

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 888**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61M 15/00 (2006.01)
A61M 11/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2013 PCT/EP2013/072691**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14067986**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2013 E 13785446 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 2914269**

54 Título: **Inhibidor de galactósido de galectina-3 y su uso para tratar fibrosis pulmonar**

30 Prioridad:

31.10.2012 CA 2794066
31.10.2012 US 201261720641 P
15.11.2012 CA 2795753
15.03.2013 US 201313832672

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2021

73 Titular/es:

GALECTO BIOTECH AB (100.0%)
Cobis, Ole Måløes Vej 3
2200 Copenhagen, DK

72 Inventor/es:

NILSSON, ULF;
LEFFLER, HAKON;
HENDERSON, NEIL;
SETHI, TARIQ y
MACKINNON, ALISON

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 817 888 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de galactósido de galectina-3 y su uso para tratar fibrosis pulmonar

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo adecuado para administración pulmonar que es un inhalador de polvo seco que comprende una composición que comprende el compuesto TD139 como se define en más detalle en las reivindicaciones, así como también al tratamiento de fibrosis pulmonar.

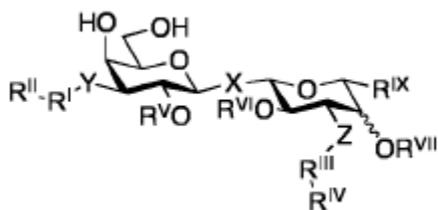
10 Cualquier materia objeto no abarcada en las reivindicaciones se divulga solo con fines informativos y no forma parte de la invención reivindicada.

15 Técnica antecedente

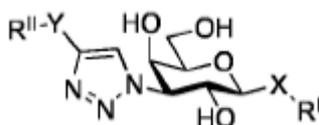
La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) representa una enorme carga sanitaria mundial. Es una afección crónica de etiología desconocida en la que la lesión pulmonar aguda repetida provoca fibrosis progresiva que da como resultado la destrucción de la arquitectura pulmonar, el deterioro de la función pulmonar con la consiguiente insuficiencia respiratoria y la muerte. Aunque la fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es la causa arquetípica y más común de fibrosis pulmonar, numerosas enfermedades respiratorias pueden progresar a fibrosis pulmonar, y esto suele significar un peor pronóstico. La mediana del tiempo hasta la muerte desde el diagnóstico es de 2.5 años y sigue aumentando la incidencia y prevalencia de la IPF. Sigue siendo una de las pocas afecciones respiratorias para las que no existen terapias efectivas y no existen biomarcadores confiables para predecir la progresión de la enfermedad. Los mecanismos que dan lugar a la fibrosis pulmonar no están claros, pero se centran en la cicatrización aberrante de heridas como consecuencia de una lesión epitelial repetitiva de una causa aún desconocida. La IPF se caracteriza por focos fibroblásticos que contienen fibroblastos/miofibroblastos que muestran una respuesta de activación aumentada a citocinas fibrogénicas tales como el factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1). Dada la no respuesta de muchos casos de IPF a los tratamientos antiinflamatorios actuales, los miofibroblastos dentro de los focos fibroblásticos representan una posible diana terapéutica novedosa. Subsiste una gran necesidad insatisfecha de fármacos para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática.

El modelo de bleomicina de fibrosis pulmonar es el modelo de roedor mejor caracterizado y es el modelo estándar de la industria. El tratamiento con bleomicina provoca daño en el ADN mediado por oxidantes e induce una inflamación pulmonar inicial seguida por fibrosis progresiva durante 2 a 4 semanas. Cuando se administra durante la última fase de la lesión, se puede evaluar el potencial antifibrótico de compuestos novedosos.

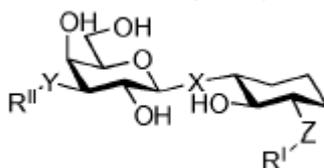
Se han descrito los inhibidores de galectina, en particular inhibidores de Gal-3 por algunos de los presentes inventores en solicitudes de patente publicadas anteriormente. Algunos de los inhibidores de galectina de la técnica anterior tienen las siguientes fórmulas generales



40 como se describe en el documento WO/2005/113568, y



45 como se describe en el documento WO/2005/113569, en la que R^I puede ser una D-galactosa, y

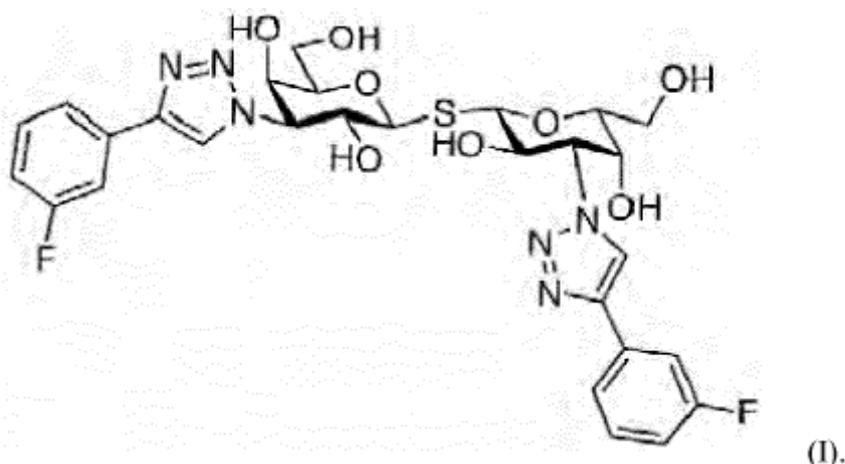


como se describe en el documento WO/2010/126435.

Resumen de la divulgación

La galectina-3 es una lectina de unión a β -galactósido que se expresa altamente en tejido fibrótico de diversas etiologías. Se examina la función de la galectina-3 en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y TGF- β 1 en ratones, y se establece su relevancia en la IPF humana. Los estudios con galectina-3 se describen en MacKinnon et al., "Regulation of TGF- β 1 driven lung fibrosis by galectin-3", Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185: 537-546 (2012, originalmente disponible en línea el 17 de noviembre de 2011). En particular, se muestra que la inhibición de la galectina-3 puede representar una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de fibrosis pulmonar. Se ha probado un compuesto de fórmula general (I) (ver más abajo) y se ha mostrado que es un inhibidor de la galectina-3, en particular, este compuesto bloqueó la activación de la β -catenina inducida por TGF- β in vitro y atenuó la progresión de la etapa tardía de la fibrosis pulmonar después de bleomicina in vivo.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona un compuesto de la fórmula general (I):



En un aspecto adicional, se proporciona una composición, particularmente, una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la fórmula (I) y opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como portador o excipiente.

