

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 044**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61K 31/57** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

**A61K 31/58** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2020** **PCT/EP2020/056591**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2020** **WO20187679**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2020** **E 20710511 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2023** **EP 3937949**

54 Título: **Fitoecdisonas y sus derivados para su utilización en el tratamiento del deterioro de la función respiratoria**

30 Prioridad:

**15.03.2019 FR 1902727**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.04.2024**

73 Titular/es:

**BIOPHYTIS (50.0%)**  
**14 avenue de l'Opéra**  
**75001 Paris, FR y**  
**SORBONNE UNIVERSITE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LATIL, MATHILDE;**  
**DILDA, PIERRE;**  
**LAFONT, RENÉ y**  
**VEILLET, STANISLAS**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 967 044 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Fitoecdisonas y sus derivados para su utilización en el tratamiento del deterioro de la función respiratoria

Campo técnico de la invención

5 La invención se refiere al uso de fitoecdisonas y derivados semisintéticos de fitoecdisonas para el tratamiento de la función respiratoria deteriorada, particularmente en el contexto de patologías neuromusculares.

Técnica anterior

10 Las enfermedades neuromusculares se caracterizan por una alteración en el funcionamiento de las unidades motoras, compuestas por neuronas motoras, uniones neuromusculares y músculos esqueléticos. Más allá de la alteración de la función motora en los pacientes afectados por estas patologías, muchas enfermedades neuromusculares agudas o progresivas conducen a una disfunción de los músculos respiratorios que, a su vez, puede provocar insuficiencia respiratoria, neumonía y la muerte de los pacientes. De hecho, los trastornos respiratorios representan la principal causa de mortalidad en pacientes con enfermedades neurológicas (Miller et al., 2009).

15 Los pacientes con enfermedades neuromusculares son propensos a desarrollar una función respiratoria deteriorada, que puede ser evidente, con la aparición frecuente de infecciones como neumonía o bronquitis (principalmente por tos ineficaz), sensación de dificultad para respirar, dificultad para expectorar pero, en algunos casos, En algunos casos, las manifestaciones son menos evidentes y los pacientes presentan pérdida de apetito con importante pérdida de peso, dolores de cabeza, sudoración o gran fatiga. Por tanto, es fundamental detectar el compromiso respiratorio lo antes posible.

20 El manejo de los problemas respiratorios en pacientes con patologías neuromusculares ha mejorado considerablemente en los últimos años, permitiendo así aumentar la esperanza de vida de pacientes, como por ejemplo los niños con enfermedad de Duchenne. La monitorización periódica de los parámetros respiratorios se realiza mediante exámenes clínicos, imágenes y espirometría que permiten la exploración funcional respiratoria o mediante gasometría para evaluar la calidad de los intercambios gaseosos (medición de la frecuencia respiratoria de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre arterial). Estas evaluaciones periódicas permiten así detectar las consecuencias de la debilidad muscular y la disfunción pulmonar y, así, adaptar la atención médica de estos pacientes para compensar su deficiente función pulmonar y mejorar su calidad de vida (Birnkran et al., 2007; Finder et al., 2004; McKim et al., 2011). El tratamiento puede llevarse a cabo a varios niveles: puede tener como objetivo mantener la movilidad y la flexibilidad del sistema respiratorio (fisioterapia respiratoria mediante movilización activa o pasiva o para hiperinhalaciones mecánicas) o desobstruir las vías respiratorias para evacuar las secreciones producidas por los bronquios (tos asistida o drenaje bronquial) o, finalmente, cuando la ventilación natural ya no satisface las necesidades del cuerpo, complementar la respiración de los pacientes con ventilación no invasiva o, en los casos más difíciles y más extremos, por ventilación por traqueotomía.

El daño a la corteza, el tronco del encéfalo, de la médula espinal, las neuronas motoras, los nervios periféricos, las uniones neuromusculares o de los músculos pueden provocar una disfunción del sistema respiratorio.

35 Hay muchas causas de enfermedades musculares crónicas que conducen a una disfunción de los músculos respiratorios, incluidas las miopatías (congénitas, hereditarias o adquiridas), las miastenias o las miotonías.

40 Por ejemplo, en la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la insuficiencia respiratoria, que conduce a numerosas complicaciones pulmonares, es la causa de la mayoría de las muertes observadas en pacientes con DMD (Mayer et al., 2015; Vianello et al., 1994; Baydur et al., 1990; Smith et al., 1987; Inkley et al., 1974). La DMD es la distrofia muscular más común. Afecta a uno de cada 3500 niños y es el resultado de mutaciones que afectan el gen de la distrofina, ubicado en el cromosoma X. Una forma menos grave, la distrofia muscular de Becker (BMD), también afecta al gen de la distrofina y afecta a uno de cada 18000 niños. Los niños que tienen DMD generalmente no tienen dificultad para respirar ni toser cuando todavía pueden caminar. A medida que envejecen y la enfermedad afecta sus músculos respiratorios, los niños afectados corren el riesgo de sufrir infecciones respiratorias, a menudo por una tos ineficaz. 45 Las células del músculo liso y, por extensión, los músculos lisos de las vías respiratorias están implicados en numerosas patologías respiratorias.

Además del procedimiento miopático, las anomalías del propio sistema pulmonar (vías respiratorias o pulmones) están fuertemente implicadas en la insuficiencia ventilatoria en pacientes con DMD (Benditt y Boitano, 2013). De hecho, la distensibilidad pulmonar (capacidad del pulmón para modificar su volumen en respuesta a una variación de la presión) se reduce por dos razones principales: la retracción y el colapso de los alvéolos pulmonares (atelectasia) causados por la hipoventilación, pero también la aparición de fibrosis y la obstrucción de las vías respiratorias, lo que resulta en una mayor resistencia de las vías respiratorias (Lo Mauro y Aliverti, 2016).

55 Las propiedades elásticas del pulmón se alteran en pacientes con distrofia muscular, y el pulmón se vuelve menos distensible. La causa de la reducción de la distensibilidad pulmonar en la distrofia muscular aún no se comprende completamente. Sin embargo, se han propuesto diferentes hipótesis para intentar explicar la reducción de la elasticidad de los pulmones: una maduración incompleta del tejido pulmonar en el contexto de una enfermedad congénita, la

atelectasia inducida por hipoventilación, el aumento de la tensión superficial alveolar o una alteración del parénquima pulmonar debido a una fibrosis. Además, uno de los factores importantes que puede explicar esta reducción en la distensibilidad y distensibilidad pulmonar es respirar con un volumen pulmonar bajo, que es una característica de las distrofias musculares (Lo Mauro y Aliverti, 2016). Otro mecanismo implicado es la degradación crónica y progresiva de los músculos respiratorios que limitan, *de facto*, el rango de actividad del pulmón. De hecho, las propiedades elásticas de un sistema están determinadas en parte por las restricciones a las que está sujeto el sistema. La capacidad pulmonar total es el resultado del equilibrio entre la presión de retracción elástica instantánea durante la ventilación y la presión generada por la contracción de los músculos inspiratorios. Esta última se reduce y, en consecuencia, también la capacidad pulmonar total, lo que altera los parámetros espiratorios y provoca una disminución de la distensibilidad pulmonar.

En conclusión, la insuficiencia respiratoria, caracterizada por la incapacidad del sistema respiratorio para proporcionar una oxigenación y eliminación de dióxido de carbono adecuadas, es común en pacientes afectados con DMD.

Por lo tanto, la evaluación de la disfunción del sistema respiratorio en el ratón mdx, el modelo de ratón más utilizado de distrofia muscular de Duchenne, es un parámetro importante a considerar en el establecimiento y la evaluación de soluciones terapéuticas en el contexto de enfermedades neuromusculares.

La evaluación del sistema respiratorio de ratones mdx durante estudios preclínicos presenta ventajas significativas: por un lado, se trata de un déficit clínicamente importante y por otro lado, las mediciones espirométricas o pletismográficas no son invasivas y pueden repetirse de manera longitudinal durante el ensayo y posiblemente llevado a cabo como un criterio de valoración para evaluar la eficacia de diversos tratamientos para la distrofia muscular. Diferentes grupos se han interesado en la función respiratoria en ratones mdx en comparación con ratones control sanos, y han informado alteraciones en la función respiratoria en ratones mdx (Gosselin et al. 2003; Matecki et al. 2003; Mosqueira et al. 2013; Gayraud et al., 2007). Así, con algunas modificaciones sobre la gravedad de las alteraciones y la edad de aparición de estas, todos reportan una alteración de los parámetros respiratorios, en condiciones normóxicas (Huang et al., 2011) o en respuesta a hipercapnia (Gosselin et al. 2003).

El documento RU 2 257 906 describe una composición que comprende la ecdisterona (20hidroxiecdisona) para su utilización en el tratamiento de enfermedades pulmonares y pleurales supurativas.

