

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 198**

51 Int. Cl.:

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2008 E 08007676 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2110132**

54 Título: **Utilización de óxido de deuterio como inhibidor de elastasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2014

73 Titular/es:

**D2 BIOSCIENCE GROUP LTD (100.0%)
Penthouse Suite 129 Front Street
Hamilton HMLX, BM**

72 Inventor/es:

BAYERL, THOMAS, PROF. DR.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 459 198 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

Utilización de óxido de deuterio como inhibidor de elastasa.

5 La presente invención se refiere a la utilización de óxido de deuterio (D2O) como inhibidor de elastasa y en particular como inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana (HNE). Además, la invención se refiere a la utilización de óxido de deuterio para la profilaxis y/o terapia de enfermedades asociadas a HNE.

10 Las elastasas pertenecen a la familia de las serina proteasas y rompen las amidas, por consiguiente también los enlaces amida de péptidos y proteínas, y ésteres con absorción de H2O. Las elastasas humanas se codifican por seis genes diferentes y comprenden la elastasa leucocitaria humana (HLE), también conocida como elastasa de neutrófilos humana (HNE), (EC 3.4.21.37). La elastasa de neutrófilos humana (HLE) es una serina proteasa básica glicolizada con 218 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 33 kDa. La HNE aparece en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares humanos (en inglés *polymorphnuclear leucocyte*, PMN). La función fisiológica intracelular de la HNE consiste en la degradación de partículas extrañas orgánicas, que se captan a través de fagocitosis. Tras la activación de los leucocitos polimorfonucleares se libera la elastasa HNE de los mismos al espacio extracelular (elastasa libre), quedando un porcentaje unido a la membrana plasmática de neutrófilos de los PMN (elastasa de membrana). La HNE extracelular activa puede hidrolizar prácticamente todas las proteínas de matriz extracelular, tales como por ejemplo elastina, colágeno, laminina, citocinas y fibronectina.

20 Sin embargo, debido a su actividad proteolítica incontrolada la HNE desempeña un papel destructivo en un gran número de procesos patológicos. A éstos pertenecen en particular enfermedades inflamatorias, por ejemplo enfermedades inflamatorias de la piel, tales como dermatosis neutrofilicas, tales como pustulosis palmoplantar, dermatosis pustulosa subcórnea (enfermedad de Sneddon-Wilkinson) (Gliński W. *et al.*, Basement membrane zone as a target for human neutrophil elastase in psoriasis, Arch Dermatol Res. 1990; 282(8):506-11; Meyer-Hoffert U. *et al.*, Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation, J Invest Dermatol. Agosto de 2004; 123(2):338-45; Wiedow O. *et al.*, Lesional elastase activity in psoriasis. Diagnostic and prognostic significance, Arch Dermatol Res. 1995; 287(7):632-5), dermatosis ampollosa autoinmunitaria, penfigoide, tal como penfigoide ampolloso, penfigoide vulgar, penfigoide vegetante y penfigoide foliáceo (Oikarinen Al *et al.*, Demonstration of collagenase and elastase activities in the blister fluids from bullous skin diseases. Comparison between dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid, J Invest Dermatol. septiembre de 1983; 81(3):261-6; sLiu Z. *et al.*, A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid, J Clin Invest. enero de 2000; 105(1):113-23; Shimanovich I. *et al.*, Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid, J Pathol. Diciembre de 2004; 204(5):519-27), enfermedades aftosas de la mucosa bucal, inflamación de los senos paranasales, de la mucosa nasal, el oído medio, de la conjuntiva así como rinitis alérgica, asma, vasculitis cutánea, vasculitis pulmonar, peritonitis y choque séptico (Tsujiimoto H. *et al.*, Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis, Shock. Enero de 2005; 23(1):39-44; Jochum M. *et al.*, Proteolytic destruction of functional proteins by phagocytes in human peritonitis, Eur J Clin Invest. Marzo de 1999; 29(3):246-55) así como enfermedades pulmonares, por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, bronquitis crónica, fibrosis pulmonar, síndrome respiratorio agudo, enfisema pulmonar (Yoshioka, A. *et al.*, Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. Am. J. Respir. Crit. Care Med., diciembre de 1995; 152:2127.) hemorragia (daño pulmonar), etc., enfermedades cardíacas y vasculares, tales como infarto de miocardio, isquemia cerebral así como otras alteraciones tisulares tras un infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca y síndrome coronario agudo (trastornos circulatorios de los vasos coronarios) (Lechleitner P. *et al.*, Granulocyte elastase in acute myocardial infarction, Z Kardiol. octubre de 1993; 82(10):641-7; Dinerman JL *et al.*, Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction, J Am Coll Cardiol. junio 1990; 15(7):1559-63; Tiefenbacher CP *et al.*, Inhibition of elastase improves myocardial function after repetitive ischaemia and myocardial infarction in the rat heart, Pflugers Arch. Marzo de 1997; 433(5):563-70; Bidouard JP *et al.*, SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury, Eur J Pharmacol. 7 de febrero de 2003; 461(1):49-52; Ohta K. *et al.*, Elafin-overexpressing mice have improved cardiac function after myocardial infarction, Am J Physiol Heart Circ Physiol. Julio de 2004; 287(1):H286-92; Shimakura A. *et al.*, Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion; Brain Res. 6 de marzo de 2000; 858(1):55-60) y enfermedades alérgicas, tales como alergia al polvo, a los ácaros, al polen de las plantas, asma alérgica, etc. (Sehgal N. *et al.*, Potential roles in rhinitis for protease and other enzymatic activities of allergens, Curr Allergy Asthma Rep. Mayo de 2005; 5(3):221-6; Gunawan H. *et al.*, Protease Activity of Allergenic Pollen of Cedar, Cypress, Juniper, Birch, and Ragweed, Allergol Int. 1 de marzo de 2008; 57(1):83-91; Runswick S. *et al.*, Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions, Respirology. noviembre de 2007; 12(6):834-42.

