

**(12) BREVET D'INVENTION BELGE**

(47) Date de publication : 02/12/2021

(21) Numéro de demande : BE2021/5463

(22) Date de dépôt : 13/06/2021

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 31/724, A61K 9/00, A61K 9/08, A61P 11/06

(30) Données de priorité :

15/06/2020 BE 2020/5430

(73) Titulaire(s) :

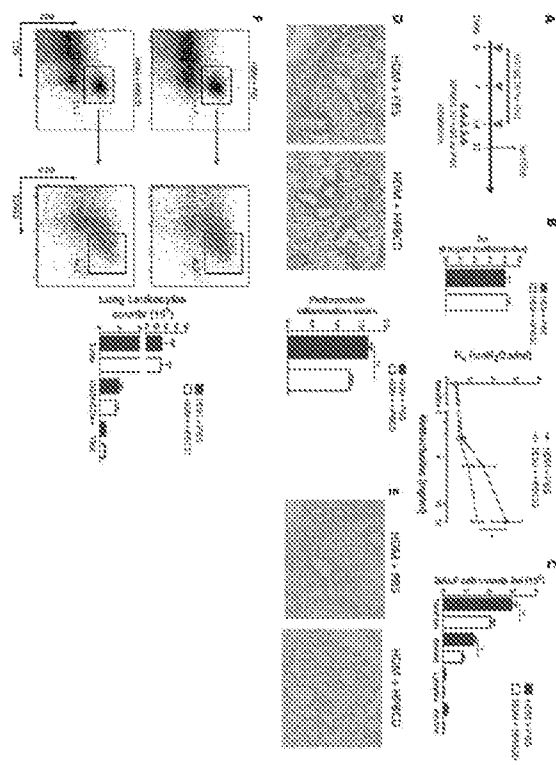
**UNIVERSITE DE LIEGE**  
Etablissement public  
4000, LIEGE  
Belgique

(72) Inventeur(s) :

**CATALDO Didier**  
4877 OLNE  
Belgique**EVRARD Brigitte**  
4053 EMBOURG  
Belgique**(54) Cyclodextrine utilisée dans le traitement et la prévention de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme provoqué par des allergènes**

(57) Une cyclodextrine inhalable destinée à être utilisée dans le traitement et la prévention de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme provoqué par des allergènes est divulguée. L'utilisation d'une cyclodextrine dans le traitement et la prévention par inhalation de la bronchoconstriction tardive dans l'asthme allergique est également divulguée.

Fig. 1



## Cyclodextrine utilisée dans le traitement et la prévention de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme provoqué par des allergènes

### DOMAINE TECHNIQUE

5 L'asthme est une maladie complexe et multifactorielle caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires qui touche plus de 300 millions de personnes dans le monde. L'asthme entraîne une constriction des voies respiratoires, appelée bronchoconstriction. On distingue deux formes d'asthme, l'asthme non provoqué par des allergènes et l'asthme provoqué par des allergènes.

10

### L'HISTORIQUE DE L'INVENTION

#### Asthme

Dans l'asthme induit par des allergènes, une réponse inflammatoire est générée par les antigènes. Cette réponse implique différents types de cellules du système immunitaire  
15 inné et adaptatif. Ces cellules recrutent et activent les cellules inflammatoires, ce qui entraîne une hyperréactivité bronchique, une surproduction de mucus et un remodelage de la paroi des voies aériennes. Les microdomaines lipidiques membranaires régulent les cascades de signalisation cellulaire. Celles-ci comprennent des interactions lipide-protéine complexes et le regroupement de récepteurs spécifiques. Le cholestérol est un  
20 élément clé des domaines ordonnés par les liquides sur la membrane cellulaire, appelés radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques sont également impliqués dans la présentation des allergènes et l'activation ultérieure des cellules T par l'enrichissement localisé des molécules du CMH de classe II à la surface des cellules présentant l'antigène.

#### Réaction de phase précoce dans l'asthme induit par des allergènes

25 La bronchoconstriction en phase précoce survient généralement immédiatement après l'exposition à l'allergène. Les mastocytes produisent des médiateurs qui provoquent des changements dans les voies respiratoires. Certains médiateurs provoquent immédiatement une inflammation dans la phase précoce.

### Réaction de phase tardive dans l'asthme induit par des allergènes

La réaction de phase tardive se produit environ deux à quatre heures après l'exposition initiale à un antigène. Les médiateurs induisent le recrutement chimiotactique et l'activation des éosinophiles et des neutrophiles pendant la réaction de phase tardive.

- 5 Les renforcements provoquent une inflammation persistante des voies respiratoires. Cela rend les voies respiratoires de plus en plus hypersensibles aux déclencheurs de l'asthme et augmente le risque de futures crises d'asthme. La phase tardive peut durer de 12 à 24 heures.

### Cyclodextrine pour le traitement des troubles pulmonaires

- 10 Les cyclodextrines ont été proposées pour le traitement des troubles pulmonaires, y compris l'asthme :

EP1799231 à l'Université de Liège révèle l'utilisation d'un composé de cyclodextrine pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement et à la prévention des maladies inflammatoires des bronches, en particulier l'asthme.

- 15 EP2900246A1 à SolAeromed divulgue l'utilisation de la méthyl-bêta-cyclodextrine pour le traitement du dysfonctionnement des surfactants pulmonaires. Cette publication affirme que le dommage oxydatif du surfactant pulmonaire est dû à l'interaction entre les espèces réactives de l'oxygène et le cholestérol. Elle affirme en outre que la méthyl-bêta-cyclodextrine peut restaurer le fonctionnement normal d'un agent de surface
- 20 dysfonctionnel retiré des poumons d'enfants atteints de mucoviscidose et de bronchiolite non mucoviscidose.

- US2010173869A1 à SolAeromed divulgue une méthode de traitement d'un agent tensioactif, en particulier un agent tensioactif pulmonaire. L'agent tensioactif est traité
- 25 avec un agent de traitement tensioactif séquestrant les lipides ou le cholestérol, dans lequel des lipides ou du cholestérol neutres, notamment, sont séquestrés de manière sélective au moyen de l'agent de traitement tensioactif, de sorte que l'effet des lipides et/ou l'effet du cholestérol sur l'agent tensioactif est réduit ou inversé.

- US2013029937A1 à SolAeromed divulgue une méthode pour améliorer un agent de surface par la cyclodextrine. Le document porte sur une méthode d'atténuation des
- 30 dommages oxydatifs causés aux agents de surface pulmonaires par l'ajout de

cyclodextrine comme agent séquestrant du cholestérol. Cette publication présente également une méthode de traitement d'un patient présentant un dysfonctionnement du tensioactif dû à un dommage oxydatif du tensioactif pulmonaire par l'administration d'une quantité protectrice de tensioactif d'une cyclodextrine comme agent séquestrant le cholestérol pour protéger le tensioactif des effets négatifs de la dégradation oxydative.

Enfin, EP3151836A1 à l'Université de Liège et Paul Maes divulgue des compositions pharmaceutiques formulées avec un composé de la cyclodextrine, en particulier le HPBCD et un dérivé du budésonide pour le traitement et/ou la prévention des maladies inflammatoires pulmonaires.

Cependant, aucune des publications ci-dessus ne révèle la différence cruciale entre le traitement de la phase précoce et celui de la phase tardive de l'asthme induit par les allergènes.

Ainsi, il est toujours urgent d'améliorer l'efficacité des cyclodextrines dans le traitement et la prévention de l'asthme provoqué par des allergènes.

Les inventeurs actuels ont maintenant découvert de manière surprenante que la cyclodextrine peut être utilisée dans le traitement de la bronchoconstriction en phase tardive chez les asthmatiques légers à modérés. Les demandeurs suggèrent que les cyclodextrines entraînent une perturbation de l'organisation des membranes des cellules T des poumons qui entravent leur activation après la reconnaissance des allergènes.

#### BRÈVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

Un premier aspect de l'invention est une cyclodextrine inhalable ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de celle-ci, destinée à être utilisée dans le traitement ou la prévention de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des allergènes.

Dans un autre aspect, la cyclodextrine est l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est une solution aqueuse inhalable.

Dans un autre mode réalisation, la concentration de cyclodextrine est de 5 millimoles à 50 millimoles.

Dans un autre mode réalisation, la concentration de cyclodextrine est de 7 millimoles à 40 millimoles.

- 5 Dans un autre mode réalisation, la concentration en cyclodextrine est de 10 à 30 millimoles.

Dans un autre aspect, la cyclodextrine est une poudre séchée par pulvérisation.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée en quantité efficace pour réduire l'ordre des membranes dans les cellules.

- 10 Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée par inhalation à raison de 0,1 mg à 30 mg par jour.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée par inhalation à raison de 0,5 mg à 20 mg par jour.

- 15 Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée par inhalation à raison de 1 mg à 10 mg par jour.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de deux ans au maximum par inhalation à raison de 0,1 mg à 0,5 mg par jour.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de deux à six ans par inhalation à raison de 0,5 mg à 1 mg par jour.

- 20 Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de 6 à 14 ans par inhalation à raison de 1 à 2 mg par jour.

Dans un autre mode réalisation, la cyclodextrine est administrée à raison de 0,1 mg à 15 mg par jour dans l'asthme léger à modéré induit par des allergènes et de 1 mg à 30 mg dans l'asthme grave induit par des allergènes.

- 25 Un autre aspect de l'invention est une méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T dans le tissu pulmonaire, dans laquelle la cyclodextrine est administrée par inhalation en une quantité efficace pour réduire l'ordre de la membrane des cellules chez les sujets présentant un dysfonctionnement des cellules T dans leur tissu pulmonaire, de préférence sans provoquer d'effets secondaires limitant le traitement,

tels que ceux choisis dans le groupe constitué par la clairance rénale, l'insuffisance hépatique exprimée par des niveaux élevés de transaminase, et la respiration sifflante après l'administration, par rapport aux sujets non traités avec la cyclodextrine.

5 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution isotonique saline HPBCD de 15 mM.

Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution à base de HPBCD PBS, pH 7,4, 15 mMol.

10 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution isotonique saline HPBCD, 5 mMol.

15 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution à base de HPBCD PBS, pH 7,4, 25 mMol.

Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution isotonique saline HPBCD de 40 mMol.

20 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution isotonique saline HPBCD de 25 mMol.

Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'un citrate HPBCD 10 mMol pH 4,5.

25 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'un citrate HPBCD de 40 mMol pH 4,5.

30 Dans un autre aspect de la méthode de traitement du dysfonctionnement des cellules T, la cyclodextrine est administrée par inhalation sous la forme d'une solution isotonique saline HPBCD de 50 mMol.

Les cyclodextrines peuvent être administrées dans une solution isotonique ou une solution hypertonique.

5 Une solution est isotonique lorsque sa concentration effective en osmole est la même que celle du cytosol à l'intérieur de la cellule et en particulier des cellules respiratoires, de préférence les cellules de la muqueuse pulmonaire.

