

Artigos de revisão

Avaliação da eficácia da adição de ensifentrina ao tratamento com tiotrópio em comparação com o uso exclusivo de tiotrópio: uma revisão sistemática e meta-análise

Fernanda de Oliveira Ramos,¹ Bruno Eulálio Santos,¹ Julia Hafermann Romão,² Geraldo Lucas Lopes Costa,¹ Guido Tasca Petroski,¹ Pedro Henrique Siedschlag Schmidt,¹ Mariangela Pimentel Pincelli³

1. Estudante do Curso de Graduação em Medicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
2. Estudante do Curso de Graduação em Medicina, Universidade do Sul de Santa Catarina. Palhoça, Santa Catarina, Brasil.
3. Professora do Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Palavras-chave: ensifentrina; metanálise; doença pulmonar obstrutiva crônica; tratamento

Autor para contato: Bruno Eulálio Santos. E-mail blkfut1007@gmail.com

DOI:10.32963/bcmufsc.v10i3.7758

Resumo

Introdução. Há diversas terapias inalatórias disponíveis para o tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). No entanto, muitos pacientes ainda sofrem com sintomas e limitações na função pulmonar. Isso destaca a necessidade de adicionar novas terapias complementares na tentativa de melhoria dos sintomas e da qualidade de vida destes pacientes. **Objetivos.** Realizamos uma meta-análise para avaliar a eficácia da adição de Ensifentrina (ENS) ao tratamento com Tiotrópio (TIO) em comparação com o uso exclusivo de Tiotrópio em pacientes com DPOC. **Método.** Nós pesquisamos no Pubmed, Embase e Cochrane por ensaios clínicos randomizados e controlados (ERCs). Posteriormente, identificamos os seguintes desfechos de interesse: Pico de VEF1 no dia 1, Área Sob a Curva (ASC) média do VEF1 (0-12h), Tratamento de Emergência relacionado a Eventos Adversos (TEEA) e qualquer Efeito Adverso (EA). Também analisamos os seguintes subgrupos: Pico de VEF1 Alta Dose (AD) (>1,5mg), Pico de VEF1 Baixa Dose (BD), ASC média de VEF1 (0-12H) Baixa Dose (\leq 1,5mg) e ASC Média do VEF1 (0-12H) Alta Dose. A análise estatística foi realizada usando RevMan 5.4.1. A heterogeneidade foi avaliada com estatística I². **Resultados.** Identificamos 3 RCTs com um total de 528 pacientes incluídos. Houve diferença para os resultados individuais de Pico de VEF1 no dia 1 (Diferença Média (MD) 97.15 ml; 95% IC [59.65, 134.66]; $p < 0.00001$; I²=0%) e média de VEF1 ASC (0-12H) (Medida de Desvio Padrão (SMD) 0.24; 95% IC [0.03, 0.45]; $p = 0.03$; I²=0%), que foram estaticamente elevados em pacientes tratados com ENS+TIO em comparação com Placebo (PBO) + Tiotrópio. Em relação ao pico de VEF1 no dia 1 o subgrupo Dose Alta observou-se resultado clinicamente significativo (SD 106.10 ml; 95% IC [38.43, 173.78]; $p = 0.002$; I²=27%). Além disso, analisamos quaisquer eventos adversos graves emergentes do tratamento e qualquer efeito adverso, em que não houve diferença significativa para o número destes eventos, comparando ENS+TIO à terapia convencional com Tiotrópio. **Conclusão:** Os resultados desta meta-análise sugerem que o uso de ENS+TIO promove broncodilatação adicional significativa em pacientes com DPOC e apresenta bom perfil de segurança. Esses achados indicam que ENS+TIO podem ser considerados no tratamento de pacientes com DPOC.

INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma condição pulmonar heterogênea caracterizada por sintomas respiratórios crônicos (dispneia, tosse, produção de escarro e/ou exacerbações) devido a anormalidades das vias aéreas (bronquite, bronquiolite) e/ou alvéolos (enfisema) que causam obstrução persistente ao fluxo aéreo, muitas vezes progressiva.¹ Os

(LAMAs) e agonistas beta2 de ação prolongada (LABAs), bem como corticosteroides inalados (ICS). No entanto, apesar de receberem as doses mais elevadas de terapias inaladas, numerosos pacientes continuam a apresentar sintomas e limitações funcionais^{2,4}.