El compuesto de fórmula (I) es adecuado para uso en un método para tratar la fibrosis pulmonar, tal como la fibrosis pulmonar idiopática en un mamífero. Normalmente, dicho mamífero es un sujeto humano. El modo de administración se selecciona normalmente entre oral, intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) y pulmonar. En particular, se ha mostrado que la ruta pulmonar proporciona una vida media considerablemente más larga que las rutas i.v. o s.c. en ratones. Cuando se trata la fibrosis pulmonar, en particular la IPF, es importante obtener concentraciones locales suficientemente altas del agente terapéutico en las partes más estrechas del tejido pulmonar, que incluyen los bronquiolos y los alvéolos. Adicionalmente, es importante que el agente terapéutico obtenga un tiempo de residencia adecuado en el sitio de acción en el tejido pulmonar. Adicionalmente, dado que la fibrosis en pacientes con IPF solo se localiza en el pulmón, es preferible obtener una alta exposición pulmonar con una exposición sistémica mínima o nula y es eficaz el uso de nebulizadores en particular nebulizadores electrónicos de tipo ultrasónico. Sin embargo, la tos es un síntoma central para los pacientes con fibrosis pulmonar y, en particular, IPF, un síntoma que probablemente se agrave si se introduce un irritante en el pulmón. Por tanto, el tratamiento con un polvo seco, tal como con un inhalador de polvo seco o similar, no es adecuado para estos pacientes. Sin embargo, suministrar el compuesto utilizando un nebulizador, como un nebulizador electrónico, es particularmente beneficioso, ya que permite suministrar el compuesto a los compartimentos más pequeños del pulmón, sin provocar irritación en el pulmón.

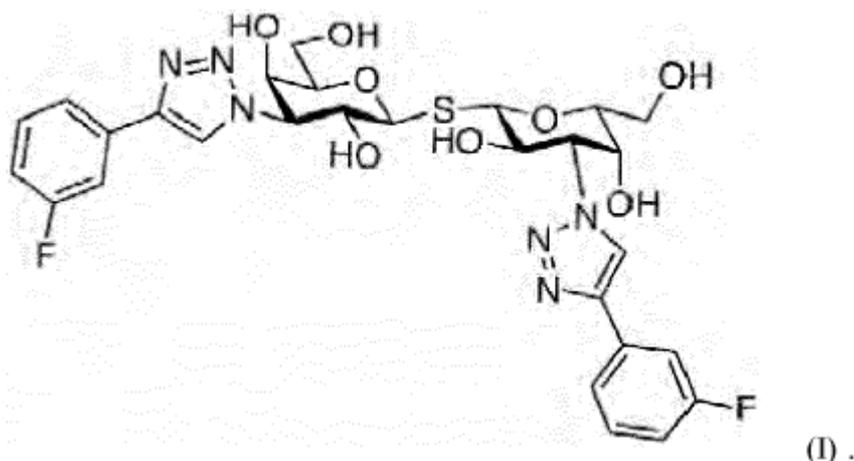
Más aún, en un aspecto adicional se proporciona un método para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, tal como la fibrosis pulmonar idiopática, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I)

En otro aspecto, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula I que comprende la etapa de hacer reaccionar bis-(3-desoxi-3-azido- β -D-galactopiranosil) sulfano con 3-fluorofenilacetileno y una amina, tal como trietilamina, opcionalmente en presencia de un catalizador, tal como Cu(I), en un solvente, tal como N,N-dimetilformamida (DMF), lo que resulta en el compuesto de la fórmula I.

Descripción detallada

Se proporciona un compuesto de la fórmula general (I):

50



En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición para administración pulmonar, en la que dicha composición comprende un compuesto de la fórmula (I).

El compuesto de la fórmula (I) tiene el nombre químico (IUPAC) bis(3-desoxi-3-(3-fluorofenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-β-D-galactopiranosil) sulfano.

En todavía una realización adicional, el compuesto de la fórmula (I) es útil para tratar fibrosis pulmonar, y por lo tanto es adecuado para uso como un medicamento.

La administración pulmonar se lleva a cabo por un inhalador de polvo seco.

En una realización adicional las composiciones farmacéuticas para administración pulmonar son para uso en un método para tratamiento de fibrosis pulmonar, tal como IPF.

Las composiciones farmacéuticas para administración pulmonar es una composición farmacéutica.

Una composición farmacéutica comprende un aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como un excipiente y/o portador, que es conocido por el experto en la técnica.

La presente invención se refiere a un dispositivo para administración pulmonar que comprende las composiciones farmacéuticas para administración pulmonar que es un inhalador de polvo seco.

En un aspecto adicional, se proporciona un dispositivo para uso en un método para tratar fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar Idiopática en un mamífero. Dicho mamífero es normalmente un sujeto humano, preferiblemente un sujeto humano diagnosticado con IPF.

Cuando se utilizan los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en este documento para el tratamiento anterior, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto a un mamífero que necesita dicho tratamiento.

El término "tratamiento" y "tratar" como se utiliza en este documento significa el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. El término está destinado a incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o mitigar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección, así como para prevenir la afección, en la que la prevención se entiende como el manejo y cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir la aparición de los síntomas o complicaciones. El tratamiento se puede realizar de forma aguda o crónica. El paciente que se va a tratar es preferiblemente un mamífero; en particular un humano, pero también puede incluir animales, como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de fórmula (I) de la presente invención como se utiliza en este documento significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada se puede lograr utilizando experimentación de rutina, al construir una matriz de valores

y probando diferentes puntos en la matriz, todo lo cual está dentro de las habilidades ordinarias de un médico o veterinario capacitado.

5 Como se utiliza en el presente documento, "aditivo farmacéuticamente aceptable" pretende, sin limitación, incluir portadores, excipientes, diluyentes, adyuvantes, colorantes, aromas, conservantes, etc., que el experto consideraría utilizar al formular un compuesto de la presente invención con el fin de hacer una composición farmacéutica.

10 Los adyuvantes, diluyentes, excipientes y/o portadores que se pueden utilizar en la composición de la invención deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con el compuesto de fórmula (I) y los demás ingredientes de la composición farmacéutica y no perjudicial para el destinatario del mismo. Se prefiere que las composiciones no contengan ningún material que pueda causar una reacción adversa, tal como una reacción alérgica. Los adyuvantes, diluyentes, excipientes y portadores que se pueden utilizar en la composición farmacéutica de la invención son bien conocidos por una persona dentro de la técnica.

15 Como se mencionó anteriormente, las composiciones farmacéuticas y particularmente las composiciones farmacéuticas como se divulgó en este documento pueden, además de los compuestos divulgados en el presente documento, comprenden adicionalmente al menos un adyuvante, diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden desde 1 hasta 99 % en peso de dicho al menos un adyuvante, diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable y desde 1 hasta 99 %
20 en peso de un compuesto como se divulgó en este documento. La cantidad combinada del ingrediente activo y del adyuvante, diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable puede no constituir más de 100 % en peso de las composiciones farmacéuticas, particularmente las composiciones farmacéuticas farmacéutica.

25 En algunas realizaciones, solo se utiliza un cómo se divulgó en este documento para los propósitos discutidos anteriormente.

En algunas realizaciones, se utilizan dos o más de los compuestos como se divulgó en este documento en combinación para los propósitos discutidos anteriormente.

30 Las composiciones farmacéuticas, particularmente la composición farmacéutica que comprende un compuesto establecido en este documento en la forma de un polvo fino.

35 Se requieren las siguientes características para el dispositivo de suministro pulmonar: Debe poder proporcionar una dosis específica de forma precisa y repetida. Debe ser capaz de proporcionar 2 o más niveles de dosis diferentes, por ejemplo, mediante dosificación repetida o al ajustar la dosis proporcionada al paciente. El dispositivo debe asegurar que el fármaco se suministra al espacio bronquiolar o preferiblemente al espacio bronquiolar y alveolar del pulmón preferiblemente de manera uniforme sobre el tejido pulmonar. Por lo tanto, el dispositivo debe generar aerosoles o polvo seco de un tamaño suficientemente pequeño para asegurar este suministro, sin suministrar partículas tan pequeñas que se exhale inmediatamente y, por lo tanto, no permanezcan en el tejido pulmonar.