Une solution hypertonique est dite hypertonique si elle présente une plus grande concentration de solutés que le cytosol à l'intérieur de la cellule et en particulier des cellules respiratoires, de préférence les cellules de la muqueuse pulmonaire.

10 Il est en outre préférable que le pH de la composition soit ajusté à 3,5 à 7,5, de préférence de 6,5 à 7.

Afin d'ajuster le pH, la tension de surface, la viscosité, l'osmolalité, la stabilité, le goût et d'autres propriétés de la composition, un ou plusieurs autres excipients peuvent être utilisés. Par exemple, la composition peut comprendre un ou plusieurs excipients choisis  
15 parmi les acides organiques pharmaceutiquement acceptables, les sels d'acides organiques, les acides inorganiques, les sels inorganiques, les bases, les sucres, les alcools de sucre, les stabilisateurs, les antioxydants, les tensioactifs, les conservateurs et les agents masquant le goût.

#### DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

20 Les inventeurs actuels ont découvert de manière surprenante que la cyclodextrine peut être utilisée pour extraire des lipides ou réduire l'ordre de la membrane des cellules épithéliales et en particulier de la membrane des cellules T du parenchyme pulmonaire. La réduction de l'ordre de la membrane par l'inhalation de cyclodextrine entraîne une diminution de l'activation et de la prolifération des cellules T. L'activation et la  
25 prolifération des lymphocytes T ont un impact sur la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par les allergènes. Ainsi, un premier aspect de l'invention est une cyclodextrine inhalable ou un dérivé cyclique pharmaceutiquement acceptable de celle-ci pour une utilisation dans le traitement de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des allergènes.

## Définitions

Le terme "asthme" décrit une maladie entraînant une inflammation chronique et une constriction des voies respiratoires.

5 Le terme "bronchoconstriction" désigne la constriction des voies respiratoires dans les poumons due au resserrement des muscles lisses environnants, avec pour conséquence une toux, une respiration sifflante et un essoufflement dus à une réaction immunologique impliquant la libération de médiateurs inflammatoires. Dans un cas, la bronchoconstriction est mesurée par une diminution du VEMS.

10 Le terme "FEV1" décrit le volume expiratoire forcé en 1 seconde. Le VEMS est le volume d'air qui peut être expiré de force en une seconde après une inspiration complète.

Le terme "phase précoce" désigne la bronchoconstriction qui se produit généralement immédiatement après l'exposition à l'allergène dans l'asthme induit par l'allergène jusqu'à 60 minutes après l'exposition à l'allergène.

15 Le terme bronchoconstriction "en phase tardive" décrit une bronchoconstriction de 180 minutes à 360 minutes après l'exposition à l'allergène. Un exemple de bronchoconstriction en phase tardive est une diminution de 15 % du VEMS de 180 minutes à 360 minutes après l'exposition aux allergènes. Dans certains cas, la bronchoconstriction en phase tardive dure plusieurs heures, par exemple de 180 minutes à cinq, six, sept, huit, neuf ou dix heures après l'exposition aux allergènes. Dans certains cas, la phase  
20 tardive peut durer jusqu'à 24 heures après l'exposition aux allergènes.

L'expression "trouble membranaire" ou "réduction de l'ordre membranaire" signifie une réduction de l'organisation et de la rigidité des membranes cellulaires, en particulier des membranes des cellules T du parenchyme pulmonaire. Dans un cas, le trouble de l'ordre des membranes signifie une augmentation de la mobilité et de la polarité des  
25 phospholipides dans les membranes des cellules T. Dans une forme de vie, la mobilité et la polarité des phospholipides sont mesurées par marquage avec des fluorescents tels que le Laurdan ou par coloration bleue de sections de poumons. La dynamique et la fluidité des lipides au niveau de la chaîne acyle après incubation de la cyclodextrine peuvent être mesurées à 37 degrés Celsius. L'anisotropie à 37 degrés Celsius peut être  
30 utilisée pour mesurer la rigidité de la membrane. Un exemple d'une façon de mesurer

le désordre membranaire ou la réduction de l'ordre de la membrane est donné dans l'exemple 1 ci-dessous.

Le terme "prolifération des cellules T" signifie une augmentation des cellules T sur une période donnée. Dans un autre mode réalisation, la prolifération des lymphocytes T est mesurée par analyse de cytométrie de flux des cellules TH2 du poumon et par comptage  
5 des leucocytes totaux. Un exemple de méthode de mesure de la prolifération des lymphocytes T est donné dans l'exemple 1 ci-dessous. Dans une des applications, des cellules T CD4+ naïves sont exposées à une concentration de 5 mM de HPBCD et d'un anti-CD3 (3 mcg/ml) pendant 24 heures ou 48 heures avec du HPBCD (5 mM) ou avec un milieu de culture seul à 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Pendant les 2 dernières heures du test de  
10 prolifération, la bromodésoxyuridine est ajoutée au milieu et l'incorporation est quantifiée par ELISA. La sécrétion d'IL-2 est mesurée dans le milieu après 24 heures et 48 heures de stimulation anti-CD3 par ELISA.

Le terme "traitement" ou "soigner" décrit l'inhalation d'une cyclodextrine pour réduire la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme. En particulier, le terme "traitement"  
15 décrit l'inhalation d'une cyclodextrine pour réduire l'ordre de la membrane des cellules T.

Le terme "prévention" décrit toute réduction du risque de bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme par l'inhalation d'une cyclodextrine. En particulier, le terme  
20 "prévention" décrit l'inhalation d'une cyclodextrine pour réduire l'ordre de la membrane des cellules T.

Les termes "quantité efficace" ou "quantité thérapeutiquement efficace", tels qu'ils sont utilisés dans le présent document, désignent une quantité d'un agent actif tel que décrit dans le présent document, qui est suffisante pour atteindre, ou contribuer à atteindre,  
25 un ou plusieurs résultats cliniques souhaitables, tels que ceux décrits dans la description du "traitement" ci-dessus. Une quantité "efficace" appropriée dans chaque cas individuel peut être déterminée en utilisant des techniques standard connues dans la profession, telles qu'une étude d'escalade de dose. Dans certains cas, tels qu'ils sont utilisés dans le présent document, l'expression "quantité thérapeutiquement efficace" désigne une  
30 quantité d'un agent actif ou d'une combinaison d'agents efficace pour améliorer, retarder ou prévenir les symptômes.

Le terme "cyclodextrine" décrit les oligosaccharides composés d'unités de glucopyranose. Les principales cyclodextrines non substituées sont généralement préparées par la dégradation enzymatique de l'amidon. La cyclodextrine de l'invention peut être n'importe quelle cyclodextrine, en particulier les alpha-, bêta- et gamma-cyclodextrines, comprenant respectivement 6, 7 et 8 unités glucopyranose. Dans une autre variante de l'invention, des dérivés de cyclodextrines sont utilisés, par exemple des cyclodextrines modifiées chimiquement, qui peuvent avoir une solubilité dans l'eau plus importante que les cyclodextrines non modifiées. Parmi les exemples de tels dérivés, on peut citer en particulier la 2-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine (HPBCD), la 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrine (HPGCD), la sulfobutyléther-bêta-cyclodextrine (SBEB CD) et la méthyl-bêta-cyclodextrine (MBCD).

Le terme "dérivé pharmaceutiquement acceptable" d'une cyclodextrine décrit les composés organiques cycliques dérivés des cyclodextrines qui sont capables de créer un trouble de la membrane épithéliale dans le parenchyme pulmonaire dans une mesure comparable aux cyclodextrines.

Le terme "solution aqueuse" tel qu'il est utilisé ici se réfère à une composition comprenant au moins une cyclodextrine, de l'eau et éventuellement un ou plusieurs autres composants appropriés pour une utilisation dans l'administration pharmaceutique tels que des supports, des stabilisateurs, des diluants, des agents dispersants, des agents de suspension, des agents épaississants, des excipients et similaires. Dans certains cas, la composition pharmaceutique est exempte d'alpha ou de gamma-cyclodextrine.

Le terme "ingrédient pharmaceutique actif" désigne toute substance ou combinaison de substances utilisée dans un produit pharmaceutique fini, destinée à exercer une activité pharmacologique ou à avoir un effet direct sur le diagnostic, la guérison, l'atténuation, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou à avoir un effet direct sur la restauration, la correction ou la modification des fonctions physiologiques chez les êtres humains. De préférence, le terme "ingrédient pharmaceutique actif" désigne une molécule destinée à être biologiquement active, par exemple pour traiter une maladie, un trouble ou un état inflammatoire, auto-immun ou pulmonaire.

### Réduction de l'ordre des membranes des cellules T

Les inventeurs actuels ont découvert de manière surprenante que la cyclodextrine peut être utilisée pour extraire des lipides ou réduire l'ordre de la membrane des cellules épithéliales et en particulier de la membrane des cellules T du parenchyme pulmonaire.

- 5 La réduction de l'ordre de la membrane par l'inhalation de cyclodextrine entraîne une diminution de l'activation et de la prolifération des cellules T. L'activation et la prolifération des cellules T ont un impact sur la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par les allergènes. Ainsi, un premier aspect de l'invention est une cyclodextrine inhalable ou un dérivé cyclique pharmaceutiquement acceptable de celle-
- 10 ci pour une utilisation dans le traitement de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des allergènes. Les inventeurs montrent en outre que les cyclodextrines administrées par inhalation diminuent l'inflammation induite par les allergènes et l'hyperréactivité associée dans la bronchoconstriction induite par les allergènes.

15

Dans un autre mode de réalisation, la cyclodextrine de l'invention est utilisée pour réduire la prolifération des cellules T ou l'activation des cellules T.

De plus, les inventeurs actuels ont découvert que les cyclodextrines peuvent n'avoir aucun impact sur l'asthme en phase précoce.

- 20 La cyclodextrine de l'invention est l'Hydroxypropyl-béta-cyclodextrine.

Dans un autre aspect, l'asthme est un asthme léger à modéré induit par des allergènes.

Un autre aspect de l'invention est une composition comprenant une cyclodextrine ou un dérivé cyclique pharmaceutiquement acceptable de celle-ci pour une utilisation dans le traitement de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des

25 allergènes.

### Quantité, concentration et dosage

La cyclodextrine de la présente invention est utilisée pour traiter ou prévenir la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme provoqué par des allergènes. Elle est

administrée en une seule fois aux patients qui présentent une bronchoconstriction tardive dans l'asthme d'origine allergique. Il est administré en quantité suffisante pour réduire la bronchoconstriction dans l'asthme en phase tardive par rapport aux patients sous placebo.

- 5 Dans une des formes d'administration, la cyclodextrine est administrée à une dose quotidienne de 0,1 mg à 30 mg, de préférence de 0,5 mg à 20 mg, d'environ 1 mg à 10 mg, et encore plus préférablement d'environ 5 mg à 10 mg.

Dans une autre variante, la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de deux ans au maximum par inhalation à raison de 0,1 à 0,5 mg par jour.

- 10 La cyclodextrine est administrée par inhalation aux enfants âgés de deux à six ans à raison de 0,5 mg à 1 mg par jour.

La cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de 6 à 14 ans par inhalation, à raison de 1 à 2 mg par jour.

- 15 La cyclodextrine est administrée à raison de 0,1 mg à 15 mg par jour dans l'asthme allergique léger à modéré et de 1 mg à 30 mg dans l'asthme allergique sévère.

La cyclodextrine est administrée une fois par jour par inhalation.

Dans une autre variante, la cyclodextrine est administrée deux fois par jour par inhalation, de préférence une fois le matin et une fois le soir.

- 20 Dans une autre variante, la cyclodextrine est administrée trois fois par jour par inhalation, de préférence une fois le matin, une fois à midi et une fois le soir.

Toutefois, on peut prévoir un plus grand nombre d'inhalations par jour, par exemple quatre, cinq, six ou sept fois par jour.

- 25 La cyclodextrine est une composition liquide comprenant de la cyclodextrine dans la gamme de 1 mg/ml à 100 mg/ml, de préférence de 5 mg/ml à environ 50 mg/ml, et plus préférablement de 10 mg/ml à environ 30 mg/ml. Les autres concentrations préférées vont de 15 mg/ml à 25 mg/ml.

Dans une autre variante, la concentration de cyclodextrine dans la composition du liquide est comprise entre 1 et 100 millimoles, de préférence entre 3 et 80 millimoles, plus préférablement encore entre 5 et 50 millimoles, plus préférablement encore entre

7 et 40 millimoles, plus préférablement encore entre 10 et 30 millimoles, et plus préférablement encore entre 12,5 et 17,5 millimoles.

#### Autres ingrédients

- 5 Dans une de ses formes, la cyclodextrine est associée à un autre ingrédient pharmaceutique actif.

Dans une autre version, aucun autre ingrédient pharmaceutique actif n'est associé à la cyclodextrine de la présente invention.

- 10 Dans un autre mode de réalisation, la composition inhalable comprend en outre un composant choisi dans le groupe constitué par les supports, les stabilisateurs, les diluants, les agents dispersants, les agents de suspension, les agents épaississants, les excipients et les conservateurs antimicrobiens. Dans les solutions aqueuses, ces composants sont présents en faibles quantités, généralement dans la fourchette de 0,1 mg/ml à 5 mg/ml.

- 15 Un autre aspect de l'invention est l'utilisation d'une cyclodextrine ou d'une composition de l'invention dans le traitement et la prévention par inhalation de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des allergènes.

Un autre aspect de l'invention est un dispositif générateur d'aérosol ou un inhalateur de poudre sèche comprenant la cyclodextrine ou la composition de l'invention.

20

#### BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

Fig. 1	La figure 1 montre comment le HPBCD protège contre l'inflammation induite par les allergènes et la procréation assistée chez la souris
Fig. 1A	Protocole pour l'inflammation induite par les HDM et l'hyperréactivité des voies aériennes, intranasale 100mcg/50mcl
Fig. 1B	Tests de la fonction respiratoire après exposition à des doses croissantes de méthacholine de 3 à 12 mg/ml et résistance pulmonaire de base sans méthacholine.

Fig. 1C	Les cellules BALF comptent les éosinophiles, les lymphocytes, les neutrophiles
Fig. 1D	Sections pulmonaires colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et scores d'inflammation
Fig. 1E	Coloration bleu d'Alcian des sections pulmonaires
Fig. 1F	Analyse par cytométrie de flux des cellules TH2 du poumon et numération des leucocytes totaux
Fig. 2	La figure 2 montre comment le HPBCD cible la réactivité et l'inflammation des voies aériennes induites par l'ovalbumine.
Fig. 2A	Protocole pour l'inflammation induite par l'OVA et l'inhalation de l'AHR.
Fig. 2B	Mesure des résistances des voies respiratoires suite aux défis de la méthacholine avec Augmenter les doses (3-24 mg/ml) et la résistance pulmonaire de base sans méthacholine. Rn, Résistance Newtonienne.
Fig. 2C	Contenu cellulaire dans le BALF. Eosino, éosinophiles ; Lympho, lymphocytes, Neutro, les neutrophiles.
Fig. 2D	Taches rouges de congo représentatives des sections pulmonaires et nombre d'éosinophiles/mm de membrane basale.
Fig. 2E	Pourcentage d'éosinophiles (%) dans le BALF chez les animaux traités par HPBCD, dextrans linéaires et glucose.
Fig. 2F	Les scores d'inflammation péri-bronchique.
Fig. 2E - F	n=7-8mice/groupe, moyenne +/-s.e.m, test d'ANOVA à sens unique, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.
Fig. 3	La figure 3 montre comment le HPBCD réduit la prolifération des cellules T dans les ganglions lymphatiques drainant la lande (LDLN).
Fig. 3A	Nombre total de cellules en LDLN
Fig. 3B	Analyse par cytométrie de flux de DC-OVA+ (F4/80- CD11c+ MHCII+) dans les LDLN dans LDLN.

Fig. 3A - B	N=7 mice/groupe, signifie +/- s.e.m, test de Mann-Whitney bilatéral, *P<0,05, Les données sont représentatives d'au moins deux expériences indépendantes.
Fig. 4	La figure 4 montre comment l'extraction des lipides par HPBCD entrave l'activation et la prolifération des cellules T.
Fig. 4A	Étude de séparation de phases (liquid-ordered (lo) - liquid-disordered (ld)) dans les GUV (TR-DPPE (rouge, ld) ; NBD-PE (vert, lo) suite à l'incubation du HPBCD (5 mM).
Fig. 4B	GPex (n=6) et anisotropie (n=3) sur cellules de jurkat (HPBCD (5 mM) incubation 3 h.
Fig. 4C	Étude de la prolifération (incorporation de BrdU - n=4) et de la sécrétion d'IL-2 dans le milieu de culture (ELISA - n=6) sur des cellules T CD4+ naïves (Balb/c) stimulées par des anti-CD3 fixés sur plaque (3 µg/ml).
Fig. 4D	Étude de restimulation ex-vivo des cellules LDLN. Mesure ELISA des IL-4, -5 et -13 sécrétés.
Fig. 4B-D	Test t bilatéral par paires.
Fig. 4E	Cytométrie de flux des poumons DC (F4/80- CD11c+ MHCII+) pour l'expression OVA-FITC et MHCII (MFI) n=6 mice/groupe, signifie +/- s.e.m, test de Mann-Whitney bilatéral. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.
Fig. 5	La figure 5 montre comment la bronchoconstriction induite par les allergènes HPBCD inhalés dans un essai clinique de validation de principe
Fig. 5A	Profil des essais cliniques.
Fig. 5B	Variation du VEMS (%) par rapport à la valeur de référence suite à la provocation par les allergènes (HDM).
Fig. 5C	CUA de la diminution du pourcentage de VEMS ajusté au temps.
Fig. 5D	Diminution maximale du VEMS (% par rapport au niveau de référence) pendant les phases précoce (0-60 min) et tardive (180-360 min) (B-E).
Fig. 5E	Pourcentage moyen de baisse du VEMS pendant les phases précoce (0-60 min) et tardive (180-360 min).
Fig. 5B-E	N=15 patients asthmatiques légers à modérés, signifie +/- s.e.m. , un test de Wilcoxon à la queue par paires appariées.

## EXEMPLES

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans en limiter la portée. Les figures 1 à 5 illustrent les exemples de manière plus détaillée.

### 5 Abréviations

APCs	Cellules présentatrices d'antigènes
AHR	Hyper-réactivité des voies aériennes
AUC	Courbe FEV1 en fonction du temps
BALF	Liquide de lavage bronchoalvéolaire
BrdU	Bromodésoxyuridine
ELISA	Essai immuno-sorbant lié à une enzyme
FEV1	Volume expiratoire forcé après une seconde
BPC	Bonnes pratiques cliniques
GUVs	Vésicules unilamellaires géantes
HDM	Acarions de la poussière de maison
HPBCD	Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine
i.n.	les instillations intranasales
ld	Liquid-disordered
LDLN	Ganglions lymphatiques qui drainent les poumons
lo	Commande de liquide
mcg	microgramme
mcl	microlitre
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PD20	Dose provocatrice qui provoque une baisse de 20 % du VEMS
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
Rn	Les résistances newtoniennes
SEM	Erreur type de la moyenne
TRM	Cellules T de la mémoire résidente à long terme

**Exemple 1 : solution isotonique saline HPBCD de 15 mMol**

Dissoudre 21,73 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex, disponible chez Roquette Frères, France) et 8,54 grammes de NaCl dans 1 litre d'eau pour injection, ou stériliser à la vapeur d'eau.

**5 Exemple 2 : solution à base de 15 mMol de HPBCD PBS pH7,4**

Dissoudre 21,73 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) ; 7g de NaCl ; 0,2g de KCl ; 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 800 ml d'eau stérile. Ajustez le pH à 7,4 avec du HCl 0,1N. Ajustez le volume à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillé supplémentaire. Stériliser à l'autoclave ou distribuer dans des flacons stériles en utilisant une double filtration de  
10 5 microns et 0,22 microns.

**Exemple 3 : solution isotonique saline HPBCD de 5 mMol**

Dissoudre 8,75 grammes de Kleptose® HPBCD® (HP-Betadex) et 8,74 grammes de NaCl dans 1 litre d'eau pour injection, ou stériliser à la vapeur.

**Exemple 4 : solution à base de HPBCD PBS de 25 mMol, pH7,4**

15 Dissoudre 36,22 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) ; 6,47g de NaCl ; 0,2g de KCl ; 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 800 ml d'eau stérile. Ajustez le pH à 7,4 avec du HCl 0,1N. Ajustez le volume à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillé supplémentaire. Stériliser à l'autoclave ou distribuer dans des flacons stériles en utilisant une double filtration de 5 microns et 0,22 microns.

**20 Exemple 5 : solution isotonique saline HPBCD de 40 mMol**

Dissoudre 57,91 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) et 7,94 grammes de NaCl dans 1 litre d'eau pour injection, ou stériliser à la vapeur.

**Exemple 6 : solution isotonique saline HPBCD de 25 mMol**

Dissoudre 36,22 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) et 8,74 grammes de NaCl  
25 dans 1 litre d'eau pour injection, ou stériliser à la vapeur.

**Exemple 7 : solution 10 mMol de citrate HPBCD pH4,5**

Dissoudre 17,45 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) ; 8,27g de NaCl ; 0,306g d'acide citrique monohydraté, 0,500g de citrate de sodium dihydraté dans 800 ml d'eau

stérile. (Ajuster le pH à 4,5 avec HCl 0,1N ou NaOH 0,1N si nécessaire). Ajuster le volume à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillé supplémentaire. Stériliser à l'autoclave ou distribuer dans des flacons stériles en utilisant une double filtration de 5 microns et 0,22 microns.