60 El papel de las serina proteasas en general, como las elastasas, en procesos patológicos se basa probablemente en un desequilibrio de la enzima y su inhibidor natural propio del cuerpo. En el caso de la HNE, la inhibición de la enzima tiene lugar mediante la proteína inhibidora alfa-1-antitripsina, A1AT (Stockley, Neutrophils and protease-antiprotease imbalance, AmJ.Respir.Crit.Care Med 1999; 160, 49-52). La A1AT se secreta normalmente por el hígado al suero y se encuentra en un elevado exceso con respecto a la HNE y se une de manera irreversible al centro activo de la HNE y tripsina. De esta manera se desactiva la enzima HNE libre. Sin embargo, en cuanto hay

una carencia de A1AT, esto conduce a un exceso de HNE activa y a una actividad incontrolada de la enzima. Además, la enzima HNE de membrana no es accesible para A1AT.

En los últimos años se han buscado, cada vez más, inhibidores de serina proteasas específicos. Se han propuesto e investigado numerosos inhibidores para elastasas, incluyendo la HNE, en su mayor parte a base de pequeñas moléculas con un MW > 1 kD (Edwards, P. D.; Bernstein, P. R. Synthetic inhibitors of elastase. Med. Res. Rev. 1994, 14, 127-94; J. Potemp *et al.*, The Serpin Superfamily of Proteinase Inhibitors: Structure, Function, and Regulation, J. Biol. Chem vol. 269 n.º 23, número del 10 de junio, págs. 15957-15960 1994).

Tales inhibidores de elastasa pueden clasificarse en general en los grupos de inhibidores irreversibles y reversibles. Mientras los inhibidores de elastasa irreversible, tales como los inhibidores de HNE (entre otros alquilfluorofosfatos, clorometilcetonas, fluoruros de sulfonilo), en su mayor parte forman un enlace covalente con el sitio de unión a sustrato de las elastasas o HNE, los inhibidores de elastasas o HNE reversibles se caracterizan en su mayor parte por puentes de hidrógeno, enlaces iónicos o interacciones de van der Waals entre el inhibidor y la elastasa o HNE y presentan a menudo un grupo funcional electrófilo en el extremo C-terminal del residuo P1, que les proporciona una mayor afinidad de unión (entre otros trifluorometilcetonas, ésteres de ácido bórico, aldehídos).

Para el desarrollo de inhibidores de elastasa y en particular inhibidores de HNE para la terapia de enfermedades se prefieren los inhibidores reversibles por sus efectos secundarios tóxicos potencialmente menores. A pesar de ello, estos inhibidores reversibles también presentan todavía desventajas considerables en su aplicación en un organismo animal. Los aldehídos están sujetos, por ejemplo, al peligro de una rápida oxidación para dar ácidos carboxílicos así como de la racemización en presencia de ácidos o bases, cuando hay un centro quiral en el carbono alfa del residuo P1. Además, su escasa biodisponibilidad, en particular su escasa biodisponibilidad oral, es un factor limitante debido a grupos funcionales electrófilos en su utilización en un organismo animal, tal como en un mamífero.

