



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 340 511**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/724 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05801277 .4**
(96) Fecha de presentación : **30.09.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1799231**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

(54) Título: **Uso de ciclodextrina para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales.**

(30) Prioridad: **10.10.2004 EP 04104957**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2010

(73) Titular/es: **Université de Liège
Antheunis Nicole
Interface Entreprises-Université
4, avenue Pré-Aily
4031 Angleur, BE**

(72) Inventor/es: **Cataldo, Didier;
Evrard, Brigitte;
Noel, Agnes y
Foidart, Jean-Michel**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 340 511 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

Uso de ciclodextrina para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales.

5 La presente invención se refiere al uso de un compuesto de ciclodextrina para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales.

10 Los compuestos para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales se clasifican en la técnica como broncodilatadores, también llamados medicaciones aliviadoras, o agentes antiinflamatorios no bronco-dilatadores, denominados agentes controladores, basándose en sus efectos farmacodinámicos. Los broncodilatadores de acción corta, tales como un agonista beta o anticolinérgicos inhalados, se consideran medicaciones aliviadoras. Los corticosteroides, la cromolina sódica, el nedocromil sódico, la teofilina de liberación sostenida y un agonista beta de acción prolongada se consideran medicaciones controladoras, ya que se usan para alcanzar y mantener el control de los síntomas y se usan diariamente a largo plazo.

15 Entre la medicación aliviadora, los agonistas β_2 -adrenérgicos son fármacos para el alivio de los síntomas debidos a una obstrucción aguda de las vías respiratorias. Tienen un rápido comienzo de acción y una duración de actividad de 3-6 h. Desgraciadamente, tienen efectos secundarios tales como taquicardia, palpitaciones y temblores que a menudo desaparecen durante la administración crónica. Los agentes anticolinérgicos inducen la relajación del músculo liso de las vías respiratorias. Su actividad no es eficaz como agonistas beta en el asma pero es más prolongada (6 a 8 horas).

20 Entre las medicaciones controladoras, los glucocorticosteroides son agentes eficaces con efectos antiinflamatorios. Desgraciadamente, sus efectos secundarios incluyen supresión adrenal, osteoporosis, supresión del crecimiento, aumento de peso, hipertensión, diabetes, adelgazamiento dérmico, cataratas, miopatía y acciones psicóticas. Estos efectos están relacionados con la dosis y se observan habitualmente con la administración sistémica. Pueden producirse efectos secundarios locales, incluyendo candidiasis oral y disfonía, con dosis inferiores de glucocorticoides inhalados.

25 La cromolina sódica y el nedocromil sódico también se clasifican como agentes controladores, debido a su perfil clínico similar. Inhiben la broncoconstricción inducida por episodios mediados neuralmente.

30 La teofilina se considera generalmente un broncodilatador pero tiene una actividad broncodilatadora débil en dosis terapéuticas. También puede tener propiedades antiinflamatorias. Los efectos adversos relacionados con la dosis de la teofilina son náuseas, nerviosismo, ansiedad y taquicardia.

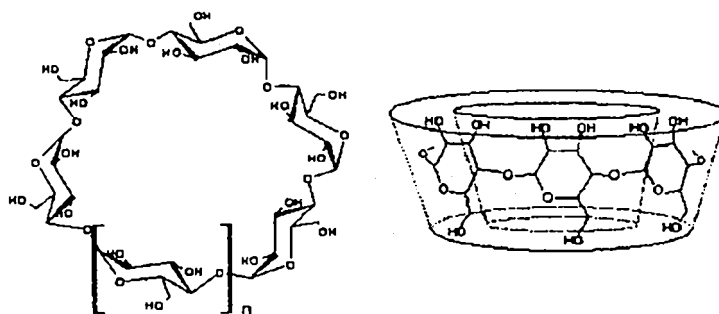
35 Los inhibidores de lipoxigenasa y los agonistas de receptor de leucotrieno también son agentes controladores. Alteran los efectos patológicos de leucotrienos derivados de la 5-lipoxigenación de ácido araquidónico. Pueden inhibir los efectos broncoespásticos de los alérgenos, el ejercicio, el aire seco frío y la alergia a la aspirina. Ambos son eficaces para aliviar los síntomas y mejorar la función pulmonar durante 4-6 semanas de terapia en pacientes con asma moderada. US4050736 divulga compuestos de clatrato de prostaglandinas o sus análogos con ciclodextrinas útiles como remedios para el asma.

40 Por lo tanto, existe una necesidad de compuestos mejorados que puedan usarse para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales.

45 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la ciclodextrina es útil como un componente activo para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales.

50 Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un compuesto de ciclodextrina para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria bronquial en un mamífero huésped que necesite tal tratamiento, caracterizado porque el compuesto de ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en: β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfolbutiléter- β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, dimetil- β -ciclodextrina, trimetil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, hidroxibutil- β -ciclodextrina, glucosil- β -ciclodextrina, maltosil- β -ciclodextrina, 2-O-metil- β -ciclodextrina o una combinación de las mismas, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

55 Por compuesto de ciclodextrina se hace referencia a la ciclodextrina así como a sus sales farmacéuticamente aceptables, formas enantiómeras, diastereoisómeros y racematos. Por ciclodextrina se hace referencia a oligosacáridos cíclicos producidos por degradación enzimática de almidón tal como se describe en "Cyclodextrin Technology, J Szejtli, Kluwer Academic Publishers 1998, pp 1-78", y que están compuestas por un número variables de unidades de glucopiranosas (n), principalmente 6, 7 u 8. Estas ciclodextrinas se denominan respectivamente ciclodextrinas α , β y γ (α CD, β CD, γ CD).



$n = 6$ α -ciclodextrina

$n = 7$ β -ciclodextrina

$n = 8$ γ -ciclodextrina

La ciclodextrina también se representa por CD posteriormente en la presente memoria.

El compuesto de ciclodextrina es ciclodextrina de por sí, alquil-ciclodextrina (R-CD), en donde R es metilo, etilo, propilo y butilo; carboxialquil-ciclodextrina (CR-CD), ciclodextrina eterificada (RO-CD), sulfoalquil-ciclodextrina (SR-CD), hidroxialquil-ciclodextrina (HR-CD), glucosil-ciclodextrina, di- y tri-glicéridos-ciclodextrina o una combinación de las mismas y sus sales farmacéuticamente aceptables que al menos son solubles en una cantidad de 0,5 g/100 ml a 25°C.

Compuesto de ciclodextrina soluble en agua se refiere a un compuesto de ciclodextrina que tienen una solubilidad en agua de al menos la de la β -ciclodextrina (1,85 g/100 ml). Ejemplos de tal compuesto de ciclodextrina soluble en agua son sulfobutilciclodextrina, hidroxipropilciclodextrina, maltosilciclodextrina, y sales de las mismas. En particular, sulfobutil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina, maltosil- β -ciclodextrina, y sales de las mismas. Otros compuestos de ciclodextrina son metilciclodextrinas (productos de la metilación de ciclodextrinas) tales como 2-O-metil- β -ciclodextrina; dimetilciclodextrina (DIMEB) (preferiblemente sustituida en 2 y en 6); trimetilciclodextrina (preferiblemente sustituida en 2, 3 y 6); ciclodextrinas "metiladas aleatoriamente" (RAMEB o RM) (preferiblemente sustituidas aleatoriamente en 2, 3 y 6, pero con un número de 1,7 a 1,9 metilos por unidad de glucopiranos), hidroxipropilciclodextrinas (HPCD), ciclodextrinas hidroxipropiladas preferiblemente sustituidas aleatoriamente principalmente en la posición 2 y 3 (HP- β -CD, HP- γ -CD)), sulfobutileterciclodextrinas (SBECD), hidroxietilciclodextrinas, carboximetilciclodextrinas, etilciclodextrinas, ciclodextrinas anfífilas obtenidas injertando cadenas hidrocarbonadas en los grupos hidroxilo y que son capaces de formar nanopartículas, colesterol-ciclodextrinas y triglicéridos-ciclodextrinas obtenidas injertando ciclodextrinas monoaminadas (con un brazo espaciador) según se describe en Critical Review in Therapeutic drug Carrier Systems, Stephen D. Bruck Ed, Cyclodextrin-Enabling Excipient; their present and future use in Pharmaceuticals, D. Thomson, Volumen 14, Edición 1 p1-114 (1997).

