

(11) Número de Publicação: **PT 2672957 T**

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/437** (2016.01) **A61K 31/44** (2016.01)

**A61K 45/06** (2016.01) **A61K 31/5575**

(2016.01)

**A61K 31/5578** (2016.01) **A61K 31/5585**

(2016.01)

**A61P 11/00** (2016.01) **A61P 43/00** (2016.01)

(22) Data de pedido: **2012.02.03**

(30) Prioridade(s): **2011.02.07 EP 11153541**

(43) Data de publicação do pedido: **2013.12.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.11.02**  
**022/2017**

(73) Titular(es):

**SCIPHARM SÀRL**

**26-28, RUE EDWARD STEICHEN 2540**

**LUXEMBOURG**

**LU**

(72) Inventor(es):

**MICHAEL FREISSMUTH**

**CHRISTINA GLOECKEL**

**XAVER KOENIG**

**SIMON KEUERLEBER**

**AT**

**AT**

**AT**

**AT**

(74) Mandatário:

**EVANGELINO MARQUES RIBEIRO**

**AVENIDA LUÍSA TODI, Nº 33 - 1º B 2900-460 SETÚBAL**

**PT**

(54) Epígrafe: **RESUMO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO PELO MENOS UM ANÁLOGO DE PROSTACICLINA OU PROSTACICLINA OU UM SEU SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL E PELO MENOS UM INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE (PDE) 4 E OPCIONALMENTE UM OUTRO INIBIDOR DE PDE PARA UTILIZAÇÃO NA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DA FIBROSE CÍSTICA AUMENTANDO SELETIVAMENTE OS NÍVEIS DE CAMP EM BRONCO EPITELIAIS.

## Resumo

A presente invenção proporciona uma composição compreendendo pelo menos um análogo de prostaciclina ou prostaciclina ou um seu sal farmacologicamente aceitável e pelo menos um inibidor de fosfodiesterase (PDE) 4 e opcionalmente um outro inibidor de PDE para utilização na prevenção ou tratamento da fibrose cística aumentando seletivamente os níveis de cAMP em bronco epiteliais.

## Descrição

Composição inovadora para o tratamento da fibrose cística

A presente invenção proporciona composições que compreendendo uma prostaciclina ou um análogo de prostaciclina, selecionados do grupo de Treprostinil, lloprost, Cicaprost ou Beraprost ou seus sais farmacologicamente aceitáveis em combinação com um inibidor de fosfodiesterase 4 para utilização na prevenção ou tratamento da fibrose cística.

A prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina, epoprostenol, PGI<sub>2</sub>) é um metabolito oxigenado de ácido araquidônico formado e enzimaticamente pelas atividades sequenciais da ciclooxigenase e enzimas PGI-sintase. É produzido constitutivamente por endotelial vascular e músculo liso células e é induzida em condições inflamatórias células vasculares e macrófagos.

A PGI<sub>2</sub> é um potente vasodilatador e anti trombótico cujos efeitos resultam da ligação a um único agente heptahelicó o receptor acoplado a proteína G denominado I<sub>4</sub> prostanóide (IP)<sub>4</sub>. Este receptor é acoplado a G<sub>s</sub>- e ativa a adenilato ciclase, resultando numa rutura aguda de cAMP intracelular. Uma vez que a expressão de CFTR e mutação CFTR é dependente de AMPC, substâncias que os níveis intracelulares de cAMP são de interesse para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de CF. A maioria destas substâncias, como a forskolina, no entanto, induz uma elevação inespecífica de AMPC, que também pode ter efeitos nocivos, tais como inflamação. Assim, existe uma necessidade não satisfeita de intensificadores específicos de AMPC em epitélio células pulmonares.

O Treprostinil é um potente agonista dos recetores IP, a sua especificidade para este recetor é desconhecida. Sprague R.S. et al., *Microcirculation* 2008 Jul; 15 (5): 461-71, mostrou que os análogos de prostaciclina (UT-15, Remodulin) estimulam o cAMP mediado pelo recetor síntese e libertação de ATP a partir de eritrócitos de coelho e humanos.

A fosfodiesterase nucleica (PDE) é uma enzima que catalisa a hidrólise de cAMP e cíclico 3', 5-guanosina mono fosfato (cGMP) a 5'-nucleotídeos. CAMP e cGMP exibem muitos efeitos, mediados em grande parte pelos seus efeitos sobre as proteínas quinases de substrato múltiplo. Inibindo PDE, o nível de cAMP e cGMP aumentado, o resultando em relaxamento do músculo liso das vias aéreas e inibição da ativação das células inflamatórias. PDE4, PDE7 e PDE8 são específicos para cAMP.

Os inibidores da fosfodiesterase bloqueiam um ou mais dos subtipos da enzima fosfodiesterase (PDE), impedindo assim a inativação do sistema intracelular segundos mensageiros adenosina mono fosfato cíclico (CAMP) e guanosina mono fosfato cíclico (cGMP) pelo (s) subtipo (s) de PDE respetivo (s). Isso enzimas de 3 'cíclico,5'-nucleótido PDE são um componente criticamente importante da via de sinalização da proteína cinase A de AMPc (PKA). Foram identificadas 11 famílias PDE. A super família das enzimas de PDE consiste em pelo menos nove genes de Famílias (tipos), PDE1 a PDE11. Algumas famílias PDE são muito diversas e consistem em vários subtipos e numerosos isoforma-splice variantes.

Exemplos de inibidores de PDE inespecíficos são teofilina e compostos de xantina relacionados, cafeína, amino felina,

etc. A vinpocetina é um inibidor seletivo de PDE1. Os inibidores seletivos de PDE2 conhecidos são EHNA ou anagrelida, os inibidores seletivos de PDE3 são enoximone ou milrinone.

PDE4 é a principal enzima metabolizadora de AMPc encontrados em células inflamatórias e imunes. Inibidores de PDE4 têm potencial comprovado como fármacos anti-inflamatórios, em doenças pulmonares inflamatórias tais como asma, DPOC e rinite. Eles suprimem a liberação de citocinas e outros sinais inflamatórios, e inibir a produção de espécies reativas de oxigênio. Inibidores de PDE4 conhecidos são por exemplo Mesembrine, Rolipram, Ibudilast, etc.,

Os inibidores da PDE5 são metabolizados a enzima CYP3A4 do citocromo P450. O potencial existe para interações medicamentosas adversas com outras drogas que inibem ou induzem o CYP3A4, incluindo a protease do HIV inibidores, cetoconazol, itraconazol e outros anti-hipertensivos como nitro-spray. Exemplos de PDE5 são Sildenafil, Tadalafil, Verdenafil ou Udenafil.

A fibrose cística (FC) é uma doença genética resultante a partir de mutações num gene de 230kb no cromossoma 7 codificando um polipéptido de 1480 aminoácidos conhecido como Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR) que serve como um canal de cloreto em epitélio membranas. Foram identificados mais de 1000 alelos mutantes a data. A mutação mais comum,  $\Delta F508$ , é a deleção de um resíduo de fenilalanina no codão 508 no Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR). Esta mutação resulta numa redução na função CFTR, e leva à clássica fibrose cística

fenótipo caracterizado por anormalidade em funções da glândula como cloreto de suor elevado, Infecção respiratória com bronquiectasias e início precoce De insuficiência pancreática.

Clinicamente, a FC é geralmente suspeita quando as características fenotípicas CF mais típicas estão presentes num sujeito. Esta pode ser uma doença pulmonar crónica muito frequentemente associada a alterações gastrointestinais e anormalidades (por exemplo, insuficiência pancreática e Pancreatite), síndromes de perda de sal e anomalias (isto é, azoospermia obstrutiva). No pulmão do ser humano, as secreções espessas e tenazes obstruem a vias aéreas e glândulas submucosas, que expressam CFTR. A dilatação ductular destas glândulas (associada a obstrução pelo muco) e o reboco das superfícies das vias aéreas por detritos mucopurulentos espessos, viscosos, dominados por neutrófilos estão entre as marcas patológicas da doença. A inflamação pulmonar é outra das principais causas do declínio da função respiratória em indivíduos com fibrose cística e pode preceder o aparecimento de infeção crónica.

Impacção mucina e concreções espessas no tecido pancreático conduzir a fibrose crónica, substituição gordurosa da glândula, ou ambos, num grande subgrupo de sujeitos com diagnóstico prévio de pancreatite idiopática ou alcoólica.

A fibrose cística é a hereditária fatal mais comum doença na população caucasiana, afetando 4 em 10.000 crianças. Nos Estados Unidos, a média idade de morte aumentou de 8,4 anos em 1969 idade de 14,3 anos em 1998. A idade média de morte aumentou de 14 anos em 1969 para 32,4 anos de idade em 2003 (Fundação de Fibrose Cística). Para

crianças nascidas na década de 1990, prevê-se que a sobrevivência mediana seja superior a 40 anos. Um contributo importante para o aumento da esperança de vida é o tratamento melhorado das infeções do trato e eliminação de muco em indivíduos com FC bem como nutrição melhorada e diagnóstico precoce.

