

Brevet N°	86809	GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
du	13 mars 1987	
Titre délivré :	12 AOUT 1987	



Monsieur le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Intellectuelle  
LUXEMBOURG

## Demande de Brevet d'Invention

### I. Requête

La société dite: Fisons plc, Fison House, Princes Street, Ipswich, Angleterre, représentée par Maître Alain RUKAVINA, avocat-avoué, demeurant à Luxembourg, 10A, boulevard de la Foire, agissant en sa qualité de mandataire (1)

dépose(nt) ce treize mars 1987 quatre-vingt-sept (2)

à 15.00 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg : (3)

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :

"Composition pharmaceutique" (4)

2. la délégation de pouvoir, datée de \_\_\_\_\_ le \_\_\_\_\_

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. // planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 13 mars 1987

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :

Monsieur Hugh CAIRNS, 2, Laneslaw Avenue, Loughborough, Leicestershire, Angleterre (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de brevet d'invention déposée(s) en (7) Grande-Bretagne les 15 mars 1986 sous le no 86/06455 et 17 mars 1986 sous le no 86/06553 (8)

au nom de la déposante (9)

élit(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg 10A, boulevard de la Foire (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à // mois. (11)

Le mandataire

### II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du:

13 mars 1987

à 15.00 heures



Pr. le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes,  
p. d.

Revendication de la priorité  
de(s) la demande(s) correspondante(s)  
déposée(s) en Grande-Bretagne  
les 15.03.86 et 17.03.86  
sous les nos 86/06455 et 86/06553

M E M O I R E   D E S C R I P T I F

déposé à l'appui d'une demande de

B R E V E T   D ' I N V E N T I O N

au Grand-Duché de LUXEMBOURG

au nom de: FISOONS PLC

pour: "Composition pharmaceutique"

---

Composition pharmaceutique

5

10                    La présente invention concerne de nouveaux  
composés, leurs mélanges et des procédés pour les pré-  
parer.

                  Le nédocromil sodique, qui est le sel de sodium  
de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-  
15    pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique, a été re-  
commandé pour le traitement d'états allergiques et autres,  
en particulier des affections obstructives réversibles  
des voies aériennes.

                  Les bronchodilatateurs et les stéroïdes ont  
20    été recommandés aussi pour le traitement des affections  
obstructives réversibles des voies aériennes. Toutefois,  
le traitement au moyen d'une combinaison de constituants  
actifs, en particulier des combinaisons à dose fixée,  
peut susciter des inconvénients et il existe une forte  
25    prévention contre l'administration de ces combinaisons.  
Chez de nombreux patients, le traitement au moyen d'un  
bronchodilatateur sur une base régulière pendant une  
longue durée, par exemple six semaines, conduit à une  
baisse de la réponse à l'agent thérapeutique qui laisse  
30    le patient sans protection. Dans certains cas, l'admi-  
nistration prolongée d'un bronchodilatateur peut même  
provoquer une bronchoconstriction de rebond. Dans  
d'autres cas, l'un des constituants du mélange peut par  
lui-même suffire à maîtriser l'affection, rendant ainsi  
35    les autres constituants superflus.

La Demanderesse a découvert à présent que les mélanges de nédocromil sodique avec des agents propres à l'inhalation choisis parmi les bronchodilatateurs et les stéroïdes, les sels de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique avec ces agents, et les mélanges de ces sels avec le nédocromil sodique ou l'agent dans le rapport thérapeutique approprié offrent l'avantage qu'ils sont tant palliatifs que prophylactiques, sont plus efficaces, exposent moins à une perte de réponse, induisent moins d'effets secondaires, réduisent l'hyperactivité bronchique, peuvent être administrés en doses plus faibles, peuvent être administrés directement au site de l'affection, par exemple par inhalation, peuvent être administrés moins fréquemment, par exemple 1 ou 2 fois par jour, peuvent être administrés en thérapie à long terme, ont un effet plus durable, réduisent la candidiase induite par les stéroïdes, sont plus stables, sont synergiques, mènent le patient à une meilleure observance, ont un goût moins désagréable ou ont d'autres propriétés souhaitables par comparaison avec les stéroïdes ou bronchodilatateurs administrés tels quels, le nédocromil sodique administré tel quel ou certains autres mélanges lors d'épreuves sur des modèles pharmacologiques compétents.

