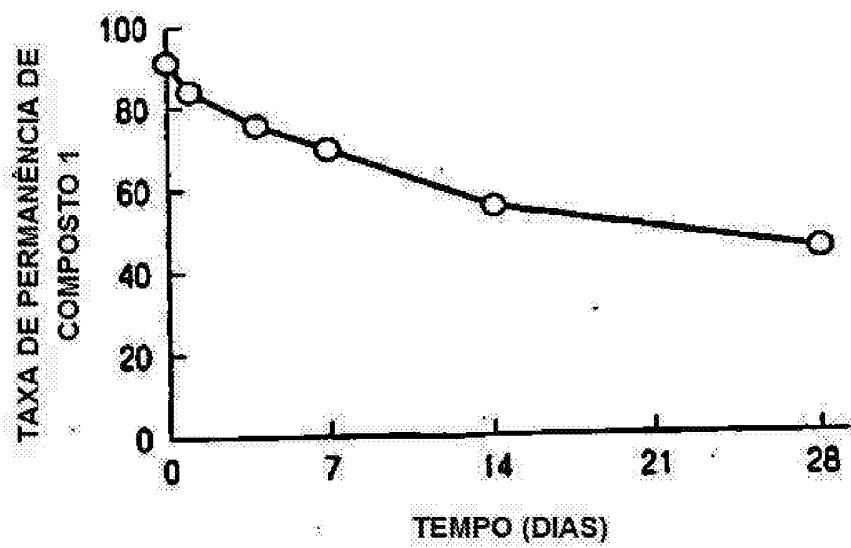


FIG. 5