Diante disso, a Ensifentrina (RLP-554), um inibidor das enzimas fosfodiesterases 3 e 4 (PDE3 e PDE4), surge como um novo medicamento inalado que se mostrou promissor na complementação do tratamento da DPOC. O medicamento tem como objetivo facilitar efeitos anti inflamatórios nas vias aéreas, broncodilatação e promover melhora da função ciliar no epitélio brônquico^{5,6}. Estudos pré-clínicos^{2,3} e ensaios clínicos anteriores com número limitado de pacientes sugerem broncodilatação adicional quando a RLP-554 é adicionada ao Tiotrópio. Além disso, persiste o debate quanto à necessidade de uma dose baixa ou alta de Ensifentrina quando combinada com Tiotrópio para obter broncodilatação adicional. Diante deste incerteza, conduzimos uma meta-análise para avaliar a eficácia de ENS+TIO versus placebo +TIO em pacientes com DPOC. Explorou-se populações com doses baixas e altas com um intervalo de acompanhamento entre 3 e 28 dias.

MÉTODO

Esta revisão sistemática e meta-análise foram realizadas de acordo com as diretrizes do Cochrane Collaboration Handbook for Systematic Review of Interventions e das diretrizes da PRISMA. O protocolo de meta-análise de intervenção foi registrado no PRÓSPERO em 17 de fevereiro de 2024, sob número de protocolo CRD42024510265. O registro utilizado encontra-se no Apêndice A.

Critérios de elegibilidade

A inclusão nesta meta-análise foi restrita a estudos que atendessem a todos os seguintes critérios de elegibilidade: ¹ensaios clínicos randomizados e controlados; ²comparação de Ensifentrina + Tiotrópio com Placebo + Tiotrópio; ³em pacientes com DPOC que apresentassem limitação do fluxo aéreo no exame espirométrico; ⁴não tratados ou recebendo monoterapia (LABA), terapia dupla (LABA + LAMA) ou terapia tripla (LABA + LAMA + ICS). Além disso, foram incluídos apenas os estudos que relataram algum dos desfechos clínicos de interesse. Foram Bol Curso Med UFSC 2024; 10 (3)

excluídos estudos envolvendo Ensifentrina para outras condições além da DPOC.

Estratégia de pesquisa e extração de dados

Pesquisamos sistematicamente PubMed, Scopus e Cochrane Central Register of Controlled Trials desde o início até janeiro de 2024 com os seguintes termos de pesquisa: 'Ensifentrine', 'RPL554', 'COPD' e 'treatment'. As referências de todos os estudos incluídos, bem como revisões sistemáticas anteriores, também foram pesquisadas manualmente em busca de estudos adicionais. Dois autores (Santos, B. E. e Ramos, F. O.) extraíram independentemente os dados seguindo critérios de pesquisa predefinidos e avaliação de qualidade. No Apêndice A encontra-se o protocolo PROSPERO bem como as frases de busca utilizadas em cada plataforma.

Desfechos e análises de subgrupos

Os resultados incluíram pico de VEF1 no dia 1, ASC média de FEV1 (0–12h) e qualquer TEAE e qualquer TEAE grave. Foram examinamos todos os desfechos de interesse citados anteriormente. Dividimos os participantes em dois grupos com base na dosagem do tratamento, conforme orientação da literatura relevante sobre o tema. Definimos Dose Baixa (DB) como aqueles grupos de participantes em que o grupo de intervenção recebeu dosagem de RLP-554 igual ou inferior a 1,5mg. Todos os grupos de participantes que receberam dosagem acima de 1,5mg foram categorizados como Dose Alta (DA).