L'invention a pour objet un mélange pharmaceutique comprenant

- a) un ou plusieurs d'entre l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci, comme "constituant actif A", en combinaison avec
- b) un ou plusieurs agents propres à l'inhalation choisis parmi les bronchodilatateurs, les stéroïdes et leurs dérivés pharmaceutiquement acceptables, comme "consti-

tuant actif B".

La Demanderesse préfère utiliser le sel disodique de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-10-propyl-4H-pyrano[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique, connu sous le nom de nédocromil sodique. Elle préfère aussi utiliser un seul constituant actif A en mélange avec soit un bronchodilatateur, soit un stéroïde comme constituant actif B.

Les bronchodilatateurs que le constituant B peut représenter comprennent l'isoprénaline. La Demanderesse préfère toutefois que le bronchodilatateur soit bêta-2-sélectif.

Un bronchodilatateur bêta-2-sélectif est un agoniste des récepteurs bêta-adrénergiques qui a davantage d'affinité pour les récepteurs bêta-2-adrénergiques, dont la stimulation se traduit par le relâchement des muscles bronchiques (et aussi artériels et utérins) que pour les récepteurs bêta-1-adrénergiques, dont les agonistes induisent la stimulation cardiaque (et la lipolyse). Pour la détermination de la bêta-2-sélectivité, une comparaison est établie entre l'activité du composé (a) comme agent de relâchement des préparations de trachée isolée de cobaye sous tonus spontané ( $CE_{50}$  = concentration molaire donnant 50% de la réponse de relâchement maximale à l'isoprénaline) et (b) l'augmentation de la fréquence de battement auriculaire de l'oreillette isolée en battement spontané du cœur de cobaye ( $CE_{50}$  = concentration molaire induisant 50% de l'augmentation maximale de rythme induite par l'isoprénaline). Un composé bêta-2-sélectif doit avoir une  $CE_{50}$  plus faible sur la trachée que sur l'oreillette. Il est possible de déterminer un rapport de sélectivité qui est l'antilogarithme de la différence entre le logarithme négatif de  $CE_{50}$  (trachée) et le logarithme négatif de  $CE_{50}$  (oreillette). Plus ce rapport de sélectivité est

élevé et plus le composé est sélectif pour les récepteurs bêta-2-adrénergiques.

La Demanderesse préfère que le bronchodilatateur bêta-2-sélectif soit à action durable. Par l'expression "à action durable", on entend que le composé a comme agent de relâchement du muscle bronchique lisse dans les épreuves pharmacologiques une durée d'action plus longue que celle de l'isoprénaline ou de l'orciprénaline. Pour les études de la durée d'action, une comparaison est établie entre l'effet de doses i.v. également actives pour l'inhibition du bronchospasme induit par l'acétylcholine ou l'histamine chez le cobaye anesthésié. La durée d'action de l'isoprénaline dans une telle épreuve est relativement brève (retour de la réponse témoin à la valeur normale en 10 à 25 minutes). Dans le cas d'un composé ayant une plus longue durée d'action, la réponse témoin ne devrait retourner à la valeur normale qu'en une durée plusieurs fois plus longue.

Des bronchodilatateurs spécifiques qui peuvent être cités sont la terbutaline, le fénotérol, le réprotérol, le pirbutérol, le rimitérol, l'orciprénaline et en particulier le salbutamol.