Perda da condutância transmembrana da fibrose cística da regulação (CFTR) da condutância aniónica das membranas apicais do epitélio das vias aéreas perturba a regulação da camada líquida de superfície das vias respiratórias. Isso leva a depuração muco ciliar, infeção das vias aéreas e inflamação característico da fibrose cística (FC). O comum da mutação  $\Delta F508$  de CFTR está presente em pelo menos um alelo em > 90% dos pacientes com FC e > 50% dos pacientes são homozigóticos para  $\Delta F508$ , sendo o restante composto heterozigoto. Uma questão central na doença dos FC é a incapacidade desta variante comum de CFTR para conseguir o nativo, dobrado o estado que irá sair do retículo endoplasmático (ER) e tráfego para a membrana apical da célula epitelial.

Se a aquisição da conformação nativa for retardada, CFTR é pensado para manter excessiva ou prolongadas interações com chapeirões moleculares, que são alvo para a degradação por mecanismos que a polícia da ER para dobrarem de forma incompleta as proteínas complexas. A degradação associada ao ER (ERAD) envolve um substrato de proteínas aberrantes e sua entrega ao proteassoma para digestão. Se o ERAD estiver atrasado a taxa de síntese proteica, ou durante o tratamento com inibidores de proteassoma, agregados da proteína mutante acumulados. CFTR foi o primeiro mamífero membranas integral da proteína a ser identificado como um substrato para proteína de proteassoma

da degradação mediada, e tem servido como um modelo para a crescente lista de doenças de conformação de proteínas, que são responsáveis por um conjunto diverso de etiologias.

Essencialmente, todos os  $\Delta 508$  CFTR produzidos pela célula foram destruídos pelo ERAD. Além disso, devido ao seu complexo padrão de dobramento, 60-70% da proteína de tipo selvagem (wt) pode ser degradada de forma semelhante, embora isso possa variar entre células tipos. Os padrões de clivagem proteolítica das formas de peso e CFTR de F508 são semelhantes, ao padrão de digestão da CFTR madura que é diferente. Esta conclusão apoia o conceito de que pelo menos uma mutante CFTR mutada com RE está presente num intermediário que é formada ao longo da dobra normal CFTR, em oposição à formação de uma variante da proteína. Para  $\Delta F508$  CFTR, este intermediário de conformação não pode ir além de um passo crítico do processo de dobragem, mas isso implica que  $\Delta F508$  CFTR poderia ser resgatado se fosse possível facilitar esta etapa.

Uma variedade de condições experimentais, de temperatura reduzida, incubação com chapeirões químicos, ou corretores farmacológicos, podem promover a F508 CFTR do ER, resultando numa função da união na superfície da célula. Além disso, os investigadores relataram a restauração da função  $\Delta F508$  CFTR por co expressão de várias construções CFTR parciais ou subdomínios de CFTR de wt. Contudo, um consenso para os quais os subdomínios CFTR são eficazes na proteína mutante do resgate não é aparente, e o mecanismo deste efeito permanece obscuro. Além disso, o fragmento induzido pelo fragmento CFTR do resgate tem sido observados principalmente em células exógenas acima expressas tanto o



fragmento CFTR como o comprimento total  $\Delta F508$  CFTR.

O documento WO 08/098196 descreve o tratamento de Fibrose com Treprostinil. Fibrose pulmonar, entretanto, é uma doença pulmonar intersticial causada pelo cúmulo de fibras de colagénio no pulmão; isso restringe a capacidade do pulmão de inalar ar: o pulmão perde a sua complacência e a resistênciã das vias aéreas aumenta (=  $1/\text{resistênciã}$ ). À medida que a doença avança é também um aumento na resistênciã vascular. O local de ação do Treprostinil na fibrose pulmonar é a vasculatura e o espaço intersticial na alvéola.

Tissieres et al., descreve estudos usando lloprost para o tratamento de um paciente com fibrose cística e Hipertensão pulmonar. É revelado que o Lloprost aerolizado foi eficaz na diminuição da pressão arterial (Os anais da cirurgia torácica, vol., 78, N°3, E48-E50).

US2001/006979 A1 descreve o uso de prostaciclina derivados como o lloprost ou o Cicaprost para o tratamento de doenças fibróticas.

A fibrose cística não está relacionada à fibrose pulmonar porque é uma doença que se origina na doença brônquica epitélío. Devido à ausência de CFTR, não há muito pouca água no muco que cobre o brônquio epitélío; consequentemente, os cílios não conseguem que a mucosa e a depuração muco ciliar se decomponha (muco ciliar como uma correia transportadora, onde a os cílios bateram ritmicamente de maneira concentrada para o muco de volta para a traqueia e a faringe, de onde pode ser eliminado por deglutição ou tosse etc.). Se o mucociliar quebra, as bactérias não podem ser removidas

dos brônquios, os brônquios são colonizados por bactérias e há ataques repetidos de infecções pulmonares que destroem o pulmão. A situação pode ser corrigida através da CI- fluxos para o epitélio brônquico. Assim, na fibrose cística o local de ação é o epitélio das vias aéreas brônquios o local de ação é anatomicamente distinto (pulmão interstício versus via aérea brônquica), envolve um conjunto diferente de células (fibroblastos, células musculares lisas vasculares, endotélio versus absorção e secreção de epitélio brônquico células) e presumivelmente também envolve diferentes recetores (Recetor de prostaciclina vs. possivelmente recetor EP2).

DE102005016345A1 e US2005101608A1 descrevem o uso de inibidores de PDE5 para o tratamento de hipertensão pulmonar.

O documento US2009325976A1 revela uma nova prostaciclina de derivados que podem ser utilizados também em combinação com um inibidor de PDE 5 para utilização no tratamento da hipertensão arterial.

Os inibidores de PDE clinicamente utilizados foram ativando a secreção do cloreto no ambiente de baixa CAMP tal como descrito por Cobb B.R. Et al., (Am J Respir Cell Mol Biol. 2003 Sep; 29 (3 Pt1): 410-418).

Inibidores de PDE 5, Sildenafil e Vardenafil, e o seu papel no transporte de cloretos na fibrose cística são descritos por Lubamba B. Et al. (Am J Respir Crit Care Med. 2008 1 de Março; 177 (5): 506-515).

Inibidores de PDE 5 e seu papel no CFTR de  $\Delta F508$

Canal é descrita por Clarke Lane L. (J Respir Crit Care Med. 2008 1 de Março; 177 (5): 469-70).

No documento WO2010106494A1 a utilização de mesembrina HCl, um inibidor de PDE4 fraco conhecido para tratar distúrbios é revelado.

US20070249668 descreve uma composição contendo um inibidor de PDE e um análogo de prostaciclina para aumentar o conteúdo de ATP nos glóbulos vermelhos.

Atualmente, nenhum tratamento de fibrose cística que melhora significativamente a qualidade de vida dos pacientes durante um período mais longo. Portanto, é um objeto da invenção proporcionar composições para tratamento que podem aumentar a expressão de CFTR e/ou cloreto de F508 canal em células epiteliais do pulmão.

#### Breve descrição da invenção

O objetivo da invenção é conseguido proporcionando uma composição compreendendo pelo menos uma prostaciclina ou um análogo ou um sal farmacologicamente aceitável selecionado do grupo de Treprostinil, lloprost, Cicaprost ou Beraprost ou farmacologicamente aceitável seus sais em combinação com pelo menos um inibidor de PDE4 para utilização na prevenção ou tratamento da fibrose cística. Como uma forma de realização alternativa, a referida composição pode ainda compreender pelo menos uma PDE5 e/ou PD7 e/ou PDE8 inibidor. Numa forma de realização da presente invenção, o o análogo de treprostinil é um isômero de Treprostinil.

De acordo com a invenção, o inibidor de PDE4 pode ser especificamente selecionado do grupo de Ro

20-1724, Ibudilast, Roflumilast e seu N-Óxido, Cilomilast, BAY 19-8004, CC3, AWD 12-281, SCH 351591, Ciclamilast, Piclamilast, CGH2466, Mesembrina, Rolipram, Luteolina e Drotaverina.

De acordo com a invenção, o inibidor de PDE5 pode ser especificamente selecionado a partir de Avanafil, Lodenafil, Mirodenafil, citrato de sildenafil, Tadalafil, Vardenafil e Udenafil; os inibidores de PDE7 e PDE8 podem ser selecionados de Dipiridamol, BRL-50481 e PF-04957325.

De acordo com uma forma de realização específica da invenção, a composição consiste especificamente num único tipo de análogo de prostaciclina e um tipo de inibidor de PDE4.

Como realização específica, a composição compreende Treprostinil e um inibidor de PDE4 selecionado do grupo de RO 20-1724, Roflumilast e Ibudilast.

Uma outra forma de realização da invenção, a composição compreende inibidores de PDE adicionais selecionados a partir de inibidores de PDE5, PDE7 ou PDE8.

Numa outra forma de realização, a invenção proporciona uma composição isenta de interferência.

Especificamente, a composição da invenção é formulada como uma composição farmacêutica. Podem ser utilizadas quaisquer formas de administração conhecidas para administrar a combinação inventiva, por exemplo pode ser administração intravenosa ou subcutânea ou administração por inalação, ou numa forma oralmente disponível

selecionado do grupo de formas de libertação sustentada, comprimidos e cápsulas.

De acordo com uma forma de realização específica, a quantidade de treprostinil ou uma quantidade farmacologicamente aceitável do seu sal é preferencialmente de cerca de 1,0n/kg de corpo do peso, o Ibudilast é preferivelmente até 5x30mg, de preferência até 2 x 30mg a quantidade eficaz do inibidor de PDE4 é de aproximadamente 0,5mg. Adicionalmente, um ou mais inibidores do grupo de inibidores de PDE5 e PDE7 pode estar contido numa quantidade eficaz de cerca de 0,5mg de cada um dos inibidores.