Exemple 8 : solution 40 mMol de citrate HPBCD, pH4,5

- 5 Dissoudre 57,91 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) ; 7,97g de NaCl ; 0,306g d'acide citrique monohydraté, 0,500g de citrate de sodium dihydraté dans 800 ml d'eau stérile. (Ajuster le pH à 4,5 avec HCl 0,1N ou NaOH 0,1N si nécessaire). Ajuster le volume à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillé supplémentaire. Stériliser à l'autoclave ou distribuer dans des flacons stériles en utilisant une double filtration de 5 microns et 0,22 microns.

10 Exemple 9 : solution isotonique saline HPBCD de 50 mMol

Dissoudre 72,38 grammes de Kleptose® HPBCD (HP-Betadex) et 7,77 grammes de NaCl dans 1 litre d'eau pour injection, (ou stériliser à la vapeur d'eau chaude)

Exemple 10 : L'inhalation de HPBCD réduit l'inflammation induite par les allergènes et l'hyperréactivité des voies respiratoires

15

L'impact du HPBCD sur l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique associées à l'asthme a été étudié dans un modèle murin d'inflammation et d'hyperréactivité des voies respiratoires.

- 20 Six à sept souris par groupe ont été testées. Un test de Mann-Whitney bilatéral a été effectué avec des valeurs p de \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 dans deux expériences indépendantes.

- 25 Deux instillations intranasales d'acariens ont été effectuées les jours 0 et 7 pour induire la migration des cellules T CD4+ à mémoire spécifique dans le parenchyme pulmonaire, suivies d'une instillation de provocation le jour 14. Les cellules T à mémoire résidente à long terme dans les poumons sont associées à un faible niveau de prolifération mais sont très efficaces contre les allergènes connus. La dernière instillation d'acariens a été précédée de deux jours d'inhalations de HPBCD ou de PBS et suivie de trois inhalations jusqu'au sacrifice (figure 1A). L'hyperréactivité des voies respiratoires est une caractéristique de l'asthme et est principalement induite par des changements
- 30 structurels et une inflammation des voies respiratoires. La réactivité des voies aériennes

a été évaluée en exposant des animaux à des doses croissantes de méthacholine inhalée et en mesurant les résistances newtoniennes représentant la résistance des voies aériennes centrales ou conductrices. Les inventeurs ont observé que l'inhalation de HPBCD diminuait de manière significative la réactivité des voies aériennes à la méthacholine, alors que la réactivité de base était similaire entre les groupes (figure 1B). Le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) a ensuite été récupéré et analysé pour en déterminer le contenu cellulaire. L'inflammation éosinophile liée à l'exposition aux allergènes a été significativement réduite chez les animaux exposés au HPBCD par rapport au placebo (Figure 1C). L'étendue de l'inflammation autour des bronches (figure 1D) et le nombre de cellules épithéliales productrices de mucus bleu d'Alcian positif (figure 1E) ont également été réduits lorsque les souris ont été traitées avec du HPBCD par rapport au placebo. L'effet de l'inhalation de HPBCD sur le nombre de cellules T dans le parenchyme pulmonaire a été étudié par cytométrie de flux. Ni le nombre total de cellules T CD4+ (CD3+ CD4+) ni le nombre de cellules TH2 (CD3+ CD4+ T1ST2+ ICOS+) n'ont été modifiés, ce qui suggère l'absence de mort significative des cellules T suite aux inhalations de HPBCD (figure 1F). Ces résultats démontrent l'effet du HPBCD sur l'inflammation et l'hyperréactivité induites par les allergènes et ont été confirmés dans un autre modèle d'exposition aux allergènes utilisant de l'ovalbumine en nébulisation (figure 2A). Dans ce modèle, les inhalations de HPBCD ont également réduit de manière significative l'hyperréactivité des voies respiratoires induite par l'ovalbumine (figure 2B) et le nombre de cellules inflammatoires dans le BALF ainsi que le nombre d'éosinophiles autour des bronches (figures 2C et 2D).

#### Protocole d'essai de l'exemple 1

##### Souris

Des souris BALB/c mâles âgées de 6 à 8 semaines ont été achetées aux laboratoires Janvier (Saint-Berthevin, France). Toutes les souris ont été élevées et hébergées dans des installations universitaires. Toutes les expériences et les protocoles ont été préalablement approuvés par le comité d'éthique local (soin et utilisation des animaux) de l'Université de Liège.

Réactifs et anticorps

Des extraits lyophilisés de HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus*) pour les études sur les animaux ont été achetés aux laboratoires Greer (Lenoir, USA). La méthacholine et l'ovalbumine proviennent de Sigma-Aldrich (Karlsruhe, Allemagne). Le HPBCD (Kleptose® HPB - substitution molaire = 0,64) a été aimablement fourni par Roquette (Lestrem, France). Le D(+)-Glucose et la dextrine linéaire ont été achetés auprès de VWR (Louvain, Belgique). Le test ELISA colorimétrique de prolifération cellulaire au BrdU a été fourni par Roche (Mannheim, Allemagne). Le TR-DPPE (Texas red 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) et le NBD-PE (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadécanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) ont été achetés chez Invitrogen (Paisley, Écosse). Le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) et le Laurdan (6-dodécanoyl-2-diméthyl-aminonaphtalène) ont été achetés auprès de Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA). POPC (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), la sphingomyéline et le cholestérol ont été commandés à Avanti Polar Lipids (Birmingham, UK). L'OVA-fluorescéine isothiocyanate (FITC) a été commandé à Invitrogen (Paisley, Écosse). L'anti-F4/80 (BM8) conjugué à la phycoérythrine, l'anti-CD11c (N418) conjugué à l'APCcyanine7 et l'anti-MHCII (AF6-120.1) conjugué au PerCP-Cy5.5 proviennent de eBioscience (San Diego, États-Unis). Les anti-CD3 (17A2) conjugués à l'APCcyanine7 et les anti-CD4 (RM4-5) conjugués au BV510 ont été achetés auprès de BD biosciences (Mississauga, Canada). L'anti-ICOS conjugué à l'Alexa 647 (C398.4A) a été obtenu auprès de Biolegend (San Diego, États-Unis). L'anti-T1ST2 conjugué à du PE (DJ8) a été commandé auprès de MD Biosciences (St Paul, USA). Les contrôles d'isotypes et les anticorps provenaient du même fabricant. Les anticorps du récepteur Fc 2.4G2 ont été produits en interne.

#### Cytométrie en flux

25 Les réactions de coloration ont été effectuées à 4°C. Les cellules ont été préalablement incubées avec des anticorps du récepteur Fc 2.4G2 pour réduire la liaison non spécifique. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

#### Protocole sur l'inflammation des voies aériennes

30 Les souris ont été légèrement anesthésiées à l'isoflurane et ont reçu une instillation intranasale (i.n) d'extrait de HDM (100 µg ; 50 µl) dans une solution saline sans endotoxine les jours 0, 7 et 14. Des souris ont été soumises à l'inhalation (générée par un nébuliseur ultrasonique (Devlbiss 2000)) de HPBCD 10 mM ou d'une solution saline sans endotoxine

pendant 40 minutes entre les jours 12 et 16. Le 14<sup>e</sup> jour, elles ont reçu l'inhalation 1h avant la dernière instillation de HDM. Après la mesure de la réactivité bronchique à l'aide du système FlexiVent, les souris ont été sacrifiées le 17<sup>e</sup> jour. Les souris soumises à l'ovalbumine comme allergène ont reçu une injection i.p. de 10 mcg d'ovalbumine de grade 5 et ont été exposées à l'ovalbumine de grade 3 par inhalation entre le 21<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour. Les souris ont été traitées avec du HPBCD 10 mM administré par inhalation entre le 19<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour. Après la mesure de la réactivité bronchique à l'aide du système FlexiVent, les souris ont été sacrifiées le 26<sup>e</sup> jour.

#### Mesure de la réactivité bronchique

10 Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (10 mg/ml, Merial, Bruxelles, Belgique) et de xylazine (1 mg/ml, VMD, Arendonk, Belgique). Une trachéotomie a été réalisée par l'insertion d'un cathéter en polyéthylène de calibre 20 dans la trachée. Les souris ont été ventilées avec un ventilateur pour petits animaux FlexiVent® (SCIREQ, Montréal, Canada) comme décrit précédemment (18). Les paramètres respiratoires à la suite d'une provocation à la méthacholine (3, 6 et 12 gr/l (ou 24 gr/l)) ont été évalués à l'aide d'un signal à large bande de 3 secondes pour mesurer l'impédance d'entrée de 1 à 20,5 Hz et pour calculer les paramètres du modèle à phase constante (Quick-prime 3). La résistance newtonienne ( $R_n$ ) a été le principal paramètre mesuré pendant le défi.

#### 20 Liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF)

Des souris ont été sacrifiées et un lavage bronchoalvéolaire a été effectué avec du PBS-EDTA 0,05 mM (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne). Les cellules ont été récupérées par aspiration manuelle douce. Après centrifugation du liquide bronchoalvéolaire (BALF) (1200 tr/min ; 10 min ; 4 °C), le culot cellulaire a été remis en suspension dans 0,5 ml de PBS-EDTA 0,05 mM. Les numérations cellulaires différentielles ont été effectuées sur des préparations cytocentrifugées (Cytospin) après coloration Diff-Quick (Dade, Belgique).

#### Histologie pulmonaire et traitement des tissus

Le poumon gauche a été excisé et congelé dans de l'azote liquide. Le poumon droit a été perfusé avec 4 % de paraformaldéhyde, incorporé dans de la paraffine et utilisé pour

l'histologie. Des sections de 5 µm d'épaisseur ont été coupées de la paraffine et colorées avec de l'hématoxyline-éosine pour estimer l'étendue de l'inflammation (18) et avec du bleu d'Alcian (coloration de la mucine).