Avaliação da qualidade

Avaliamos o risco de viés em estudos randomizados usando a versão 2 da ferramenta de avaliação Cochrane Risk of Bias. Dois autores independentes completaram a avaliação do risco de viés (Santos, B. E. e Ramos, F. O.). As divergências foram resolvidas por meio de consenso após discussão dos motivos da discrepância. A certeza das evidências foi classificada de acordo com o método Grading of

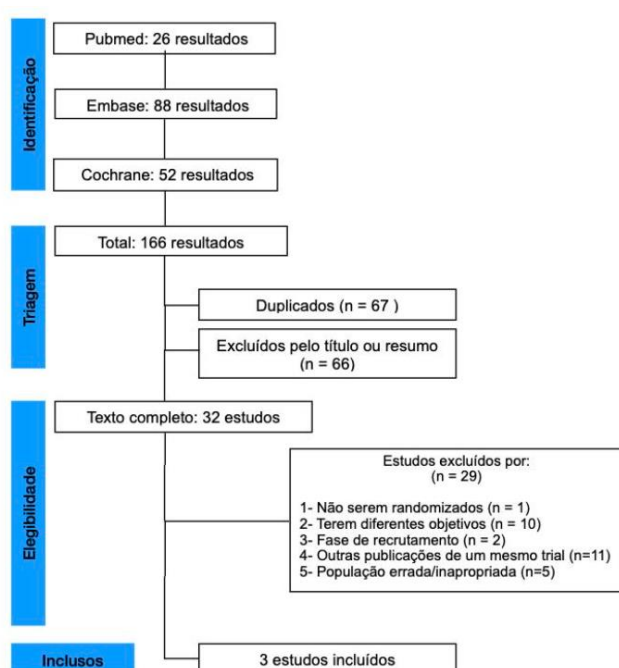
Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE).

Análise estatística

A Razão de Risco (RR) com intervalos de confiança de 95% foi usada para comparar os efeitos do tratamento para desfechos categóricos. Os resultados contínuos foram comparados com diferenças médias padronizadas e diferenças médias de acordo com requisitos estatísticos. Avaliamos a heterogeneidade com estatística I² e teste Cochran Q; Valores de $p < 0,10$ e $I^2 > 25\%$ foram considerados significativos para heterogeneidade. Utilizamos um modelo de efeito fixo para desfechos com baixa heterogeneidade ($I^2 < 25\%$). Nos estudos de Atribuição Cruzada incluídos, apenas a população abordada no primeiro período de tratamento foi considerada para evitar sobreposição populacional. O Review Manager 5.4.1 (Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, Dinamarca) foi utilizado para análise estatística.

RESULTADOS

Seleção dos estudos e características iniciais



E

Figura 1. Diagrama PRISMA de fluxo, triagem e seleção de estudos

Conforme mostrado na Figura 1, a pesquisa inicial produziu 166 resultados. Após remoção de duplicatas e exclusão de estudos com base na triagem de título/resumo, 32 estudos foram revisados na íntegra. Por fim, três RCTs com 528 pacientes foram incluídos na revisão sistemática e na meta-análise. As características do estudo estão relatadas na Tabela 1. Entre os 528 pacientes, 303 (57,3%) eram do sexo feminino, predominantemente de etnia branca. Além disso, toda a população do estudo apresentou um período de acompanhamento variando de 3 a 28 dias e valores basais de VEF1 pós-broncodilatador entre $\geq 30\%$ e $< 80\%$. Além disso, esses pacientes utilizaram ensifentrina na forma nebulizada.

Análises agrupadas de todos os estudos

Pico de VEF1 no dia 1 (Diferença Média (MD) 97.15 ml; 95% Intervalo de Confiança (IC) [59.65, 134.66]; $p < 0.00001$; $I^2=0\%$) e Área sob a curva (ASC) Média de VEF1 (0-12H) (Diferença Média Padrão (DMP) 0.24; 95% IC [0.03, 0.45]; $p = 0.03$; $I^2=0\%$) apresentaram uma diferença estatística significativa, porém não clinicamente significativo em pacientes tratados com ENS + TIO em comparação com PBO+TIO. A respeito da análise do perfil de segurança, de acordo com a revisão sistemática, Tratamento de Emergência relacionado a Eventos Adversos (TEAEs) Ferguson, 2021 21/246 grupo BD e 10/83 eventos no grupo AD; Richard K, 2020 15/75 eventos no grupo BD e 15/74 AD; Singh, 2018 16/29 eventos no grupo BD e 20/27 eventos no grupo AD e Qualquer Eventos Adversos (AE) (Ferguson, 2021 21/246 grupo BD e 10/83 eventos no grupo AD; Richard K, 2020 15/75 eventos no grupo BD e 15/74 eventos no grupo AD; Singh, 2018 16/29 eventos no grupo BD e 20/27 eventos no grupo AD foram avaliados. Por fim, ao analisar os seguintes tópicos, nenhum evento foi identificado: hora do primeiro evento (exacerbação), taxa anualizada de eventos de exacerbação, tempo até o primeiro evento, quaisquer eventos adversos emergentes do tratamento (TEAEs) causalmente relacionados ao