A presente divulgação também proporciona um invitro para aumentar o nível de cAMP numa célula em que a referida célula é posta em contacto com pelo menos uma prostaciclina ou análogo de prostaciclina e pelo menos um inibidor de PDE4 ou um seu sal farmacologicamente aceitável. Além disso, um inibidor PDE5, PDE7 e/ou PDE8 pode ainda ser utilizado de acordo com o referido método.

Especificamente, a célula é uma célula epitelial, mais especificamente, pode ser uma célula bronco epitelial.

É também divulgada uma combinação terapêutica, compreendendo pelo menos uma prostaciclina ou análogo de prostaciclina e pelo menos um inibidor de PDE4 ou um farmacologicamente aceitável do mesmo, em que a prostaciclina análogo e o inibidor de PDE4 são fornecidos em quantidades que, em conjunto, são suficientes para tratar e/ou menos um sintoma associado com fibrose cística. Mais especificamente, o análogo de prostaciclina e o inibidor de PDE4 são formulados para administração por

inalação.

A referida composição terapêutica pode, a uma realização alternativa, contêm pelo menos mais um inibidor selecionado do grupo de PDE5, PDE7 e inibidores de PDE8.

Figuras:

Fig. 1: Acumulação de AMPc em células IB3-1 após incubação com treprostínil sozinho ou em combinação com os inibidores de PDE 4 Ibudilast (100µM) e cilostazol (100µM).

Fig. 2: Acumulação de AMPc em células IB3-1 após incubação com treprostínil em combinação com o os inibidores de PDE 4 RO-20-1724 (100µM) e Roflumilast (10µM).

Fig. 3: Ativação de uma corrente Cl pelo Treprostínil na Epitelial brônquica humana IB3-1 linha transiente Expressando CFTR-wt.

Fig. 4: Acumulação de AMPc em células IB3-1 estimuladas Por Treprostínil 10µM na ausência e na presença das concentrações indicadas de dipiridamol, Ibudilast, RO20-1724 ou Roflumilast. Células foram metabolicamente pré-marcados com [3H] adenina para 4h e subsequentemente incubadas com os compostos durante 30 min. A formação de [3H] cAMP foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados são meios 6 s.e.m. (N = 3).

Fig. 5: Curva de concentração-resposta para Treprostínil induzido em acumulação de cAMP em células IB3-1. Células foram incubadas com concentrações crescentes de Treprostínil na ausência e na presença das concentrações de Ibudilast, RO20-1724 ou Roflumilast. As células foram

metabolicamente pré-marcadas com [3H] adenina durante 4h e subsequentemente incubadas com os compostos indicados durante 30 min. A formação de [3H] cAMP foi determinada conforme descrito em materiais e métodos. Os dados são meios  $\pm$  6 s.e.m. (N = 3).

Fig. 6: Efeito de inibidores de fosfodiesterase selecionados sobre o acúmulo basal de cAMP em células IB3-1. células foram metabolicamente pré-marcadas com [3H] adenina para 4 h e subsequentemente incubadas na ausência (basal) e presença das concentrações de dipiridamole, Ro-20-1724 ou Roflumilast durante 30 min. Os níveis de [3H] cAMP foram determinados como delineado sob materiais e métodos. Os dados são meios  $\pm$  6 S.e.m. (N = 3).

#### Descrição detalhada da invenção

Verificou-se surpreendentemente pelos inventores que prostaciclina ou análogos ou um fármaco farmacologicamente aceitável sal do mesmo, selecionado do grupo de Treprostinil, Lloprost, Cicaprost ou Beraprost ou farmacologicamente seus sais aceitáveis em combinação com uma PDE4 inibidor pode ser utilizado no tratamento da fibrose cística. Isso foi mostrado que uma combinação de prostaciclina ou prostaciclina análogos e inibidores de PDE4 têm efeito sinérgico CAMP, especificamente na via aérea humana afetada células epiteliais, em comparação com o uso de substâncias individuais. O referido efeito pode ainda ser reforçado pela presença de outros inibidores de PDE selecionados a partir de PDE5, PDE7 e inibidores de PDE8.

Os análogos de prostaciclina sintéticos são Treprostinil, Lloprost, Cicaprost ou Beraprost.

Treprostínil é comercializado como Remodulina<sup>™</sup>. Treprostínil é um derivado de (1R, 2R, 3aS, 9aS) - [[2,3,3a, 4,9,9a-hexa-hidro-2-hidroxi-1 - [(3S) -3-hidroxi-octil] -1H-benz [f] inden-5-il] oxi] acético.

O Iloprost é comercializado como "Ilomedine" e é um 5 - {(E) - (1S, 5S, 6R, 7R) -7-hidroxi-6 [(E) - (3S, 4RS) -3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil] -bi- ciclo [3.3.0] octan-3-Ilidenelpentanoico.

O Beraprost é um ácido 2,3,3a, 8b-tetra-hidro-2-hidroxi-1- (3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil) -1H-ciclopenta (B) ácido benzofuran-5-butanóico.

Cicaprost é uma 2 - [(2E) -2 - [(3aS, 4S, 5R, 6aS) -5-Hidroxi-4 - [(3S, 4S) -3-hidroxi-4-metilnona-1,6-diinil] -3,3a, 4,5,6,6a-hexa-hidro-1H-pentalen-2-ilideno] etoxi] acético.

Os análogos de prostaciclina ou de prostaciclina adequados incluem formas de libertação sustentada, formas inaladas e formas de Treprostínil, lloprost, Cicaprost ou Beraprost.

De acordo com uma forma de realização específica da invenção, o Treprostínil é um isómero de Treprostínil.

Da mesma forma, lloprost, Cicaprost ou Beraprost podem incluir os seus isómeros. Um composto farmacologicamente aceitável de sal de uma prostaciclina ou um análogo de prostaciclina desta invenção pode ser formada entre um ácido e um ácido do grupo básico do composto, tal como um grupo amino funcional do grupo, ou uma base e um grupo ácido do composto, tal como um grupo funcional carboxilo.



Especificamente, sais fisiologicamente aceitáveis dos análogos de prostaciclina incluem sais derivados de bases. Os sais de base incluem sais de amónio (tais como sais de quaternário sais de amónio), sais de metais alcalinos tais como os de sódio e sais de potássio, sais de metais alcalino-terrosos tais como aqueles de cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas tal como diciclo-hexilamina e N-metil-D-glucamina, e sais com aminoácidos tais como arginina e lisina.

Especificamente, a utilização de Treprostinil é vantajosa de acordo com a invenção. O Treprostinil pode aumentar a expressão de CFTR de  $\Delta F508$  e/ou a função do canal de cloreto em células epiteliais do pulmão dos pacientes com fibrose cística.

Foi surpreendentemente mostrado que uma prostaciclina análogo em combinação com um inibidor de PDE4 e opcionalmente em combinação com uma PDE5 e/ou PDE7 e/ou inibidor de PDE8 leva a estimulação sinérgica de produção de AMPc e/ou aumento do conteúdo de AMPc Bronco epiteliais.

Interessantemente inibidores de PDE3 como Anagrelida e cilostazol não induzem qualquer acumulação de AMPc Em experimentos.

Dada esta capacidade de estimular a produção de AMPc através do recetor IP, e a presença limitada de IP recetores para um pequeno número de tipos celulares (tais como epitélio células pulmonares), uma prostaciclina ou um seu análogo, para exemplo Treprostinil pode induzir a expressão e gating de CFTR e mutCFTR de uma maneira

específica que podem ser utilizados para o tratamento da FC, em particular, quando combinados com os referidos inibidores de PDE4 para induzir um aumento duradouro em níveis de AMPc dentro do epitélio das vias aéreas.

De acordo com uma outra forma de realização, o referido AMPc pode ser ainda induzido pela combinação de um inibidor de PDE4 com outros inibidores de PDE do grupo de inibidores de PDE5, PDE7 e/ou PDE8.

Os inibidores da PDE4 são aprovados para o tratamento de DPOC e asma; o principal alvo da DPOC e asma é reduzir a hiper-reatividade do músculo liso das células que revestem as vias aéreas. Aumentar os níveis de AMPc em células musculares tem sido conhecida por causar relaxamento do músculo liso, através da ação sobre a quinase de cadeia leve de miosina. Além disso, pensa-se que os inibidores da PDE da resposta imune que impulsiona a asma alérgica por monócitos, eosinófilos e basófilos granulócitos, B e T das células inflamatórias. Nenhum destes dois mecanismos é relevante como um modo de ação na fibrose. Na fibrose cística, os níveis de AMPc devem ser um compartimento celular muito diferente, isto é, o epitélio das vias respiratórias. De fato, segundo o nosso conhecimento, não existe nenhum relatório científico que demonstre que a PDE4 é a isoforma que melhora o acúmulo de cAMP mediado pelo recetor dentro do epitélio das vias aéreas.

De acordo com a presente invenção, qualquer PDE4 Inibidor pode ser utilizado tendo atividade inibitória para a enzima PDE4. Assim, não se exclui que a PDE4 Inibidor pode ainda inibir outras enzimas PDE também.