40 Para el experto en la técnica es bien conocido que las partículas con un diámetro aerodinámico de masa medio (MMAD) entre 0.1 y 20 μm , tal como entre 0.5 y 10 μm , por ejemplo, entre 1 y 5 μm (micrómetros) tienen una mayor probabilidad de depositarse en las regiones bronquiales y alveolares terminales. Este rango de tamaño de partícula es ideal para muchas indicaciones en el suministro de fármacos pulmonar, ya que también una porción del material
45 aún se depositará en las vías respiratorias superiores. (Véase Controlled Pulmonary Drug Delivery, Smith and Hickey, Editors, Springer 2011, capítulo 13).

50 De acuerdo con Controlled Pulmonary Drug Delivery, Smith and Hickey, Editors, Springer 2011 en particular los capítulos 13, 14 y 15, el experto sabrá cómo formular compuestos, tales como el compuesto de fórmula (I) para el suministro pulmonar de fármacos. Normalmente, los liposomas, nanopartículas y micropartículas son adecuados para suspensión, así como para polvos secos.

55 Los inhaladores de polvo seco (DPI), tales como los inhaladores de medicamentos de dosis medidas, son bien conocidos para administrar medicamentos a los pulmones de un paciente. Algunos inhaladores anteriores han comprendido un recipiente dispensador de aerosol presurizado, en el que los aerosoles contienen propulsores de gas en los que está suspendido el medicamento en polvo. Luego del accionamiento, el contenido de aerosol se expulsa, a través de una válvula dosificadora, hacia los pulmones del paciente.

60 Los diseños actuales incluyen DPI medidos previamente y medidos por dispositivo, los cuales pueden ser impulsados solo por la inspiración del paciente o con asistencia eléctrica de algún tipo. Los DPI medidos previamente contienen dosis o fracciones de dosis medidas previamente en algún tipo de unidades (por ejemplo, presentaciones únicas o múltiples en ampollas, cápsulas u otras cavidades) que se insertan posteriormente en el dispositivo durante la fabricación o por el paciente antes de uso. A partir de entonces, la dosis se puede inhalar directamente desde la unidad
65 medida previamente o se puede transferir a una cámara antes de ser inhalada por el paciente. Los DPI medidos por dispositivo tienen un depósito interno que contiene suficiente formulación para múltiples dosis que son medidas por el propio dispositivo durante el accionamiento del paciente. La amplia gama de diseños de DPI, muchos de ellos con

características exclusivas del diseño, presentarán desafíos en el desarrollo de información en apoyo de una aplicación. Independientemente del diseño de DPI, los atributos más importantes son la reproducibilidad de la dosis y la distribución del tamaño de partícula. Mantener estas cualidades durante el período de fecha de caducidad y garantizar la funcionalidad del dispositivo durante su vida útil bajo las condiciones de uso del paciente probablemente presentará el desafío más formidable.

Los inhaladores de dosis medida presurizada (pMDI) también pueden ser dispositivos de suministro adecuados para el presente compuesto de fórmula (I) y se describen en *Controlled Pulmonary Drug Delivery*, Smith and Hickey, Editors, Springer 2011, capítulo 8.

Por lo tanto, se han proporcionado varios tipos de inhaladores de polvo seco accionados por respiración, sin aerosol. Por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5,503,144 otorgada a Bacon, muestra un inhalador de polvo seco accionado por respiración. El dispositivo incluye un depósito de polvo seco para contener un medicamento en polvo seco, una cámara dosificadora para retirar el medicamento en polvo del depósito en cantidades discretas y una entrada de aire para arrastrar el medicamento en polvo extraído a través de una boquilla tras la inhalación del paciente.

La patente de EE.UU. No. 5,458,135 divulga un método y un aparato para producir una dosis en aerosol de un medicamento para la posterior inhalación por parte de un paciente. El método comprende primero dispersar una cantidad preseleccionada del medicamento en un volumen predeterminado de gas, normalmente aire. La dispersión se puede formar a partir de un líquido o un polvo seco. El método se basa en hacer fluir sustancialmente toda la dosis en aerosol hacia una cámara que inicialmente está llena de aire y se abre a través de una boquilla al ambiente. Después de que el medicamento en aerosol se haya transferido a la cámara, el paciente inhalará la dosis completa en una sola respiración.

El documento US 6,065,472 divulga un dispositivo de inhalación de polvo que comprende una carcasa que contiene un compuesto farmacológicamente activo, un conducto con una salida que se extiende hacia el interior de la carcasa a través del cual un usuario puede inhalar para crear un flujo de aire a través del conducto, una unidad de dosificación para suministrar una dosis del compuesto al conducto y deflectores dispuestos dentro de dicho conducto para ayudar a la desintegración de los aglomerados de polvo arrastrados en dicho flujo de aire.

Independientemente de si se utiliza un inhalador en aerosol o sin aerosol, es de suma importancia que las partículas del medicamento en polvo seco administrado sean lo suficientemente pequeñas como para asegurar la penetración adecuada del medicamento en la región bronquial de los pulmones del paciente durante la inhalación. Sin embargo, debido a que el medicamento en polvo seco está compuesto por partículas muy pequeñas y, a menudo, se proporciona en una composición que incluye un portador tal como lactosa, se forman aglomerados no definidos o agregados del medicamento al azar antes de ser administrados. Por lo tanto, se ha descubierto preferiblemente proporcionar inhaladores de polvo seco accionados por respiración con medios para descomponer los aglomerados de medicamento o medicamento y portador antes de la inhalación del medicamento.

Las dosis típicas de los compuestos aquí expuestos varían dentro de un amplio rango y dependen de muchos factores, tales como la ruta de administración, el requerimiento del individuo que necesita tratamiento, el peso corporal, la edad y el estado general del individuo.

El compuesto de fórmula (I) se puede preparar como se describe en la sección experimental a continuación.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula I que comprende la etapa de hacer reaccionar bis-(3-desoxi-3-azido- β -D-galactopiranosil) sulfano con 3-fluorofenilacetileno y una amina, tal como trietilamina, opcionalmente en presencia de un catalizador, tal como Cu(I), en un solvente, tal como N,N-dimetilformamida (DMF), lo que resulta en el compuesto de la fórmula I. En una realización particular, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula I que comprende las etapas descritas en el esquema 1 en la sección experimental.

También se divulga un compuesto de la fórmula (I) que se puede obtener mediante la etapa de hacer reaccionar bis-(3-desoxi-3-azido- β -D-galactopiranosil) sulfano con 3-fluorofenilacetileno y una amina, tal como trietilamina, opcionalmente en presencia de un catalizador, tal como Cu(I), en un solvente, tal como N,N-dimetilformamida (DMF), lo que resulta en el compuesto de la fórmula I, tal como se puede obtener mediante las etapas que se describen en el esquema 1 en la sección experimental.

Normalmente, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

En una realización adicional, se diagnostica al sujeto humano con formas leves, moderadas o agresivas de fibrosis pulmonar según el nivel de galectina-3.

También se divulga un método para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar idiopática en un sujeto humano que tiene un nivel de galectina-3 indicativo de fibrosis pulmonar o exacerbación de síntomas que

comprende administrar a un sujeto humano una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de galectina-3. El inhibidor de galectina-3 es el compuesto de fórmula (I).