Tabela 1. Características de base dos estudos

	Linha de base pos-broncodilatador			Média pos-broncodilatador FEV1, % (SD)	Medida de tempo-ano	Rota de administração	Número de pacientes	Raça, n (%)		Média idade, ano (SD)	Sexo e idade, n (%)	
	FEV1	FEV1/FVC	Aumento previsto, ml					Branco	Negro		Feminino	Masculino
Fergaon, G. T. 2021	≥30% e ≤70%	≤0.70	NA	50.1 (10.25)	57.9 (25.22)	Nebulizada	415	372 (90.1)	41 (9.9)	64.3 (8.06)	237 (57.4)	178 (42.6)
Richard K 2020	≥30% e ≤70%	≤0.70	>150	ND	ND	Nebulizada	79	72 (91.1)	6 (7.6)	62.7	46 (62.0)	30 (38.0)
Singh 2018	≥40% e <80%	ND	>150	50.4 (12.2)	47.1 (18.3)	Nebulizada	36	36 (100)	ND	61.3 (5.2)	17 (47.2)	19 (52.8)

FEV1: Volume expiratório forçado ao final do primeiro segundo; FVC: Capacidade Vital forçada; ND: Não Disponível

tratamento, qualquer evento adverso grave, palpitações e pré-síncope. Nenhum evento foi identificado após a enumeração dos eventos que foram analisados.

Análise de subgrupos

Pico de VEF1 no dia 1 BD (SD 89.92 ml; 95% IC [50.72, 129.12]; $p < 0.00001$; $I^2=0\%$) e Pico de VEF1 no dia 1 AD (SD 106.10 ml; 95% IC [38.43, 173.78]; $p = 0.002$; $I^2=27\%$) foram estatisticamente elevados em pacientes tratados com ENS+TIO em comparação com placebo + TIO. Sendo que Pico de VEF1 no dia 1 AD foi o único desfecho que obteve resultado clinicamente significativo (44). Com relação a ASC média de FEV1 (0–12h) no grupo BD, (DMP 0.21; 95% IC [-0.01, 0.44]; $p = 0.07$; $I^2=0\%$), não houve indicação de diferença em comparação com o grupo placebo. Por outro lado, no grupo AD, (SMD 0.32; 95% IC [0.05, 0.58]; $p = 0.02$; $I^2=0\%$), houve evidência de um perfil de melhoria favorável em comparação com o grupo controle.

Avaliação de qualidade

A ferramenta Risk of Bias 2 (RoB 2) foi utilizada para avaliação da qualidade⁷. Nenhum estudo foi considerado de alto risco de viés.

DISCUSSÃO

Nesta meta-análise de 3 ERC's que incluiu o total de 528 pacientes, a incorporação de ensifentrina à terapia convencional de tiotrópio foi comparada ao uso de tiotrópio isolado. Os principais achados da análise foram: ¹a ENS+TIO obteve diferença estaticamente significativa em Bol Curso Med UFSC 2024; 10 (3)

relação ao pico de VEF1 no dia 1 quando comparado com TIO+ placebo $p < 0.00001$, ²Área sob a curva média de FEV1(0–12h) houve evidência de um perfil de melhora estatisticamente significativo ($p = 0.03$) quando comparado ao grupo controle.³ Acerca do perfil de segurança, analisamos Qualquer Tratamento de Emergência relacionado a Eventos Adversos e Tratamento de Emergência relacionado a Eventos Adversos, onde o número de eventos para cada estudo analisado não foi significativamente diferente entre os grupos de estudo, comparando ENS + TIO à terapia convencional com tiotrópio. Nenhum dos desfechos primários foram clinicamente significativos. Porém, ao analisar o subgrupo pico de VEF1 no dia 1 Dose Alta observou-se resultado clinicamente significativo (SD 106.10 ml; 95% IC [38.43, 173.78]; $p = 0.002$; $I^2=27\%$).