Especificamente, o inibidor de PDE4 pode ser um PDE4.

O inibidor de PDE4 da invenção pode ser Ro 20-1724, Ibudilast, Roflumilast (3- (ciclopropilmetoxi) - N- (3,5-dicloropiridin-4-il) -4- (difluorometoxi) Benzamida) e seu N-Óxido, Cilomilast, BAY 19-8004, CC3, AWD 12-281 (N- (3,5-dicloro-4-piridinil) - 2- [1- (4-fluorobenzil) -5-hidroxi-1H-indol-3-il] -2- Oxoacetamida), SCH 351591 (N (3,5-dicloro-1-óxido-4- Piridinil) -8-metoxi-2- (trifluorometil) -5-quinolina carboxamida), Ciclamilast, Piclamilast, CGH2466, Mesembrine, Rolipram, Luteolina e Drotaverina.

Mais especificamente, a composição para a utilização de prevenir ou tratar os FC, especificamente levantando a níveis de cAMP nas células bronco epiteliais de indivíduos com sofrimento de CF pode compreender especificamente Treprostinil e Roflumilast ou Treprostinil e Ibudilast ou Treprostinil e Ro-20-1724. Os inibidores de PDE5 foram mostrados para aumentar os níveis de segundo mensageiro de nucleótidos cíclicos nas células musculares lisas.

De acordo com a presente invenção, qualquer PDE5 inibidor pode ser utilizado tendo atividade inibitória para a enzima PDE5. Assim, não se exclui que a PDE5 inibidor pode ainda inibir outras enzimas PDE também.

De acordo com a invenção, o inibidor de PDE5 pode ser especificamente selecionados a partir de Avanafil (4 - [(3-cloro-4-metoxibenzil) amino] -2- [2- (hidroximetil) -1-pirrolidinil] -N- (2-pirimidinilmetil) - 5-pirimidinacarboxamida), Lodenafil (bis- (2- {4- [4-etoxi-

3- (1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-di-hidro-1H-pirazolo [4,3-d] pirimidin-5-il) -benzenossulfonil] piperazin-1-il} -etil) carbonato de etilo), Mirodenafil (5-etil-3,5-di-hidro-2- [5 - ([4- (2-hidroxi-etil) 1-piperazinil] sulfonil) -2-propoxifenil] -7-propil-4H-pirrolo [3,2-d] pirimidin-4-ona), citrato de Sildenafil (1- [4-etoxi-3- (6,7-di-hidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo [4,3-d] pirimidin-5-il) fenilsulfonil] -4-Metilpiperazina), Tadalafil (6R-trans) -6- (1,3-benzodioxol-5-il) -2,3,6,7,12,12a-hexa-hidro-2-metil-pirazino[1', 2': 1,6] pirido [3,4-b] indole-1,4-diona), Vardenafil (4- [2-etoxi-5- (4-etilpiperazin-1-il) sulfonil-fenil] -9-metil-7-propil-3,5,6,8-tetrazabicyclo[4.3.0] nona-3,7,9-trien-2-ona) ou Udenafil (3- (1-metil-7-oxo-3-propil-4,7-di-hidro-1H-pirazolo [4,3-d] pirimidin-5-il) -N- [2- (1-metilpirrolidin-2-il) etil] -4-propoxibenzenossulfonamida).

Numa forma de realização específica da invenção, a composição pode compreender Treprostínil, Roflumilast e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Treprostínil, Ibudilast e opcionalmente PDE5, PDE7 ou PDE8 inibidor ou Treprostínil, Ro-20-1724 e opcionalmente PDE5, PDE7 ou PDE8.

Numa outra forma de realização da invenção, a composição pode compreender Beraprost, Roflumilast e opcionalmente um inibidor de PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Beraprost, Ibudilast e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Beraprost, Ro-20-1724 e opcionalmente uma PDE5, PDE7 ou inibidor de PDE8.

Numa outra forma de realização da invenção, a composição pode compreender lloprost, Roflumilast e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou lloprost, Ibudilast

e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Lloprost, Ro-20-1724 e opcionalmente uma PDE5, PDE7 ou PDE8.

Numa outra forma de realização da invenção, a composição pode compreender Cicaprost, Roflumilast e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Cicaprost, Ibudilast e opcionalmente um inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 ou Cicaprost, Ro-20-1724 e opcionalmente uma PDE5, PDE7 ou inibidor de PDE8.

De acordo com a presente invenção, qualquer PDE7 ou inibidor de PDE8 pode ser utilizado tendo atividade inibitória para a enzima PDE7 ou PDE8. Assim, não é excluído que o inibidor PDE7 ou PDE8 pode inibir ainda mais outras enzimas PDE também.

De acordo com a invenção, o inibidor de PDE7 pode ser especificamente selecionado a partir de dipiridamole e BRL50481.

De acordo com a invenção, o inibidor de PDE8 pode ser especificamente selecionado a partir de nipecótico substituído por 1,5 amidas e PF-4957325.

Numa realização alternativa da invenção, a composição pode compreender especificamente Treprostinil, Roflumilast e Dipiridamole ou Treprostinil, Ibudilast e Dipiridamole ou Treprostinil, Ro-20-1724 e Dipiridamole.

Numa outra forma de realização alternativa da invenção, a composição pode compreender especificamente Beraprost, Roflumilast e Dipiridamole ou Beraprost, Ibudilast e Dipiridamole ou Beraprost, Ro-20-1724 e Dipiridamole.

Ainda noutra forma de realização alternativa da Invenção, a composição pode compreender especificamente lloprost, Roflumilast e Dipiridamole ou lloprost, Ibudilast e Dipiridamole ou lloprost, Ro-20-1724 e Dipiridamole.

Numa outra forma de realização da invenção, a composição pode compreender especificamente Cicaprost, Roflumilast e Dipiridamole ou Cicaprost, Ibudilast e Dipiridamole ou Cicaprost, Ro-20-1724 e Dipiridamole.

Alternativamente, a composição pode compreender Treprostinil, Roflumilast e BRL 50481 ou Treprostinil, Ibudilast e BRL 50481 ou treprostinil, Ro-20-1724 e BRL 50481.

Alternativamente, a composição pode especificamente compreender Treprostinil, Roflumilast e PF-4957325 ou Treprostinil, Ibudilast e PF-4957325 ou Treprostinil, Ro-20-1724 e PF-4957325.

De acordo com a invenção, o termo "pelo menos um" ou "a" significa que um tipo de prostaciclina ou prostaciclina análogo e um tipo de inibidor de PDE4 e opcionalmente um ou mais inibidores de PDE5, PDE7 ou PDE8 está presente para utilização no tratamento ou prevenção de fibrose, especificamente para o uso para aumentar o AMPC nas células bronco epiteliais. No entanto, alternativamente, a composição pode também compreender mais de um tipo de prostaciclina ou análogo de prostaciclina e mais de um tipo de inibidor de PDE4 e opcionalmente um ou mais de PDE5, PDE7 ou PDE8, especificamente dois, três, quatro ou mais de quatro tipos ou quaisquer combinações de

prostaciclina ou análogos de prostaciclina e PDE4 e opcionalmente PDE5, PDE7 e/ou PDE8.

A invenção proporciona ainda uma composição específica compreendendo Treprostinil e uma ou mais PDE4 inibidores selecionados do grupo de RO 20-1724, Roflumilast e Ibudilast.

A composição da invenção pode ser formulada como uma composição farmacêutica.

A composição da invenção pode estar presente em qualquer forma que possa ser utilizada para administração.

A dose específica de um composto administrado de acordo com a presente invenção para obtenção de agentes terapêuticos ou profiláticos os efeitos serão, obviamente, determinados pela circunstâncias particulares do processo, incluindo, por exemplo, a via de administração, a idade, peso e resposta do paciente individual, a condição do tratamento e a gravidade dos sintomas do doente.

Em geral, os compostos da invenção são mais desejavelmente administrados a uma concentração de resultados efetivos sem causar sérios efeitos colaterais e pode ser administrado como dose única unitária, ou se desejado, a dosagem pode ser dividida em subunidades convenientes administradas em momentos adequados ao longo do dia.

A composição pode ser proporcionada numa variedade de sistêmicas e tópicos. O sistema ou tópico das formulações da invenção são selecionadas a partir do intrabucal, intrapulmonar, retal, intrauterino,

intradérmica, tópica, dérmica, parentérica, intratumoral, intracraniana, intrapulmonar, bucal, sublingual, nasal, subcutânea, intravascular, intratecal, inalienável, respirável, intra articular, intra cavitária, implantável, transdérmica, iontoforico, intraocular, oftálmico, vaginal, ótica, intravenosa, intramuscular, intra glandular, intraorgânico, intra limático, de libertação lenta e entérico formulações. A preparação e composição reais destas diferentes formulações é conhecida na técnica e não precisam ser aqui detalhado. A composição pode ser administrada uma ou várias vezes por dia.

As formulações adequadas para respiratória, nasal, intrapulmonar, e a administração por inalação são preferidas, como são as formulações tópicas, orais e parentéricas. Em geral, as formulações são preparadas de forma uniforme e aproximando intimamente o composto ativo em associação com um transportador líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e depois, se necessário, moldando o produto nas formulações desejadas.

Composições adequadas para administração oral podem ser apresentadas em unidades discretas, tais como cápsulas, hóstias, pastilhas ou comprimidos, contendo cada um a composição como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso; ou como um óleo-em-água ou emulsão água-em-óleo.