Numerosos inhibidores de HNE conocidos son de base peptídica y están compuestos por no más de 3-5 restos de aminoácido o su equivalente (S. Sinha *et al.*, Conversion of the Alzheimer's @-Amyloid Precursor Protein (APP) Kunitz Domain into a Potent Human Neutrophil Elastase Inhibitor, J. Biol. Chem. vol. 266, n.º 31, número del 5 de noviembre, 21011-21013, 1991). Debido a este tamaño reducido sólo pueden interaccionar con zonas pequeñas de la enzima HNE, lo que limita enormemente su especificidad. Al utilizarlas en un organismo animal, tal como en un mamífero, pueden esperarse fuertes efectos secundarios de este tipo de moléculas. También diferentes sulfonamidas, para las que se ha demostrado en general un fuerte efecto inhibitor sobre las serina proteasas (Sommerhoff, C. P.; Krell, R. D.; Williams, J. L.; Gomes, B. C.; Strimpler, A. M.; Nadel, J. A. Inhibition of human neutrophil elastase by ICI 200,355. Eur. J. Pharmacol. 1991, 193, 153-8; M. Takayama *et al.*, Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion, J Appl Physiol 91: 1800 - 1807, 2001), presentan un problema de especificidad y presentan por tanto efectos secundarios en su utilización en un organismo animal, tal como en un mamífero. A moléculas más grandes, igualmente de base peptídica en su mayor parte, con efecto inhibitor para HNE se le suman dos problemas adicionales. Por un lado, están sujetas al peligro de una proteólisis no específica mediante otras proteasas (por ejemplo mediante cisteína o metaloproteasas) y los productos de esta reacción pueden provocar efectos secundarios (S. Attucci *et al.*, EPI-hNE4, a Proteolysis-Resistant Inhibitor of Human Neutrophil Elastase and Potential Anti-Inflammatory Drug for Treating Cystic Fibrosis, JPET 318:803-809, 2006). Además, estos inhibidores de HNE de mayor peso molecular sólo pueden utilizarse de manera limitada por su tamaño de molécula, dado que para una inhibición específica de la HNE es necesaria una conformación flexible del grupo funcional del inhibidor/sustrato que se une a la triada catalítica de la enzima.

Por consiguiente, las desventajas de los inhibidores de elastasa conocidos en el estado de la técnica y en particular de los inhibidores de HNE son, entre otras, un efecto inespecífico, efectos secundarios no deseados, racemización, oxidación en medio muy oxidante, escasa biodisponibilidad y el peligro de la proteólisis mediante otras proteasas, con lo que se inhibe o inactiva su actividad inhibitora.

El documento DE4427690A1 describe una composición farmacéutica que contiene deuterio o sustancias deuteradas, o sustancias que liberan o producen un enriquecimiento de deuterio, para su utilización como agente citostático o agente terapéutico tumoral, para la lucha contra tumores y metástasis.

El documento WO1999/062510A2 describe procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades inflamatorias por medio de sustancias antimicrotubulares.

El documento WO2007/129962A1 describe derivados de 2-piridona para el tratamiento de enfermedades en las que es ventajosa una inhibición de la actividad elastasa de los neutrófilos.

White *et al.*, Effect of Colchicine, vinblastine, D2O and cytochalasin B on elastase secretion, protein synthesis and fine structure of mouse alveolar macrophage", Journal of the Reticuloendothelial Society abril de 1981, tomo 29, n.º 4, 1981-04, págs. 295-304 describen el efecto de colchicina, vinblastina, D2O y citocalasina B sobre la secreción de elastasa, la síntesis de proteínas y la estructura fina de macrófagos alveolares de ratón.

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar inhibidores mejorados para elastasas, y en particular

inhibidores mejorados para la elastasa de neutrófilos humana (HNE).

Este objetivo se soluciona con la presente invención. La presente invención se basa en el conocimiento de que el óxido de deuterio (D₂O) es un inhibidor eficaz para elastasas, y en particular para la elastasa de neutrófilos humana. El óxido de deuterio (D₂O), denominado a menudo también agua pesada, es una sustancia extremadamente similar al agua natural (H₂O). El D₂O y el H₂O se diferencian físicamente por la sustitución de los átomos de hidrógeno por átomos de deuterio. El D₂O presenta una densidad aproximadamente un 10% mayor y una viscosidad aproximadamente un 25% mayor que el H₂O. Además, las temperaturas de fusión y de ebullición del D₂O son mayores que para el H₂O. Una comparación detallada de las propiedades se proporciona en Handbook of Chemistry and Physics, sección 6 (Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide, Editor, 79ª edición, 1998 CRC Press, Boca Raton, EE.UU.).