WU X ET AL: CHINESE PHARMACOLOGICAL BULLETIN, vol. 14, núm. 3, 1998, páginas 256-258 describe el efecto de la ecdisterona sobre la lesión por reperfusión pulmonar en ratas.

WU XU ET AL.:CHINESE JOURNAL OF TRAUMATOLOGY, mayo de 1997 (1997-05), páginas 295-296 describe el efecto de la ecdisterona en la contusión pulmonar debido a un impacto.

#### Presentación de la invención

Los inventores han descubierto que las fitoecdisonas y los derivados semisintéticos de las fitoecdisonas mejoran de manera significativa la función respiratoria de los mamíferos afectados por una enfermedad neuromuscular, limitando la alteración de los parámetros respiratorios en el tiempo, así como mejorando los parámetros mecánicos del sistema respiratorio. Los parámetros respiratorios y los parámetros mecánicos del sistema respiratorio se determinan respectivamente mediante pletismografía de cuerpo entero en animales alertados y mediante ventilador de pistón controlado por una unidad de control central (comúnmente denominada "ordenador") en animales anestesiados, utilizando dicho ventilador la técnica de oscilación forzada como el dispositivo conocido como FlexiVent™. Estos efectos muestran una mejora de la función respiratoria en mamíferos que padecen patologías neuromusculares genéticas o adquiridas. Las fitoecdisonas representan una familia importante de fitoesteroides polihidroxilados estructuralmente relacionados con las hormonas de muda de insectos. Estas moléculas son producidas por muchas especies de plantas y participan en su defensa contra plagas de insectos. La fitoecdisona mayoritaria es la 20-hidroxiecdisona.

Con este fin, la invención se refiere a al menos una fitoecdisona y/o al menos un derivado semisintético de fitoecdisona, para su utilización en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria, tal como se define en la reivindicación 1.

De preferencia, la invención se refiere a una composición que comprende al menos una fitoecdisona y/o al menos un derivado semisintético de fitoecdisona, para su utilización en el tratamiento de la función respiratoria deteriorada, como se define en la reivindicación 1.

En modos de realización particulares, la invención también cumple con las siguientes características, implementadas por separado o en cada una de sus combinaciones técnicamente efectivas.

Las fitoecdisonas y sus derivados se purifican ventajosamente a calidad farmacéutica.

Una fitoecdisona que puede usarse según la invención es, por ejemplo, 20-hidroxiecdisona y un derivado semisintético de fitoecdisona que puede usarse es, por ejemplo, un derivado semisintético de 20-hidroxiecdisona.

Para ello, según un modo de realización particular, la composición comprende 20-hidroxiecdisona y/o al menos un derivado semisintético de la 20-hidroxiecdisona.

Ventajosamente, la 20-hidroxiecdisona y sus derivados se purifican hasta obtener calidad farmacéutica.

- 5 La 20-hidroxiecdisona utilizada se presenta de preferencia en forma de un extracto de plantas ricas en 20-hidroxiecdisona o de una composición que comprende 20-hidroxiecdisona como agente activo. Los extractos de plantas ricas en 20-hidroxiecdisona son, por ejemplo, extractos de *Stemmacantha carthamoides* (también llamado *Leuzea carthamoides*), *Cyanotis arachnoidea* y *Cyanotis vaga*.

Los extractos obtenidos se purifican de preferencia hasta el grado farmacéutico.

- 10 En un modo de realización, la 20-hidroxiecdisona está en forma de un extracto de planta o de una parte de una planta, eligiéndose dicha planta entre plantas que contienen al menos un 0,5 % de 20-hidroxiecdisona en peso seco de dicha planta, comprendiendo dicho extracto al menos un 95 %, y de preferencia al menos 97%, de 20-hidroxiecdisona. El dicho extracto se purifica de preferencia a grado farmacéutico. Dicho extracto se denomina posteriormente BIO101. Es sorprendente que contenga entre un 0 y un 0,05%, en peso seco del extracto, de impurezas, tales como compuestos menores, que puedan afectar a la seguridad, a la disponibilidad o a la eficacia de una aplicación farmacéutica de dicho extracto.

Según una forma de realización de la invención, las impurezas son compuestos con 19 o 21 átomos de carbono, tales como por ejemplo Rubrosterona, la Dihidrorubrosterona o la Poststerona.

La planta a partir de la cual se produce BIO101 se elige de preferencia entre *Stemmacantha carthamoides* (también llamado *Leuzea carthamoides*), *Cyanotis arachnoidea* y *Cyanotis vaga*.

- 20 Los derivados de las fitoecdisonas y en particular de la 20-hidroxiecdisona se obtienen por semisíntesis y pueden obtenerse en particular del modo descrito en la solicitud de patente europea No. . EP 15732785.9.

- 25 Según un modo de realización preferida, la invención se refiere a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria, más particularmente una alteración de la función respiratoria resultante de una patología neuromuscular adquirida o genética, por ejemplo una patología neuromuscular del neuronas motoras y/o la unión neuromuscular y/o el músculo estriado esquelético.

Según un modo de realización particular, la invención se dirige a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria ligada a una alteración del músculo estriado y/o del músculo liso.

- 30 En un modo de realización particular, la invención se dirige a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria causada al menos en parte por una modificación del músculo liso. Según un modo de realización particular, la invención se dirige a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria ligada a la hiperreactividad bronquial.

- 35 En un modo de realización, la invención se dirige a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria en la que la hiperreactividad bronquial está asociada con la función del músculo liso bronquial.

En un modo de realización, la invención se dirige a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria ligada a una afección de al menos uno de los parámetros respiratorios elegidos entre el valor de Penh, el pico máximo de inspiración, el pico máximo de espiración, tiempo de relajación y frecuencia respiratoria. La composición reducirá ventajosamente la afección de estos parámetros respiratorios.

- 40 En un modo de realización, la invención se dirige a la composición que comprende para su utilización en mamíferos el tratamiento de una alteración de la función respiratoria ligada a una afección de al menos uno de los parámetros mecánicos del tejido pulmonar. Dichos parámetros mecánicos del tejido pulmonar son elastancia, distensibilidad y resistencia pulmonar.

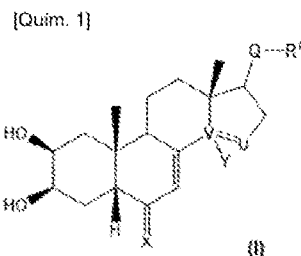
- 45 En un modo de realización particular, la invención se refiere a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria ligada a una reducción de la distensibilidad pulmonar y/o un aumento de la resistencia pulmonar y/o una disminución de la elastancia pulmonar.

En un modo de realización particular, la invención se refiere a la composición para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una patología en la que la alteración de la función respiratoria está ligada a la retracción y colapso de los alvéolos pulmonares y/o a la aparición de fibrosis.

- 50 En un modo de realización particular, las fitoecdisonas se administran a una dosis comprendida entre 3 y 15 miligramos por kilogramo por día en humanos. Por fitoecdisona se entiende aquí tanto las fitoecdisonas en general como sus derivados, así como la 20-hidroxiecdisona (en particular en forma de extracto) y sus derivados.

De preferencia, las fitoecdisonas se administran a una dosis de 200 a 1000 mg/día, en una o más dosis, en un ser humano adulto, y a una dosis de 5 a 350 mg/día, en una o más dosis, en un ser humano, niño o lactante. Por fitoecdisona se entiende aquí tanto las fitoecdisonas en general como sus derivados, así como la 20-hidroxiecdisona (en particular en forma de extracto) y sus derivados.

- 5 En modos de realización, la composición comprende al menos un compuesto considerado como un derivado de fitoecdisona, siendo dicho al menos un compuesto de fórmula general (I):



en la que:

V-U es un enlace simple carbono-carbono y Y es un grupo hidroxilo:

- 10 X es un oxígeno,

Q es un grupo carbonilo;

R<sup>1</sup> se elige entre: un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)A, A representa un heterociclo opcionalmente sustituido por un grupo de tipo OH, OMe, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo CH<sub>2</sub>Br;

- 15 W, siendo un heteroátomo elegido entre N, O y S, de preferencia O y aún más de preferencia S.

En el contexto de la presente invención nos referimos a "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)", cualquier grupo alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, lineal o ramificado, en particular, los grupos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo. Ventajosamente se trata de un grupo metilo, etilo, isopropilo o t-butilo, en particular un grupo metilo o etilo, más particularmente un grupo metilo.

- 20 En un modo de realización preferida, en la fórmula (I):

Y es un grupo hidroxilo;

R<sup>1</sup> se elige entre: un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)A, A representa un heterociclo opcionalmente sustituido por un grupo de tipo OH, OMe, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

- 25 W, siendo un heteroátomo elegido entre N, O y S, de preferencia O y más de preferencia S.