5 En una realización el nivel indicativo de galectina-3 es al menos aproximadamente 22 ng/ml, tal como al menos aproximadamente 25 ng/ml, tal como al menos aproximadamente 30 ng/ml, al menos aproximadamente 40 ng/ml, al menos aproximadamente 50 ng/ml, al menos aproximadamente 60 ng/ml, al menos aproximadamente 70 ng/ml.

10 Los niveles de galectina-3 se pueden cuantificar al realizar un inmunoensayo. Un inmunoensayo de galectina-3 implica poner en contacto una muestra de un sujeto que se va a probar con un anticuerpo apropiado bajo condiciones tales que la unión inmuno-específica pueda ocurrir si la galectina-3 está presente, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica por el anticuerpo. Se puede utilizar cualquier inmunoensayo adecuado, que incluyen, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, inmunohistoquímica, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "intercalados", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

20 El inmunoensayo enzimático más común es el "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)". ELISA es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno utilizando una forma marcada (por ejemplo, ligada a enzima) del anticuerpo. Existen diferentes formas de ELISA, que son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las técnicas de ELISA estándar se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. (1984), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22:895-904. Un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) preferido para detectar galectina-3 está disponible comercialmente (BG Medicine, Waltham, Mass.).

25 Se puede encontrar una revisión detallada del diseño, la teoría y los protocolos de ensayos inmunológicos en numerosos textos de la técnica, que incluyen Butt, W. R., Practical Immunology, ed. Marcel Dekker, New York (1984) and Harlow et al. Antibodies, A Laboratory Approach, ed. Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

30 Se describen realizaciones adicionales del proceso en la sección experimental de este documento, y cada proceso individual, así como cada material de partida constituyen realizaciones que pueden formar parte de realizaciones.

35 Las realizaciones anteriores se deben ver cómo referencias a cualquiera de los aspectos (tales como "método de tratamiento", "composición farmacéutica", "compuesto para uso como medicamento" o "compuesto para uso en un método") descritos en el presente documento, así como cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, a menos que se especifique que una realización se refiere a cierto aspecto o aspectos de la presente invención.

40 Todos los títulos y subtítulos se utilizan en el presente documento sólo por conveniencia y no se deben interpretar como limitantes de la invención de ninguna manera.

Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares, tal como se utilizan en el contexto de la descripción de la invención, se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente.

45 La mención de los rangos de valores en el presente documento está simplemente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si fuera mencionado individualmente en este documento. A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en este documento son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo, se puede considerar que todos los valores ejemplares exactos proporcionados con respecto a un factor o medida en particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", donde corresponda).

55 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no se deben interpretar como limitantes del alcance de protección. Las características divulgadas en la descripción anterior y en los siguientes ejemplos pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, ser material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

60 Experimental

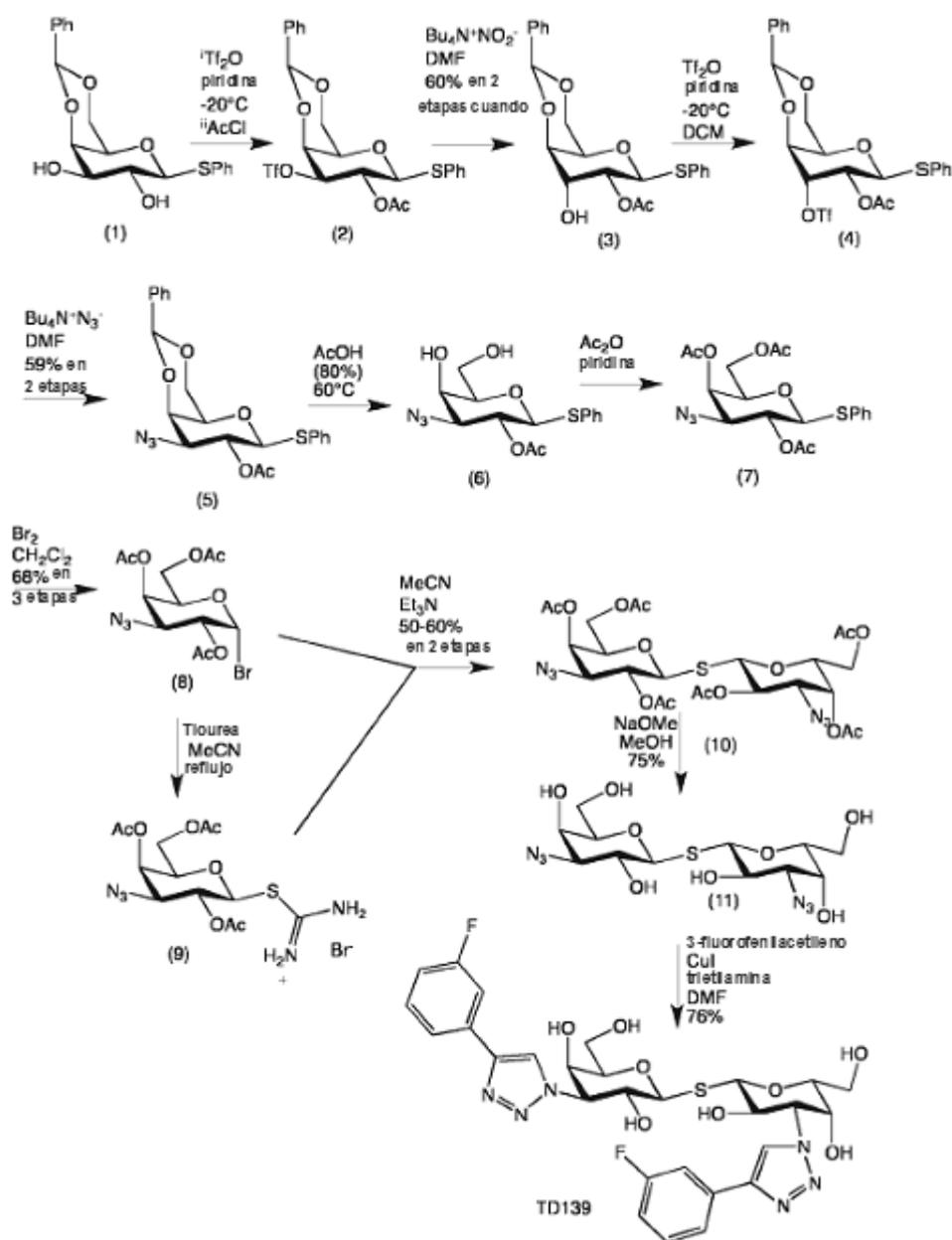
Síntesis de bis (3-desoxi-3-(3-fluorofenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-β-D-galactopiranosil) sulfano.

Métodos generales.