Des stéroïdes convenant comme constituant actif B sont notamment l'hydrocortisone, outre des composés plus actifs tels que le valérate de bêtaméthasone, le butyrate de clobétasone, l'acétonide de fluocinolone, l'hexanoate de fluocortolone, le dipropionate de béclo-méthasone, le butyrate d'hydrocortisone, le valérate de difluocortolone, l'acétonide de triamcinolone, le flucinonide, le désônide, la flurandrénalone, le pivallate de fluméthasone, la méthylprednisolone, le propionate de clobétasol, l'halcinonide, le tixocortol, la prednisolone et le 21-acétate de fluprednylidène. La Demanderesse préfère que le constituant actif B soit le dipropionate de béclo-méthasone.

L'invention a aussi pour objet un sel de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique avec un agent basique propre à l'inhalation choisi parmi les broncho-dilatateurs bêta-2-sélectifs et les stéroïdes.

Le sel peut être préparé par un procédé de double décomposition, par exemple par réaction d'un sel approprié, tel que le sel disodique, de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno- [3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique avec un sel convenable, par exemple le chlorhydrate ou le sulfate, de la base de l'agent propre à l'inhalation. Toutefois, le sel est de préférence produit par réaction de l'acide libre, à savoir l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique, avec la base libre de l'agent propre à l'inhalation, parce qu'un tel procédé ne donne pas de sel inorganique comme sous-produit. La réaction peut être exécutée dans un solvant qui est inerte dans les conditions de réaction. Le solvant est de préférence un solvant dans lequel le sel souhaité est soluble, par exemple l'eau. Le sel souhaité peut être isolé et purifié, par exemple, par cristallisation ou lyophilisation.

L'invention a donc pour objet le sel lorsqu'il n'est pas en solution, par exemple le sel lorsqu'il se trouve sous une forme sensiblement sèche, ou lorsqu'il se trouve en mélange avec insuffisamment de liquide, par exemple d'eau, pour le dissoudre complètement.

Le sel peut, si la chose est souhaitée, être utilisé conjointement avec un ou plusieurs autres sels de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique, notamment son sel disodique.

Le rapport des constituants actifs A et B dans la composition variera avec la nature des constituants

actifs particuliers et les fins spécifiques auxquelles la composition est destinée. Lorsque le constituant actif A est lui-même un sel de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique avec un agent basique propre à l'inhalation, par exemple un bronchodilatateur bêta-2-sélectif, il peut être nécessaire d'utiliser une proportion nulle ou tout au plus très faible de l'agent basique "libre" ou d'un autre sel de celui-ci comme constituant actif B.

10 Une dose appropriée du constituant actif A pour l'inhalation se situe dans l'intervalle de 1 à 100 mg et de préférence de 1 à 20 mg (à mesurer en nédocromil sodique).

15 Une dose appropriée du constituant actif B pour l'inhalation et un nombre approprié de parties en poids de constituant actif A (à mesurer en nédocromil sodique) pour une partie en poids de constituant actif B sont spécifiés ci-après:



	Composé	Dose en microgrammes	Rapport A:B (composi- tion en aérosol sous pression)
	Salbutamol	50 à 300	4 à 20 : 1
5	(sous forme de sulfate)	de préférence 50 à 200	
	Terbutaline	100 à 600	2 à 10 : 1
	(sous forme de sulfate)	de préférence 100 à 500	
10	Fénotérol	100 à 500	2 à 10 : 1
	(sous forme de bromhydrate)		
	Pirbutérol	100 à 500	2 à 15 : 1
15	(sous forme de chlorhydrate)		
	Réprotérol	150 à 750	1,3 à 6,7 : 1
	(sous forme de chlorhydrate)		
	Dipropionate de	10 à 500	2 à 40 : 1
20	béclométhasone	de préférence 25 à 200	

Il est hautement préféré que la dose de consti-  
tuant B soit de nature à exercer un effet persistant  
plutôt que transitoire.

25 Le mélange peut être administré en doses sub-  
divisées 1 à 6 et de préférence 2 à 4 fois par jour.  
Chaque dose peut comprendre une ou plusieurs doses uni-  
taires.