En modos de realización, la composición comprende al menos un compuesto elegido entre los siguientes compuestos:

No. 1: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-17-(2-morfolinoacetil)-2,3,4,5,9,11, 12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona,

- 30 No. 2: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(3-hidroxipirrolidin-1-il)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;

No. 3: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(4-hidroxi-1-piperidil)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;

No. 4: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperidil]acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;

- 35 No. 5: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-17-[2-(3-dimetilaminopropil (metil)amino)acetil]-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;

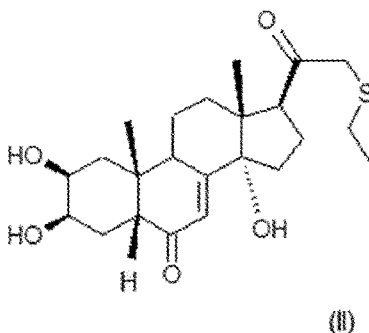
No. 6: 2-[2-oxo-2-[(2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-6-oxo-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]etil]sulfanilacetato de etilo;

No. 7: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-17-(2-etilsulfanilacetil)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;

No. 8: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(2-hidroxi-etilsulfanil)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona.

- 5 En modos de realización, la composición comprende al menos un compuesto considerado como un derivado de fitoecdisona, teniendo dicho al menos un compuesto la fórmula general (II):

[Quím. 2]



El compuesto de fórmula (II) se denomina posteriormente BIO103.

- 10 En modos de realización, la composición se incorpora a una formulación farmacéutica aceptable capaz de administrarse por vía oral.

En el contexto de la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aquello que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y que es aceptable para uso farmacéutico tanto veterinario como humano.

Breve descripción de las figuras.

- 15 La invención se comprenderá mejor con la lectura de la siguiente descripción, dada a título de ejemplo no limitativo, y realizada con referencia a las figuras que representan:

La Figura 1A representa la curva del valor de Penh antes del inicio del estudio, de ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos) y ratones mdx (n=23, cuadrados blancos) antes de recibir el tratamiento (D0: día cero), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*\*p<0,001 y \*\*\*p<0,0001. En el resto de la descripción, n corresponde al tamaño de la muestra y p corresponde al "valor p" utilizado para cuantificar la significancia estadística de un resultado con \*: p<0,05; \*\*: p<0,001; \*\*\*p<0,0001 y ns: no significativo.

La Figura 1B representa la curva del pico máximo de inspiración antes del inicio del estudio, de ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos) y ratones mdx (n=23, cuadrados blancos) antes de recibir el tratamiento (D0: día cero), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*p<0,05, \*\*p<0,001;

25 La Figura 1C representa la curva de la espiración máxima máxima antes del inicio del estudio, de ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos) y ratones mdx (n=23, cuadrados blancos) antes de recibir el tratamiento (D0: día cero), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*\*p<0,001;

La Figura 1D representa la curva del tiempo de relajación antes del inicio del estudio, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos) y ratones mdx (n=23, cuadrados blancos) antes de recibir el tratamiento (D0: día cero), medido mediante pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*\*p<0,001 y \*\*\*p<0,0001;

La Figura 1E representa la curva de frecuencia respiratoria antes del inicio del estudio, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos) y ratones mdx (n=23, cuadrados blancos) antes de recibir el tratamiento (D0: día cero), medida mediante pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*p<0,05 y \*\*\*p<0,0001;

35 La Figura 2A representa la curva del valor de Penh antes del inicio del estudio (D0), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con \*\*p<0,001 y \*\*\*p<0,0001, después de la aleatorización de los animales en los tres grupos diferentes: ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), ratones mdx que no recibirán tratamiento (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y ratones mdx que serán tratados con BIO101 (n= 12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101");

40 La Figura 2B representa la curva del pico máximo de inspiración antes del inicio del estudio (D0), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina, después de la aleatorización de los animales en los

tres grupos diferentes: ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos), ratones mdx que no recibirán tratamiento (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y ratones mdx que serán tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx" mdx BIO101"); La Figura 2C representa la curva del pico máximo de espiración antes del inicio del estudio (D0), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina, después de la aleatorización de los animales en los tres grupos diferentes: ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos), ratones mdx que no recibirán tratamiento (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y ratones mdx que serán tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx" mdx BIO101");

La Figura 2D representa la curva del tiempo de relajación antes del inicio del estudio (D0), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina, después de la aleatorización de los animales en los tres grupos diferentes: ratones control sanos C57Black10 (n= 12, círculos blancos), ratones mdx que no recibirán tratamiento (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y ratones mdx que serán tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101") ;

La Figura 2E representa la curva de frecuencia respiratoria antes del inicio del estudio (D0), medida por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina, después de la aleatorización de los animales en los tres grupos diferentes: ratones control sanos C57Black10 (n=12, círculos blancos), ratones mdx que no recibirán tratamiento (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y ratones mdx que serán tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101");

La Figura 3A representa la curva del valor de Penh después de 30 días de tratamiento, de ratones control C57Black10 sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{**}p<0,001$ ;

La Figura 3B representa la curva del pico máximo de inspiración después de 30 días de tratamiento, de ratones C57Black10 control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y mdx ratones tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medidos por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{*}p<0,05$ ,  $^{**}p<0,001$ ;

La Figura 3C representa la curva del pico máximo de espiración después de 30 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y mdx ratones tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{*}p<0,05$ ;

La Figura 3D representa la curva del tiempo de relajación después de 30 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{*}p<0,05$ ;

La Figura 3E representa la curva de la frecuencia respiratoria después de 30 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina;

La Figura 4A representa la curva del valor de Penh después de 60 días de tratamiento, de ratones control C57Black10 sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{***}p<0,0001$ ;

La Figura 4B representa la curva del pico máximo de inspiración después de 60 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y mdx. ratones tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medidos por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina con  $^{*}p<0,05$ ;

La Figura 4C representa la curva del pico máximo de espiración después de 60 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y mdx ratones tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medidos mediante pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina;

La Figura 4D representa la curva del tiempo de relajación después de 60 días de tratamiento, de ratones control C57Black10 sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo "mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido mediante pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina;

La Figura 4E representa la curva de la frecuencia respiratoria después de 60 días de tratamiento, de ratones C57Black10 de control sanos (n=12, círculos blancos), de ratones mdx no tratados (n=11, cuadrados blancos, grupo

"mdx") y de ratones mdx tratados con BIO101 (n=12, cuadrados negros, grupo "mdx BIO101"), medido por pletismografía, en respuesta a dosis crecientes de metacolina;

La Figura 5A representa la curva de la evolución del valor de Penh medido por pletismografía, de ratones C57Black10 sanos al inicio del estudio (n=12, círculos negros, D0) y al final del estudio (n=12, círculos blancos, D60), sometido a dosis crecientes de metacolina;

La Figura 5B representa la curva de la evolución del valor de Penh medido por pletismografía, de ratones mdx no tratados al inicio del estudio (n=23, círculos negros, D0) y al final del estudio (n= 12, círculos blancos, D60), sometido a dosis crecientes de metacolina con \*\*\*p<0,0001;

La Figura 6A representa los valores de Penh al inicio del estudio (D0) de ratones C57Black10 sanos (n=12) y ratones mdx no tratados (n=23) medidos mediante pletismografía a una dosis de metacolina de 40 mg/ml con \*\* \*p<0,0001;

La Figura 6B representa los valores de Penh después de 60 días de estudio (D60) de ratones C57Black10 sanos (n=12), ratones mdx no tratados (n=12) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=12) medidos mediante pletismografía a una dosis de metacolina de 40 mg/ml con \*\*\*p<0,0001;

La Figura 7A representa la evolución de la resistencia pulmonar medida por ventilador de pistón (FlexiVent™) a dosis crecientes de metacolina, en ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) con \*\*p<0,001 y \*\* \*p<0,0001;

La Figura 7B representa la evolución de la distensibilidad pulmonar medida por ventilador de pistón a dosis crecientes de metacolina, en ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) con \*\* \*p<0,0001;

La Figura 7C representa la evolución de la elastancia pulmonar medida por ventilador de pistón a dosis crecientes de metacolina, en ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) con \*\* \*p<0,0001;

La Figura 8A representa los valores de resistencia pulmonar después de 60 días de estudio de ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) medidos por el ventilador de pistón a una dosis de metacolina de 20 mg/ml con \*\*\*p<0,0001;

La Figura 8B representa los valores de distensibilidad pulmonar después de 60 días de estudio de ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) medidos por el ventilador de pistón a una dosis de metacolina de 20 mg/ml con \*\*\*p<0,0001;

La Figura 8C representa los valores de elastancia pulmonar después de 60 días de estudio de ratones C57Black10 sanos (n=10), ratones mdx no tratados (n=10) y ratones mdx tratados con BIO101 (n=10) medidos por un ventilador de pistón a una dosis de metacolina de 20 mg/ml con \*p<0,05 y \*\*p<0,001.