65 Se registraron los puntos de fusión sobre un aparato Kofler (Reichert) y están sin corregir. Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (1H) sobre un espectrómetro Bruker DRX 400 (400 MHz) o Bruker ARX

300 (300 MHz); las multiplicidades se citan como singlete (s), doblete (d), doblete de dobletes (dd), triplete (t), triplete aparente (at) o triplete aparente de dobletes (atd). Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C) sobre un espectrómetro Bruker DRX 400 (100.6 MHz). Los espectros se asignaron utilizando experimentos COSY, HMQC y DEPT. Todos los cambios químicos se citan en la escala δ en partes por millón (ppm).
 5 Se registraron los espectros de masas de bombardeo de átomos rápidos de baja y alta resolución (FAB-HRMS) utilizando un instrumento JEOL SX-120 y se registraron los de baja y alta resolución (ES-HRMS) sobre un instrumento Micromass Q-TOF. Las rotaciones ópticas se midieron sobre un polarímetro Perkin-Elmer 341 con una longitud de ruta de 1 dm; las concentraciones se dan en g por 100 mL. Se llevó a cabo cromatografía en capa fina (TLC) sobre láminas Merck Kieselgel, precubiertas con sílice 60F254. Las placas se desarrollaron utilizando ácido sulfúrico al 10%.
 10 Se llevó a cabo cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice (Matrex, 60Å, 35-70 μm , Grace Amicon). Se destiló acetonitrilo a partir de hidruro de calcio y se almacenó sobre tamices moleculares de 4 Å. Se destiló DMF a partir de tamices moleculares de 4 Å y se almacenó sobre tamices moleculares de 4 Å.

15 Se preparó Bis (3-deoxi-3-(3-fluorofenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)- β -D-galactopiranosil) sulfano (TD139) de acuerdo con el esquema de reacción 1 a continuación:



(Esquema 1)

El compuesto (1) (véase el esquema de reacción anterior) es comercial de Carbosynth Limited 8 & 9 Old Station Business Park-Compton-Berkshire-RG20 6NE - UK o se sintetiza en tres etapas casi cuantitativas a partir de D-galactosa, (véase, por ejemplo, Li, Z. and Gildersleeve, J. C. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 11612-11619)

5 Fenil 2-O-acetil-4,6-O-bencilideno-1-tio-3-O-trifluorometanosulfonyl-β-D-galactopiranosido (2)

El compuesto 1 (10.5 g, 29.2 mmol) se disolvió en piridina seca (4.73 mL, 58.4 mmol) y CH₂Cl₂ seco (132 mL). La mezcla de reacción se enfrió, bajo agitación, hasta -20 °C (Baño de hielo y NaCl 3:1). Se agregó lentamente y bajo atmósfera de N₂, Tf₂O (5.68 mL, 33.6 mmol). La mezcla de reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1 y tolueno:acetona, 10:1). Cuando se completó la reacción, se agregó AcCl (2.29 mL, 32.1 mmol) y se mantuvo la agitación, se aumentó la temperatura a temperatura ambiente. Esta mezcla también se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1 y tolueno:acetona, 10:1). Cuando se completó, se inactivó con CH₂Cl₂ y se lavó con HCl al 5%, NaHCO₃ (saturado – en adelante sat.) y NaCl (sat.). La capa orgánica se seco sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida.

15 Fenil 2-O-acetil-4,6-O-benciliden-1-tio-β-D-gulopiranosido (3)

Se agregó nitrito de tetrabutilamonio (25.3 g, 87.7 mmol) a una solución del compuesto 2 (15.6 g, 29.2 mmol) en DMF (110 mL) y se mantuvo la agitación, bajo atmósfera de N₂, a 50 °C. (La reacción empezó a ser morada y se volvió granate). La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1 y tolueno:acetona, 10:1) y se inactivó con CH₂Cl₂. La mezcla se lavó con HCl al 5%, NaHCO₃ (sat.) y NaCl (sat.). La capa orgánica se seco sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida seguida por purificación mediante cromatografía flash (Eluyente heptano:EtOAc, 1:1 y heptano:EtOAc, 1:2) y se recristalizó a partir de una mezcla de EtOAc y Heptano (1:3). ¹H RMN en CDCl₃ δ 7.60-7.57 (m, 2H, Ar), 7.43-7.40 (m, 2H, Ar), 7.37-7.34 (m, 3H, Ar), 7.29-7.25 (m, 3H, Ar), 5.50 (s, 1H, PhCH), 5.15 (d, 1H, J = 10.29 Hz, H-1), 5.10 (dd, 1H, J = 10.27 Hz, 2.85 Hz, H-2), 4.36 (dd, 1H, J = 12.49 Hz, 1.4 Hz, H-6), 4.18 (br s, 1H, H-3), 4.08 (dd, 1H, J = 3.59 Hz, 1.04 Hz, H-6), 4.03 (dd, 1H, J = 12.53 Hz, 1.75 Hz, H-4), 3.88 (s, 2H, H-5 + OH), 2.12 (s, 3H, OAc).

30 Fenil 2-O-acetil-4,6-O-bencilideno-1-tio-3-O-trifluorometanosulfonyl-β-D-gulopiranosido (4)

El compuesto 3 (1.00 g, 2.48 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (12.5 mL) y piridina seca (0.40 mL, 4.96 mmol). La mezcla de reacción se enfrió, bajo agitación, hasta -20 °C (Baño de hielo y NaCl 3:1). Se agregó lentamente y bajo atmósfera de N₂, Tf₂O (0.48 mL, 2.85 mmol). La mezcla de reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1 y tolueno:acetona, 10:1) y cuando se completó, se inactivó con CH₂Cl₂ y se lavó con HCl al 5%, NaHCO₃ (sat.) y NaCl (sat.). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida hasta que se secó.

35 Fenil 2-O-acetil-3-azido-4,6-O-bencilideno-3-desoxi-1-tio-β-D-galactopiranosido (5)

Se agregó cuidadosamente azida de tetrabutilamonio (2.12 g, 7.44 mmol) a una solución del compuesto 4 (1.3256 g, 2.48 mmol) en DMF (10 mL) y se mantuvo la agitación, bajo atmósfera de N₂, a 50 °C. La reacción se monitorizó mediante TLC (E:H, 1:1) y se concentró bajo presión reducida seguida por purificación mediante cromatografía flash (Eluyente heptano: EtOAc, 2:1 y heptano:EtOAc, 1:1). ¹H RMN en CDCl₃ δ 7.61-7.58 (m, 2H, Ar), 7.44-7.41 (m, 2H, Ar), 7.39-7.36 (m, 3H, Ar), 7.30-7.24 (m, 3H, Ar), 5.59 (s, 1H, PhCH), 5.35 (t, 1H, J = 9.95 Hz, H-2), 4.73 (d, 1H, J = 9.63 Hz, H-1), 4.44 (dd, 1H, J = 6.24 Hz, 1.60 Hz, H-6), 4.35-4.34 (dd, 1H, J = 3.33 Hz, 0.88 Hz, H-4), 4.11 (dd, 1H, J = 12.48 Hz, 1.67 Hz, H-6), 3.57 (d, 1H, J = 1.15 Hz, H-5), 3.44 (dd, 1H, J = 10.21 Hz, 3.29 Hz, H-3), 2.17 (s, 3H, OAc).

45 Fenil 2-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1-tio-β-D-galactopiranosido (6)

El compuesto 5 (470 mg, 1.1 mmol) se disolvió en ácido acético al 80% (75 mL) y la mezcla se calentó a 60 °C. La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1). Cuando se completó la reacción, la mezcla se concentró bajo presión reducida y calentamiento.

50 Fenil 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-3-desoxi-1-tio-β-D-galactopiranosido (7)

Se agregó anhídrido acético (30 mL) a una solución del compuesto 6 (373 mg, 1.1 mmol) en piridina seca (30 mL). La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1) y cuando se completó, se concentró bajo presión reducida. ¹H RMN en CDCl₃ δ 7.54-7.51 (m, 2H, Ar), 7.35-7.30 (m, 3H, Ar), 5.46 (dd, 1H, H-4), 5.23 (t, 1H, H-2), 4.73 (d, 1H, H-1), 4.15 (d, 2H, H-6, H-6), 3.94 (dt, 1H, H-5), 3.68 (dd, 1H, H-3), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc).