30 Les rapports spécifiques des constituants ac-  
tifs A et B particuliers dans toute composition conforme  
à l'invention peuvent varier dans un large intervalle.  
La Demanderesse préfère toutefois une composition conte-  
nant 0,4 à 400 parties en poids et plus avantageusement  
2 à 200 parties en poids de constituant actif A (à mesu-  
35 rer en nédocromil sodique) par partie en poids de con-

stituant actif B.

Les mélanges conformes à l'invention peuvent être préparés en mélangeant ensemble les différents constituants actifs suivant des techniques habituelles  
5 connues.

Les sels, mélanges et compositions de l'invention sont utiles parce qu'ils ont une activité pharmacologique chez les animaux; en particulier, ils sont utiles parce qu'ils inhibent le dégagement et/ou l'action des médiateurs pharmacologiques qui résultent de  
10 la combinaison in vivo de certains types d'anticorps et d'antigènes spécifiques, par exemple la combinaison d'un anticorps réaginique avec un antigène spécifique (voir exemple 27 du brevet anglais n° 1.292.601). Les  
15 sels et compositions se sont aussi révélés inhiber la dégranulation des mastocytes et intervenir dans les trajets réflexes chez les animaux d'expérience et l'homme, en particulier dans les réflexes associés à la fonction pulmonaire. Chez l'homme, les altérations tant subjectives qu'objectives qui résultent de l'inhalation d'un  
20 antigène spécifique par un sujet sensibilisé sont inhibées par une administration préalable des nouveaux sels et nouvelles compositions. Les nouveaux sels et nouvelles compositions sont donc utiles pour le traitement  
25 d'une obstruction réversible des voies aériennes et/ou pour la prévention de la sécrétion d'un excès de mucus. Ils sont donc utiles pour le traitement de l'asthme allergique, de l'asthme dit "intrinsèque" (pour lequel aucune sensibilité à un antigène extrinsèque ne peut  
30 être démontrée), de l'asthme induit par l'exercice etc., de la rhinite, du poumon du fermier, de la maladie des oiseleurs, de la bronchite, des toux (y compris la coqueluche) et des obstructions du nez et des bronches associées au rhume ordinaire. Les nouveaux sels,  
35 mélanges et compositions sont précieux aussi pour le

traitement d'autres états dans lesquels des réactions antigènes-anticorps ou une sécrétion excessive de mucus sont la cause ou une cause accessoire de la maladie.

Les nouveaux sels, mélanges et compositions de l'invention peuvent être administrés par des voies très diverses et peuvent agir par voie systémique ou locale. Par conséquent, les composés peuvent être administrés par inhalation orale ou nasale dans les poumons, directement dans le nez ou les yeux, dans la cavité buccale, dans l'oesophage ou sur d'autres surfaces accessibles du corps. Les nouveaux sels et mélanges peuvent être administrés directement sur l'organe ou la partie du corps manifestant les symptômes ou sur une partie éloignée que celle manifestant les symptômes.

L'invention a aussi pour objet un procédé de traitement des affections obstructives et réversibles des voies aériennes, qui comprend l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace de

20 a) un ou plusieurs d'entre l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci comme "constituant actif A", en combinaison avec

25 b) une quantité thérapeutiquement efficace d'un ou plusieurs agents propres à l'inhalation choisis parmi les bronchodilatateurs bêta-2-sélectifs, les stéroïdes et leurs dérivés pharmaceutiquement acceptables comme "constituant actif B",

30 simultanément ou séparément dans le temps à un patient souffrant d'une telle affection.

Le procédé de traitement est exécuté de préférence sur base quotidienne régulière, par exemple 1 à 4 fois par jour. Le procédé est exécuté de préférence pendant une longue durée, par exemple au moins

4 semaines et de préférence au moins 8 semaines. Le procédé comprend de préférence l'administration simultanée de doses fixées du constituant actif A avec des doses fixées du constituant actif B.