Compuestos de ciclodextrina de acuerdo con la invención son

- β -ciclodextrina opcionalmente con una función química injertada en las unidades de glucopiranos, tal como hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), sulfonilbutiléter- β -ciclodextrina (SBE β CD), β -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RM β CD), dimetil- β -ciclodextrina (DIME β CD), trimetil- β -ciclodextrina (TRIME β CD), hidroxibutil- β -ciclodextrina (HB β CD), glucosil- β -ciclodextrina, maltosil- β -ciclodextrina y 2-O-metil- β -ciclodextrina (Crysmeb), o una combinación de las mismas, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de ciclodextrina de acuerdo con la invención se producen mediante la bien conocida degradación enzimática de almidón tal como el método descrito en "Cyclodextrin Technology, J Szejtli, Kluwer Academic Publishers 1998, pp 1-78", seguido por el injerto de un grupo químico apropiado.

La invención proporciona además el uso de tal compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias bronquiales para un paciente que necesite tal tratamiento.

De acuerdo con la invención, el compuesto de ciclodextrina tiene que administrarse a un paciente durante varios meses o años (especialmente en el caso de la prevención). El compuesto de ciclodextrina se administra preferiblemente como un aerosol, variando las dosis atóxicas entre concentraciones nanomolares y molares.

La invención se refiere al uso del compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades inflamatorias bronquiales, preferiblemente asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un mamífero huésped que necesite tal tratamiento, p. ej., un paciente que sufra tal enfermedad, mediante la aplicación de un compuesto de ciclodextrina de acuerdo con la invención en una cantidad farmacéuticamente eficaz. El asma es

una enfermedad inflamatoria del árbol bronquial relacionada o no con una exposición a alérgenos. Esta inflamación provoca síntomas en pacientes estimulando la contracción de los músculos lisos bronquiales, potenciando la secreción de moco e induciendo cambios morfológicos bronquiales que se cree que son un factor agravante con respecto al curso de la enfermedad. La hipersensibilidad de las vías respiratorias es un rasgo distintivo de la enfermedad y el responsable de la mayoría de los síntomas. El árbol bronquial es un tejido muy complejo con muchos tipos de células (como, por ejemplo, células epiteliales, células del músculo liso, células inflamatorias, nervios, células que producen moco, fibroblastos) y los episodios de remodelación bronquial que comprenden muchos aspectos consisten principalmente en una deposición de componentes de la matriz extracelular en las paredes bronquiales, una hiperplasia del músculo liso y una hiperplasia de las células que producen moco. El uso de compuestos de ciclodextrina de acuerdo con la invención inhibe el flujo de células inflamatorias a los compartimentos de lavado broncoalveolar y al tejido peribronquial e inhibe la hipersensibilidad definida como respuesta anormal a agentes estimulantes tales como metacolina. La enfermedad y los tratamientos actuales se revisan, p. ej., en GINA Workshop Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention (Publicación NIH N° 02-3659) y Fabbri, L.M., y Hurd, S.S., Eur. Respir. J. 22 (2003) 1-2.

Por lo tanto, la invención se refiere además al uso del compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades inflamatorias bronquiales en un paciente que sufre tal enfermedad, usando un compuesto de ciclodextrina de acuerdo con la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, la invención se refiere además al uso del compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para tratar el enfisema en un paciente que sufre tal enfermedad, usando compuestos de ciclodextrina de acuerdo con la invención. En tal enfermedad, las paredes alveolares son destruidas por procesos proteolíticos y esta destrucción dificulta la transferencia de oxígeno de la sangre. En esta enfermedad, también se producen problemas fisiológicos debido a la hiperinflación derivada que provoca anomalías en la ventilación provocando una disfunción de los músculos respiratorios y debido a una hipertensión en las arterias pulmonares que conduce a fallo cardíaco en fases avanzadas.

Preferiblemente, la invención se refiere además al uso del compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) en un paciente que sufre tal enfermedad, usando compuestos de ciclodextrina de acuerdo con la invención. En tal enfermedad, las paredes bronquiales de las vías respiratorias pequeñas son remodeladas por procesos proteolíticos y esta remodelación y la fibrosis inducen una obstrucción de las vías respiratorias que puede medirse mediante espirometría. En tal enfermedad, también se producen problemas fisiológicos debido a la hiperinflación derivada que provoca anomalías en la relación ventilación/perfusión y provoca hipoventilación y finalmente acumulación de CO₂.

De acuerdo con la invención, el compuesto de ciclodextrina tiene que administrarse durante varios meses o años al paciente que necesite tal terapia. Los compuestos de ciclodextrina se administran preferiblemente mediante la aerosolización de una composición líquida o en polvo, con dosis atóxicas que varían entre concentraciones micromolares y molares por kg y día.

Un objetivo preferido adicional de la invención es una composición farmacéutica de compuesto de ciclodextrina de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades inflamatorias bronquiales, y su uso, que contiene una ciclodextrina o una sal de la misma y preferiblemente un derivado de ciclodextrina soluble en agua (definiéndose soluble en agua como una solubilidad de al menos 0,5 g/100 ml de agua a 25°C).

Las composiciones farmacéuticas son composiciones acuosas que tienen compatibilidad fisiológica. Las composiciones incluyen, además de ciclodextrina o una sal de la misma, sustancias auxiliares, tampones, conservantes, disolventes y/o agentes moduladores de la viscosidad. Los sistemas tamponadores apropiados se basan en fosfato sódico, acetato sódico o borato sódico. Se requieren conservantes para evitar la contaminación microbiana de la composición farmacéutica durante el uso. Conservantes adecuados son, por ejemplo, cloruro de benzalconio, clorobutanol, metilparabén, propilparabén, alcohol feniletílico, ácido sórbico. Tales conservantes se usan típicamente en una cantidad de 0,01 a 1% en peso/volumen.

El compuesto de ciclodextrina de la presente invención exhibe sus efectos a través bien de administración oral, bien de administración parenteral o bien de administración tópica, y se forma preferiblemente como una composición para la administración parenteral, particularmente una composición para inyección, o la administración tópica, particularmente una composición en aerosol. Tal composición en aerosol es, por ejemplo, una solución, una suspensión, una mezcla en polvo micronizado y similares. La composición se administra usando un nebulizador, un inhalador de dosis medidas o un inhalador de polvo seco o cualquier dispositivo diseñado para tal administración. Ejemplos de composiciones galénicas incluyen comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos y similares. Estas pueden producirse a través de una técnica bien conocida y con el uso de aditivos típicos tales como excipientes, lubricantes y aglutinantes. Sustancias auxiliares y composiciones farmacéuticas adecuadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.* Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la composición para hacer la composición isotónica. Ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.

Una composición farmacéutica preferida para la nebulización comprende ciclodextrina (CD), NaCl y agua. Esta solución se prepara disolviendo CD en 100 ml de agua purificada, añadiendo NaCl mediante agitación a fin de disol-

ES 2 340 511 T3

verlos y completando con agua a fin de obtener 200 ml de solución. Preferiblemente, la solución se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de polipropileno de 0,22 μm o mediante un procedimiento de esterilización con vapor de agua.

5 Una composición especialmente preferida es una combinación de (para 200 ml de solución): 10-50 g de CD, preferiblemente 20 g de CD, preferiblemente HP β CD; 1,2-1,5 g de cloruro sódico, preferiblemente 1,42 g (isotonicidad) y agua, preferiblemente agua purificada estéril libre de pirógenos añadida hasta 200 ml. Tal composición es útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias bronquiales.