#### Mesure des cellules TH2 des poumons

- 5 Pour obtenir des suspensions monocellulaires, les poumons ont été perfusés avec 10 ml de HBSS par le ventricule droit, coupés au rasoir en petits morceaux et digérés pendant 1 heure à 37 °C dans 1 mg/ml de collagénase A (Roche) et 0,05 mg/ml de DNaseI (Roche) dans le HBSS. Les leucocytes ont été enrichis grâce au gradient de Percoll (Easycoll, Millipore). Les cellules TH2 ont été définies comme des cellules CD3+ CD4+ T1ST2+ ICOS+. La cytométrie de flux a été réalisée sur un FACScanto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

#### L'absorption d'allergènes et la migration des PED

- Pour évaluer l'absorption d'allergènes par les CD pulmonaires (F4/80- CD11c+ MHCII+) et la migration des CD vers la LDLN, des souris ont reçu une injection de 100 µg d'OVA-FITC. 24 heures plus tard, les poumons et la LDLN ont été analysés par cytométrie de flux pour détecter la présence de CD chargées d'antigènes (CD FITC+). Pour évaluer l'impact du HPBCD sur l'absorption des allergènes et les migrations des DC, des souris ont été traitées par inhalation de HPBCD à J-2, J-1 et 1h avant l'instillation i.n. d'OVA-FITC. La cytométrie de flux a été effectuée sur un FACScanto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

- 20 **Exemple 11 : Le HPBCD inhalé réduit la bronchoconstriction induite par les allergènes chez les asthmatiques humains**

- Dix-sept asthmatiques légers à modérés sensibilisés à la MHD ont été inclus dans une étude croisée en double aveugle comprenant des défis allergènes avec la MHD. De manière surprenante, les patients ont montré une diminution plus faible du VEMS après une provocation par la HDM (aire sous la courbe VEMS-temps (ASC) 0-360 min) lorsqu'ils étaient traités par inhalation de HPBCD par rapport aux périodes de traitement par placebo (figure 5B). L'analyse (ASC) de la diminution du VEMS pendant les phases précoce et tardive après une provocation par HDM montre un effet prédominant de l'inhalation de HPBCD sur la prévention de la diminution du VEMS pendant la réaction de la phase tardive (figure 5C). La diminution maximale du VEMS et le pourcentage moyen de

diminution du VEMS après une provocation par HDM ont été calculés et se sont avérés nettement inférieurs chez les patients traités par HPBCD (figures 5D et 5E). Ces expériences montrent un effet significatif de l'inhalation de HPBCD sur la prévention de la diminution du VEMS induite par les allergènes pendant la phase tardive. Aucune différence significative entre l'HPBCD et le placebo n'a été observée pendant la phase précoce de bronchoconstriction. Aucun changement significatif n'a été observé dans l'hématologie, la biochimie sérique, l'analyse d'urine, les signes vitaux, les tests ECG et la radiographie pulmonaire entre les groupes de traitement

### Protocole d'essai de l'exemple 2

#### 10 Procédures d'essais cliniques

Les protocoles d'essais cliniques ont été approuvés par un comité éthique indépendant (CHU Liège - Université de Liège) conformément aux BPC, à la Déclaration d'Helsinki et à la réglementation européenne (EudraCT). Tous les participants ont donné leur consentement éclairé par écrit avant toute procédure spécifique à l'étude. Pour l'essai clinique de phase 1, 8 sujets sains (4 femmes et 4 hommes) de 18 à 40 ans ont été recrutés et inscrits à l'étude au CHU de Liège (Belgique). Les patients ont été randomisés et ont d'abord reçu le placebo (NaCl 0,9 %) ou le HPBCD à 2,5 mM et 8 jours après, le traitement inverse. Après une semaine, tous les patients ont reçu le HPBCD à 15 mM. Un mois plus tard, tous les patients ont reçu le HPBCD à 15 mM pendant 5 jours consécutifs.

20 La poudre de HPBCD apyrogène et stérile a été diluée avec du NaCl 0,9 % avant d'être inhalée (8 ml) avec un nébuliseur ultrasonique (Devlbiss 2000). Les symptômes généraux, les scores d'asthme (ACQ), la dyspnée, la radiographie thoracique, la biologie clinique, l'ECG, les signes vitaux, la spirométrie, le NO, les crachats (induits par le NaCl 4,5 %) ont été analysés après les périodes de traitement. Le deuxième essai clinique

25 (phase 2a - preuve du concept) était une étude en double aveugle, croisée, contrôlée par placebo. 17 patients asthmatiques légers à modérés ont été inclus dans l'étude sur deux sites différents (Hôpital universitaire de Liège et Hôpital universitaire Erasme) en Belgique. Les visites de caractérisation ont consisté en l'enregistrement des symptômes de dyspnée, l'ECG, la radiographie thoracique, la biologie clinique, la spirométrie et

30 l'analyse des signes vitaux. Le PD20 (dose provocatrice qui provoque une chute de 20 % du VEMS par rapport à la valeur du sérum physiologique seul) à l'allergène inhalé a été déterminé. Afin de déterminer la réponse bronchique individuelle à l'allergène, un test

de provocation a été réalisé avec un extrait de *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Stallergen ; Antony, France) dilué dans une solution saline isotonique dont l'indice de réactivité était compris entre 0,2 et 5. La PD20 de l'allergène a été calculée à partir d'une courbe dose-réponse cumulative, comme décrit précédemment, Cataldo et al, 5  
Métalloprotéïnase-9 de la matrice, mais pas l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéïnase-1 de la matrice, les augmentations dans les expectorations de patients asthmatiques allergiques après une provocation allergique, *Chest*. 2002;122(5):1553-9. Tous les sujets sains ont reçu une concentration cumulative de *Dermatophagoïdes pteronyssinus* avec un indice de réactivité de 6. Après une période  
10 de lavage de 14 jours, les patients ont été répartis au hasard en deux groupes et ont reçu soit du HPBCD 15 mM, soit un placebo (NaCl 0,9 %) par inhalation (nébuliseur ultrasonique (Devlbiss 2000)) deux fois par jour. À la fin de cette période de traitement, la fonction pulmonaire (FEV1) a été analysée après provocation allergique (HDM) sous la supervision de physiologistes cliniques respiratoires expérimentés. Le VEMS a été mesuré  
15 après un test d'inhalation d'allergènes à 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 et 360 minutes. Après une période de lavage de 28 jours, les patients ont reçu le traitement inverse pendant 14 jours supplémentaires et le VEMS après provocation allergénique a été évalué. Tous les paramètres cliniques ont été examinés après chaque période de traitement. Le critère d'évaluation de cette étude de preuve de concept était l'évolution  
20 du VEMS sur une période de 0 à 360 minutes après la provocation allergique. Le VEMS en phase précoce (0-60 min) et en phase tardive (180-360 min) a été exprimé comme suit : aire sous la courbe du VEMS en fonction du temps (ASC), pourcentage maximal de chute et pourcentage moyen de chute (calculé en divisant l'aire sous la courbe du pourcentage de chute du VEMS par la durée de la période de réponse). Un patient qui a reçu un  
25 placebo a eu une diminution maximale négative du VEMS et un pourcentage moyen de chute négatif du VEMS. Ces valeurs négatives ont été tronquées à 0. Les patients ont eu accès à  $\beta_2$ -agonist (salbutamol 100  $\mu$ g) tout au long de l'étude comme traitement "au besoin".

#### Préparation et visualisation des GUV

30 Les GUV ont été préparés par électroformation. En bref, 1 ml d'une solution de chloroforme de SM/Chol/POPC (1:1:1) a été étalée sur un verre recouvert d'oxyde d'indium et d'étain. Les sondes fluorescentes (TR-DPPE et NBD-PE) ont été ajoutées à la

solution de chloroforme à une concentration de 0,1 % mol/mol. La solution a été séchée dans une chambre à vide pendant 2 h. Une chambre d'électroformage a été construite en utilisant une autre lame de verre recouverte d'oxyde d'indium et d'étain, avec la face conductrice dirigée vers l'intérieur de la chambre d'électroformage, qui a été remplie d'une solution de saccharose 0,1 M. Du polydiméthylsiloxane contenant 5 % de silice fumée a été utilisé pour séparer les deux lames de verre. Les GUV ont été cultivées en appliquant un courant alternatif sinusoïdal de 10 Hz et 1 V pendant 2 h à 60 °C. Les GUV ont été analysées au microscope Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) avec un objectif Zeiss EC Plan-Neofluar® 40x/0,75 et les images ont été enregistrées avec un appareil photo Nikon DS-5 M à visée numérique (Nikon, Tokyo, Japon). Le TR-DPPE a été excité à 561 nm et analysé à 617 nm. Le NBD-PE a été excité à 460 nm et analysé à 535 nm. La séparation des phases (ld/lo) a été évaluée après incubation avec le HPBCD à 5 mM.

#### Organisation et rigidité de la membrane des cellules T

Pour analyser l'impact du HPBCD sur la mobilité et la polarité des phospholipides au niveau du squelette du glycérol, des cellules Jurkat ont été incubées avec du Laurdan. En bref,  $1 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans 3 ml de RPMI 10 % FBS 1 % pen/strep et traitées à 37 °C avec du HPBCD (5 mM). Après 3 h, le milieu a été remplacé et les cellules ont été incubées avec 1,4 mM de Laurdan pendant 1 h à 37 °C. Le GPex a été déterminé à 37 °C comme une mesure de l'organisation et de la rigidité de la membrane, comme décrit dans Lorent et al, Induction of Highly Curved Structures in Relation to Membrane Permeabilization and Budding by the Triterpenoid Saponins,  $\alpha$ - et  $\delta$ -Hederin, The Journal of Biological Chemistry 2013;288(20):14000-17. La dynamique des lipides/la fluidité de la chaîne acyle après incubation du HPBCD a été analysée de la même manière grâce à la sonde DPH. L'anisotropie a été déterminée à 37 °C comme mesure de la rigidité de la membrane.

#### Essai in vitro de prolifération des cellules T

Le HPBCD a été utilisé à une concentration de 5 mM. Cette concentration n'a pas été associée à une cytotoxicité (telle que mesurée après 48 h d'incubation par incorporation de BrdU). Des cellules T CD4+ naïves ont été isolées de la rate de souris Balb/c et purifiées avec un kit de sélection négative MACS®. Des cellules  $1,5 \times 10^5$  ont

été ensemencées dans une plaque de 96 puits et incubées avec du HPBCD 5 mM (en RPMI 10 % FBS 1 % pen/strep) ou avec le milieu seul pendant 3 h. Les cellules ont ensuite été récupérées et plaquées dans un puits recouvert d'anti-CD3 (3 mcg/ml) pendant 24 ou 48 h avec du HPBCD (5 mM) ou avec le milieu de culture seul à 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Au cours des 2 dernières heures du test de prolifération, du BrdU a été ajouté au milieu et l'incorporation a été quantifiée par ELISA en suivant les instructions du fabricant. D'autres puits ont été utilisés pour évaluer la sécrétion d'IL-2 (ELISA) dans le milieu après 24 et 48 h de stimulation anti-CD3.

#### Essai in vitro de stimulation des cellules T

10 Les cellules des ganglions lymphatiques qui drainent les poumons ont été isolées chez des souris qui avaient été préalablement confrontées à la HDM. Ces cellules ont été restimulées dans une plaque à 96 puits avec 30 mcg de HDM en RPMI. Les surnageants ont été évalués après 48 heures pour la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13 par ELISA.

#### Analyse statistique

15 **Essai clinique de phase 2 - Inclusion et exclusion**

#### Critères d'inclusion

- Homme ou femme souffrant d'asthme léger à modéré
- Âge : 18-65 ans
- Pas de fumeurs actuels (consommation maximale de tabac : 10/an)
- 20 • Sensibilisation aux acariens (*Dermatophagoïdes Pteronyssinus*) contrôlée par RAST ou par des tests de piqure
- Pas de traitement régulier de l'asthme (exception : bronchodilatateurs à courte durée d'action)
- Pas d'exacerbation de l'asthme ni d'infection des voies respiratoires au cours
- 25 des 6 semaines précédant l'inclusion dans l'étude
- Indice de masse corporelle (IMC) 18 - 28 kg/m<sup>2</sup>
- Pas de maladie concomitante significative ni d'anomalies des signes vitaux
- Consentement éclairé à donner
- Sujet disponible pendant l'étude

30 **Critères d'exclusion**

- Tout médicament pris au cours des 28 derniers jours
  - Les fumeurs actifs ou les personnes dépendantes de toute autre drogue
  - Allergie aux médicaments
  - Consommation d'alcool (> 2 verres/jour) et de café (> 4 tasses/jour)
- 5
- Antécédents médicaux de problèmes cardiaques, rénaux et hépatiques susceptibles d'interférer avec l'étude
  - Participation concomitante à une autre étude
  - Pas de consentement éclairé

Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM, sauf indication contraire.