Aunque las diferencias físicas entre el H₂O y el D₂O son más bien escasas, existen diferencias fisiológicas significativas (véase entre otros Kushner DJ *et al.*, Pharmacological uses and perspectives of heavy water and denatured compounds., Can J Physiol Pharmacol. Febrero de 1999; 77(2):79-88.). Así se estableció, por ejemplo, que aunque muchas algas y bacterias pueden existir en D₂O al 100% de manera completamente normal durante mucho tiempo, y que para protozoos esto es posible en D₂O hasta el 70%, esto no es aplicable para células animales. En este caso a concentraciones de D₂O en un organismo de más del 20-25% se modifican o inhiben de manera creciente diferentes reacciones controladas enzimáticamente. Un motivo para esto puede verse en la intensidad de unión modificada de los enlaces de puente de hidrógeno, cuando el átomo de hidrógeno está sustituido por un átomo de deuterio. Tanto en disoluciones acuosas de H₂O y D₂O, como en la unión del agua a moléculas orgánicas, se produce esta intensidad de unión en su mayor parte aumentada, pareciendo ser el efecto aún más marcado en moléculas orgánicas (Cuma M, Scheiner S, Influence of Isotopic Substitution on Strength of Hydrogen Bonds of Common Organic Groups, Journal of Physical Organic Chemistry, 1997 tomo 10, 383-395).

Hasta la fecha, en el estado de la técnica un aprovechamiento terapéutico de la administración de D₂O a un organismo animal, en particular a un mamífero, se consideraba poco eficaz, dado que las concentraciones de D₂O necesarias para un efecto de este tipo debían encontrarse por encima del 25% y por tanto se esperaban fuertes efectos secundarios (Kushner DJ *et al.*, Pharmacological uses and perspectives of heavy water and denatured compounds., Can J Physiol Pharmacol. Febrero de 1999;77(2):79-88.). Además, todos los estudios publicados en el estado de la técnica con respecto al efecto del D₂O sobre células, órganos y organismos llegan a la conclusión que el efecto del D₂O sólo continúa durante la duración de tiempo de la administración de D₂O, con lo que serían necesario ciclos muy largos de administración de D₂O.

Los estudios hasta la fecha del estado de la técnica se ocupan prioritariamente del efecto antitumoral y antineoplásico del D₂O.

Para el caso del crecimiento tumoral en el intestino grueso y en las células del epitelio pavimentoso en la cavidad bucal y de la faringe ya se demostró el efecto antitumoral del D₂O en los años 80 de manera experimental en ratones Balb/c-nu/nu (Altermatt HJ *et al.*, Heavy water delays growth of human carcinoma in nude mice; Cancer. 1 de agosto de 1988;62(3):462-6.) También en otros tejidos pudo demostrarse un efecto antitumoral. Así, estudios sobre cultivos celulares publicados recientemente (Hartmann, J. *et al.*, Effects of heavy water (D₂O) on human pancreatic tumor cells, Anticancer Res. Septiembre-octubre de 2005; 25(5):3407-11) con 3 líneas de células tumorales de páncreas apoyan igualmente un efecto antitumoral. Otras investigaciones han encontrado resultados inequívocos del efecto antitumoral mediado por D₂O en tejidos de células cerebrales neoplásicas (Uemura, T. *et al.*, Experimental validation of deuterium oxide-mediated antitumoral activity as it relates to apoptosis in murine malignant astrocytoma cells, Neurosurg. Mayo de 2002; 96(5):900-8.) y sugieren que el D₂O puede inducir una apoptosis en células de astrocitoma malignas. También en este trabajo, los autores concluyeron que el D₂O presenta un efecto citotóxico sobre el tejido tumoral y de este modo representa un agente citostático.

Estudios publicados, en los se administró un agente citostático establecido junto con D₂O en lugar de H₂O para el tratamiento de tumores murinos xenotrasplantados (Altermatt, HJ, Heavy water (D₂O) inhibits growth of human xenotransplanted oropharyngeal cancers, An animal experiment study in nude mice, Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). Abril de 1987; 66(4):191-4.), confirman un efecto antineoplásico adicional de D₂O.

Sin embargo, en ningún lugar en el estado de la técnica se ha descrito hasta la fecha el D₂O como un inhibidor eficaz de actividades enzimáticas, tal como el inhibidor de elastasa y sobre todo como inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana (HNE).

El mecanismo de acción según la invención del D₂O como inhibidor de elastasa, en particular inhibidor de HNE, se basa en general en modificaciones en la energía de enlace de los puentes de hidrógeno, cuando átomos de hidrógeno de tales enlaces se sustituyen por átomos de deuterio. Para proteínas y enzimas, esto es significativo en múltiples aspectos. Los enlaces de puente de hidrógeno (puentes de H) estabilizan su estructura terciaria y cuaternaria e influyen por tanto en la disposición espacial de las zonas (dominios) individuales entre sí así como en sus modificaciones (funcionales) mediante plegamientos.