Composições adequadas para administração parentérica que compreendem injeção aquosa e não aquosa estéril solução do composto ativo, cujas preparações são preferencialmente isotônicos com o sangue do recetor.

Estas preparações podem conter antioxidantes, tampões, agentes bacteriostáticos e solutos que tornam as



composições isotónica com o sangue do recetor. Aquosos e suspensões estéreis não aquosas podem incluir suspensão de agentes e agentes espessantes. As composições podem ser apresentadas em embalagens de dose unitária ou multidose, por exemplo ampolas e frascos selados, e podem ser armazenados em condições liofilizadas ou liofilizadas que apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo, solução salina ou água para injeção imediatamente antes da utilização.

As formulações nasais e instiláveis compreendem soluções aquosas do composto ativo com conservante de agentes e agentes isotónicos. Tais formulações são preferencialmente ajustados a um pH e estado isotónico compatível com as mucosas nasais.

A composição revelada de acordo com a invenção pode ser administrada no sistema respiratório por inalação, respiração, administração nasal ou instilação intrapulmonar (nos pulmões) de um indivíduo por quaisquer meios adequados e são preferencialmente administrados por gerando um aerossol ou pulverizador composto por pó ou líquido nasal, intrapulmonar, respirável ou inalável. Partículas. As partículas respiráveis ou inaláveis compreendendo o composto ativo é inalado pelo indivíduo, de inalação ou por administração nasal ou por instilação no trato respiratório ou o próprio pulmão. A formulação pode compreender partículas líquidas ou sólidas respiráveis ou inaláveis do composto ativo que, de acordo com a presente invenção, incluem partículas respiráveis ou inaláveis de tamanho suficientemente pequeno para passar pela boca e laringe por inalação e continuam para os brônquios e alvéolos dos pulmões. Em geral, partículas que variam de cerca de 0,05, cerca de 0,1, cerca de 0,5, cerca de 1,

cerca de 2 a cerca de 4, cerca de 6, cerca de 8, cerca de 10 micra de diâmetro. Mais particularmente, cerca de 0,5 a menos do que cerca de 5  $\mu\text{m}$  em são respiráveis ou inaláveis. Partículas de não respiráveis do tamanho que estão incluídos num aerossol ou spray tendem a depositar na garganta e ser engolidos. A quantidade de partículas não respiráveis no aerossol é, assim, prefimimizada. Para administração nasal ou intrapulmonar instilação, um tamanho de partícula na gama de cerca de 8, cerca de 10, cerca de 20, cerca de 25 a cerca de 35, cerca de 50, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 250, cerca de 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro é preferida para assegurar a retenção na cavidade nasal ou para instilação e deposição direta no pulmão. Formulações de líquido podem ser injetadas no aparelho respiratório ou nariz e pulmão, particularmente quando administrado a recém-nascidos e lactentes.

Os aerossóis de partículas líquidas compreendendo o composto pode ser produzido por quaisquer meios adequados, tal como com um nebulizador. Os nebulizadores são comercialmente dispositivos disponíveis que transformam soluções ou suspensões do ingrediente ativo num aerossol terapêutico por meio da aceleração de um sistema de compressão a Gás, tipicamente ar ou oxigênio. As composições adequadas para uso no nebulizador consiste no ingrediente ativo em líquido portador, compreendendo o ingrediente ativo até 40% p/p composição, mas de preferência menos de 20% p/p de transportador sendo tipicamente água ou uma solução alcoólica aquosa diluída, de preferência isotónica com fluidos corporais pela adição de, por exemplo, cloreto de sódio. Aditivos opcionais incluem conservantes se a composição não estiver preparada estéril, por exemplo, Hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes aromatizantes, óleos voláteis,

agentes tampão e tensioativos. Os aerossóis de partículas sólidas compreendendo o composto pode igualmente ser produzido com qualquer gerador de aerossol de medicamento particulado. Geradores de aerossol para administração de medicamento em partículas sólidas, partículas do produto que são respiráveis, como explicado acima, e gerar um volume de aerossol contendo um predeterminada de um medicamento a uma taxa adequada para administração humana. Exemplos de tais aerossóis os geradores incluem inaladores de dose calibrada e insufladores.

Numa realização, o dispositivo de administração compreende um inalador de pó seco (DPI) que fornece ou doses múltiplas da composição. A dose única do inalador pode ser proporcionado como um kit descartável que é pré-carregado esterilmente com formulação suficiente para uma aplicação. O inalador pode ser proporcionado como um inalador, e a formulação num dispositivo de perfuração ou cápsula ou cartucho. O kit pode opcionalmente compreender também num recipiente separado um agente tal como outros agentes terapêuticos compostos, excipientes, surfatantes (destinados a serem agentes, bem como ingredientes de formulação), antioxidantes, agentes aromatizantes e corantes, agentes de enchimento, óleos, agentes tamponantes, dispersantes, tensioativos, antioxidantes, agentes aromatizantes, agentes de volume, propulsores e conservantes, entre outros aditivos adequados para as diferentes formulações.

Devido à elevada estabilidade metabólica de algumas análogos como o Treprostinil, ou se fornecidos como as formas baseadas ou peguilhadas da prostaciclina ou prostaciclina análogos, as substâncias também podem ser administradas como medicamentos de depósito.

PDE4, PDE5, PDE 7 e PDE8 são metabolicamente estável, portanto, a combinação de a prostaciclina ou análogo de prostaciclina e a PDE4 inibidor opcionalmente em conjunto com um ou mais de PDE5, os inibidores de PDE 7 ou PDE8 também podem ser formulados como medicamentos.

A libertação em aerossol da composição pode resultar em uma distribuição mais homogênea do agente num pulmão, de modo que o pulmão profundo é obtido. Assim a dosagem de aplicação pode ser reduzida devido à presença constante do agente no local de ação do pulmão.

A composição pode, por exemplo, ser dada por um nebulizador. A vantagem do método nebulizador é menos da substância atinge o nível sistêmico circulação. A composição pode ser dada várias vezes por dia, por exemplo, cinco a dez vezes por dia, devido ao efeito sinérgico da prostaciclina ou da prostaciclina análogo e a PDE4, opcionalmente em combinação com um ou mais inibidores de PDE5, PDE7 e/ou PDE8, a frequência de dosagem pode geralmente ser reduzida.

A composição pode ser administrada com qualquer substâncias ou veículos farmacêuticamente aceitáveis ou excipientes conhecidos na arte. Estas podem ser, por exemplo, mas não estão restritos à água, agentes neutralizantes como NaOH, KOH, estabilizadores, DMSO, solução salina, betaína, taurina, Etc., O termo "farmacêuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora da união ou de um Governo ou listados nos EUA.

O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, Excipiente ou veículo com o qual a composição farmacêutica

é administrada. Soluções salinas e soluções aquosas dextrose e glicerol podem também ser empregues como líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Adequados Excipientes incluem amido, glucose, lactose, sacarose, Gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, Monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, seco Leite desnatado, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e o gosto. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" Por E.W. Martin. A formulação deve ser selecionada de acordo com o modo de administração.

A quantidade da composição da invenção pode ser selecionado por qualquer pessoa qualificada, especificamente o montante das prostaciclina ou análogos de prostaciclina ou farmacologicamente os seus sais aceitáveis, especificamente a quantidade de Treprostinil é de pelo menos 1,0ng/kg de peso corporal. A quantidade de inibidor PDE4 ou PDE5 pode ser também facilmente selecionado por pessoas qualificadas. Especificamente, o montante de PDE4 ou PDE5 ou PDE 7 ou PDE8 é de cerca de 0,5 mg para Roflumilast ou cerca de 30 mg de Ibudilast, pelo menos uma vez por dia, especificamente pelo menos duas vezes por dia.

A presente divulgação proporciona adicionalmente uma para aumentar o nível de cAMP numa célula em que a referida célula é posta em contacto com pelo menos uma prostaciclina ou análogo de prostaciclina e pelo menos uma PDE4 e opcionalmente pelo menos um dos inibidores PDE5, PD7 ou PDE8. O aumento de AMPc nas referidas células pode ser pelo menos 10%, de preferência pelo menos 25%, de preferência pelo menos 50%, mais pré-

pelo menos 100% em comparação com o tratamento de uma prostaciclina ou uma PDE4 e/ou PDE5 ou PDE7 ou PDE8 Inibidor.

Uma combinação terapêutica, compreendendo pelo menos um análogo de prostaciclina e pelo menos uma PDE4 e opcionalmente pelo menos um inibidor de PDE5 e/ou PDE7 e/ou inibidor de PDE8, em que o análogo de prostaciclina e PDE4 e/ou inibidor de PDE5 e/ou inibidor de PDE7 e/ou inibidor de PDE8 são fornecidos em quantidades que são suficientes para tratar e/ou prevenir pelo menos um sintoma associado à fibrose cística. Especificamente, um aumento do nível de cAMP nas células epiteliais do pulmão de pacientes com FC pode ser alcançada através da preparação da combinação terapêutica da invenção. Especificamente, pelo menos um dos análogos de prostaciclina e PDE4 e opcionalmente um ou mais de PDE5, PDE7 ou os inibidores de PDE8 são formulados para administração por inalação.