55 Bromuro de 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-3-desoxi-α-D-galactopiranosil (8)

El compuesto 7 (237.4 mg, 560 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (2 mL), y se agregó bromo (32 ml, 620 mmol). La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1). Cuando se completó la reacción, se agregó una pequeña

cantidad de ciclopenteno a la mezcla de reacción para eliminar los restos de Br₂. La mezcla se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash rápida (Eluyente: 500 mL de heptano:EtOAc, 2:1).

Bromuro de 2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-3-desoxi- α -D-galactopiranosil-1-isotiuronio (9)

5 El bromuro sensible 8 (70.6 mg, 180 μ mol) se disolvió inmediatamente en acetonitrilo seco (1.7 mL) y se sometió a reflujo con tiourea (13.7 mg, 180 μ mol) bajo N₂ durante 4 horas. La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1) y cuando se completó, la mezcla se enfrió.

10 Bis-(2,4,6-tri-O-acetil-3-azido-3-desoxi- β -D-galactopiranosil)-sulfano (10)

Se agregó bromuro sensible 8 (77.0 mg, 196 μ mol) y Et₃N (60 mL, 430 μ mol) a la última mezcla (9). La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc, 1:1). Cuando se completó, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y sin calentamiento. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Eluyente: heptano:EtOAc, 1:1). ¹H RMN en CDCl₃ δ 5.50 (dd, 2H, H-4), 5.23 (t, 2H, H-2, H-2'), 4.83 (d, 2H, H-1, H-1'), 4.15 (dd, 4H, H-6, H-6, H-6', H-6'), 3.89 (dt, 2H, H-5, H-5'), 3.70 (dd, 2H, H-3, H-3'), 2.19 (s, 6H, 2OAc), 2.15 (s, 6H, 2OAc), 2.18 (s, 6H, 2OAc).

Bis-(3-azido-3-desoxi- β -D-galactopiranosil)-sulfano (11)

20 El compuesto 10 (160 mg, 0.00024 mol) se disolvió en MeOH seco (2.6 mL) y CH₂Cl₂ seco (1.6 mL), y se agregó NaOMe (1 M, 24 mL, 24 μ mol). La reacción se monitorizó mediante TLC (heptano:EtOAc 1:1 y D:M 5:1). Cuando se completó la reacción, la mezcla se neutralizó con Duolite C436 hasta pH 7, se filtró y se lavó con MeOH. La solución filtrada se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Eluyente: CH₂Cl₂:MeOH, 5:1) para dar 11 puro (74.1 mg, 75%). ¹H RMN en CDCl₃ δ 4.72 (d, 2H, J = 9.7 Hz, H-1, H-1'), 3.95 (br s, 2H, H-4, H-4'), 3.84 (t, 2H, J = 9.8 Hz, H-2, H-2'), 3.74 (dd, 2H, J = 11.47 Hz, 7.23 Hz, H-6, H-6'), 3.64 (dd, 2H, J = 11.48 Hz, 4.72 Hz, H-6, H-6'), 3.60-3.55 (ddd, 2H, 7.15 Hz, 4.67 Hz, 0.93 Hz, H-5, H-5'), 3.36 (dd, 2H, J = 10 Hz, 3.05 Hz, H-3, H-3').

30 Bis-{3-desoxi-3-[4-(3-fluorofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]- β -D-galactopiranosil} sulfano (Nombrado TD139)

Se sintetizó TD139 a temperatura ambiente mediante cicloadición catalizada por Cu(I) entre bis-(3-azido-3-desoxi- β -D-galactopiranosil)-sulfano (11) y 3-fluorofenilacetileno (3 eq.) con Cu(I) (0.2 eq), trietilamina (2 eq.) en N,N-dimetilformamida (DMF, 100 mL/ μ mol de sulfano). La reacción se monitorizó con tlc hasta que se completó, se concentró y primero se purificó mediante cromatografía flash (Eluyente: CH₂Cl₂:MeOH, 8:1), seguida por purificación final mediante hplc preparativa para dar TD139 en 76% de rendimiento como un sólido amorfo blanco. ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.59 (s, 2H, triazol-H), 7.63 (br d, 2H, 7.6 Hz, Ar-H), 7.57 (br d, 2H, 8.4 Hz, Ar-H), 7.41 (dt, 2H, 6.0 y 8.0 Hz, Ar-H), 7.05 (br dt, 2H, 2.4 y 6.4 Hz, Ar-H), 4.93 (dd, 2H, 2.4 y 10.4 Hz, H3), 4.92 (d, 2H, 10.4 Hz, H1), 4.84 (2H, 10.4 Hz, H2), 4.18 (d, 2H, 2.4 Hz, H4), 3.92 (dd, 2H, 4.2 y 7.6 Hz, H5), 3.84 (dd, 2H, 7.6 y 11.4 Hz, H6), 3.73 (dd, 2H, 4.2 y 11.4 Hz, H6); FAB-HRMS m/z calculado para C₂₈H₃₀F₂N₆NaO₈S (M⁺Na⁺), 671.1712; encontrado, 671.1705.

Modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

45 Se anestesiaron ratones hembra C57/B16 (10-14 semanas de edad) con halotano y se administró bleomicina o solución salina por vía intratraqueal (33 μ g en 50 μ l de solución salina) y se recolectaron los pulmones el día 26. Se instiló TD139 en los pulmones de ratones en los días 18, 20, 22 y 24 de lesión pulmonar inducida por bleomicina. Se evaluó la fibrosis mediante la puntuación histológica de las secciones de pulmón teñidas con colágeno y el contenido total de colágeno mediante el ensayo de Sircol.

50 Se trataron los ratones con bleomicina (bleo) o solución salina (control) y los ratones tratados con bleomicina se trataron con 200 mg/kg de pirfenidona dos veces al día los días 18-24. Se administró TD139 por vía intratraqueal los días 18, 20, 22 y 24. Se recolectaron los pulmones el día 26.

55 La Figura 1 muestra (A) Colágeno pulmonar total medido mediante el ensayo de Sircol; (B) Puntuación de fibrosis; y (C) Puntuación inflamatoria. Los resultados representan la media y EEM (A) o distribución de datos (mediana, rango intercuartílico, mínimo a máximo, B y C) de n = 8 ratones por grupo (n = 7 bleo). *** P < 0.005, ** P < 0.01, * P < 0.05. Figura 1E) Se evaluó la activación de beta-catenina in vivo al puntuar las secciones de pulmón de ratón tratado con bleomicina (tratado con control y 10 μ g de TD139) teñido con una beta catenina anti-activa.

60 Efecto sobre las células epiteliales alveolares

Se sembraron células epiteliales alveolares primarias de ratones WT y se trataron con TGF- β 1 en presencia o ausencia de TD139 10 μ m. Figura 1D) Las células se lisaron y analizaron para determinar la β -catenina activa, la β -catenina total y la β -actina mediante transferencia Western.

65

En conclusión, el TD139 es un inhibidor de la galectina-3 y bloquea la activación de la β -catenina inducida por TGF- β bloqueada in vitro y la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina in vivo y se considera que representa una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de la fibrosis pulmonar en mamíferos, en particular, humanos.