Está bem definido na literatura que o tiotrópio é o Antagonista Muscarínico de longa ação (LAMA) mais estudado e o tratamento de escolha mais utilizado para a manutenção de pacientes com DPOC⁸. No entanto, a falta de uma resposta broncodilatadora instantânea ao tiotrópio⁹ possibilita a associação da RLP-554, ao tratamento já estabelecido, como estratégia de ampliar os benefícios da terapêutica. Além disso, a avaliação da ação do ENS+TIO no pico de VEF1 do dia 1 contribui para análise das vantagens da medicação possivelmente poder cobrir essa lacuna de não responsividade broncodilatadora imediata do Tiotrópio.

A RLP-554 é uma droga que atua inibindo as fosfodiesterases PDE3 e PDE4. As evidências sugerem que ela visa à broncodilatação devido a inibição da PDE3 e promove um efeito anti-inflamatório em decorrência da inibição de PED4¹⁰. Nosso estudo mostrou que a associação ENS+TIO quando administrada duas vezes ao

dia pode promover uma broncodilatação mais rápida e sustentada por 12 horas após a dose inicial, um efeito relevante para pacientes no que tange ao alívio dos sintomas. Uma vez que os estudos indicavam que as melhorias eram dose dependentes e como existia grande diversidade de grupos de dosagens, dividimos a população em subgrupos: Baixa Dose (0.375mg, 0.75mg, 1.5mg) de ENS+TIO e Alta Dose (3mg e 6mg)¹¹ de ENS+TIO. Quando observamos o subgrupo Pico do VEF1 no dia 1 AD temos (MD 89.92 ml IC 95% [50.72,129.12]), já o subgrupo Pico do VEF1 no dia 1 AD oferece (MD 106.10 ml IC 95% [38.43,173.78]) clinicamente significativo⁴⁴ e acreditamos que essa diferença esteja relacionada, provavelmente, a diferença significativa de dosagem entre o grupo AD e BD, o que reforça a relação dose dependência. Além disso, a diferença nesses valores entre os grupos AD e BD não foi tão expressiva e traz o questionamento da real vantagem quanto ao custo-benefício do uso de doses maiores que 1.5 mg, ainda que, no que tange a dosagem a RLP-554 seja bem tolerada e tenha potencial de causar menos efeitos colaterais em todas as miligramagens avaliadas.¹²

No que concerne a avaliação da ASC Média de FEV1 (0–12h), o subgrupo BD não apresentou discrepância em relação ao grupo placebo ($p= 0.07$) e isso se deveu, provavelmente, à diferença no desenho estatístico. Também é possível questionar a respeito dos seguintes tópicos: primeiro, se o aumento no número de participantes no grupo BD poderia, possivelmente, tornar o p relevante. Segundo, se uma baixa dosagem teria a real capacidade de sustentar um pico de 12 horas quando se trata da média global. Em contrapartida o subgrupo AD apresentou melhora significativa nos desfechos analisados ($p=0.02$), demonstrando a viabilidade do uso de uma dose maior que 1.5mg quando se objetiva um aumento da média global do pico de VEF1, ainda que se deva ponderar os riscos e benefícios.

Outro aspecto interessante nos estudos é a constatação de que a ensifentrina nebulizada foi bem tolerada no período de tempo analisado e que a RPL554 tem menor potencial de efeitos

colaterais em comparação com oral, devido a exposição sistêmica reduzida.¹²

Ademais, no que se refere ao perfil de segurança, analisamos Qualquer Tratamento de Emergência relacionado a Eventos adversos e Tratamento de emergência relacionado a eventos adversos, em que o número de eventos para cada estudo analisado não foi significativo quando a Ensifentrina foi adicionada ao tratamento.¹³

Nossa meta-análise apresentou algumas limitações: foram consultadas poucas bases de dados, porém as principais. Não foi consultada a literatura cinzenta. Os estudos de atribuição cruzada podem ter uma variabilidade maior nos resultados devido a diferenças nos períodos de "washout", ordem das intervenções e características individuais dos participantes, o que pode aumentar a heterogeneidade entre os estudos incluídos na meta-análise e apresentar o risco de sobreposição de populações. Como forma de solucionar o problema, utilizamos apenas a primeira população abordada para o primeiro período de tratamento. Ademais, houve a presença de heterogeneidade no grupo Pico do VEF1 dia 1 AD decorrente, muito provavelmente, da diferença no desenho dos estudos e do número de participantes entre os estudos adicionados, contudo, é válido ressaltar, que o resultado apresentou baixa relevância, a observar que na estatística do Pico do VEF1 dia 1 a heterogeneidade se expressa com um valor de zero. Ademais, devido a limitações de dados, não pudemos analisar os subgrupos do RLP-554 aplicados a pacientes previamente tratados com mono, dupla ou tripla terapia de forma distinta. Além disso, devido às restrições nos estudos incluídos, não foi viável realizar uma síntese sobre o efeito da droga em relação a taxa de exacerbação desses pacientes.