10 La composición más preferida es una combinación de 2-O-metil β CD con 1,2-1,5 g de cloruro sódico, preferiblemente 1,42 g (isotonicidad) y agua, preferiblemente agua purificada estéril libre de pirógenos añadida hasta 200 ml.

15 Los siguientes ejemplos, referencias y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos indicados sin apartarse de la invención.

Descripción de las figuras

20 Figura 1-2 Efectos de la inhalación de un compuesto de ciclodextrina sobre el porcentaje de eosinófilos de BAL (Fig 1) y valoración de la inflamación peribronquial (fig 2). Los controles son ratones expuestos a ova mediante inhalación y placebo mediante inhalación (OVA)

25 Figura 3 Efectos de la inhalación de un compuesto de ciclodextrina sobre eosinófilos peribronquiales presentados aquí como un número/mm de membrana de basamento epitelial.

Figura 4 Medidas de la sensibilidad de las vías respiratorias: Se midió la Pausa Mejorada (Penh) en ratones expuestos a OVA durante 5 minutos después de una inhalación de 2 minutos de ciclodextrina o placebo (OVA) y dosis crecientes de metacolina (Mch).

30 Figura 5 Medida de citoquinas mediante Elisa. Se midió la eotaxina mediante incubación en una rueda revestida con un anticuerpo primario específicamente dedicado al reconocimiento de la proteína y, después de enjuagar, un segundo anticuerpo contra eotaxina, acoplado con peroxidasa de rábano picante, se usó para cuantificar las cantidades de eotaxina en la solución.

35 Figura 6 Medida de niveles de IgE específica para alérgeno en suero.

Figura 7 Medida de eotaxina e IL-13 en Bal y extractos de proteína de pulmón. La IL-13 se midió mediante incubación en una rueda revestida con un anticuerpo primario específicamente dedicado al reconocimiento de la proteína y, después de enjuagar, un segundo anticuerpo contra IL-13, acoplado con peroxidasa de rábano picante, se usó para cuantificar las cantidades de eotaxina en la solución.

40 Figura 8 Medidas de la sensibilidad de las vías respiratorias: La Pausa Mejorada (Penh) se midió en ratones después de recibir tratamiento con Crysmeb o placebo

45 Figura 9 Valoración de la inflamación peribronquial medida en histología cuando se trata con diversas concentraciones de Crysmeb en comparación con placebo (fig 9A) y con otra ciclodextrina y fluticasona (fig 9B)

Figura 10 Medidas de la sensibilidad de las vías respiratorias: comparación de compuestos de ciclodextrina con placebo y fluticasona. Medidas de la respuesta de las vías respiratorias inducida por metacolina en ratones expuestos 7 días a alérgeno y que reciben una terapia inhalada 30 min antes de la exposición al alérgeno.

50 Figura 11 Niveles de IL-13 medidos mediante Elisa en extractos de proteína de pulmón.

55 Ejemplo 1

Uso de composiciones que contienen HP- β -ciclodextrina para la terapia de la inflamación de las vías respiratorias y la hipersensibilidad bronquial inducidas por alérgeno en un modelo de asma en ratones.

60 Materiales

La HP- β -CD (grado de sustitución = 0,64) se obtuvo de Roquette (Francia). La α - y la HP- γ -CD de obtuvieron de Wacker Chemie GmbH (Alemania). Una solución salina tamponada con fosfato (PBS) pirógena se adquirió de Bio-Wittaker (Verviers, Bélgica). La metacolina era de Sigma-Aldrich (Alemania).

65 Todos los otros materiales eran de calidad analítica. A lo largo de este estudio se usó agua estéril para inyección. Se prepararon soluciones de CD estériles, apirógenas e isotónicas a 1, 7,5 y 50 mM para HP- β -CD y α -CD y a 50 mM para HP- γ -CD. Las ciclodextrinas se probaron siguiendo la prueba de endotoxinas bacterianas descrita en USP XXVI

usando lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). Las osmolalidades de todas las soluciones se midieron mediante un semimicroosmómetro automático Knauer y se ajustaron hasta el valor de 300 mOsm/kg mediante la adición de una cantidad adecuada de NaCl. Se realizó una esterilización terminal de las soluciones mediante un procedimiento de esterilización con vapor de agua.

Métodos

Se produjo un aerosol usando un nebulizador ultrasónico SYSTAM, cuya frecuencia de vibración es 2,4 MHz con intensidad de vibración y niveles de ventilación variables. La intensidad de vibración se fijó en la posición 6 y el nivel de ventilación era 25 (t^{1/2}) 1/min.

- Caracterización del aerosol nebulizado

La distribución de los tamaños del aerosol emitida a partir de soluciones de CD se determinó con un analizador de tamaños por láser Mastersizer (Malvern, Orsay, Francia). Diez mililitros de cada solución se nebulizaron directamente en el haz láserico. La boquilla se mantuvo a 1 cm del centro del haz láserico. El aerosol resultante se aspiró por el lado opuesto del haz. La temperatura y la humedad relativa ambientales se mantuvieron constantes, es decir a 20°C y 40-45%. Se realizaron triplicados de cada medida y se compararon con controles de PBS. Los resultados se expresan como el porcentaje de gotículas comprendido en el intervalo de 0,5 a 5,79 μm y el diámetro mediano. La concentración de gotículas en el aire evaluada mediante el porcentaje de oscurecimiento del haz láserico estaba en el mismo intervalo para cada experimento (15-25%). Una comparación del MMAD, la GSD y el porcentaje de gotículas comprendido en el intervalo de 0,5 a 5,79 μm de todas las soluciones de CD con los correspondientes valores para PBS demostraba que la presencia de CD en la solución no influía en la distribución de tamaños de gotícula en los aerosoles. Una fracción de gotículas comprendida en el intervalo de 0,5 a 5,79 μm cercana al 65% se obtenía en cada experimento.

- Sensibilización, exposición a alérgenos y protocolos terapéuticos

Para estudiar la modulación de la inflamación de las vías respiratorias, ratones BALB/c macho de 6 a 8 semanas de edad se sensibilizaron mediante inyección intraperitoneal de 10 μg de ovoalbúmina (OVA) (Sigma Aldrich, Schneckendorf, Alemania) emulsionada en hidróxido de aluminio (AlumInject; Perbio, Erembodegem, Bélgica) los días 1 y 8. Subsiguientemente, los ratones se expusieron a alérgenos mediante la inhalación diaria de un aerosol de OVA al 1%, durante 30 minutos, generado mediante un nebulizador ultrasónico (Devlbiss 2000), desde el día 21 al 27. Los ratones se sometieron a inhalación de α -CD, HP- β -CD 1, 7,5, 50 mM y HP- γ -CD 50 mM 30 minutos antes de la inhalación de OVA. Los ratones fueron sacrificados el día 28 según era presentado previamente por Cataldo y otros en Am. J. Pathol 2002; 161 (2):491-498.

- Fluido de lavado broncoalveolar (BAL)

Inmediatamente después de la determinación de la sensibilidad de las vías respiratorias, y 24 horas después de la última exposición a alérgeno, los ratones fueron sacrificados y se realizó un lavado broncoalveolar usando 4 x 1 ml de PBS-EDTA 0,05 mM (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) según se describió previamente por Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K *et al.* en Am J Pathol 2002; 161-(2):491-498. Las células se recuperaron mediante aspiración manual suave. Después de la centrifugación del fluido broncoalveolar (BALF) (1200 rpm durante 10 minutos, a 4°C), el sobrenadante se congeló a -80°C para la determinación de proteínas y la pella celular se resuspendió en 1 ml de PBS-EDTA 0,05 mM. Los conteos celulares diferenciales se realizaron sobre preparaciones citocentrífugadas (Cytospin) después de una tinción con Diff-Quick (Dade, Bélgica).