Numa forma de realização específica da presente invenção, uma terapia de combinação é revelada para o tratamento de fibrose. De acordo com uma concretização específica, os sintomas associados a níveis reduzidos de AMPc em pacientes bronco epiteliais células de pacientes com FC podem ser tratadas ou utilizando a terapia de combinação inventiva. Possivelmente, podem também ser administrados um ou mais agentes adicionais.

A prostaciclina ou análogo de prostaciclina e a PDE4 e, opcionalmente, o inibidor PDE5, PDE7 ou PDE8 podem ser administrados em conjunto, por exemplo num único comprimido ou cápsula ou formulação inalatória ou PDE4 e opcionalmente outros inibidores de PDE da invenção

bem como agentes adicionais opcionais podem ser administrados separadamente da prostaciclina ou análogo de prostaciclina.

A divulgação proporciona ainda um kit e a sua utilização para o tratamento ou prevenção de uma condição associada com fibrose num indivíduo, compreendendo (i) uma quantidade eficaz de uma prostaciclina ou análogo de prostaciclina, (ii) uma PDE4, especificamente Roflumilast, Ro-20-1724 ou Ibudilast, e opcionalmente um ou mais compostos selecionados formam o grupo dos inibidores de PDE5, PDE7 e PDE8, (iii) um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis e/ou aditivos e (iv) instruções para utilização no tratamento ou prevenção fibrose crítica num indivíduo, de preferência um ser humano.

Os referidos componentes (i) e (ii) e (iii) podem estar numa forma adequada para administração intravenosa, para inalação ou para administração oral.

Os exemplos aqui descritos são ilustrativos da presente invenção e não se destinam a ser limitações sobre a mesma. Diferentes formas de realização da presente invenção foram descritas de acordo com a presente invenção.

### Exemplos

Exemplo 1:

As células IB3-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços (0,2 \* 10<sup>6</sup> células/poço na Fig. 1; 0,4 \* 10<sup>6</sup> células na Fig. 2) em meio de crescimento completo (LHC-8 + 5% FCS).

Os dias seguintes, o pool de nucleotídeos de adenina foi metabolicamente marcado por incubação com [3H] adenina (1  $\mu$ Ci/poço) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo adenosina-desaminase (1 unidade/ml) durante 4h. Depois disso o meio foi substituído por meio fresco; As células foram estimuladas pela adição exclusiva de Treprostinil (em logaritmicamente concentrações espaçadas entre 0,1 e 30 $\mu$ M) ou de Treprostinil em combinação com concentrações de inibidores de PDE. Após a incubação de 30 min, as células foram lizadas pela adição de perclórico ácido.

A formação de [3H] cAMP foi determinada por Cromatografia sequencial em Dowex 50WX-4 e neutras colunas de alumina seguidas por contagem de cintilação líquida do eluato. O ensaio foi realizado em triplicado.

Os resultados são mostrados nas figuras 1 e 2. A diferença entre a resposta máxima na fig. 1 e Fig. 2 é principalmente devido ao fato de que o número de células/poço na fig. 2 é cerca de duas vezes mais elevada do que a empregada na fig. 1.

Exemplo 2:

As células IB3-1 endogenamente expressam apenas mutação CFTR- $\Delta$ F508, que é retido dentro das células. Usando manipulações apropriadas (por exemplo, fármaco chaperones ou incubações a baixa temperatura), é possível translocar o mutante CFTR- $\Delta$ F508 do endoplasmático retículo para o ER; quando inserido na superfície da célula, uma condutância de Cl<sup>-</sup> pode ser estimulada elevando o cAMP. A condutância de Cl<sup>-</sup> resultante, no entanto, é menor. Em ordem a demonstrar inequivocamente que a acumulação de cAMP



induzida por Treprostinil traduzido numa ativação de CFTR, expressámos transitoriamente uma versão marcada com GFP do tipo selvagem CFTR (o marcador GFP permitiu a identificação de células que expressam a proteína na superfície celular). Como pode ser visto a partir da fig.3, o Treprostinil causou uma ativação robusta da corrente induzida por uma despolarização de -40 mV potencial de retenção para + 60 mV. O máximo efeito foi atrasado, ou seja, foi observado apenas segundos após lavagem do composto. Da mesma forma, houve também uma histerese na reação de desligamento; a corrente decaiu para basal apenas ~ 100 s após a lavagem. Estas respostas demoradas refletem (i) a intervenção de sinalização da cascata (i.e., a ativação dependente do recetor de Gs, a ativação de formação de cAMP c dependente de gás da fosforilação dependente da proteína quinase A resultante de CFTR) e (ii) a desativação retardada de CAMP por fosfodiesterase. Foram também as células estimuladas com forskolina, um ativador direto uma adenilil ciclase, que foi utilizada como um controle.

Estas observações provam que o Treprostinil pode ativar CFTR em células epiteliais brônquicas.

Métodos:

#### *Eletrofisiologia*

Utilizou-se a técnica de "patch clamp" para as gravações atuais realizadas a  $22 \pm 1.5^\circ\text{C}$  utilizando um Amplificador Axoclamp 200B patch clamp (Axon Instruments). As pipetas tiveram resistências entre 1 e 2 M $\Omega$  quando preenchido com a solução de pipeta de gravação (composição: 110 mM de CsCl, 5 mM de EGTA, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1

mM  $K_2$ .ATP, Hepes 10 mM, pH ajustado para 7,2 com CsOH). Foram realizados protocolos de fixação de tensão e aquisição de dados com o software pclamp 6.0 (Axon Instruments). Dados foram filtrados a baixa frequência a 2 kHz (-3 dB) e foram digitalizados a 10-20 kHz. As células foram continuamente superfusões com solução externa (composição: 145 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM de  $CaCl_2$  1 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de glucose, 10 mM Hepes, pH ajustado para 7,4 com NaOH). Quando indicado, a solução externa continha Treprostinil (10  $\mu$ M) ou forskolina (5  $\mu$ M), a comutação entre as soluções foram válvulas de pressão controladas eletronicamente.

Com base nos resultados do exemplo 1, uma resposta é esperada, se o Treprostinil for combinado com inibidores de PDE 4 ou 5, e.g., Roflumilast 10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M Ibudilast ou 10-100  $\mu$ M Tadalafil ou Sildenafil ou Vardenafil.

#### *Cultura de células:*

As células IB3-1 foram cultivadas em placas (Nunc, 3,5 cm Diâmetro) cobertas com fibronectina (10 $\mu$ g/mL) de colagénio de rato I (30 $\mu$ g/mL) e BSA 10 $\mu$ g/mL) em meio LHC-8 (Gibco) contendo 5% de soro fetal de vitelo (FCS). As células foram transfetadas transientemente com um plasmídeo que conduz a expressão de CFTR de tipo selvagem marcado com GFP humano usando Lipofetamina Plus® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

As amplitudes de corrente representativas A de configuração de braçadeira de conjunto de células em +60 mV. Uma Transfetada transitoriamente células IB3-1 expressando GFP-marcadas com CFTR de tipo selvagem que foi selecionado sob

luz fluorescente e fixado a um potencial de retenção a -40 mV. Despolarização foi induzida por um passo de tensão para + 60 mV durante 50 ms e A amplitude atual foi registrada. Lavagem de Treprostinil (Concentração final 10 mM, TP) foi iniciada no ponto de tempo 50 s e terminou a 125 s. Forskolin foi Lavado a 275 s e removido a 375 s. Os resultados são mostrados na figura 3.

### Exemplo 3

#### Introdução

Observações anteriores indicaram que, em células epiteliais das vias aéreas, o acúmulo de cAMP induzido por Treprostinil foi especificamente reforçada por inibidores de Fosfodiesterase-4 (PDE4).

#### Materiais e métodos

##### *Linhas celulares e cultura celular:*

A seguinte célula epitelial brônquica humana de linhas foram obtidas através da ATCC: BEAS-2B (ATCC CRL-9609), NuLi-1 (ATCC CRL-4011), IB3-1 (ATCC CRL-2777), CuFi-1 (ATCC CRL-4013). As células foram propagadas utilizando as condições de cultura descritas na ATCC recomendações, e.g., células I3B-1 foram mantidas em pratos revestidos com fibronectina (10µg/ml) de colagénio de rato I (30µg/ml) e BSA 10µg/mL) em meio LHC-8 (Gibco) contendo 5% de soro fetal de vitelo (FCS) a 37°C numa solução a 5% atmosfera CO2 humificada. As células BEAS-2B foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada a 5% de CO2 sobre pratos pré-revestidos com colagénio IV (60µg/ml em 0,25% ácido acético) em meio BEGM (Lonza); O GA-1000

(Mistura de gentamicina-anfotericina B) fornecida com o BEGM kit não foi adicionado ao meio. O nível de expressão endógena de CFTR foi muito baixa para um sinal confiável. Em conformidade, as células BEAS-2B foram transientes transfetada com um plasmídeo que conduz a expressão de CFTR de tipo selvagem marcado com GFP humano usando Lipofetamina Plus® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células que expressam esta etiqueta GFP CFTR foram identificadas por microscopia de fluorescência e sujeitas a gravações de grampos de remendos como descrito abaixo.