5 Les nouveaux sels, mélanges et compositions de l'invention peuvent être administrés suivant une grande variété de posologies, soit tels quels, soit conjointement avec un ou plusieurs autres composés actifs.

10 Les nouveaux sels de l'invention et les constituants actifs des mélanges et compositions peuvent être préparés à des granulométries d'une grande variété. Par exemple, pour l'inhalation et d'autres applications, les composés peuvent avoir un diamètre médian en masse  
15 de 0,01 à 10  $\mu\text{m}$ , de préférence de 2 à 6  $\mu\text{m}$  et plus avantageusement de 2 à 4  $\mu\text{m}$ .

L'invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique comprenant (de préférence à raison de moins de 80% et plus avantageusement à raison de moins  
20 de 50% en poids) un sel ou mélange conforme à l'invention, en association avec un adjuvant, diluant ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Des exemples d'adjuvants, diluants ou excipients appropriés sont:

25 pour les comprimés, capsules et dragées: la cellulose microcristalline, le phosphate de calcium, la terre de diatomées, un sucre tel que le lactose, le dextrose ou le mannitol, le talc, l'acide stéarique, l'amidon, le bicarbonate de sodium et/ou la gélatine;

30 pour les suppositoires: les cires et huiles naturelles ou durcies, et

pour les compositions à inhaler: le lactose grossier.

Pour l'administration par inhalation, les nouveaux sels ou mélanges peuvent être mis en composition avec un gaz comprimé, par exemple l'azote, ou avec  
35

un agent propulseur liquéfié à l'état de composition en aérosol sous pression, la composition contenant de préférence 1 à 20% p/v du ou des agents actifs.

Les nouveaux sels ou mélanges peuvent être administrés aussi à l'état de solution nébulisée.

L'invention est illustrée par les exemples suivants.

#### EXEMPLE 1

Aérosol sous pression débitant du nédocromil sodique (2 mg) et du sulfate de salbutamol (0,1 mg)

Nédocromil sodique (micronisé, séché)	1,4420% p/p
Salbutamol (micronisé)	0,0721
Trioléate de sorbitan	0,5000
Dichlorotétrafluoroéthane	39,1944
Dichlorodifluorométhane	58,7915

Refroidir le dichlorodifluorométhane à -55°C et y disperser le trioléate de sorbitan au moyen d'un mélangeur à cisaillement intense. Disperser le nédocromil sodique et le sulfate de salbutamol dans le mélange et ajouter le dichlorotétrafluoroéthane préalablement refroidi à -55°C. Introduire la suspension dans des bidons et sertir sur chaque bidon une valve doseuse d'une capacité de 100  $\mu$ l.

#### EXEMPLE 2

Aérosol sous pression débitant du nédocromil sodique (2 mg) et de la terbutaline (0,25 mg).

Nédocromil sodique (séché, micronisé)	1,4286% p/p
Terbutaline (micronisée)	0,1786
Trioléate de sorbitan	0,5000
Trichlorofluorométhane	24,4732
Dichlorotétrafluoroéthane	24,4732
Dichlorodifluorométhane	48,9464

Dissoudre le trioléate de sorbitan dans le trichlorofluorométhane et disperser le nédocromil sodi-

que et le sulfate de terbutaline dans la solution.  
 Refroidir la solution à -55°C et ajouter le dichloro-  
 tétrafluoroéthane et le dichlorodifluorométhane re-  
 froidis à -55°C. Introduire la suspension dans des  
 5 bidons et sertir sur chaque bidon une valve doseuse  
 d'une capacité de 100  $\mu$ l.

#### EXEMPLE 3

Aérosol sous pression débitant du nédocromil sodique  
 (2 mg) et du réprotérol (0,5 mg).

10	Nédocromil sodique (séché, micronisé)	1,4663% p/p
	Chlorhydrate de réprotérol (micronisé)	0,3666
	Trioléate de sorbitan	1,0000
	Trichlorofluorométhane	10,0000
	Dichlorotétrafluoroéthane	13,0751
15	Dichlorodifluorométhane	74,0920

Préparer comme dans l'exemple 2.