Histología pulmonar y procesamiento tisular

Después del BAL, el tórax se abrió y el bronquio principal izquierdo se pinzó. El pulmón izquierdo se extirpó y se congeló inmediatamente a -80°C para la extracción de proteínas y mRNA. El pulmón derecho se infundió con 4 ml de paraformaldehído al 4%, se embebió en parafina y se usó para histología. Secciones de 5 μm de grosor se cortaron de la parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La extensión de la inflamación peribronquial se estimó mediante una valoración calculada mediante la cuantificación de células inflamatorias peribronquiales, según se describió previamente por Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K *et al.* en Am J Pathol 2002; 161-(2): 491-498. Se adjudicaba un valor de 0 cuando la inflamación no era detectable, un valor de 1 cuando había ocasionalmente células inflamatorias, un valor de 2 cuando la mayoría de los bronquios estaban rodeados por una capa delgada (de 1 a 5 células) de células inflamatorias y un valor de 3 cuando la mayoría de los bronquios estaban rodeados por una capa gruesa (>5 células) de células inflamatorias. Puesto que se valoraban 5-7 secciones de tejido seleccionadas aleatoriamente por ratón, las valoraciones de inflamación se expresan como un valor medio y pueden compararse entre grupos. Después de una tinción con rojo Congo, la infiltración eosinofílica en las paredes de las vías respiratorias se cuantificó mediante conteo manual y se presentó al perímetro de la membrana de basamento epitelial que define una valoración inflamatoria eosinofílica.

El pulmón izquierdo se trituró usando un Mikro-Dismembrator (Braun Biotech International, GmbH Melsungen, Alemania). Para la extracción de proteínas, el tejido pulmonar triturado se incubó durante la noche a 4°C en una solución que contenía urea 2 M, NaCl 1 M y Tris 50 mM (pH 7,5) y subsiguientemente se centrifugó 15 minutos a 16.000 x g. El sobrenadante se almacenó a -80°C.

- Medida de la sensibilidad bronquial

Veinticuatro horas después de la última exposición a alérgeno, la hipersensibilidad bronquial se determinó midiendo la Penh (Pausa mejorada) usando un pletismógrafo barométrico (Emka technologies, París) según se propuso por Hamelmann, E., *et al.*, Am. J Respir. Crit Care Med. 156 (1997) 766-775). La Penh se midió en la línea de base y 5 min después de la inhalación de dosis crecientes (25, 50, 75 y 100 mM) de metacolina (Mch).

Medidas de citoquinas mediante ELISA

Los niveles de eotaxina e IL-13 se determinaron usando ELISA comerciales (R&D systems, Abingdon, Reino Unido).

La eotaxina se midió mediante incubación en una rueda revestida con un anticuerpo primario específicamente dedicado al reconocimiento de la proteína y, después de enjuagar, un segundo anticuerpo contra eotaxina, acoplado con peroxidasa de rábano picante, se usó para cuantificar las cantidades de eotaxina en la solución.

Medida de IgE sérica específica para alérgeno

Al final del experimento, se extrajo sangre del corazón para la medida de IgE sérica específica para OVA. Las placas de microvaloración se revistieron con OVA. Se añadió suero seguido por una IgE antirratón de conejo policlonal biotinilada (S. Florquin, ULB, Bruselas, Bélgica). Una fracción sérica procedente de animales sensibilizados con OVA se usó como patrón interno de laboratorio; 1 unidad se definió arbitrariamente como una dilución 1/100 de esta fracción.

Medida de eotaxina e IL-13 en BAL y extractos de proteína de pulmón

La IL-13 se midió mediante incubación en una rueda revestida con un anticuerpo primario específicamente dedicado al reconocimiento de la proteína y, después del enjuague, un segundo anticuerpo contra IL-13, acoplado con peroxidasa de rábano picante, se usó para cuantificar las cantidades de eotaxina en la solución.

Análisis estadístico

Los resultados del conteo de células de BAL, la histología pulmonar, las citoquinas y los niveles de mRNA se expresaron como media $\pm$ SEM y la comparación entre los grupos se realizó usando la prueba de Mann-Whitney. La prueba de Mann-Whitney se realizó usando GRAPHPAD INSTAT versión 3.00 para WINDOWS 95 (GRAPH-PAD SOFTWARE, San Diego, CA, EE. UU. de A., WWW.GRAPHPAD.Com.). Valores de $p < 0,05$ se consideraban significativos.

Resultados farmacológicos

Células inflamatorias en el BAL

Después de la exposición a alérgeno, los conteos de eosinófilos se disminuían significativamente después de la inhalación de HP- β -CD y HP- γ -CD a la dosis de 50 mM. Había una disminución dependiente de la dosis en eosinófilos de BAL con la inhalación de HP- β -CD 1, 7,5 y 50 mM. Otras células inflamatorias no estaban presentes en diferentes cantidades en el BAL después de la inhalación de HP- β -CD cuando se comparaban con el placebo. Por el contrario, una inhalación de α -CD conducía a una tendencia a incrementar el número de eosinófilos en BAL después de la exposición a alérgeno (figura 1).

Inflamación peribronquial

Después de la exposición a alérgeno, los ratones tratados con placebo presentaban un incremento significativo en la inflamación peribronquial según se cuantificaba por la valoración de la inflamación peribronquial. Se observó que los ratones tratados con HP- β -CD 1, 7,5 y 50 mM y HP- γ -CD 50 mM tenían una valoración de inflamación disminuida cuando se comparaban con ratones tratados con placebo. La inhalación de α -CD no reducía la valoración de la inflamación peribronquial (figura 2).

Infiltración de eosinófilos peribronquiales

Como se demostró previamente, la exposición a alérgeno inducía un incremento significativo en el número de eosinófilos detectable en el área peribronquial. Todas las CD probadas inducían una disminución de esta infiltración y esta disminución alcanzaba una significación estadística para α -CD, HP- β -CD 1, 7,5, y HP- γ -CD 50 mM (figura 3).

Sensibilidad bronquial

La inhalación de HP- β -CD 50 mM reducía el incremento de Penh inducido por metacolina (figura 4). Cuando se medía el área bajo la curva de respuesta a la dosis de metacolina (A.U.C) para diferentes CD, la HP- β -CD 50 mM era la única que mostraba una disminución significativa (figura 5).

ES 2 340 511 T3

Medidas de citoquina en BAL y extractos de proteína de pulmón

Quando se comparaban con ratones expuestos a placebo, todas las dosis de HP- β -CD probadas inducían una disminución en los niveles de eotaxina medidos mediante ELISA en extractos de proteína de pulmón (figura 7a). Los niveles de IL-13 se disminuían en BAL después de la exposición a HP- β -CD y, por el contrario, se incrementaban después de una exposición a α -CD (figura 7b).

Medidas de IgE específica de alérgeno en suero

No había diferencias significativas entre los grupos para la sensibilización a alérgeno según se determinaba por los niveles similares de IgE específica para OVA medidos mediante ELISA en suero (figura 6).

Ejemplo 2

Uso de composiciones que comprenden 2-O-metil-ciclodextrina para la terapia de la inflamación de las vías respiratorias y la hipersensibilidad bronquial inducidas por alérgeno en un modelo de asma en ratones.

Materiales

Los materiales son idénticos al ejemplo 1, con la excepción del compuesto de ciclodextrina que es aquí 2-O-metilciclodextrina, KLEPTOSE CRYSMEB®, un producto comercializado por Roquette. Tiene, de media, 4 grupos metilo por molécula de ciclodextrina natural y se caracteriza por un peso molecular promedio de 1135 y un grado de sustitución molar promedio de 0,57.