#### Descripción de modos de realización

La invención se describirá a continuación en el contexto particular de algunos de sus campos de aplicación preferidos, sin limitación.

#### 1. Procedimiento de purificación BIO101

BIO101 se prepara a partir de aproximadamente un 90 % de 20-hidroxiecdisona pura, siguiendo las siguientes etapas:

i) disolución en caliente de 20-hidroxiecdisona pura a aproximadamente el 90% en metanol, filtración y concentración parcial,

ii) adición de 3 volúmenes de acetona,

iii) enfriar a una temperatura comprendida entre 0 y 5°C, con agitación,

iv) filtración del precipitado obtenido,

v) enjuagues sucesivos con acetona y agua, y

vi) secado.

Esta purificación implica un procedimiento de recristalización adecuado a esta molécula y susceptible de realizarse a escala industrial.

La filtración de la etapa i) se lleva a cabo utilizando un filtro de partículas de 0,2 µm.

La concentración parcial de la etapa i) se lleva a cabo ventajosamente por destilación al vacío, a una temperatura de alrededor de 50°C, en presencia de MeOH.

La etapa de secado vi) se lleva a cabo al vacío a una temperatura de aproximadamente 50°C.

## 2. Actividad biológica de BIO101

5 Se utilizaron ratones macho C57BL/10ScSnJ (ratones sanos denominados "C57Black10" en las figuras) y C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (modelo de ratón con distrofia muscular de Duchenne, denominado "mdx" en las figuras) de doce semanas de edad. Los ratones se dividieron en tres grupos de 12 ratones cada uno: un grupo de ratones C57Black10 de control sanos no tratados, un grupo de ratones mdx (mdx) no tratados y un grupo de ratones tratados con una dosis de 50 mg/kg/día por vía oral, de manera crónica, en el agua potable.

10 La función respiratoria de todos los ratones se evaluó mediante pletismografía de cuerpo entero antes del inicio del estudio, (D0), luego 30 días (D30) y 60 días (D60) después del inicio del tratamiento. Después de dos meses de tratamiento, la función respiratoria fue evaluada de forma invasiva, justo antes del sacrificio del animal, mediante un ventilador de pistón controlado por una unidad de control central (comúnmente llamada "ordenador"), utilizando dicho ventilador la técnica de oscilación forzada como el dispositivo conocido como FlexiVent™, con el fin de determinar más  
15 directamente los parámetros mecánicos del sistema respiratorio.

### a. Análisis por pletismografía de los efectos del BIO101 sobre la función respiratoria

Para controlar con precisión el cambio en la función respiratoria durante el tratamiento, se llevaron a cabo análisis de pletismografía de cuerpo entero (Emka Technologies, París, Francia) en ratones C57Black10 de control sanos, en  
20 ratones mdx no tratados y en ratones mdx tratados con BIO101. Las ventajas de esta técnica residen en que permite el seguimiento de un animal alerta, libre de moverse en un recinto hermético, de forma no invasiva. Por lo tanto, se reduce el estrés debido al manejo de los animales y es posible repetir las mediciones durante períodos prolongados. Por lo tanto, la pletismografía barométrica se utiliza ampliamente para medir la reactividad bronquial en animales pequeños (Chong et al., 1998; Djuric et al., 1998; Hoffman et al., 1999).

25 Las variaciones de presión medidas con respecto a una cámara de referencia permiten definir diferentes parámetros respiratorios como los picos y tiempos de presión inspiratoria y espiratoria así como una cantidad sin unidad denominada Penh (*Pausa mejorada*) que permite evaluar la broncoconstricción. En efecto, el valor del Penh, calculado a partir de la señal de presión en la cámara (Pb), es un índice importante a obtener, porque las variaciones del Penh evolucionan en paralelo con las de la resistencia respiratoria y, por tanto, representa un parámetro predictivo de  
30 cambios en las propiedades resistivas del sistema respiratorio (Hamelmann et al., 1997; Berggren, 2001; Onclinx et al., 2003). Se calcularon los siguientes valores a partir del Pb filtrado: el cambio máximo en Pb durante la espiración (PEP: *Peak expiratory Pressure*), el cambio máximo en Pb durante la inspiración (PIP: *Peak Inspiratory Pressure*) y el intervalo de tiempo (TR). Luego, el Penh se calculó de la siguiente manera:

$$[\text{Mat. 1}] \text{ (PIP/PEP)} \times \text{Pausa}$$

o

$$35 \quad [\text{Mat. 2}] \text{ Pausa} \approx (\text{TE}-\text{TR}) / \text{TE}$$

siendo TE el tiempo espiratorio (Adler et al., 2004).

Además, también se midieron y representaron el pico máximo de inspiración y el pico máximo de espiración (PIF: *Peak Inspiratory Flow* y PEF: *Peak Expiratory Flow*), el tiempo de relajación (RT) y la frecuencia respiratoria (BF).

40 El valor de Penh se midió antes del inicio del tratamiento (D0), 30 días después del inicio del tratamiento (D30) y 60 días después del tratamiento (D60).

En primer lugar, se comparó toda la cohorte de ratones mdx (n=24) con ratones C57Black10 sanos (n=12), antes de recibir el tratamiento. Se expusieron ratones vigilantes a dosis crecientes de aerosoles de metacolina generados por nebulizador que contenían de 0 a 40 mg/ml de metacolina en PBS. Como era de esperar y ya demostrado, los ratones mdx presentan una alteración de su función respiratoria (Huang et al., 2011; Gosselin et al., 2003; Gayraud et al.,  
45 2007; Ishizaki et al., 2008) con un aumento significativo de Penh en respuesta a metacolina ( $p<0,001$  y  $p<0,0001$ ) (Figura 1A) asociado con un pico de inspiración y un pico de espiración de manera significativa más bajos ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ ) (Figuras 1B y 1C) en comparación con ratones sanos, particularmente antes o con dosis bajas de broncoconstrictor. El tiempo de relajación (RT) también es muy de manera significativa mayor en los ratones mdx en comparación con los ratones control ( $p<0,001$  y  $p<0,0001$ ) (Figura 1D). Los valores del tiempo inspiratorio (TI) y el  
50 tiempo espiratorio (TE) se mantuvieron comparables entre los grupos en cada momento de medición (datos no mostrados). La frecuencia respiratoria de los ratones mdx también se reduce en comparación con los ratones sanos ( $p<0,05$  y  $p<0,0001$ ) (Figura 1E).

Luego, los ratones mdx se dividieron en dos grupos diferentes: los ratones mdx que no recibirán ningún tratamiento (cuadrados blancos) y los ratones mdx que recibirán la molécula BIO101 (cuadrados negros). Como se muestra en el Figura 2A, 2B, 2C, 2D y 2E, estos dos grupos presentan las mismas capacidades de su función respiratoria sin diferencia significativa entre los diferentes parámetros respiratorios medidos, lo que demuestra que antes del tratamiento, todos los ratones mdx no tratados tienen el mismo perfil respiratorio.

Después de 30 días de tratamiento, los ratones mdx tratados con BIO101 muestran una disminución significativa en Penh ( $p<0,001$ ) en comparación con los ratones mdx en D0, con una curva de Penh en respuesta a la metacolina comparable a la de los ratones sanos C57Black10 (Figura 3A). La disminución de Penh se asocia con un aumento en el pico máximo de inspiración, particularmente en estado estacionario o con dosis bajas de metacolina ( $p<0,05$ ) (Figura 3C). Además, observamos una clara mejora en el tiempo de relajación en ratones mdx tratados con BIO101 en comparación con ratones mdx no tratados ( $p<0,05$ ) (Figura 3D). Por otro lado, el pico máximo de inspiración y la frecuencia respiratoria se mantienen sin cambios respecto a los medidos en D0 (Figuras 3B Y 3E).

Después de 60 días de tratamiento, BIO101 mantuvo su efecto beneficioso sobre las funciones respiratorias de los ratones mdx. De hecho, los resultados confirman lo observado tras 30 días de tratamiento. Los ratones mdx tratados con BIO101 muestran una disminución significativa en el valor de Penh en comparación con los ratones mdx no tratados ( $p<0,0001$ ) y el perfil de variaciones en el valor de Penh es similar al de los controles, independientemente de la dosis de metacolina (Figura 4A). Se observa una mejora significativa en el pico máximo de inspiración ( $p<0,05$ ) junto con una tendencia a la mejora en el tiempo de relajación (Figuras 4B Y 4D). Por otro lado, el pico máximo de espiración y la frecuencia respiratoria se mantienen sin cambios (Figuras 4B Y 4E).