- 10 Les différences entre les valeurs moyennes ont été estimées à l'aide d'un test de Mann-Whitney bilatéral (expériences sur animaux et in vitro), sauf indication contraire. Toutes les expériences sur les animaux ont été répétées au moins 2 fois ;  $n \geq 6$  dans chaque groupe expérimental. Le test ANOVA Friedman (dose unique) et le test de Wilcoxon à rang signé (doses multiples) ont été utilisés pour analyser les résultats obtenus lors de
- 15 l'essai clinique de phase 1. Le test de Wilcoxon à un rang (paires appariées) a été utilisé pour évaluer les différences intra-individuelles dans l'essai clinique de preuve de concept. Une valeur P inférieure à 0,05 a été jugée significative. Les logiciels GraphPad Prism et Statistica ont été utilisés pour analyser les résultats.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : L'essai clinique de phase 1 NO, FEV1 et éosinophiles (crachats) ont été suivis après une ou plusieurs administration(s) unique(s) (HPBCD 2,5 mM et 15 mM) ou multiple(s) (HPBCD 15 mM/5 jours). Le QT et le QTc ont été évalués au cours de l'essai à doses multiples. n=8 sujets sains, moyenne +/- s.d. ANOVA test de Friedman (dose unique) et test de rang signé Wilcoxon (doses multiples).

Paramètres	Placebo		HPBCD 2,5 mM		HPBCD 15 mM		P-Value
	moyenne ± SD	moyenne ± SD	moyenne ± SD	moyenne ± SD	moyenne ± SD	moyenne ± SD	
Dose unique							
Aucune mesure (ppb) 15 min après inhalation	22.57 ± 8.07		23.85 ± 7.56		28.48 ± 17.92		0.69
VEMS (l/sec) 15 min après inhalation	4.04 ± 0.87		4.08 ± 0.87		4.01 ± 0.87		0.22
FEV1 (l/sec) 1h après inhalation	4.06 ± 0.82		4.11 ± 0.83		4.04 ± 0.86		0.20
FEV1 (l/sec) 3h après inhalation	4.09 ± 0.83		4.10 ± 0.82		4.07 ± 0.85		0.66
FEV1 (l/sec) 5h après inhalation	4.15 ± 0.88		4.11 ± 0.87		4.08 ± 0.92		0.66
Eosinophiles (%) 5h après inhalation	0.10 ± 0.21		0.00 ± 0.00		0.20 ± 0.49		0.66
Dose multiple (HPBCD 15 mM)							
	Avant la première inhalation		Après 5 jours d'inhalation				
	moyenne ± SD		moyenne ± SD				
Aucune mesure (ppb) 15 min après inhalation	25.74 ± 11.13		25.16 ± 9.76				0.78
VEMS (l/sec) 15 min après inhalation	4.10 ± 0.84		4.13 ± 0.87				0.31
FEV1 (l/sec) 1h après inhalation	4.10 ± 0.84		4.07 ± 0.82				0.26
FEV1 (l/sec) 3h après inhalation	4.10 ± 0.84		4.11 ± 0.87				0.83
FEV1 (l/sec) 5h après inhalation	4.10 ± 0.84		4.10 ± 0.87				0.67
Eosinophiles (%) 5h après inhalation	0.00		0.00				/
QT (ms)	384.80		393.50				0.23
QtTc (ms)	408.00		393.30				0.14

## RÉCLAMATIONS

1. Cyclodextrine inhalable ou un dérivé pharmaceutiquement acceptable de celle-ci, destinée à être utilisée dans le traitement ou la prévention de la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme induit par des allergènes.
2. Cyclodextrine selon la revendication 1, dans laquelle la cyclodextrine est l'Hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine.
3. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est une solution aqueuse inhalable.
4. Cyclodextrine selon la revendication 4, dans laquelle la concentration en cyclodextrine est comprise entre 5 millimoles et 50 millimoles.
5. Cyclodextrine selon la revendication 4, dans laquelle la concentration en cyclodextrine est comprise entre 7 millimoles et 40 millimoles.
6. Cyclodextrine selon la revendication 4, dans laquelle la concentration en cyclodextrine est comprise entre 10 millimoles et 30 millimoles.
7. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est une poudre séchée par pulvérisation.
8. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes dans le tissu pulmonaire, dans laquelle la cyclodextrine est administrée en une quantité efficace pour réduire l'ordre de la membrane dans les cellules.
9. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée par inhalation dans la quantité de 0,1 mg à 30 mg par jour.
10. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée par inhalation dans la quantité de 0,5 mg à 20 mg par jour.
11. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée par inhalation dans la quantité de 1 mg à 10 mg par jour.
12. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de deux ans au maximum par inhalation dans la quantité de 0,1 mg à 0,5 mg par jour.

13. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de deux à six ans par inhalation dans la quantité de 0,5 mg à 1 mg par jour.
- 5 14. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée aux enfants âgés de 6 à 14 ans par inhalation dans la quantité de 1 mg à 2 mg par jour.
- 10 15. La cyclodextrine de l'une des revendications précédentes, dans laquelle la cyclodextrine est administrée de 0,1 mg à 15 mg par jour dans l'asthme léger à modéré induit par un allergène et de 1 mg à 30 mg dans l'asthme grave induit par un allergène.