Se prepararon soluciones de CD estériles, apirógenas e isotónicas con 10, 20, 50 y 75 mM para 2-O-metil-ciclodextrina. Las ciclodextrinas se probaron siguiendo la prueba de endotoxinas bacterianas descrita en USP XXVI usando lisado de amebocitos de Limulus (LAL). Las osmolalidades de todas las soluciones se midieron mediante un semimicroosmómetro automático de Knauer y se ajustaron hasta el valor de 280-300 mOsm/kg mediante la adición de una cantidad adecuada de NaCl. Una esterilización terminal de las soluciones se realizó mediante un procedimiento de esterilización con vapor de agua.

Métodos

Se usan los mismos métodos que en el ejemplo 1, pero en el presente ejemplo los ratones se expusieron a CRYSMEB aerosolizado (10, 20, 50, 100 ó 200 mM) en una caja de exposición estándar (20 X 30 X 15 cm) durante 30 min/día durante 7 días.

Resultados farmacológicos

Células inflamatorias en el BAL

La composición celular del lavado broncoalveolar no se alteraba significativamente por la exposición a CRYSMEB. En particular, no había diferencias referentes a los conteos de eosinófilos y neutrófilos (véase la tabla 1).

La eosinofilia del lavado broncoalveolar se disminuía significativamente en los grupos tratados mediante CRYSMEB. La disminución en la eosinofilia del lavado era comparable a la obtenida con diferentes concentraciones de HP-beta-ciclodextrinas o fluticasona, un esteroide de inhalación comúnmente usado como una terapia de referencia (tabla 2).

Inflamación peribronquial

Después de la exposición a alérgeno, los ratones tratados con placebo presentaban un incremento significativo en la inflamación peribronquial según se cuantificaba mediante la valoración de la inflamación peribronquial. Se observó que los ratones tratados con CRYSMEB 20 mM tenían una valoración de inflamación disminuida cuando se comparaban con ratones tratados con placebo (figura 9A). La valoración de la inflamación peribronquial se midió y se disminuía significativamente en cualquier grupo de tratamiento en comparación con el placebo (figura 9B).

Sensibilidad bronquial

La inhalación de CRYSMEB 10 mM reducía el incremento de Penh inducido por metacolina (figura 10).

La sensibilidad a metacolina se incrementaba después de la exposición a alérgeno y el placebo y se reducía significativamente mediante el tratamiento con CRYSMEB en una extensión comparable con la obtenida con terapia con fluticasona (figura 10).

ES 2 340 511 T3

Medidas de citoquina en BAL y extractos de proteína de pulmón

Para desvelar los mecanismos implicados en el efecto farmacológico de CRYSMEB, se midió IL-13, una citoquina Th2 principal implicada en la hipersensibilidad y la inflamación de las vías respiratorias. Se encontró que los niveles de IL-13 medidos mediante ELISA en extractos de proteína de pulmón enteros se disminuían significativamente mediante la exposición a CRYSMEB así como a fluticasona y HP-beta-CD 50 mM. (véase la fig 11).

Ejemplo 3

Composición farmacéutica que ha de administrarse en un aerosol a un paciente que necesite tratamiento para una enfermedad inflamatoria bronquial:

HP betaCD 75 mM

La osmolalidad de la solución es 308 mOs/kg. El pH es 7,2.

La concentración de compuesto de CD puede modificarse en función de los requisitos. Se prefiere ajustar la tonicidad mediante la adición de NaCl.

Una composición preferida para la nebulización es:

Para 200 ml de solución:

- HPβCD exenta de pirógenos 20,15 g (75 mM)
- Cloruro sódico 1,42 g (isotonicidad)
- Agua purificada estéril libre de pirógenos c.s. hasta 200 ml

a) Pésense 20,15 g de HPβCD exenta de pirógenos (3,2% de H₂O, de ROQUETTE) y disuélvanse en 100 ml de agua purificada.

b) Pésense 1,42 g de cloruro sódico y añádanse a una solución (a) agitando enérgicamente a fin de disolverlos.

c) Complétese con agua a fin de obtener 200 ml de solución.

Esterilícese mediante filtración a través de una membrana de polipropileno de 0,22 μm.

TABLA 1

Conteos celulares diferenciales en el lavado broncoalveolar medidos después de la exposición a diferentes concentraciones de CRYSMEB inhalado

	PLACEBO	Crysmeb 20 mM	Crysmeb 50 mM	Crysmcb75 mM
Células epiteliales (%)	15,9714±5,154	29,9±5,909	36,1375±4,52	30,8875±1,349
Eosinófilos (%)	0,0428±0,0428	0,0375±0,0375	0,1125±0,0789	0,0375±0,0375
Neutrófilos (%)	0,1285±0,236	0,0375±0,1061	0,2±0,3505	0,0375±0,1061
Linfocitos (%)	0,1857±0,1421	0,425±0,1485	0,275±0,1161	0,075±0,0491
Macrófagos (%)	83,5857±1,179°	69,5±5,956	63,1625±4,695	68,9±1,334

Tabla 2: conteos diferenciales en el lavado broncoalveolar medidos después de la exposición a diferentes concentraciones de CRYSMEB inhalado.

	PLACEBO	Fluticasona	HPBcta-CD 1mM	HPBcta-CD 10mM	HPBcta-CD 50mM	CRYSMEB 10mM
Células epiteliales (%)	3,86±2,551	22,85±5,343	25,08±3,413	34,44±3,723	45,04±5,534	36,83±5,644
Eosinófilos (%)	53,08±4,683	32,92±7,306°	34,2±7,705°	27,24±4,98°	12,18±4,366°	8,84±2,946°
Neutrófilos (%)	3,03±1,333	1,85±1,093	0,36±0,1563	0,83±0,5838	0,72±0,3992	1,26±0,4587
Linfocitos (%)	3,62±1,576	1,68±0,7115	0,48±0,1869	0,21±0,08571	0,12±0,12	0,214±0,1079
Macrófagos (%)	36,25±5,016	40,52±3,122	39,75±5,427	37,114±3,878	41,86±9,043	52,714±6,49
Células totales (10 ⁴ /ml)	220,42±81,709	75,92±11,922	74,92±14,396	114,43±33,245	37,33±10,683	131,93±33,637

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria bronquial en un mamífero huésped que necesite tal tratamiento, **caracterizado** porque

el compuesto de ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en:

β -ciclodextrina, hidroxipropil- β ciclodextrina, sulfolbutiléter- β ciclodextrina, β ciclodextrina metilada aleatoriamente, dimetil- β ciclodextrina, trimetil- β ciclodextrina, hidroxibutil-ciclodextrina, glucosil- β ciclodextrina, maltosil- β ciclodextrina, 2-O-metil- β ciclodextrina o una combinación de las mismas, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. Uso de un compuesto de ciclodextrina para la fabricación de un medicamento para la prevención de una enfermedad inflamatoria bronquial en un mamífero huésped que necesite tal tratamiento, **caracterizado** porque

el compuesto de ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en:

β -ciclodextrina, hidroxipropil- β ciclodextrina, sulfolbutiléter- β ciclodextrina, β ciclodextrina metilada aleatoriamente, dimetil- β ciclodextrina, trimetil- β ciclodextrina, hidroxibutil- β ciclodextrina, glucosil- β ciclodextrina, maltosil- β ciclodextrina, 2-O-metil- β ciclodextrina o una combinación de las mismas, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. Uso de un compuesto de ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto de ciclodextrina es hidroxipropil- β ciclodextrina.

4. Uso de un compuesto de ciclodextrina de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto de ciclodextrina es una 2-O-metil- β ciclodextrina.