#### EXEMPLE 4

Aérosol sous pression débitant du nédocromil sodique  
 (2 mg) et du dipropionate de béclo méthasone (0,05 mg)

20	Nédocromil sodique (séché, micronisé)	1,4420% p/p
	Dipropionate de béclo méthasone (micronisé)	0,0361%
	Trioléate de sorbitan	0,5000
	Dichlorotétrafluoroéthane	39,2088
	Dichlorodifluorométhane	58,8131

25 Préparer comme dans l'exemple 1.

On a examiné les effets des mélanges, sels et  
 compositions conformes à l'invention dans les systèmes  
 suivants:

#### EXEMPLE A

30 Epreuve d'anaphylaxie pulmonaire passive chez le rat

On a sensibilisé passivement des femelles  
 de rat (Charles River) d'un poids de 250 g par injec-  
 tion intraveineuse de 0,5 ml d'antisérum à l'IgE de  
 rat potentialisée dirigée contre l'ovalbumine.

35 On a anesthésié les rats à la pentobarbitone

sodique (70 mg/kg) par voie intraveineuse. On a canulé la trachée et on a ventilé le rat à l'aide d'une pompe respiratoire Palmer Miniature Ideal en système clos. On a enregistré la pression dans la trachée au moyen

5 d'une dérivation de la canule connectée à un transducteur de différence de pression de l'air (UPI, Pye Ether Ltd.). On a réglé le rythme respiratoire à 99 coups par minute avec une pression dans la trachée de 6 cm d'eau.

10 On a agressé les rats, 48 heures après la sensibilisation, avec de l'ovalbumine (25 mg/kg par voie intraveineuse) et on a mesuré, en pinçant la trachée, l'augmentation résultante de la pression dans la trachée exprimée en pourcentage du degré maximum possible de

15 bronchoconstriction ( $\Delta$  PCB max).

On a administré le constituant actif A et/ou le constituant actif B, soit isolément, soit en combinaison, par voie intraveineuse dans de la solution physiologique salée au cours de la période de 1 à 5 minutes

20 avant l'agression par l'antigène.

On a analysé les résultats de l'administration des deux composés en combinaison en exécutant une analyse de variance pour un agencement factoriel avec des mesures répétées dans chaque cellule. On a effectué une

25 transformation par racine carrée avant l'analyse.

On a examiné plus en détail un effet antagoniste ou synergique éventuel des deux composés en appliquant le procédé décrit par Berenbaum, Clin. Exp. Immunol., 28, 1 (1977). Celui-ci consiste à calculer

30 la grandeur:

$$Z = \frac{\text{dose de A}}{A_e} + \frac{\text{dose de B}}{B_e}$$

où (A,B) est la combinaison exerçant un effet X.

A<sub>e</sub> est la dose de A seul donnant un effet X.

Be est la dose de B seul donnant un effet X.

Si  $Z < 1$ , A et B sont synergiques.

$Z = 1$ , A et B sont additifs.

$Z > 1$ , A et B sont antagonistes.

## 5 EXEMPLE B

### Inhibition du dégagement du médiateur par les cellules broncho-alvéolaire

#### Matériels et procédés

##### Matériels

10 On a acquis de la [ $^3\text{H}$ ]-S-adénosyl-L-méthionine (500mCi/mole) et du [ $^{32}\text{P}$ ]-orthophosphate (sans entraîneur) chez Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, Royaume-Uni), de l'antisérum de mouton contre l'IgE de rat, de l'antisérum de chèvre contre de l'IgE  
15 humaine et du sérum de chèvre normal chez Miles Laboratories (Slough, Buckinghamshire, Royaume-Uni). On a précipité le sérum de chèvre anti-IgE humaine et le témoin avec du sulfate d'ammonium saturé à 40% (Largman et al, Methods Enzymol (1981) 74:22) et après dialyse, on a  
20 ajusté la fraction de globuline au volume original du sérum. On a préparé l'antigène d'*ascaris* à partir du liquide pseudocoelomique d'*Ascaris suum* adulte par chromatographie sur Sephadex G200 (Pharmacia, Milton Keynes, Buckinghamshire, Royaume-Uni) suivant le procédé d'Ambler et al, J. Immunol. Meth. (1972), 1, 317.