§

Fig. 1

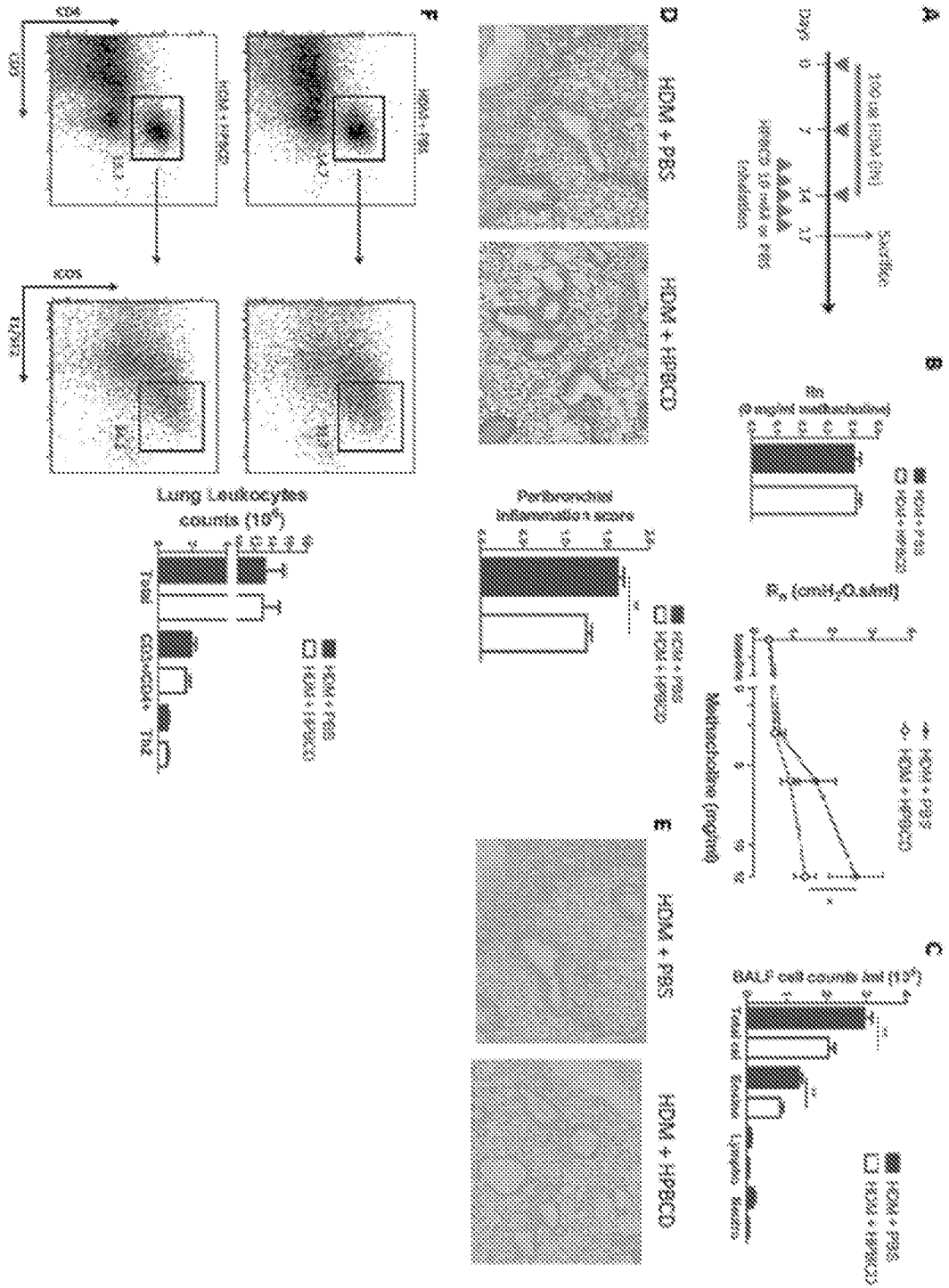


Fig. 2

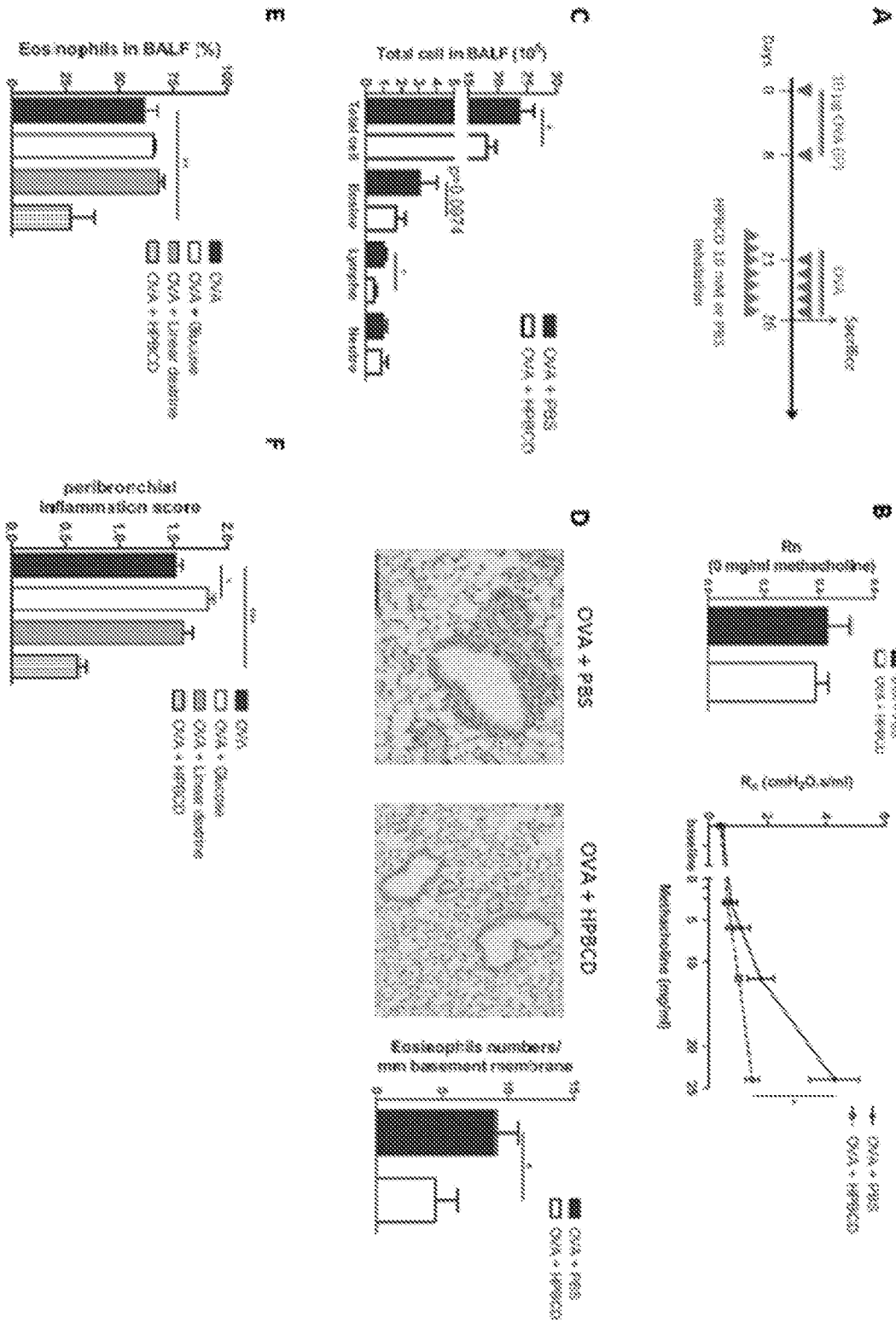


Fig. 3

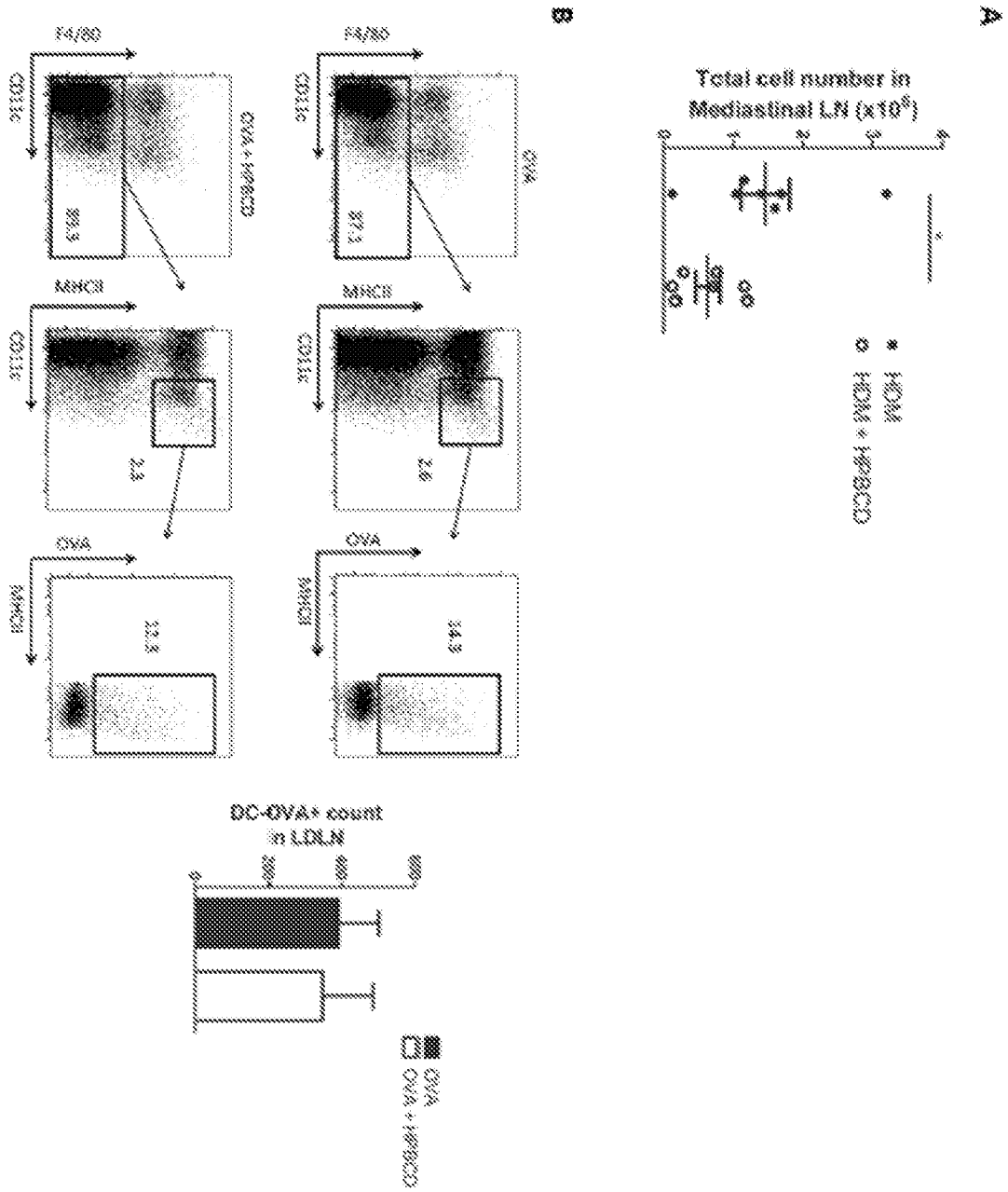


Fig. 4

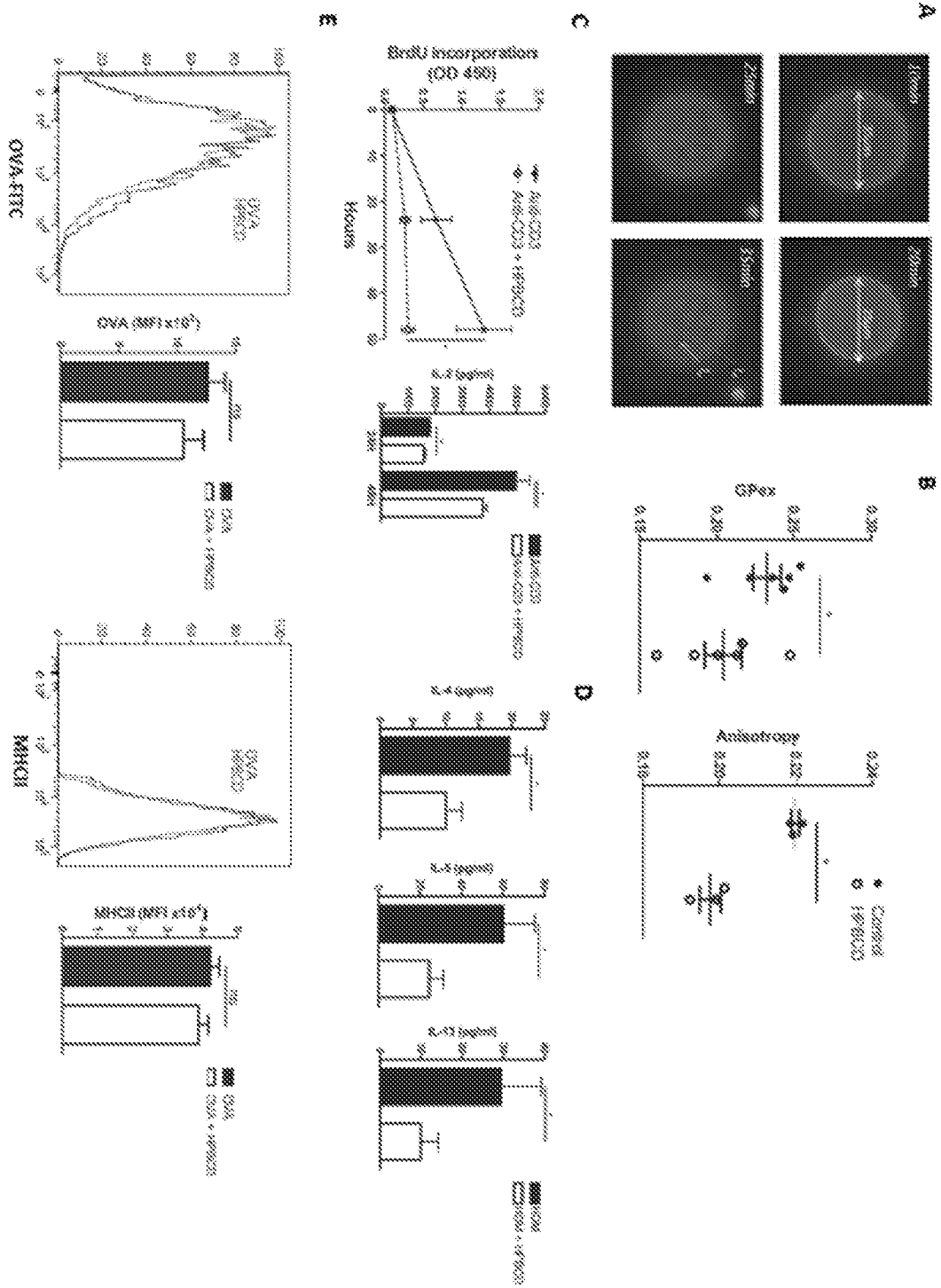
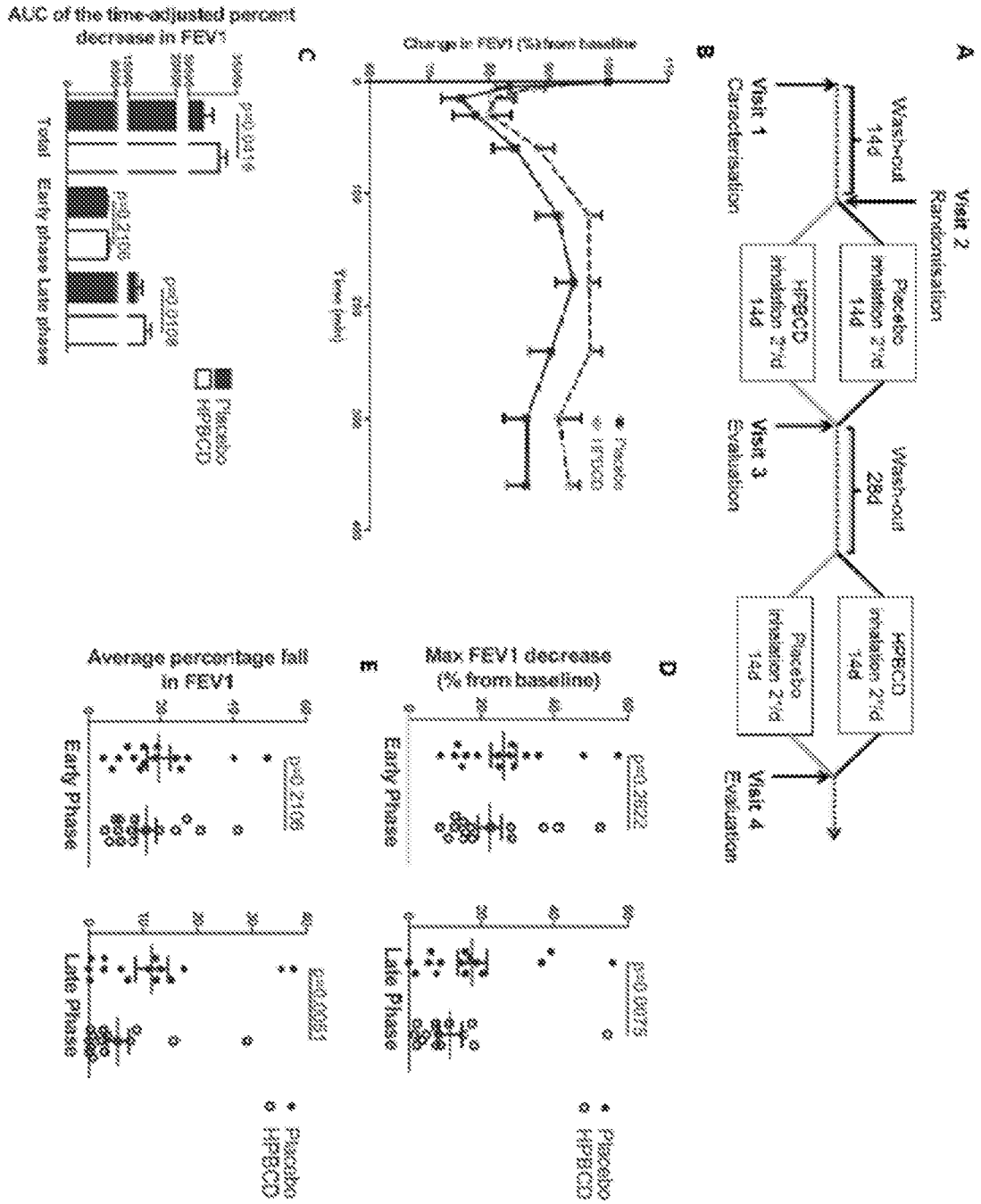