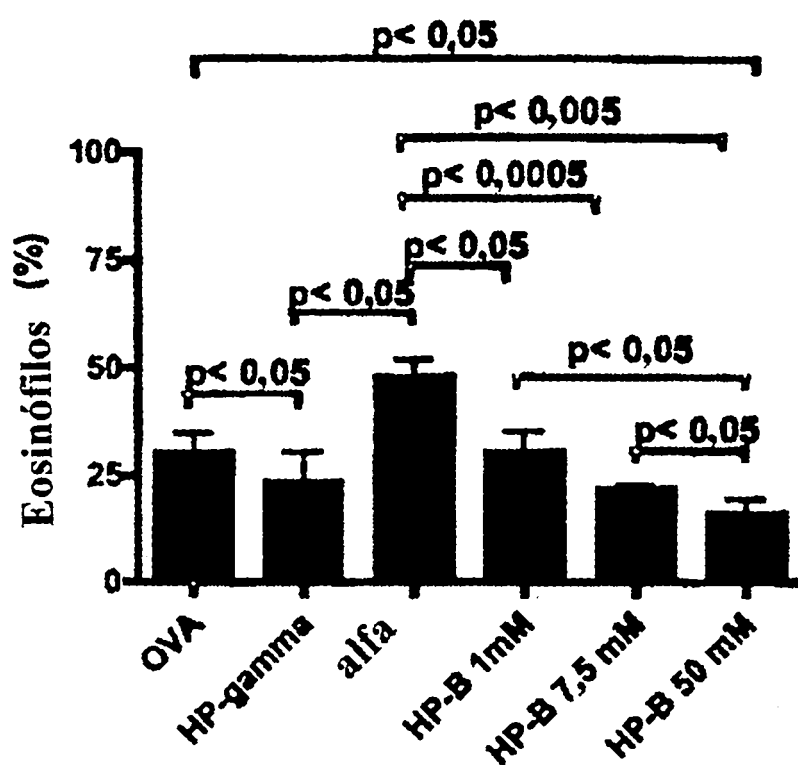


Figura 1

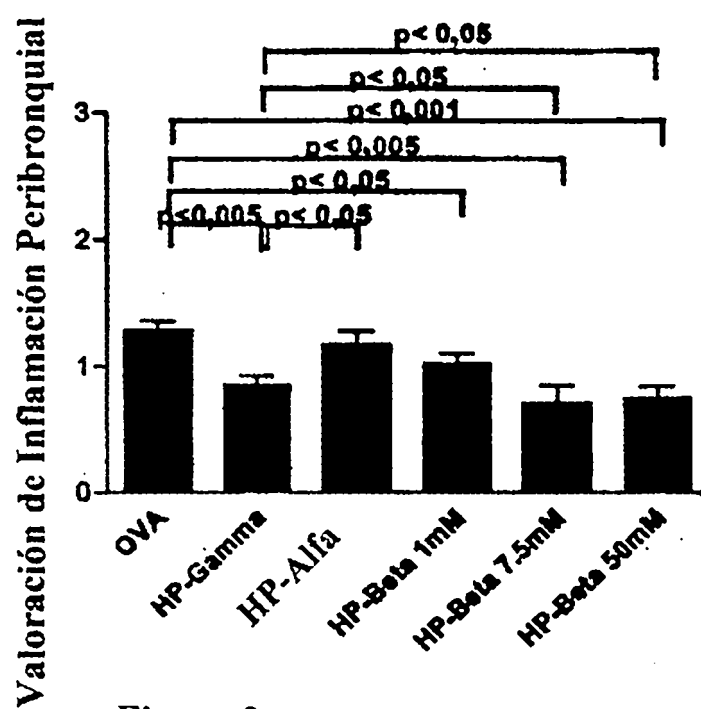


Figura 2

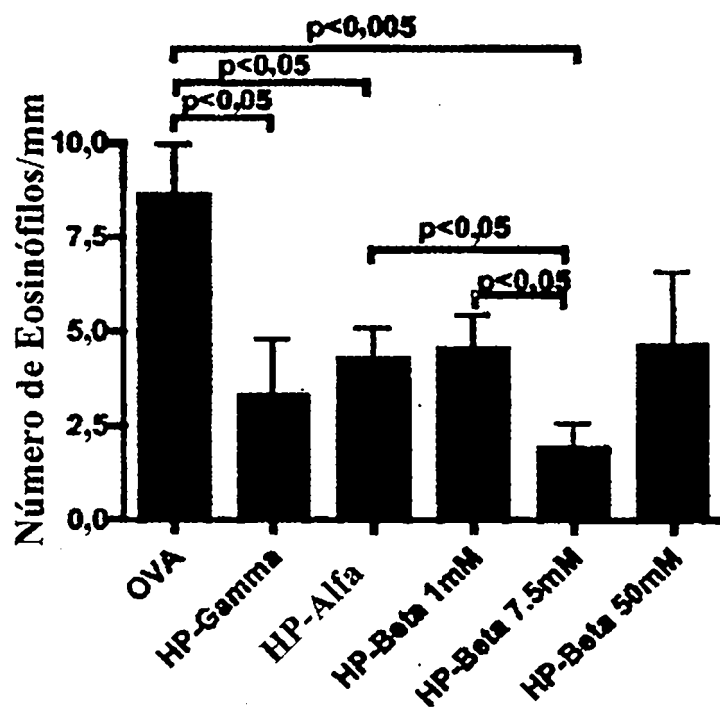


Figura 3

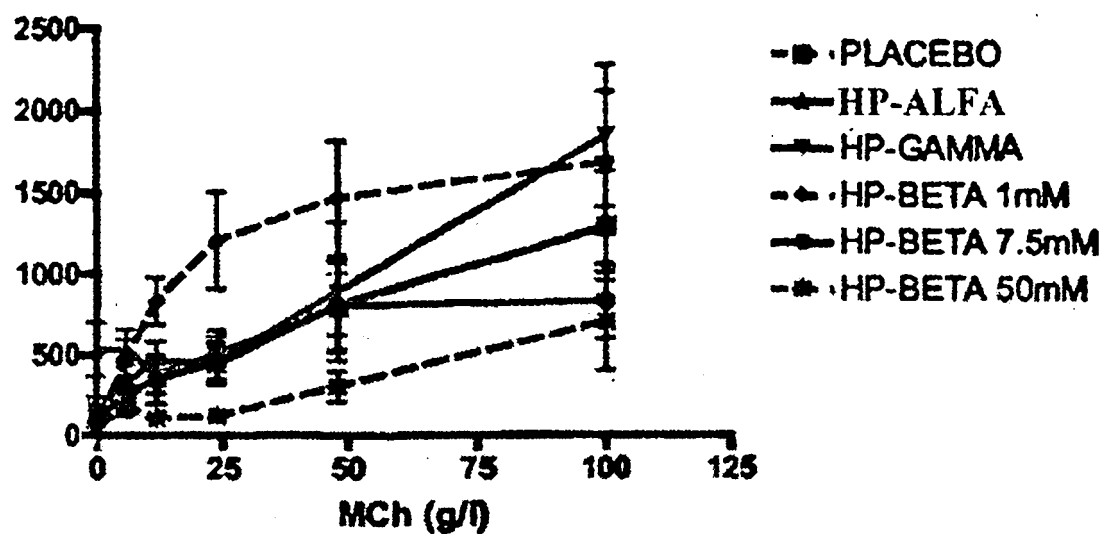


Figura 4