##### Infection et lavage broncho-alvéolaire chez des macaques

On a utilisé pour ces études un groupe de 20 singes Macaca arctoides, d'un poids de 8-18 kg. On a infecté les animaux au moyen d'*A. suum* et on a effectué  
30 le lavage comme décrit par Pritchard et al, Clin. Exp. Immunol., (1983), 54:469. On a recueilli le liquide du lavage dans des tubes héparinisés et on l'a mis sur glace.  
Traitement de cellules du lavage broncho-alvéolaire

On a filtré le liquide de lavage à travers un  
35 filtre en Nylon de  $175\mu\text{m}$  et on a recueilli les cellules



par centrifugation (450 g pendant 5 minutes à 4°C). On a lavé les cellules et on les a remises en suspension à la dilution de travail requise dans du tampon (Tyrode tamponné à l'HEPES 10 mM, pH 7,4, contenant 1 mg/ml de gélatine et 5 unités/ml d'héparine). On a effectué les comptages différentiels de cellules sur les préparations humides dans du milieu colorant de Kimura (20). Lorsque seul le dégagement d'histamine devait être mesuré, les cellules ont été agressées, en triple expérience, par addition de 0,05 ml de cellules, à une densité de  $10^5$  mastocytes/ml, à du constituant A, par exemple à 0,05 ml de tampon contenant l'agent de dégagement outre le constituant B, par exemple ( $3 \times 10^{-8}$  -  $10^{-6}$  M), et du nédocromil sodique ( $3 \times 10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M) isolément et en combinaison à 37°C. Après 20 minutes d'incubation à 37°C, le processus de dégagement a été bloqué par addition de 0,25 ml de tampon glacé exempt de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  contenant de l'EDTA 2 mM. Après centrifugation (450 g pendant 5 minutes à 4°C), on a recueilli 0,2 ml de liquide surnageant pour le dosage de l'histamine. Dans toutes les expériences d'inhibition, on a choisi un taux d'agression submaximal qui, d'après l'expérience de lavages antérieurs du même animal, dégage 15-25% de l'histamine totale, mais pas plus de la moitié du dégagement maximum réalisable.

#### Mesures de l'histamine

On a mesuré l'histamine par le procédé isotopique double de Beaven et al, Clin. Chim. Acta, (1972), 37, 97 modifié comme décrit dans Pritchard et al.

#### 30 EXEMPLE C

#### Hyperactivité bronchique non spécifique chez l'asthmatique adulte

Des adultes asthmatiques ont donné leur consentement après information et participé à l'étude.

35 On a effectué l'agression par l'histamine

suivant le procédé de Cockcroft, Clin. Allergy, (1977),  
 7, 235. On a fait inhaler pendant 2 minutes à inter-  
 valles de 5 minutes, des concentrations doublées de  
 phosphate acide d'histamine (0,03 - 8 mg/ml). On a  
 5 mesuré le volume expiratoire forcé à une seconde ( $VEF_1$ )  
 au moyen d'un spiromètre Vitalograph à coin sec avant,  
 de même que 0,5 et 1,5 minute après chaque inhalation.  
 On a interrompu l'agression lorsque le  $VEF_1$  a été dimi-  
 nué de 20% ou davantage par rapport à la ligne de base  
 10 mesurée. On a établi les courbes Log-dose/réponse  
 et mesuré la  $CP_{20}$  par interpolation des deux derniers  
 points.