#### *CAMP ensaio de acumulação:*

As células IB3-1 foram semeadas em poços revestidos com PDL de placas de 6 poços (2 a  $2,5 \times 10^5$  células/poço) em (LHC-8+5% FCS). No dia seguinte, a piscina de nucleotídeos de adenina celular foi metabolicamente marcado por incubação com [3H] adenina (1 $\mu$ Ci/poço) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) na presença de adenosina desaminase (5 $\mu$ g/ml) durante 4h. Subsequentemente, o meio foi substituído por DMEM fresco e a formação de cAMP foi estimulada pela adição de 5 $\mu$ M de forskolina, um ativador direto da adenilil ciclase, ou treprostínil 10 $\mu$ M na ausência e presença de diferentes concentrações da seguinte fosfodiesterase (PDE): ibudilast (0,3-1000 $\mu$ M), Ro-20-1724 (0,03 - 300 $\mu$ M), roflumilast (1nM-10 $\mu$ M), dipiridamol (0,01 - 100 $\mu$ M), amrinona (1, 10, 100 $\mu$ M), anagrelida (1, 10, 100 $\mu$ M), enoximona (1, 10, 100 $\mu$ M), milrinona (1, 10, 100 $\mu$ M) e cilostazol (0,1 a 100 $\mu$ M) durante 20 min A 37°C. Em alguns casos, o efeito destes inibidores Sobre a acumulação basal de cAMP foi examinada por incubação na ausência de qualquer estímulo adicional com concentrações crescentes de inibidores de PDE (i.e.,

dipiridamole, Ibudilast e Ro-20-1724 a 1, 10 e 100µM; Roflumilast at e 0,1, 1 e 10µM de Roflumilast). Concentrações de curvas de resposta para treprostnil foram obtidas por adição de treprostnil (0,1 a 30µM) sozinho ou em combinação com 100µM de Ro-20-1724, 100µM de ibudilast ou 5MM de roflumilast. A reação realizada em triplicado foi adicionada 2,5% de ácido perclórico juntamente com CAMP 0,1mM (não marcado). [<sup>3</sup>H]cAMP foi isolado por cromatografia sequencial em Dowex 50W-X4 e neutro de alumina. A formação de [<sup>3</sup>H]cAMP foi quantificada por contagem de cintilação líquida.

*Eletrofisiologia - gravações de grampos:*

Utilizou-se a técnica de "patch clamp" para as gravações atuais realizadas a 22±1.5°C utilizando um Amplificador Axoclamp 200B patch clamp (Axon Instruments). As pipetas tiveram resistências entre 1 e 2 MΩ quando preenchido com a solução de pipeta de gravação (composição: 110mM de CsCl, 5 mM de EGTA, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>ATP, Hepes 10 mM, pH ajustado para 7,2 com CsOH). Foram realizados protocolos de fixação de tensão e aquisição de dados com o software pclamp 6.0 (Axon Instruments). Dados foram filtrados a baixa frequência a 2 kHz (-3 dB) e foram digitalizados A 10-20 kHz. As células foram continuamente superfetadas com solução externa (composição: 145 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glucose, 10 mM Hepes, pH ajustado para 7,4 com NaOH). Quando indicado, a solução externa continha Treprostnil (10µM) ou Forscolina (5µM), a comutação entre as soluções foram válvulas de pressão controladas eletronicamente.

*A acumulação de AMPc na linha celular IB3-1 na ausência da presença de inibidores de fosfodiesterase:*

A pesquisa de isoformas de PDE prevê que os inibidores de PDE devem ter um efeito pronunciado na acumulação do AMPc em células epiteliais brônquicas humanas. Além, desta análise forneceu evidências para a presença de isoformas adicionais de fosfodiesterase. Em conformidade, os inibidores seletivos de PDE-4 Roflumilast e Ibudilast foram testados e o seu efeito foi comparado com o de vários inibidores de PDE adicionais: RO20-1724, um inibidor não seletivo inibidor de PDE com preferência a PDE4; Dipiridamole, que bloqueia o transportador nucleosídeo equilíbrio-1 e -2 (ENT1 e ENT2) e, além disso, inibe PDE5, PDE7A, PDE8A, PDE10A e PDE11 (Soderling Et al., 1998; Hetman et al., 2000a & b; Omori & Kotera, 2007). Amrinona, milrinona e cilostazole, que são inibidores seletivos de isoformas de PDE3; Anagrelida, que inibe PDE2 e PDE3. Ibudilast é menos seletivo que Roflumilast e também inibe PDE10- e PDE11-Isoformas. A abordagem centrou-se nos níveis de cAMP; Daí as enzimas específicas de cGMP PDE5, PDE6 e PDE9 não foram mais considerados (Bender & Beavo, 2006; Omori & Kotera, 2007).

As células tipicamente expressam muitas isoformas de adenilil de Ciclase. Em muitos casos, os recetores que são acoplados para Gs não têm acesso a todas as piscinas de celular de adenilil-ciclases. Em contraste, a forskolina estimula as Isoformas de adenilil ciclase. Na ausência de fosfodiesterase Inibição, o AMPc é rapidamente hidrolisado de tal forma que se acumula apenas a níveis baixos no estado estacionário.

A inibição da fosfodiesterase resulta na acumulação

de AMPc. Roflumilast, Ibudilast, dipiridamole e RO20-1724 aumentaram substancialmente a acumulação de cAMP desencadeada por 5 $\mu$ M de forskolina. O Roflumilast foi o inibidor mais potente e o dipiridamole foi menos potente Inibidor. Ibudilast e RO20-1724 foram mais eficazes de Roflumilast. Em conjunto, estes dados sugerem que as isoformas de PDE4 contribuíram em grande Hidrólise de cAMP. Se a acumulação de cAMP foi desencadeada Treprostinil, a curva concentração-resposta para todos os Inibidores foram deslocados para a esquerda. Este deslocamento para a esquerda indica que o cAMP gerado via estimulação do recetor é mais facilmente acessível à degradação por fosfodiesterase. Uma explicação possível é a ancoragem de Fosfodiesterase na vizinhança dos recetores (Francis Et al., 2011). A maior eficácia do dipiridamole também sugere uma possível contribuição de PDE8 ou PDE10. O A principal da ação dos inibidores da fosfodiesterase é acumulação de cAMP: enquanto o  $E_{max}$  (isto é, o efeito aumenta), a aparente afinidade do agonista (Isto é, o seu  $EC_{50}$ ) não é deslocado.

Na ausência de um agonista adicionado exogenamente (ou de forskolina), os inibidores de PDE não possuem per si causar qualquer aumento apreciável no acúmulo de cAMP isto é esperado; A atividade basal de adenilato Ciclase é muito baixa e requer a entrada através de recetores dependentes da ativação de  $G_s$  para catalisar a formação de acampamento. No entanto, sob condições de cultura de células - i.e., em definitivo - não há nenhum agonista presente.

*A inibição de PDE aumenta as correntes  $Cl^-$  induzidas por treprostinil através do CFTR:*

Devido à inibição das isoformas de PDE4 Treprostinil

induzida pelo acúmulo de cAMP, essa manipulação foi predito para aumentar o efeito de treprostínil na corrente de cloreto através da fibrose cística transmembrana Regulador de condutância/canal Cl (CFTR). Este foi o caso: treprostínil causado como ativação sustentada de CFTR; A corrente resultante para fora pode ser detetada por saltos de tensão de -20 a -80 mV. A adição de Roflumilast (e de outros inibidores de PDE4 tais como Ibudilast e RO20-1724) causou um aumento adicional do atual. A corrente é transportada pelo CFTR, porque é reversivelmente bloqueada pelo inibidor específico.

#### Conclusões

1) As células epiteliais das vias respiratórias humanas expressam vários recetores que podem ser alvejados pelo treprostínil para CAMP e assim ativar CFTR em via aérea humana epitelial.

2) PDE4-Isoforms estão presentes em células epiteliais e inibidoras de PDE4 em humanos e aumentam a resposta ao treprostínil.

Lisboa, 17 de Janeiro de 2017



## Referencias

Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, Ballinger MN, Carstens JK, Coleman N, Moore BB, Peebles RS, Faccioli LH, Peters-Golden M (2007) Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol* 178:1628-1634.

Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488-520

Francis SH, Blount MA, Corbin JD (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91:651-690.

Hetman JM, Soderling SH, Glavas NA, Beavo JA. (2000a) Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 472-476

Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, Beavo JA (2000b) Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12891-12895

Houslay MD, Schafer P, Zhang KY (2005) Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 10:1503-1519

Omori K, Kotera J (2007) Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.* 100:309-327

Nikam VS, Wecker G, Schermuly R, Rapp U, Szelepusa K, Seeger W, Voswinckel R (2011) Treprostinil inhibits adhesion and differentiation of fibrocytes via cAMP and Rap dependent ERK inactivation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 692-703

Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998) Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8991-8996.

Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB  
(2004) Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate  
treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line  
demonstrates a major influence on heat-shock proteins.  
Physiol Genomics16:204-211

## Reivindicações

1. Composição compreendendo pelo menos uma prostaciclina ou análogo de prostaciclina ou um análogo farmacologicamente aceitável seu sal e pelo menos uma fosfodiesterase (PDE) 4 para uso na prevenção ou tratamento de fibrose cística, em que o referido análogo de prostaciclina é selecionado do grupo de Treprostinil, Lloprost, Cicaprost ou Beraprost ou farmacologicamente aceitável seus sais.

2. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que sendo o referido análogo de prostaciclina selecionado de um isômero de Treprostinil.

3. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o referido inibidor de PDE4 é selecionado do grupo de RO 20-1724, Ibudilast, Roflumilast e seu N-Óxido, Cilomilast, BAY 19-8004, CC3, AWD 12-281, SCH 351591, Ciclamilast, Piclamilast, CGH2466, Mesembrina, Rolipram, Luteolina e Drotaverina.

4. Composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 compreendendo Treprostinil e um inibidor de PDE4 selecionado do grupo de RO 20-1724, Roflumilast e Ibudilast.

5. Composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que um outro inibidor de PDE selecionado de entre o grupo dos inibidores de PDE5, PDE7 e PDE8 é contido.

6. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido inibidor de PDE5 é selecionado de

Avanafil, Lodenafil, Mirodenafil, Citrato de Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil e Udenafil.

7. Composição para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que os referidos inibidores PDE7 e PDE8 são selecionados a partir de dipiridamole, BRL50481 e PF-4957325.

8. Composição para utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7 que é uma composição farmacêutica.

9. Composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 para inalação.

10. Composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 para administração intravenosa ou subcutânea, ou na forma oralmente disponível, selecionada a partir do Grupo de formas de libertação sustentada, comprimidos e cápsulas.

11. Composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a quantidade eficaz de Treprostinil ou um seu sal farmacêuticamente aceitável está a pelo menos 1,0ng/kg de peso corporal.

Lisboa, 17 de Janeiro de 2017

Fig. 1

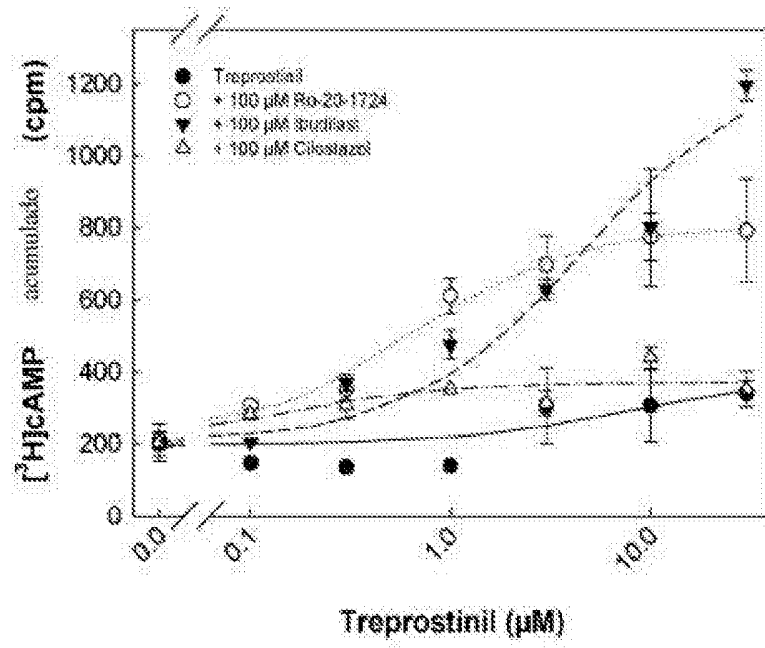


Fig. 2

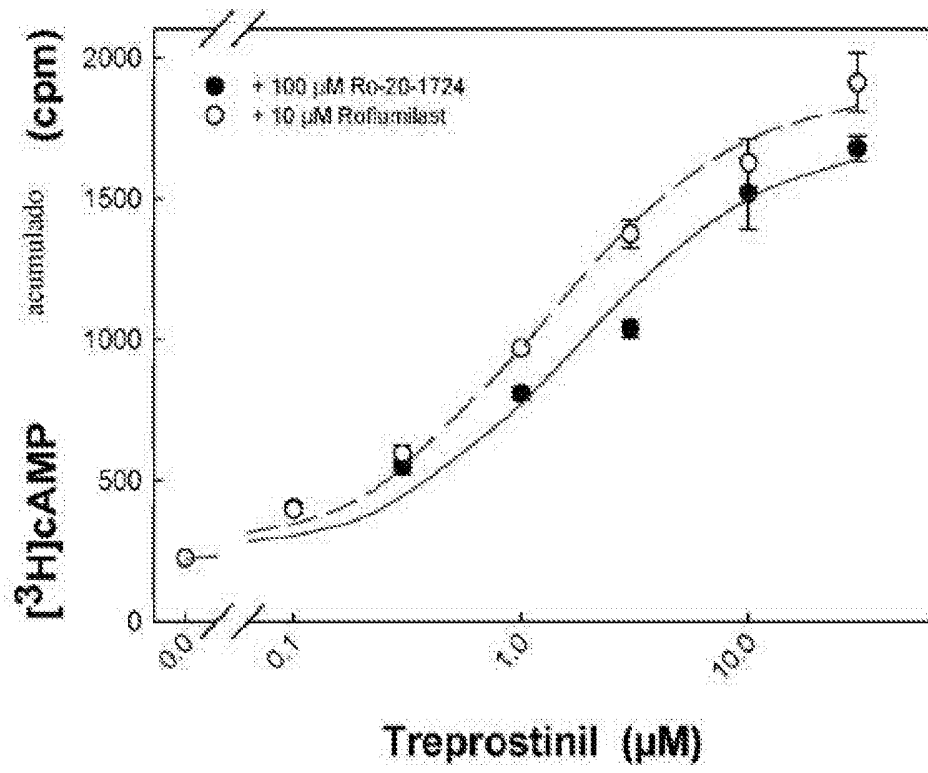


Fig. 3

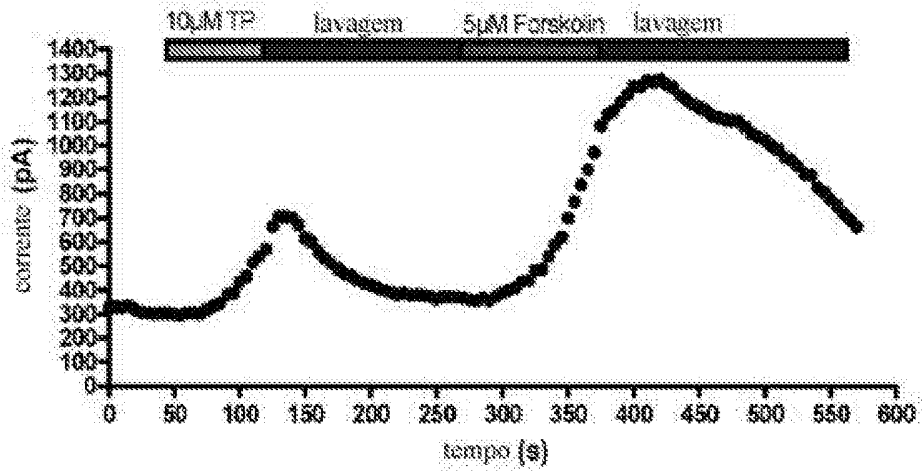


Fig. 4

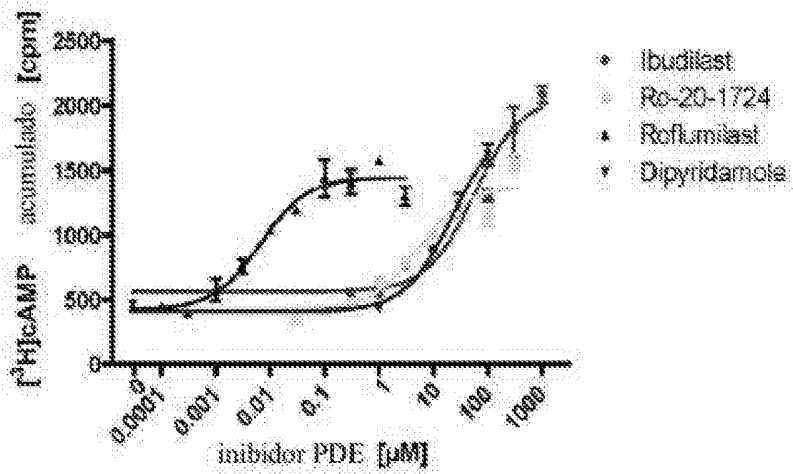


Fig. 5

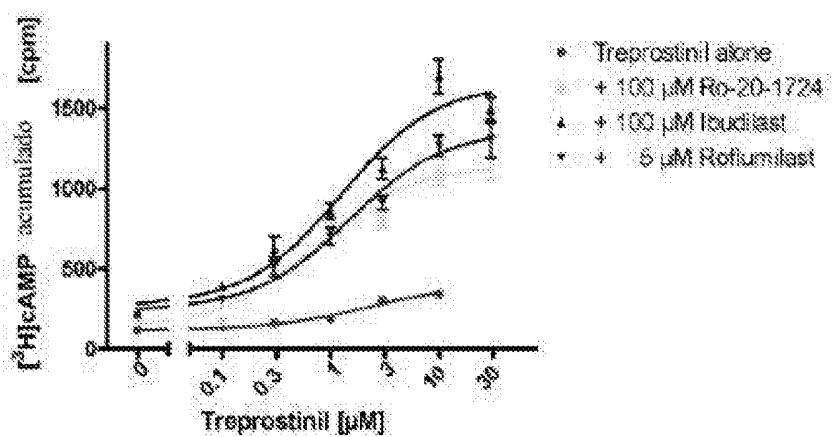




Fig. 6