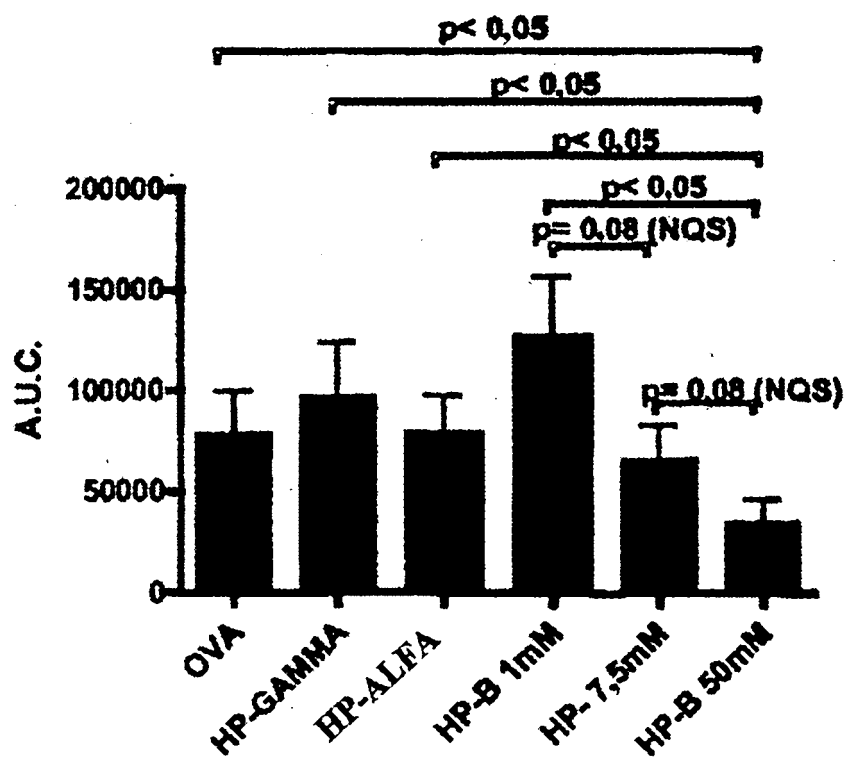


Figura 5

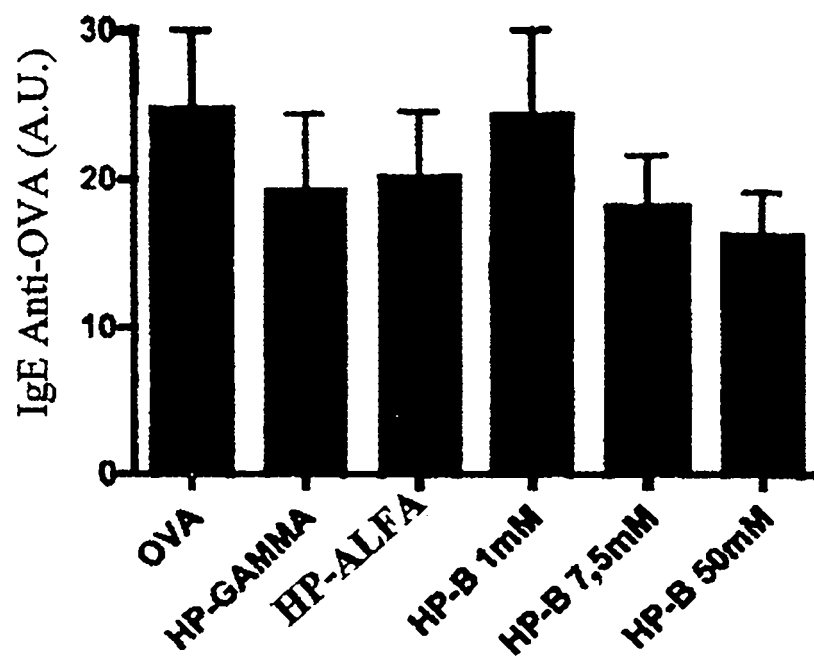


Figura 6

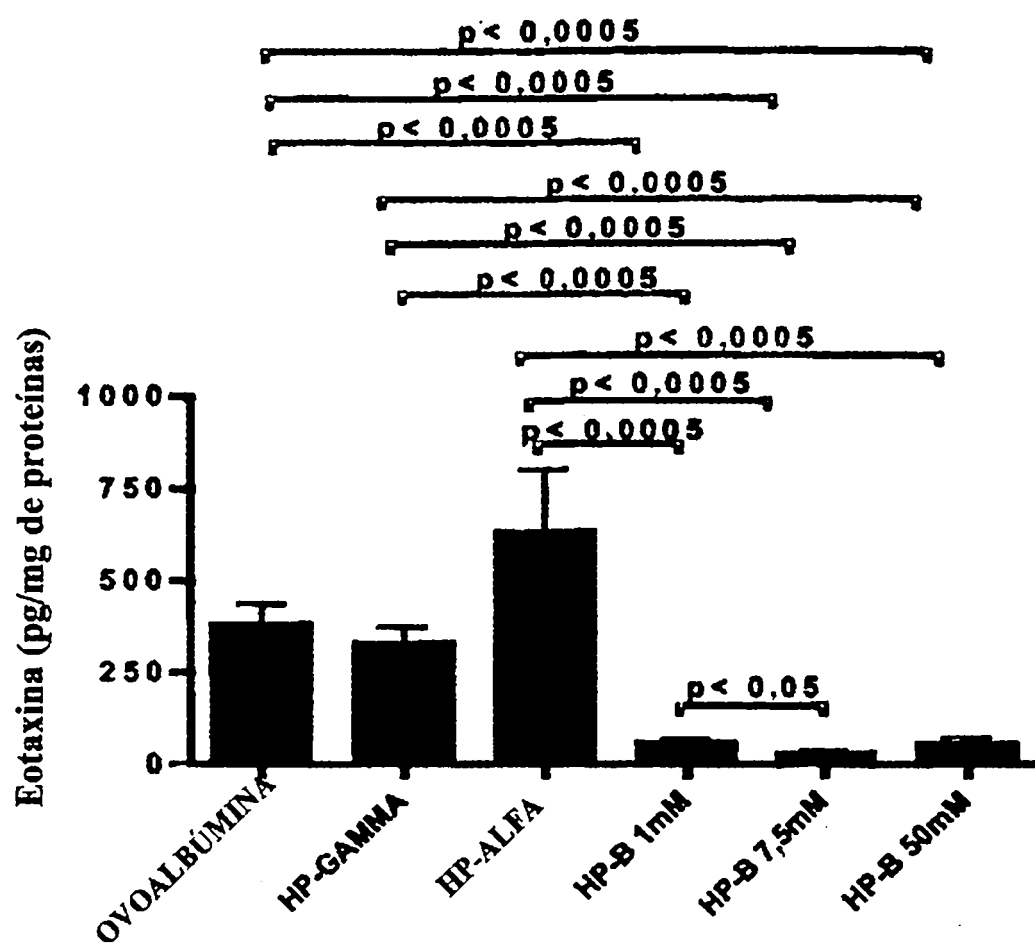


Figura 7a

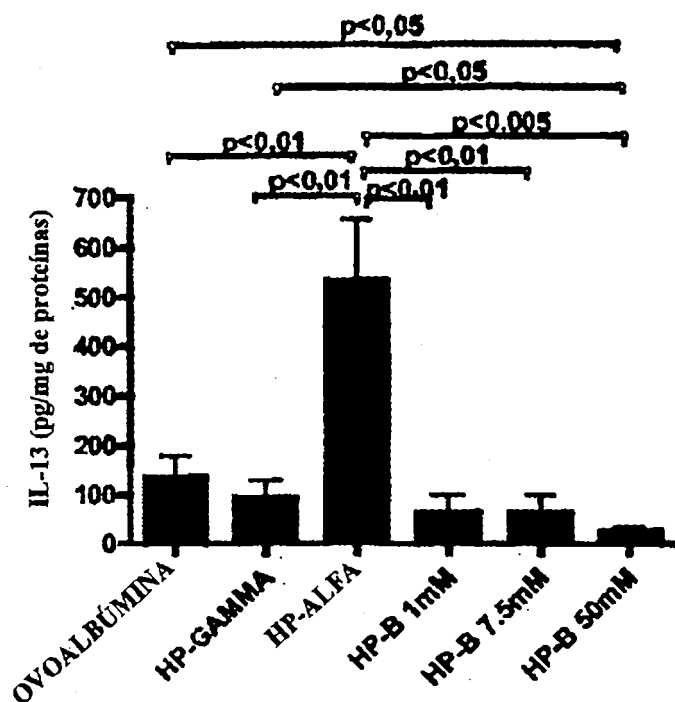


Figura 7b

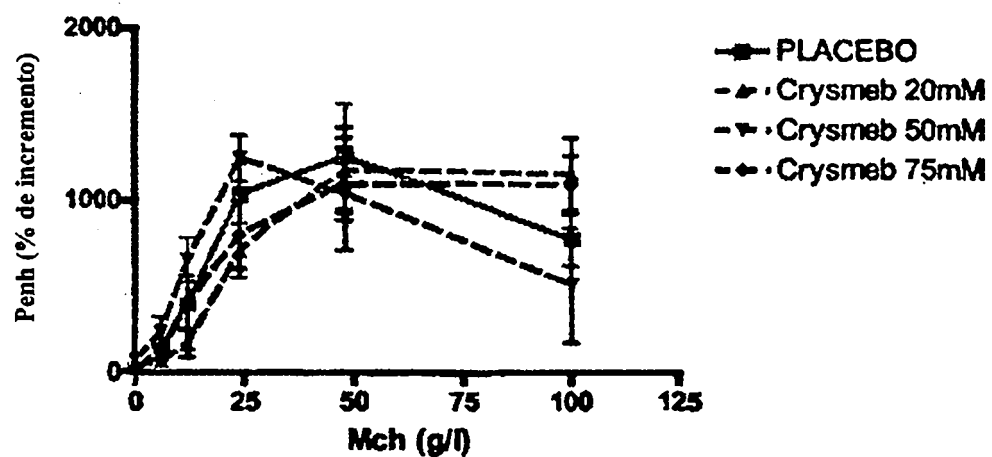