Para evaluar longitudinalmente la alteración de la función respiratoria en ratones mdx, se comparó la variación en el valor de Penh entre D0 y D60 en ratones control sanos, así como entre D0 y D60 en ratones mdx no tratados. Como se esperaba, Penh no cambió entre D0 y D60 en ratones control ( $p=ns$ ) (Figura 5A). Por otro lado, la función respiratoria se deterioró de manera significativa en ratones mdx en D60 en comparación con D0, como lo demuestra el aumento de Penh en respuesta a la metacolina ( $p<0,0001$ ) (Figura 5B).

Con una dosis de metacolina de 40 mg/ml, el valor promedio de Penh en ratones de control sanos ( $n=12$ ) es de manera significativa menor que el encontrado en ratones mdx ( $n=23$ ) antes del tratamiento (respectivamente Penh=0,72 y 1,42 con  $p<0,0001$ ) (Figura 6A). En D60, este valor de Penh aumenta aún más en ratones mdx no tratados ( $n=12$ ) en comparación con los ratones de control sanos ( $n=12$ ) con valores respectivamente de 4 y 1,04 ( $p<0,0001$ ) (Figura 6B). De manera interesante, el tratamiento con BIO101 reduce de manera significativa este valor, con un valor de Penh igual a 1,87 ( $p<0,0001$ ) en comparación con los ratones mdx no tratados (Figura 6B). El tratamiento reduce el valor de Penh de los ratones mdx a un nivel no de manera significativa diferente del de los ratones sanos (Penh = 1,04 en ratones C57Black10 versus 1,87 en ratones mdx con  $p<0,05$ ).

#### *b. Análisis del ventilador de pistón de los efectos del BIO101 sobre la resistencia, distensibilidad y elastancia pulmonares.*

Para determinar más directamente los parámetros mecánicos del sistema respiratorio y el impacto del tratamiento crónico durante dos meses con BIO101 (D60) sobre estos parámetros, se midió la resistencia pulmonar dinámica utilizando un sistema de ventilador con pistón como se describió anteriormente, en respuesta dosis creciente de metacolina.

Los ratones fueron anestesiados y conectados mediante una cánula endotraqueal al sistema de ventilación de pistón. Después del inicio de la ventilación mecánica, cada ratón recibió una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de solución de bromuro de rocuronio de 10 mg/ml. El animal fue ventilado a una frecuencia respiratoria de 150 respiraciones/minuto y con un volumen corriente de 10 ml/kg frente a una presión espiratoria final positiva de 3 cm H<sub>2</sub>O. Los mecanismos respiratorios se evaluaron mediante una maniobra de oscilación forzada de 1,2 segundos (2,5 Hz) y una maniobra de oscilación forzada de banda ancha de 3 segundos que contenía 13 frecuencias primordiales entre 1 y 20,5 Hz. La resistencia del sistema respiratorio (R) se calculó utilizando una unidad central de procesamiento de tipo microordenador conectada al sistema de ventilación de pistón y que incluye en particular un software configurado para realizar dicho cálculo. Las dos maniobras se realizan cada 15 segundos alternativamente después de cada nebulización con un aerosol de metacolina para medir la evolución en el tiempo y la respuesta de la broncoconstricción inducida por la metacolina. De este modo se pudieron determinar la resistencia, la distensibilidad y la elastancia pulmonar.

En línea con los resultados obtenidos en pletismografía, se observa que los ratones mdx no tratados tienen mayor resistencia de las vías respiratorias que los ratones sanos C57Black10 ( $p<0,001$ ) (Figura 7A). Después de 60 días de tratamiento, en respuesta a dosis crecientes de metacolina de 0 a 20 mg/ml, los ratones mdx tratados con BIO101 exhiben una resistencia de las vías respiratorias de manera significativa menor que los ratones mdx no tratados ( $p<0,0001$ ), comparable al nivel de resistencia pulmonar observado en ratones de control sanos (Figura 8A). Asimismo, el tratamiento crónico durante dos meses con BIO101 mejora de manera significativa la distensibilidad pulmonar ( $p<0,0001$ ) y la elastancia ( $p<0,0001$ ), dos parámetros que están alterados en ratones mdx (Figuras 7B y 7C). De hecho, con la dosis más alta de metacolina probada (20 mg/ml), los ratones mdx exhiben una distensibilidad pulmonar de manera significativa reducida en comparación con los ratones C57Black10 de control (respectivamente 0,017

ml/cmH<sub>2</sub>O y 0,031 ml/cmH<sub>2</sub>O con  $p < 0,0001$ ). Este defecto de distensibilidad pulmonar se corrige de manera significativa con el tratamiento con BIO101 de ratones mdx (0,029 ml/cmH<sub>2</sub>O con  $p < 0,0001$ ) (Figura 8B). De manera similar, la elastancia pulmonar se reduce considerablemente en ratones mdx en comparación con los ratones control C57Black10 (34,8 cmH<sub>2</sub>O/ml versus 62,8 cmH<sub>2</sub>O/ml, con  $p < 0,05$ ) y el tratamiento con BIO101 permite mantener una elastancia pulmonar similar a la de los ratones control sanos y de manera significativa mayor que la de los ratones mdx no tratados (34,8 cmH<sub>2</sub>O/ml versus 69,1 cmH<sub>2</sub>O/ml con  $p < 0,001$ ) (Figura 8C).

### 3. Conclusión

Estos resultados demuestran que el tratamiento con BIO101 (50 mg/kg por día en agua potable) mejora la función respiratoria de ratones mdx (un modelo animal de distrofia muscular de Duchenne) de manera sostenida en el tiempo. Este efecto sobre la función respiratoria se asocia no sólo con los parámetros respiratorios (duración y frecuencia inspiratoria y espiratoria), como lo demuestran los resultados de la pletismografía y, en particular, las mediciones de Penh, sino que también demuestra una mejora en la estructura de la respiración profunda demostrada por experimentos utilizando el sistema de ventilación de pistón. De hecho, los datos de este sistema demuestran de manera significativa los efectos beneficiosos del tratamiento con BIO101 sobre los parámetros mecánicos respiratorios de resistencia, distensibilidad y elastancia pulmonar en ratones mdx. Estas observaciones son consecuencia de la protección del tratamiento con fitoecdisonas, en particular BIO101, frente al deterioro de las funciones pulmonares con el tiempo, en un modelo murino de patología neuromuscular.

De manera más general, cabe señalar que los modos de realización y de realización de la invención considerados anteriormente se han descrito a modo de ejemplos no limitativos y que, por lo tanto, son posibles otras variantes.

### Referencias bibliográficas

Adler A, Cieslewicz G, Irvin CG. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/6 mice. *J. Appl. Physiol.* (1985). (2004); 97(1):286-92.

Baydur A, Gilgoff I, Prentice W, Carlson M, Fischer DA. Decline in respiratory function and experience with long-term assisted ventilation in advanced Duchenne's muscular dystrophy. *Chest* (1990); 97:884-9.

Benditt JO and Boitano LJ. Pulmonary Issues in Patients with Chronic Neuromuscular Disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2013); 187 (10):1046-55. Bergren DR. Chronic tobacco smoke exposure increases airway sensitivity to capsaicin in awake guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* (2001); 90:695-704.

Birnkrant DJ, Panitch HB, Benditt JO, Boitano LJ, Carter ER, et al. American College of Chest Physicians consensus statement on the respiratory and related management of patients with Duchenne muscular dystrophy undergoing anesthesia or sedation. *Chest* (2007); 132:1977-86.

Chong BT, Agrawal DK, Romero FA, Townley RG. Measurement of bronchoconstriction using whole-body plethysmograph: comparison of freely moving versus restrained guinea pigs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* (1998); 39:163-8.

Djuric VJ, Cox G, Overstreet DH, Smith I, Dragomir A, Steiner M. Genetically transmitted cholinergic hyperresponsiveness predisposes to experimental asthma. *Brain Behav. Immun.* (1998); 12:272-84.

Finder JD, Birnkrant D, Carl J, Farber HJ, Gozal D, et al. American Thoracic Society. Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2004); 170:456-65.

Gayraud J, Matecki S, Hnia K, Mornet D, Prefaut C, et al. Ventilation during airbreathing and in response to hypercapnia in 5 and 16 month-old mdx and C57 mice. *J. Muscle Res. Cell Motil.* (2007); 28(1):29-37.

Gosselin LE, Barkley JE, Spencer MJ, McCormick KM, Farkas GA. Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumor necrosis factor- $\alpha$  deletion. *Muscle Nerve* (2003); 28:336-43.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1997); 156:766-75.