Fig. 5



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE  <b>CD for T-cells</b>
Demande nationale belge n°  <b>202005430</b>	Date du dépôt  <b>15-06-2020</b>
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom)  <b>UNIVERSITE DE LIEGE</b>	
Date de la requête d'une recherche de type international  <b>19-09-2020</b>	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international  <b>SN76916</b>
<b>I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  <b>Voir rapport de recherche</b>	
<b>II. DOMAINES RECHERCHES</b>	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
<b>IPC</b>	<b>Voir rapport de recherche</b>
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
<b>III. <input type="checkbox"/> IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDECTIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE</b> (Observations sur la feuille supplémentaire)	
<b>IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE</b> (Observations sur la feuille supplémentaire)	

# RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202005430

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K31/724 A61K9/00 A61K9/08 A61P11/06 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,D	WO 2006/037769 A1 (UNIV LIEGE [BE]; CATALDO DIDIER [BE] ET AL.) 13 avril 2006 (2006-04-13) cité dans la demande	1-8
Y	* le document en entier *	1-15
X	US 2013/196947 A1 (CATALDO DIDIER [BE] ET AL) 1 août 2013 (2013-08-01)	1-8
Y	* le document en entier *	1-15
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	"&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
"P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée	Date d'expédition du rapport de recherche de type international	
3 mars 2021		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Houyvet-Landriscina	

# RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202005430

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2006037769	A1	13-04-2006	AT 456955 T 15-02-2010
			EP 1655034 A1 10-05-2006
			EP 1799231 A1 27-06-2007
			ES 2340511 T3 04-06-2010
			JP 4989481 B2 01-08-2012
			JP 2008515847 A 15-05-2008
			PL 1799231 T3 30-07-2010
			US 2009012041 A1 08-01-2009
			US 2011028432 A1 03-02-2011
			US 2012295872 A1 22-11-2012
			WO 2006037769 A1 13-04-2006
-----			
US 2013196947	A1	01-08-2013	US 2013196947 A1 01-08-2013
			US 2015258133 A1 17-09-2015
-----			



## OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN76916	Date du dépôt ( <i>jour/mois/année</i> ) 15.06.2020	Date de priorité ( <i>jour/mois/année</i> )	Demande n° BE202005430
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K31/724 A61K9/00 A61K9/08 A61P11/06			
Déposant UNIVERSITE DE LIEGE			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE297A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Houyvet-Landriscina
--	----------------------------------

## OPINION ÉCRITE

Demande n°  
BE202005430

---

### Cadre n° I Base de l'opinion

---

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
  - a. Nature de l'élément:
    - un listage de la ou des séquences
    - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
  - b. Type de support:
    - sur papier
    - sous forme électronique
  - c. Moment du dépôt ou de la remise:
    - contenu(s) dans la demande telle que déposée
    - déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
    - remis ultérieurement
3.  De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

## OPINION ÉCRITE

Demande n°  
BE202005430

---

**Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

---

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	9-15
	Non : Revendications	1-8
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-15
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-15
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

**voir feuille séparée**

---

**Cadre n° VIII Observations relatives à la demande**

---

**voir feuille séparée**

**Ad point V**

**Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 WO 2006/037769 A1, cité dans la demande
- D2 US 2013/196947 A1

A moins qu'il n'en soit indiqué autrement, il est également fait référence aux passages pertinents cités dans le rapport de recherche pour ces documents.

La présente administration considère que l'objet des revendications 1-15 a trait à une méthode de traitement thérapeutique du corps humain. Par conséquent, leur brevetabilité dépend de la manière dont ces revendications sont formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets n'accepte pas de revendications d'utilisation d'une substance ou composition à des fins médicales et ne reconnaît pas non plus comme brevetables des revendications rédigées selon le format dit de type Suisse, pour les demandes ayant une date de priorité ou de dépôt du ou ultérieure au 28.01.2011, lorsque les produits revendiqués sont déjà connus. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ou une utilisation thérapeutique ultérieure, sous la forme : "substance/composition ... pour utilisation dans le traitement de ...", comme c'est le cas ici à la revendication 1. Peuvent être également acceptées des revendications dépendantes sous la forme : "substance/composition .... pour utilisation selon la revendication 1, ladite .....".

V.2.1. La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-8 n'étant pas nouveau.

D1-D2 tous deux décrivent l'utilisation de la cyclodextrine, sous forme de composition aqueuse inhalable, dans le traitement et la prévention des maladies inflammatoires des bronches telles que l'asthme allergique. Les exemples de D1-D2 démontrent que l'hydroxypropyl-beta-cyclodextrine et la 2-O-méthyl-cyclodextrine permettent de réduire l'inflammation, l'hyperactivité, la métacholine et le nombre d'eosinophiles induits par l'allergène ovalbumine, 24 heures après la dernière exposition à l'allergène. D1-D2 ne mentionnent aucunement les termes de phase précoce ou tardive. Cependant, les tests étant effectués 24 heures après la dernière exposition à l'allergène, il est considéré que ce moment correspond à une phase tardive de l'asthme (voir définition donnée dans la

demande en page 7, lignes 14-15). Ainsi, les revendications 1-8 ne sont pas nouvelles au vu de D1-D2.

Les revendications 9-15 apparaissent nouvelles au vu de l'art antérieur.

V.2.2. La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-15 n'impliquant pas d'activité inventive.

L'objet des revendications 9-15 de la demande diffère de l'enseignement de l'art antérieur de part le fait que ce dernier ne divulgue pas les quantités journalières de cyclodextrine à administrer.

Aucun effet technique particulier ne semble être associé à ces doses journalières.

Sans effet technique particulier, le problème peut donc être considéré comme la simple détermination de la dose de cyclodextrine journalière à administrer.

La solution étant donnée dans les revendications 9 à 15.

Cette solution ne peut pas être considérée comme impliquant une activité inventive en l'absence d'avantage technique lié à ces doses. De plus l'homme du métier est en mesure de déterminer la dose optimale de cyclodextrine à administrer par jour aux patients concernés.

Par conséquent, l'objet des revendications 9-15 est considéré comme dépourvu d'activité inventive.

En ce qui concerne l'effet de la cyclodextrine sur la bronchoconstriction en phase tardive de l'asthme allergique, il est déjà connu dans les exemples de D1-D2 comme expliqué plus haut. Par ailleurs, il est observé que les résultats de l'essai clinique de phase 1 présenté dans le tableau 1 de la demande ne démontrent aucun effet significatif de la cyclodextrine HPBCD ni à dose unique comparé au placebo, ni à doses multiples.

### **Ad point VIII**

#### **Certaines observations relatives à la demande**

a) Le terme "dérivé" utilisé à la revendication 1 prive sa portée de clarté puisque l'homme du métier qui lirait le document ne saurait pas reconnaître toutes les structures censées être couvertes par ce terme et possédant l'activité recherchée.

Les termes tels que dérivés et analogues englobent en effet des composés obtenus par réaction chimique à partir d'un autre composé (y compris les composés dont la structure est éloignée de l'élément de départ), les dérivés fonctionnels (tels que les composés

dans lesquels les hétéroatomes sont remplacés par d'autres atomes), les composés comportant de nombreux types de groupes latéraux différents, etc.

Les dérivés de cyclodextrine englobent donc une infinité de composés alors qu'il n'existe pas de définition claire qui permettrait de définir dans quelle mesure les composés selon la revendication 1 peuvent être modifiés, tout en étant encore considérés comme "dérivés". Ceci a donc pour conséquence que l'homme du métier ne peut pas décider clairement quels composés tombent sous la définition de la revendication, alors que seuls les composés définis en page 9, ligne 9 à 11 se fondent sur la description.

En conséquence, l'objet de la revendication 1 ne remplit pas les conditions de clarté.

- b) La dépendance des revendications 4, 13-15 n'est pas correcte.
- c) La revendication 8 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car son objet n'est pas clairement défini. La revendication tente de définir l'objet par le résultat recherché (quantité efficace pour réduire l'ordre de la membrane dans les cellules), ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.