CONCLUSÃO

Os resultados desta meta-análise sugerem que o uso de ENS+TIO promove broncodilatação adicional clinicamente significativa em pacientes com DPOC e apresenta bom perfil de segurança. Nossos achados indicam um aumento dose-dependente, com doses baixas de ENS+TIO sendo suficientes para broncodilatação adicional substancial. Esses achados sugerem que a combinação ENS+TIO podem ser considerados no tratamento de pacientes com DPOC.

REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). (2024). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: 2024 report. Retrieved from <https://goldcopd.org/2024-gold-report/>
2. Calzetta L, Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG. Pharmacological characterization of the interaction between the dual phosphodiesterase (PDE) 3/4 inhibitor RPL554 and glycopyrronium on human isolated bronchi and small airways. *Pulm Pharmacol Ther* 2015; 32: 15-23
3. Calzetta L, Page CP, Spina D, Cazzola M, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG. Effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor RPL554 on human isolated bronchial smooth muscle tone. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346: 414-423
4. Mahler D, Decramer M, D'Urzo A, et al. Dual bronchodilation with QVA149 reduces patient-reported dyspnoea in COPD: the BLAZE study. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1599–1609. doi:10.1183/09031936.00124013
5. Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA, Page CP. The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 840–848
6. Turner MJ, Dautlebaev N, Lands LC, Hanrahan JW. The phosphodiesterase inhibitor ensifentrine reduces production of proinflammatory mediators in well differentiated bronchial epithelial cells by inhibiting PDE4. *J Pharmacol Exp Ther* 2020; 375: 414–429
7. Higgins JPT, Savović J, Page MJ, Elbers RG, Sterne JAC. Chapter 8: Assessing risk of bias in a randomized trial. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 5.4.1). Cochrane, 2023
8. Maia IS, Pincelli MP, Leite VF, Amadera A, Buehler AM. Antagonistas muscarínicos de longa duração vs. β_2 -agonistas de longa duração em exacerbações da DPOC: revisão sistemática e meta-análise. *J Bras Pneumol*. 2017; 43(4): 302-312
9. Tashkin D, Kesten S. Long-term treatment benefits with tiotropium in COPD patients with and without short-term bronchodilator responses. *Peito*. 2003; 123(5):1441-9
10. Zuo H, Cattani-Cavaliere I, Musheshe N, Nikolaev V, Schmidt M. Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacol Ther*. 2019; 197:225–242.
11. Rickard K. et al. Bronchodilator Effect of RPL554 Administered in Addition to Tiotropium/ Olodaterol in Patients With COPD. National Library of Medicine, 2020
12. Singh D, Banner K, Bengtsson T, Newman K. The short term bronchodilator effects of the dual PDE3 and PDE4 inhibitor RPL554 in COPD. *Eur Respir J*. 2018; 52: 1801074
13. Ferguson GT, Kerwin EM, Rheault T, Bengtsson T, Rickard K. A dose ranging study of the Novel Inhaled Dual PDE and 4 Inhibitor Enfisentrine in Patients with COPD Receiving Maintenance Tiotropium Therapy. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2021; 16: 1137–1148
14. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed April 12, 2021
15. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; 2020. Available from: <https://goldcopd.org/gold-reports/>. Accessed April 12, 2021
16. Vestbo J, Papi A, Corradi M, et al. Single inhaler extrafine triple therapy versus long-acting muscarinic antagonist therapy for chronic obstructive pulmonary disease (TRINITY): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389 (10082):1919–1929. doi:10.1016/S0140-6736(17)30188-5
17. Mahler D, Decramer M, D'Urzo A, et al. Dual bronchodilation with QVA149 reduces patient-reported dyspnoea in COPD: the BLAZE study. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1599–1609. doi:10.1183/09031936.00124013
18. Banner KH, Press NJ. Dual PDE3/4 inhibitors as therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol*. 2009;157 (6):892–906. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00170.x
19. De Boer J, Philpott AJ, Van Amsterdam RG, Shahid M, Zaagsma J, Nicholson CD. Human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: biochemical and pharmacological analysis using selective inhibitors. *Br J Pharmacol*. 1992;106(4):1028–1034. doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb14451.x
20. Page CP, Spina D. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. In: Francis S, Conti M, Houslay M, editors. *Phosphodiesterases as Drug Targets*. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer; 2011:391–414

21. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ. M2-124 and M2-125 Study Groups. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*. 2009;374(9691):685–694. doi:10.1016/S0140-6736(09)61255-1
22. Singh D, Nandeuil MA, Pigeon-Francisco C, et al. Efficacy and safety of CHF6001, a novel inhaled PDE4 inhibitor in COPD: the Pioneer Dose Finding Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199: A4529
23. DALIRESP® (roflumilast) [prescribing information]. Wilmington, DE: AstraZeneca Pharmaceuticals LP; January, 2018.
24. Zuo H, Cattani-Cavaliere I, Musheshe N, Nikolaev V, Schmidt M. Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacol Ther*. 2019;197:225–242
25. Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA, Page CP. The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2-(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 840-848.
26. Franciosi LG, Diamant Z, Banner KH, Zuiker R, Morelli N, Kamerling IM, de Kam ML, Burggraaf J, Cohen AF, Cazzola M, Calzetta L, Singh D, Spina D, Walker MJ, Page CP. Efficacy and safety of RPL554, a dual PDE3 and PDE4 inhibitor, in healthy volunteers and in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: findings from four clinical trials. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 714-727
27. de Boer J, Philpott AJ, van Amsterdam RG, Shahid M, Zaagsma J, Nicholson CD. Human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: biochemical and pharmacological analysis using selective inhibitors. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 1028-1034
28. Bardin PG, Dorward MA, Lampe FC, Franke B, Holgate ST. Effect of selective phosphodiesterase 3 inhibition on the early and late asthmatic responses to inhaled allergen. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 387-391
29. Myou S, Fujimura M, Kamio Y, Ishiura Y, Tachibana H, Hirose T, Hashimoto T, Matsuda T. Bronchodilator effect of inhaled olprinone, a phosphodiesterase 3 inhibitor, in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 817-820
30. Page CP, Spina D. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *Handb Exp Pharmacol* 2011: 391-414
31. Banner KH, Press NJ. Dual PDE3/4 inhibitors as therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 892-906
32. Abbott-Banner KH, Page CP. Dual PDE3/4 and PDE4 inhibitors: novel treatments for COPD and other inflammatory airway diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014; 114: 365-376
33. Calzetta L, Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG. Pharmacological characterization of the interaction between the dual phosphodiesterase (PDE) 3/4 inhibitor RPL554 and glycopyrronium on human isolated bronchi and small airways. *Pulm Pharmacol Ther* 2015; 32: 15-23
34. Calzetta L, Page CP, Spina D, Cazzola M, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG. Effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor RPL554 on human isolated bronchial smooth muscle tone. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346: 414-423
35. Singh D BK, Newman K. RPL554, an inhaled PDE3/4 inhibitor, causes profound and sustained bronchodilatations in health volunteers and COPD patients. *European Respiratory Journal* 2016; 48 (Suppl. 60)
36. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wang J, Force AET. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338
37. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. *Eur Respir J* 1993; 6 Suppl 16: 5-40
38. Langer D, Ciavaglia CE, Neder JA, Webb KA, O'Donnell DE. Lung hyperinflation in chronic obstructive pulmonary disease: mechanisms, clinical implications and treatment. *Expert Rev Respir Med* 2014; 8: 731-749
39. Venkatasamy R, Spina D. Novel relaxant effects of RPL554 on guinea pig tracheal smooth muscle contractility. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 2335-2351
40. Naline E, Qian Y, Advenier C, Raeburn D, Karlsson JA. Effects of RP 73401, a novel, potent and selective phosphodiesterase type 4 inhibitor, on contractility of human, isolated bronchial muscle. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 1939-1944.