Hoffman AM, Dhupa N, Cimetti L. Airway reactivity measured by barometric whole-body plethysmography in healthy cats. *Am. J. Vet. Res.*, (1999); 60:1487-92.

Huang P, Cheng G, Lu H, Aronica M, Ransohoff RM, Zhou L. Impaired respiratory function in mdx and mdx/utrn(+/-) mice. *Muscle Nerve* (2011); 43(2):263-7.

Inkley SR, Oldenburg FC, Vignos PJ Jr. Pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy related to stage of disease. *Am. J. Med.* (1974); 56:297-306.

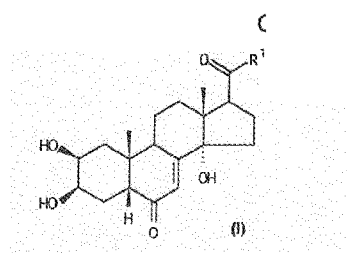
- Ishizaki M, Suga T, Kimura E, Shiota T, Kawano R, et al. Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul. Disord.* (2008); 18(4):342-8.
- Lo Mauro A and Aliverti A. Physiology of respiratory disturbances in muscular dystrophies. *Breathe* (2016); 12(4):318-27.
- 5 Matecki S, Rivier F, Hugon G, Koechlin C, et al. The effect of respiratory muscle training with CO2 breathing on cellular adaptation of mdx mouse diaphragm. *Neuromuscul. Disord.* (2005); 15:427-36.
- Mayer OH, Finkel RS, Rummey C, Benton MJ, Glanzman AM, et al. Characterization of Pulmonary Function in Duchenne Muscular Dystrophy, *Pediatr. Pulmonol.* (2015); 50:487-94.
- 10 McKim DA, Road J, Avendano M, Abdool S, Cote F, et al. Canadian Thoracic Society Home Mechanical Ventilation Committee. Home mechanical ventilation: a Canadian Thoracic Society clinical practice guideline. *Can. Respir. J.* (2011); 18:197-215.
- 15 Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forshew D, et al. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* (2009); 73:1218-26.
- Mosqueira M, Baby SM, Lahiri S, Khurana TS. Ventilatory chemosensory drive is blunted in the mdx mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). *PLoS One.* (2013); 8(7):e69567
- 20 Onclinx C. Relation entre la résistance pulmonaire totale et la Penh en fonction de la localisation anatomique de l'obstruction des voies aériennes (mémoire-diplôme d'étude approfondie). Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire: Liège, (2003), 24p.
- Smith PE, Calverley PM, Edwards RH, Evans GA, Campbell EJ. Practical problems in the respiratory care of patients with muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* (1987); 316:1197-205.
- Vianello A, Bevilacqua M, Salvador V, Cardaioli C, Vincenti E. Long-term nasal intermittent positive pressure ventilation in advanced Duchenne's muscular dystrophy. *Chest* (1994); 105:445-8.

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos una fitoecdisona y/o al menos un derivado semisintético de fitoecdisona para su utilización en mamíferos en el tratamiento de una alteración de la función respiratoria resultante de una patología neuromuscular adquirida o genética, o una alteración de la función respiratoria ligada a una hiperreactividad bronquial, eligiéndose dicho al menos un derivado semisintético de fitoecdisona entre:

- un compuesto de fórmula general (I):

[Quím. 1]



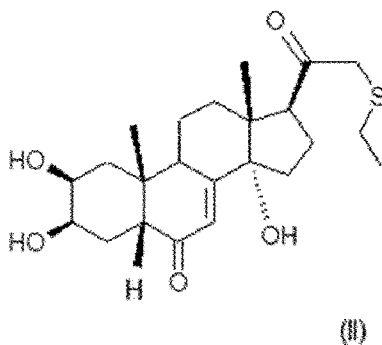
en la que:

- 10 R<sup>1</sup> se elige entre: un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ; un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ; un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)W(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ; un grupo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)A, A representando un heterociclo opcionalmente sustituido por un grupo de tipo OH, OMe, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ; un grupo CH<sub>2</sub>Br;

W, siendo un heteroátomo elegido entre N, O y S, de preferencia O y aún más de preferencia S.

- el compuesto de fórmula (II):

[Quím. 2]



- 15 2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, que comprende 20-hidroxiecdisona.

3. Composición para su utilización según la reivindicación 2, en la que la 20-hidroxiecdisona está en forma de extracto de planta o parte de una planta, eligiéndose dicha planta entre vegetales que contienen al menos un 0,5% de 20-hidroxiecdisona en peso seco de dicho vegetal, comprendiendo dicho extracto al menos 95%, y de preferencia al menos 97%, de 20-hidroxiecdisona.

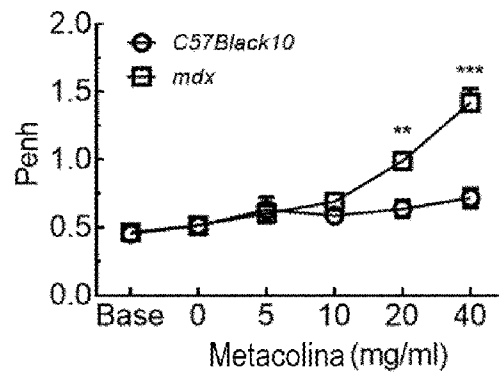
- 20 4. Composición para su utilización según la reivindicación 3, que comprende notablemente entre un 0 y un 0,05%, en peso seco del extracto, de impurezas que pueden afectar a la seguridad, la disponibilidad o la eficacia de una aplicación farmacéutica de dicho extracto.

5. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en la que la planta se elige entre *Stemmacantha carthamoides*, *Cyanotis arachnoidea* y *Cyanotis vaga*.

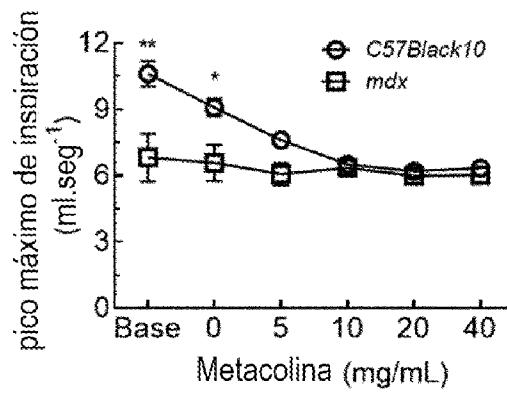
- 25 6. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la alteración de la función respiratoria resulta de una patología neuromuscular de las neuronas motoras y/o de la unión neuromuscular y/o del músculo estriado esquelético.

7. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6, en la que la alteración de la función respiratoria está ligada a una alteración del músculo estriado y/o del músculo liso.
8. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la hiperreactividad bronquial está asociada a la función del músculo liso bronquial.
- 5 9. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la alteración de la función respiratoria está ligada a una afección de al menos uno de los parámetros respiratorios elegidos entre el valor de Penh, el pico máximo de inspiración, el pico máximo de espiración, el tiempo de relajación y la frecuencia respiratoria.
- 10 10. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la alteración de la función respiratoria está ligada a una afección de al menos uno de los parámetros mecánicos del tejido pulmonar.
11. Composición para su utilización según la reivindicación 10, en la que la alteración de la función respiratoria está ligada a una disminución de la distensibilidad pulmonar y/o un aumento de la resistencia pulmonar y/o una reducción de la elastancia pulmonar.
- 15 12. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que las fitoecdisonas se administran a una dosis de entre 3 y 15 miligramos por kilogramo por día en humanos.
13. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las fitoecdisonas se administran a una dosis de 200 a 1000 mg/día, en una o más dosis, en un ser humano adulto, y a una toma de 5 a 350 mg /día, en una o más dosis, en niños o lactantes humanos.
- 20 14. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho al menos un compuesto de fórmula general (I) se elige entre:
- No. 1: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-17-(2-morfolinoacetil)-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - No. 2: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(3-hidroxipirrolidin-1-il)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - 25 - No. 3: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(4-hidroxi-1-piperidil)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - No. 4: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperidil)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - No. 5: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-17-[2-(3-dimetilaminopropil(metil)amino)acetil]-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-30 2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - No. 6: 2-[2-oxo-2-[(2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-6-oxo-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]etil]sulfanilacetato de etilo;
  - No. 7: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-17-(2-etilsulfanilacetil)-2,3,14-trihidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona;
  - 35 - No. 8: (2S,3R,5R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihidroxi-17-[2-(2-hidroxietilsulfanil)acetil]-10,13-dimetil-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-6-ona.