#### EXEMPLE D

On a rassemblé pour cette étude des volon-  
 15 taires souffrant d'asthme allergique spécifique. Chez  
 ces volontaires, une crise d'asthme succède normalement  
 à l'inhalation d'un antigène auquel ils sont spécifique-  
 ment sensibles. Le degré d'asthme provoqué par ce mode  
 opératoire peut être mesuré par examen répété de la  
 20 résistance des voies aériennes.

On utilise un spiromètre approprié conçu pour  
 mesurer le volume expiratoire forcé à une seconde  
 ( $VEF_1$ ) et dès lors les modifications de la résistance  
 des voies aériennes.

25 On mesure les modifications de  $VEF_1$  induites  
 par le médicament 5 minutes après l'administration du  
 médicament.

Six heures après l'administration du médica-  
 ment, on déclenche une attaque témoin par antigène  
 30 chez le volontaire et on mesure la baisse de  $VEF_1$  5 mi-  
 nutes après l'administration de l'antigène.

# RE V E N D I C A T I O N S

1 - Mélange pharmaceutique comprenant

- a) un ou plusieurs d'entre l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique et les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci, comme "constituant actif A", en combinaison avec
- b) un ou plusieurs agents propres à l'inhalation choisis parmi les bronchodilatateurs, les stéroïdes et leurs dérivés pharmaceutiquement acceptables, comme "constituant actif B".

2 - Mélange suivant la revendication 1, dans lequel le constituant actif A est le nédocromil sodique.

3 - Mélange suivant la revendication 1, comprenant 0,4 à 400 parties en poids de constituant actif A, à mesurer en nédocromil sodique, par partie en poids de constituant actif B.

4 - Mélange suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le constituant actif B est un bronchodilatateur ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

5 - Mélange suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le constituant actif B est un bronchodilatateur bêta-2-sélectif ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

6 - Mélange suivant l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le constituant actif B est le salbutamol ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

7 - Mélange suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le constituant actif B est la terbutaline, le fénotérol, le réprotérol, le pirbutérol, le rimitérol ou un sel pharmaceutiquement acceptable de l'un de ceux-ci.

8 - Mélange suivant l'une quelconque des re-

vendications 1 à 3, dans lequel le constituant actif B est un stéroïde ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

9 - Mélange suivant la revendication 8, dans lequel le constituant actif B est la béclo méthasone, un solvate de celle-ci ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de l'un ou l'autre.

10 - Mélange suivant la revendication 8, dans lequel le constituant actif B est l'hydrocortisone, le valérate de bétaméthasone, le butyrate de clobétasone, l'acétonide de fluocinolone, l'hexanoate de flucortolone, le butyrate d'hydrocortisone, le valérate de diflucortolone, l'acétonide de triamcinolone, le flucinonide, le désônide, la flurandrénalone, le pivallate de fluméthasone, la méthylprednisolone, le propionate de clobétasol, l'halcinonide, le tixocortol, la prednisolone, le 21-acétate de fluprednylidène ou un solvate de l'un de ceux-ci.

11 - Sel de l'acide 9-éthyl-6,9-dihydro-4,6-dioxo-10-propyl-4H-pyranno[3,2-g]quinoléine-2,8-dicarboxylique avec un agent basique propre à l'inhalation choisi parmi les bronchodilatateurs bêta-2-sélectifs et les stéroïdes.

12 - Composition pharmaceutique comprenant un mélange suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou un sel suivant la revendication 9 en association avec un adjuvant, diluant ou excipient pharmaceutiquement acceptable et sous une forme propre à l'inhalation.

13 - Composition suivant la revendication 12, sous la forme d'une composition en aérosol sous pression contenant 1 à 20% p/p du ou des constituants actifs et comprenant 0,05 à 1,5% en poids d'un agent tensio-actif.

Dessins : ☒ planches

35 ~~19~~ pages dont ~~4~~ page de garde

~~16~~ pages de description

~~2~~ pages de revendication

~~1~~ résumé descriptif

Luxembourg, le 19 MARS 1987  
Le mandataire:

Me ALAIN D. J. .