Figura 8

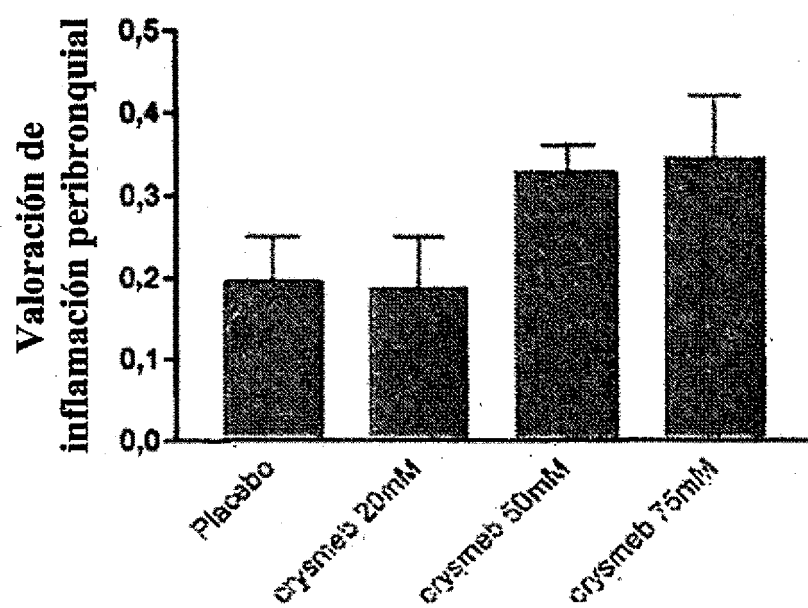


Figura 9A

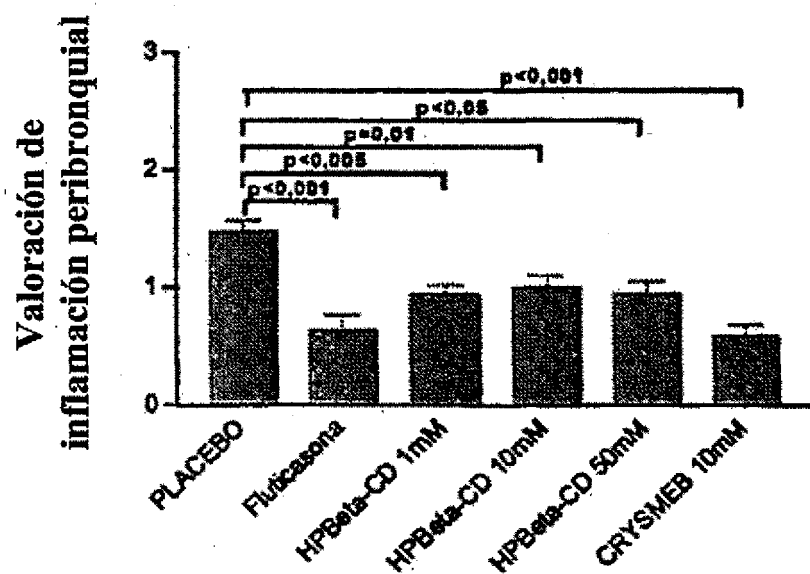


Figura 9B

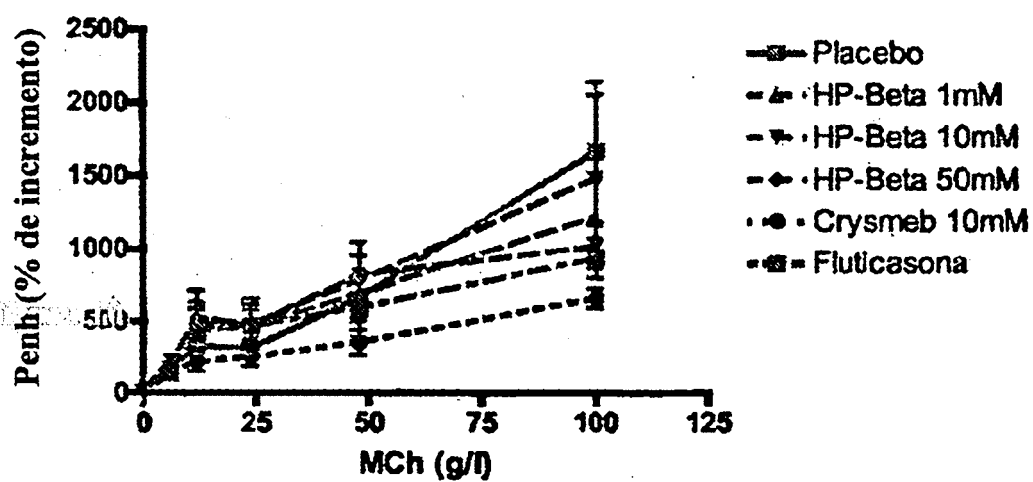


Figura 10

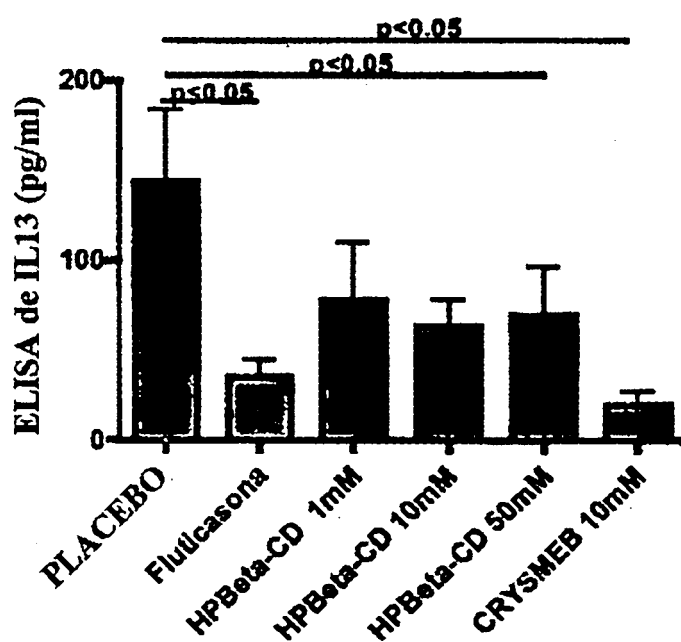


Figura 11