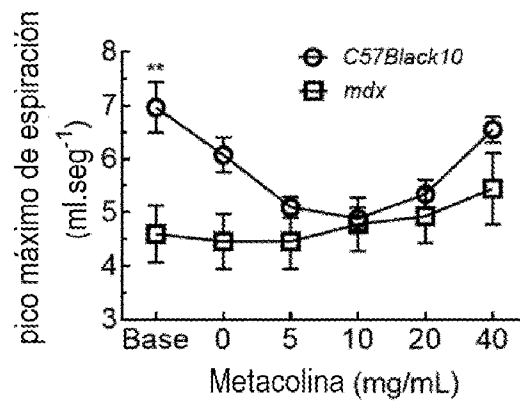
[Fig. 1A]



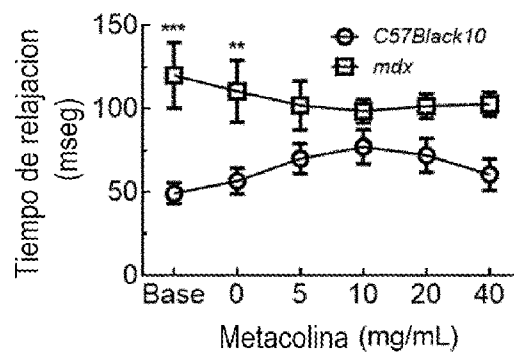
[Fig. 1B]



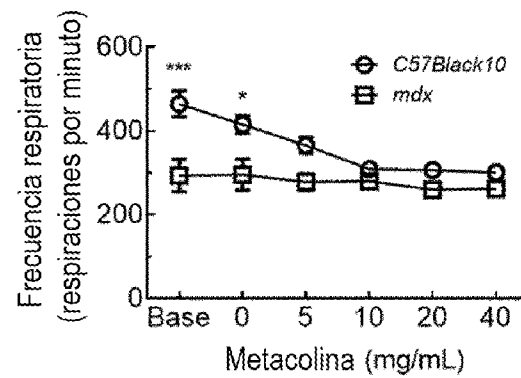
[Fig. 1C]



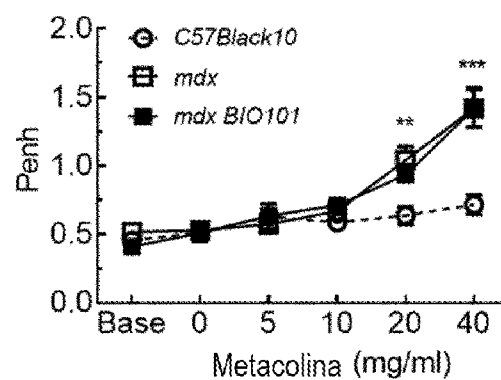
[Fig. 1D]



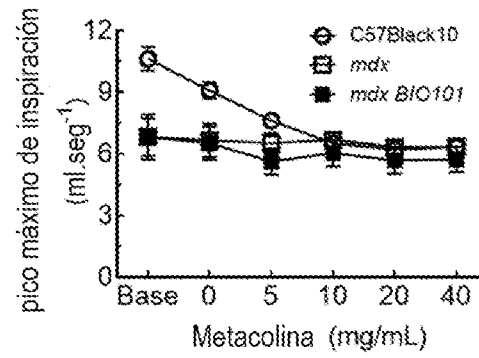
[Fig. 1E]



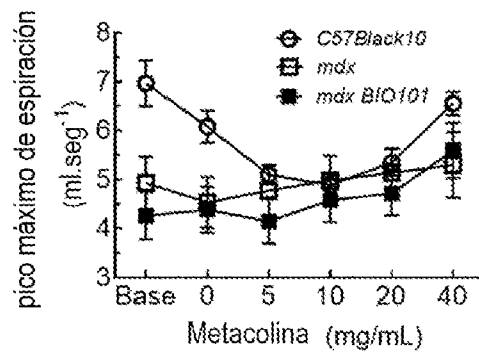
[Fig. 2A]



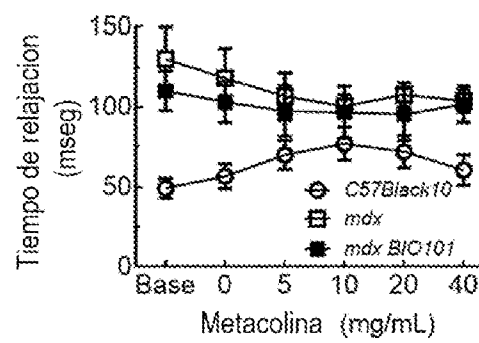
[Fig. 2B]



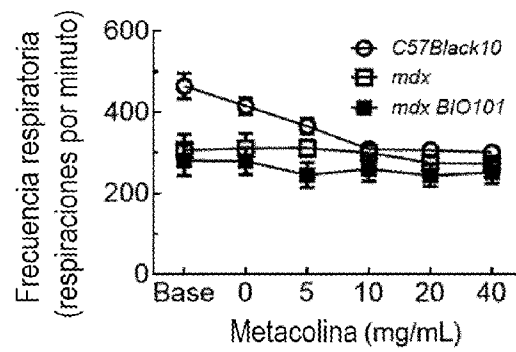
[Fig. 2C]



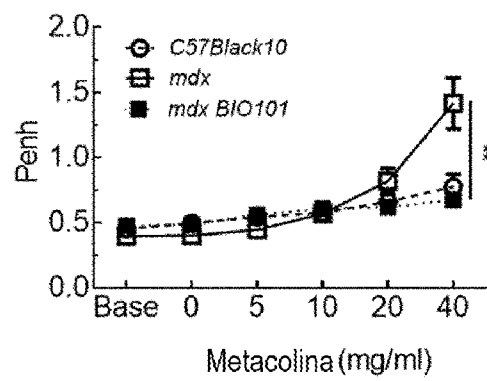
[Fig. 2D]



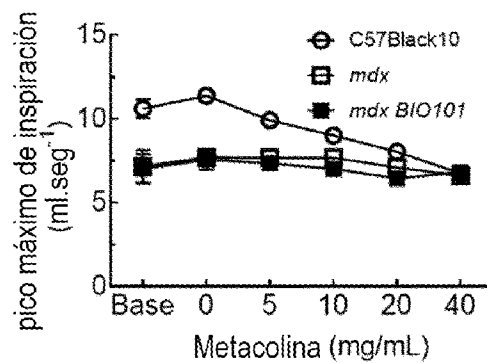
[Fig. 2E]



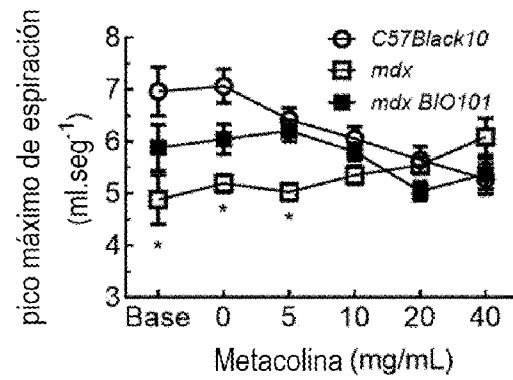
[Fig. 3A]



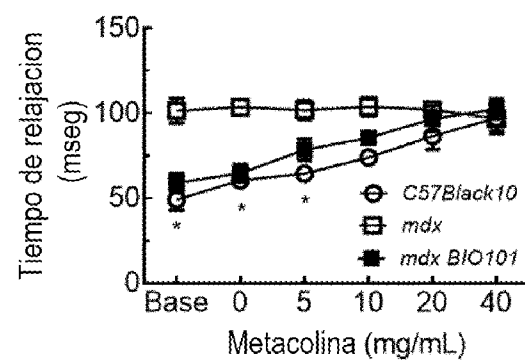
[Fig. 3B]



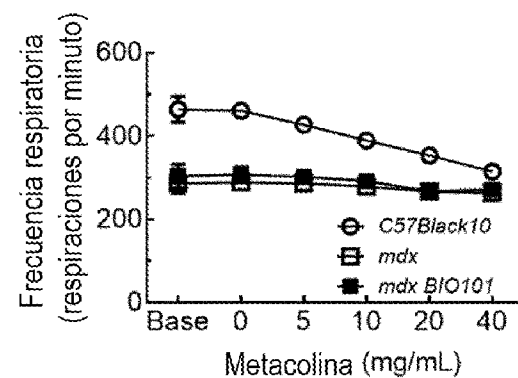
[Fig. 3C]



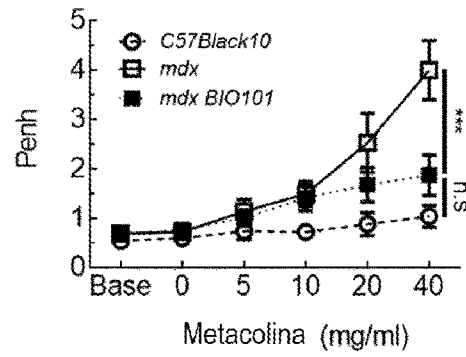
[Fig. 3D]