5 Tratamiento de fármacos

Los ratones se dividieron en los siguientes grupos establecidos en la Tabla I:

10 Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones de tejido de ratón embebidas en parafina con tricrómico de Masson y hematoxilina y eosina (H&E) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se procesaron para inmunohistoquímica y se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: beta-catenina anti-activa (ABC) de ratón (Millipore) y las secciones se visualizaron y cuantificaron.

15 Tabla 1

Grupo	Inducción	Tratamiento	Dosis	Días de dosificación	Administración
1	Control	Vehículo		N/A	
2	Bleomicina	Vehículo		18, 20, 22 y 24	Intratraqueal
3	Bleomicina	TD139	10 ug	18, 20, 22 y 24	Intratraqueal
4	Bleomicina	TD139	3 ug	18, 20, 22 y 24	Intratraqueal
5	Bleomicina	TD139	1 ug	18, 20, 22 y 24	Intratraqueal
6	Bleomicina	TD139	0.1 ug	18, 20, 22 y 24	Intratraqueal
7	Bleomicina	Pirfenidona	200 mg/kg	b.i.d. desde el día 18	oral

Determinación de fibrosis e inflamación pulmonar.

20 Se llevó a cabo una puntuación de inflamación pulmonar y fibrosis histológica en secciones teñidas con tricrómico de Masson. La inflamación (grosor de la pared peribronquiolar, perivascular y alveolar) puntuó en > 5 campos aleatorios con un aumento de X630 utilizando el siguiente sistema (peribronquiolar y perivascular, 1 = sin células, 2 = < 20 células, 3 = 20-100 células, 4 => 100 células; grosor de la pared alveolar, 1 = sin células, 2 = 2-3 grosor de células, 3 = 4-5 grosor de células, 4 => 5 grosor de células). La puntuación inflamatoria combinada fue la suma de estas puntuaciones. La puntuación de fibrosis se evaluó como el área de la sección teñida positivamente para colágeno (1 = ninguno, 2 = < 10 %, 3 = < 50 %, 4 => 50 %). Solo se puntuaron los campos en los que la mayor parte del campo estaba compuesto por alvéolos.

Determinación de colágeno pulmonar mediante ensayo de Sircol

30 Se determinó el contenido de colágeno en el lóbulo del pulmón izquierdo mediante el ensayo de Sircol según las instrucciones del fabricante. El lóbulo izquierdo se trituró en 5 ml de pepsina 3 mg/ml en ácido acético 0.5 M y se incubó con agitación a 4 °C durante 24 h. El extracto de pulmón depurado (0.2 ml) se incubó con 0.8 ml de reactivo de Sircol durante 1 h a temperatura ambiente y el colágeno precipitado se centrifugó a 10.000 g durante 5 min a 4 °C. Los sedimentos se solubilizaron en 1 ml de NaOH 1 M y se midió la absorbancia a 570 nm junto con estándares de colágeno.

Aislamiento de células epiteliales alveolares primarias de tipo II

40 Se extrajeron células epiteliales alveolares (AEC) de pulmón tipo II de ratón tratadas y de control siguiendo un método estándar. Brevemente, se administró 1 ml de dispasa 50 U/ml (BD Biosciences) por vía intratraqueal en pulmones perfundidos seguido de instilación de 0.5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1 %. La agarosa dentro de las vías respiratorias superiores se dejó reposar en hielo durante 2 minutos y los pulmones se colocaron en 4 ml de dispasa 50 U/ml durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se dispersaron los lóbulos pulmonares menos las vías respiratorias superiores en DMEM que contenía 50 μ g/ml de DNasa I (Sigma-Aldrich, Reino Unido). La suspensión celular se pasó a través de un filtro de malla de células de 100 μ m y las células se lavaron en DMEM seguido de resuspensión en DMEM que contenía FCS al 10 %. La suspensión celular se sembró sobre plástico de cultivo de tejidos durante 1 h para permitir que se adhirieran los fibroblastos y macrófagos contaminados. Se contaron las células epiteliales no adherentes y se cultivaron durante 2 días sobre plástico de cultivo de tejidos o cubreobjetos recubiertos previamente con 5 μ g/ml de colágeno (AMS Biotechnology) y 10 μ g/ml de fibronectina (Sigma-Aldrich). Las células se lavaron tres veces en PBS antes del tratamiento. Las células epiteliales se incubaron en DMEM que contenía FCS al 10 %, 50 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomycin y 5 μ g/ml de L-glutamina o se transfirieron a medio de ratón completo (DMEM/F-12 que contenía BSA al 0.25 %, hidrocortisona 10 nm, 5 μ g/ml de Insulina-Transferrina-Sodio-Selenito (ITS) y se complementaron con 0.1 mg/ml de succinato de sodio, 75 μ g/ml de ácido succínico y 1.8 μ g/ml de bitartrato de colina).

55 Transferencia Western

Las células se lisaron en HEPES 25 mM pH 7.4, NaCl 0.3 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, triton X-100 al 0.5 %, ditiotreititol 0.5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasa (Boehringer Mannheim, Sussex, Reino Unido); preparado según las instrucciones del fabricante). Los lisados se equilibraron para la proteína utilizando el reactivo de ensayo de proteínas BCA Pierce (Pierce) y se resolvieron en geles SDS-PAGE al 12%. Se realizó análisis de transferencia de Western utilizando los siguientes anticuerpos primarios; anti-beta-catenina de conejo, (BD Biosciences), anticuerpo anti-beta-actina policlonal de conejo (Sigma, Reino Unido), beta-catenina anti-activa de ratón (ABC) (Millipore).

Ejemplo 1 Medición de los niveles de galectina-3 en biopsias de pulmón humano:

Se tomaron muestras de biopsias de pacientes con neumonía intersticial habitual (UIP), la causa más común de IPF. Las biopsias se fijaron en formalina tamponada neutra durante 12-24 h antes de embeberlas en cera de parafina para seccionamiento. Se cortaron secciones de 5 um y se transfirieron a portaobjetos de vidrio. Las secciones se desparafinaron en xileno durante 10 minutos y se rehidrataron al colocar los portaobjetos durante 2 minutos cada uno en etanol graduado (100 % -95 % -80 % -70 % -50 % de agua) La recuperación del antígeno se realizó mediante secciones de microondas en citrato 0.01 a pH 6.0 durante 15 min. Después de enfriar en agua potable de red, se bloqueó la peroxidasa al incubar en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 15 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloqueó la unión no específica utilizando un bloque de proteína libre de suero y un kit de bloqueo de avidina/biotina (Vector Laboratories, EE.UU.). Las secciones se incubaron con el clon 9C4 de galectina-3 antihumana monoclonal de ratón de Novocastra (diluido a 1:100 en diluyente de anticuerpos, DAKO, Reino Unido) durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario IgG anti-ratón de conejo (H+L) biotinilado (diluido 1:200 en diluyente de anticuerpo) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagaron 3 veces con PBS y se incubaron con 3 gotas de complejo de avidina: enzima biotinilada (R.T.U. Vectastain Elite ABC Reagent, PK-7100, Vector Labs, Burlingame, CA, EE.UU.) durante 30 minutos seguido de diaminobencidina líquida (DAB) (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468, Dako UK Ltd, Cambridgeshire) en la oscuridad durante 10 minutos.