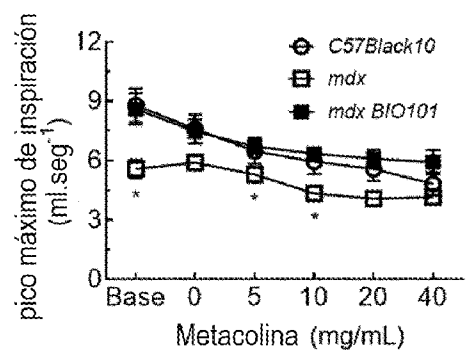
[Fig. 3E]



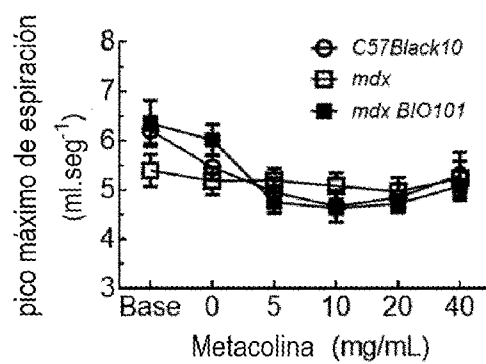
[Fig. 4A]



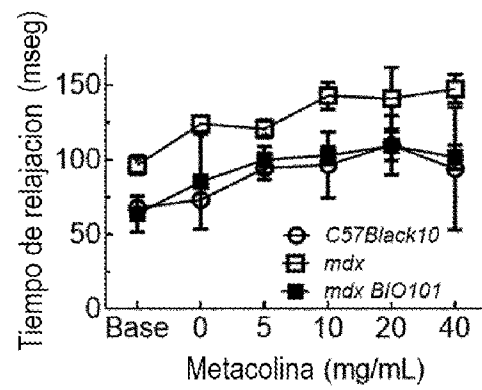
[Fig. 4B]



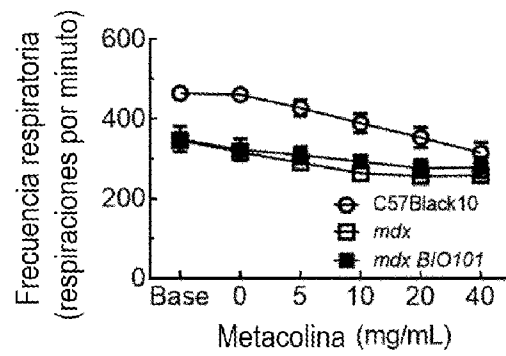
[Fig. 4C]



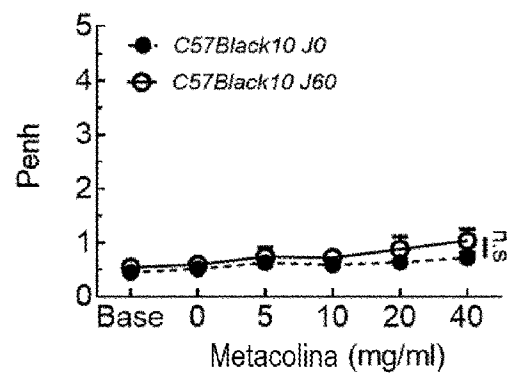
[Fig. 4D]



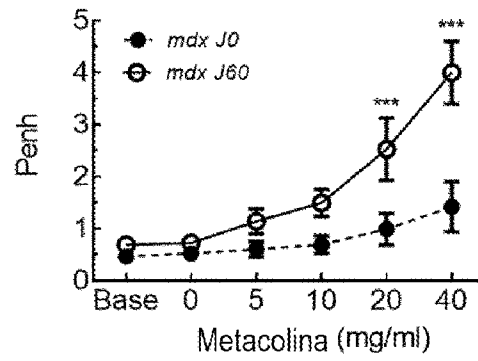
[Fig. 4E]



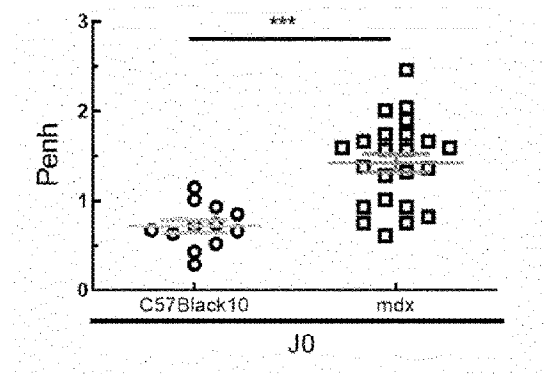
[Fig. 5A]



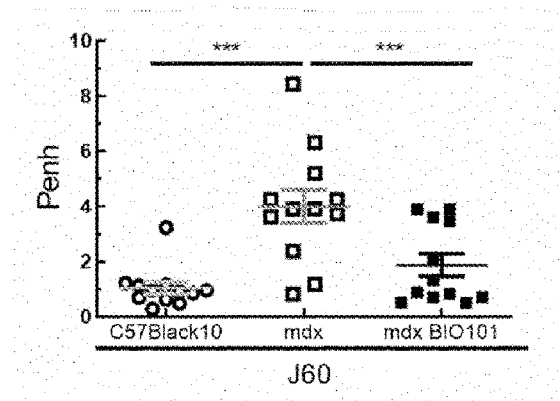
[Fig. 5B]



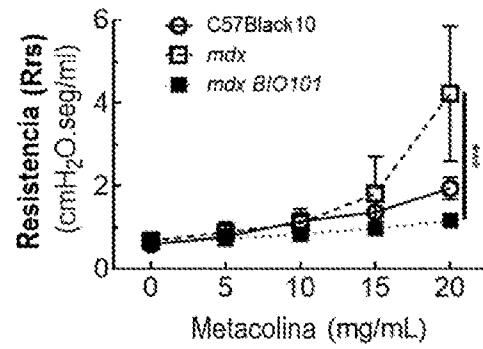
[Fig. 6A]



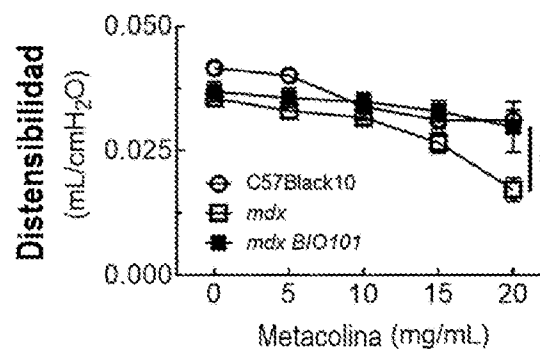
[Fig. 6B]



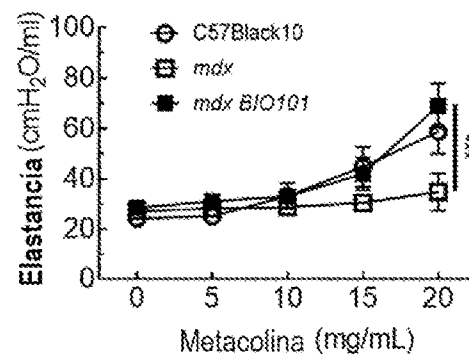
[Fig. 7A]



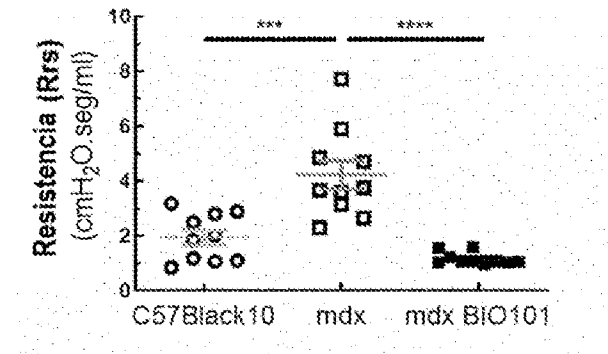
[Fig. 7B]



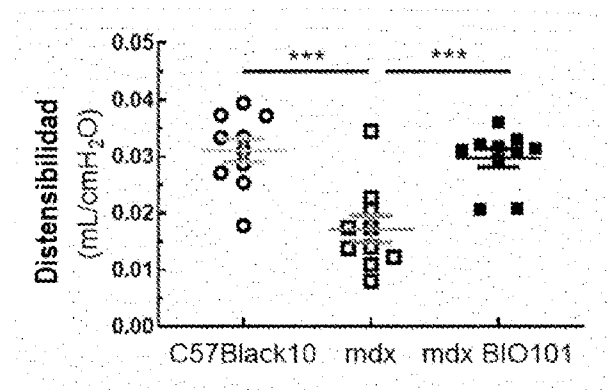
[Fig. 7C]



[Fig. 8A]



[Fig. 8B]



[Fig. 8C]