Los portaobjetos se enjuagaron 3 veces en PBS, se contratiñeron durante 30 segundos con hematoxilina de Mayers (ThermoShandon, Reino Unido) y 30 segundos en agua potable Scotts (MgSO₄ 83 mM, NaHCO₃ 7.1 mM en agua potable), se deshidrataron a través de etanol graduado (70 %, 90 %, 100 % 2 min cada uno) y se depuraron en xileno. Los portaobjetos se montaron utilizando una solución de montaje Pertex (CellPath Hemel Hempstead, Reino Unido).

Las secciones se visualizaron mediante microscopía de luz.

La galectina-3 está marcadamente regulada por aumento en áreas fibroproliferativas en el pulmón de pacientes con UIP.

Ejemplo 2 Método para medición de los niveles de Galectina-3 en suero humano o fluido de lavado broncoalveolar humano:

1. Diluya el Anticuerpo de Captura a la concentración de trabajo en PBS sin proteína transportadora. Recubra inmediatamente una microplaca de 96 pocillos con 100 µl por pocillo del Anticuerpo de Captura diluido. Selle la placa e incube durante la noche a temperatura ambiente.

2. Aspire cada pocillo y lave con Tampón de Lavado, repitiendo el proceso dos veces para un total de tres lavados. Lave llenando cada pocillo con Tampón de Lavado (400 µL) utilizando una botella rociadora, un distribuidor de distribución o una lavadora automática. La eliminación completa del líquido en cada etapa es esencial para un buen desempeño. Después del último lavado, retire cualquier Tampón de Lavado restante al aspirar o invertir la placa y secar con toallas de papel limpias.

3. Bloquee las placas al agregar 300 µL de Diluyente de Reactivo a cada pocillo. Incube a temperatura ambiente por un mínimo de 1 hora.

4. Repita la aspiración/lavado como en la etapa 2. Las placas están ahora listas para la adición de la muestra.

Procedimiento de ensayo

1. Agregue 100 µL de muestra o estándares en Diluyente de Reactivo, o un diluyente apropiado, por pocillo. Cubra con una tira adhesiva e incube 2 horas a temperatura ambiente.

2. Repita la aspiración/lavado como en la etapa 2 de Preparación de Placa.

3. Agregue 100 µL del Anticuerpo de Detección, diluido en Diluyente de Reactivo, a cada pocillo. Cubra con una nueva tira adhesiva e incube 2 horas a temperatura ambiente.

4. Repita la aspiración/lavado como en la etapa 2 de Preparación de Placa.

5. Agregue 100 µL de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Cubra la placa e incube durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evite colocar la placa a la luz directa.

5 6. Repita la aspiración/lavado como en la etapa 2.

7. Agregue 100 µL de Solución de Sustrato a cada pocillo. Incube durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evite colocar la placa a la luz directa.

10 8. Agregue 50 µL de solución de detención a cada pocillo. Golpee suavemente la placa para asegurar una mezcla completa.

15 9. Determine la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente, utilizando un lector de microplacas configurado a 450 nm. Si la corrección de la longitud de onda está disponible, configúrela en 540 nm o 570 nm. Si la corrección de la longitud de onda no está disponible, reste las lecturas a 540 nm o 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta resta corregirá las imperfecciones ópticas de la placa. Las lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección pueden ser más altas y menos precisas.

20 Ejemplo 3 Medición de los niveles de galectina-3 en suero de pacientes y controles:

Se tomaron muestras de suero de pacientes con UIP, pacientes con neumonía intersticial no específica (NSIP) y controles de la misma edad. Se midieron los niveles de galectina-3 utilizando el método ELISA descrito en el ejemplo 2. El suero se recogió y se almacenó a -80 °C antes del ensayo. Las muestras se diluyeron normalmente 1:10 en PBS antes del ensayo. Se llevó a cabo ELISA como se describe en el protocolo del fabricante:

25 Se midió la Galectina-3 en serie (en 2-5 ocasiones) en el suero de 6 pacientes con IPF estable (UIP). La IPF estable se definió como ningún cambio significativo en la tolerancia al ejercicio, la disnea o la función pulmonar. La Galectina-3 estaba elevada en el suero de pacientes con IPF (control 17.9 ± 0.95 ng/ml $n = 8$, IPF 26.7 ± 4.7 ng/ml $n = 6$, $P < 0.05$) pero no en pacientes con neumonía intersticial inespecífica (NSIP) (concentración sérica 14.57 ± 0.84 ng/ml ($n = 10$)).

35 El nivel sérico de galectina-3 permanece notablemente constante a lo largo del tiempo en estos pacientes (galectina-3 sérica 25.5 ± 0.8 ng/ml $n = 23$). Analizamos 5 muestras de suero de pacientes sometidos a una exacerbación aguda de IPF. Estos pacientes se definieron por tener una exacerbación aguda por disminución del ejercicio hasta la tolerancia, disminución de la función pulmonar y aumento de la disnea. En estos pacientes hubo un aumento dramático de la galectina-3 sérica, 73.8 ± 12.2 ng/ml. Adicionalmente, identificamos a 2 pacientes que tenían mediciones de galectina-3 seriadas antes y durante una exacerbación aguda de su IPF. Ambos pacientes muestran niveles séricos estables de galectina-3 durante el período en que su función pulmonar se mantuvo estable. Sin embargo, durante una exacerbación aguda cuando la función pulmonar disminuyó, hubo un aumento brusco de la galectina-3 sérica.

40 Ejemplo 4 Medición de los niveles de galectina-3 en el fluido BAL de pacientes y controles:

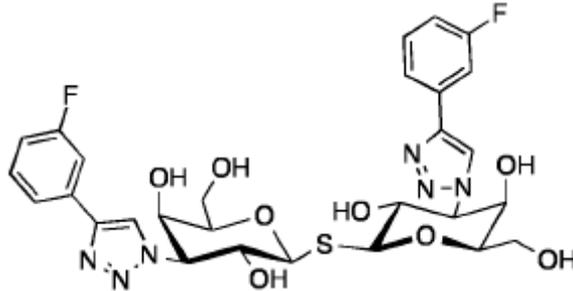
45 Se tomaron muestras de fluido de lavado bronco-alveolar (BAL) de pacientes con IPF y controles de la misma edad utilizando una técnica estándar. Brevemente, se pasó un broncoscopio a través de la boca o la nariz hasta los pulmones y se enjuagó una pequeña sección del pulmón con una cantidad específica de solución salina. El fluido BAL se recogió y se almacenó a -80 °C. El nivel de Galectina-3 se midió utilizando el método ELISA descrito en el Ejemplo 2.

50 Los niveles de galectina-3 se elevaron significativamente en muestras de BAL de pacientes con IPF en comparación con controles de la misma edad (control 18.8 ± 3.6 ng/ml $n = 16$, IPF 39.7 ± 3.7 ng/ml $n = 15$, $P < 0.01$).

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo adecuado para administración pulmonar en el que dicho dispositivo es un inhalador de polvo seco que comprende una composición que comprende un compuesto de la fórmula (I)

5



en el que el compuesto de la fórmula (I) está presente como partículas de un tamaño seleccionado a partir de un diámetro aerodinámico de masa medio entre 0.1 y 20 μm .

10

2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula (I) está presente como partículas de un tamaño seleccionado a partir de un diámetro aerodinámico de masa medio de entre 0.5 y 10 μm .

15

3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula (I) está presente como partículas de un tamaño seleccionado a partir de un diámetro aerodinámico de masa medio de entre 1 y 5 μm .

4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método para tratamiento de fibrosis pulmonar.