Por la estructura terciaria de una proteína se entiende la estructura espacial de proteínas superior a la estructura secundaria (cadena de aminoácidos), es decir la estructura tridimensional completa de la cadena de aminoácidos, que es imprescindible para la función biológica de la proteína. En el plegamiento de la cadena de aminoácidos para dar la estructura tridimensional de la proteína se disponen las regiones hidrófobas en el interior de la proteína, mientras que las regiones hidrófilas apuntan hacia fuera y por tanto están orientadas hacia el entorno acuoso de la proteína. La estabilización de la estructura terciaria de una proteína tiene lugar a través de diferentes enlaces: los puentes disulfuro, enlaces iónicos, enlaces de puente de hidrógeno así como interacciones hidrófobas.

La estructura cuaternaria está compuesta por la superposición de varias moléculas proteicas para dar un complejo funcional. Esta superposición tiene lugar a través de interacciones no covalentes: enlaces de puente de hidrógeno entre enlaces peptídicos y cadenas laterales, enlaces iónicos y fuerzas de van der Waals. La superposición de subunidades en regiones hidrófobas, por consiguiente de regiones en el interior de la proteína, tiene lugar en primera línea a través del efecto hidrófobo.

Mediante modificaciones de las energías de enlace de los puentes de hidrógeno y por tanto la estabilización de la proteína o enzima mediante puentes de H de la estructura terciaria y cuaternaria, la elastasa, en particular la HNE, puede lograr una conformación, que impide estéricamente o hace que se desfavorable desde el punto de vista energético la unión a un sustrato. La consecuencia es una inhibición parcial o completa de su actividad.

Además, en muchos casos los puentes de H están implicados en la unión de sustratos y su modificación mediante enzimas. A este respecto, una modificación de la energía de enlace puede presentar muchas repercusiones, que pueden provocar como consecuencia una modificación de la ruta de reacción y/o de la velocidad de reacción. Como se ha mencionado, las elastasas pertenecen a la familia de las serina proteasas y se caracterizan por una especificidad por restos alifáticos de cadena ramificada a P1 (sustrato). La triada catalítica de la enzima HNE está compuesta por restos Ser 195, His 57 y Asp 102 (numeración de quimotripsina, para nomenclatura véase Greer J Comparative modeling methods: Application to the family of the mammalian serine proteases. Proteins Struct Funct Genet, 1990, 7:317-334) y un "hueco" de oxianión en la región de captación de sustrato. El sustrato se une formando un complejo de Michaelis, exponiéndose el grupo carbonilo del enlace amida que va a cortarse al grupo hidroxilo de la Ser 195 y sometándose a una catálisis básica mediante la cadena lateral de imidazol de la His 57. El producto intermedio tetraédrico resultante se estabiliza mediante puentes de hidrógeno, que lo unen a la estructura principal de NH de Ser 195 y Gly 193. A continuación tiene lugar una hidratación en el complejo, con lo que se forma un segundo producto intermedio tetraédrico y finalmente se descompone mediante una catálisis favorecida por ácido a través de His 57, regenerándose la Ser 195 y el fragmento N-terminal del sustrato cortado. El hidrógeno está implicado en este proceso catalítico en tres etapas esenciales. En primer lugar en la formación de un puente de H entre Ser 195 y His 57, que no tiene lugar hasta la unión del sustrato, y que es decisiva para la eficacia catalítica de la triada (Perona J J y C S Craik, Structural basis of substrate specificity in the serine proteases, Protein Science (1995), 4:337-360). Además, en la formación de los puentes de H para la estabilización de los productos intermedios y finalmente en la hidratación catalítica en el complejo. Dado que los enlaces de puente de deuterio (puentes de D) presentan una energía de enlace significativamente diferente en comparación con los puentes de H (el neutrón adicional en el deuterio limita algunos grados de libertad de alta frecuencia en el intervalo de frecuencia de los petahercios (10^{15} Hz), con lo que los puentes de D presentan entre otros unas distancias de enlace ligeramente reducidas), se perturba el efecto catalítico de His 57 así como la unión a través de puentes de D a Ser 195 y Gly 193. La conversión catalítica se ralentiza o se inhibe completamente.

Un mecanismo de acción adicional son las energías de enlace y las distancias de enlace modificadas mediante la sustitución hidrógeno-deuterio en los puentes de H necesarios para la unión al sustrato. De este modo o bien se dificulta o bien se impide la unión específica de sustratos. Por otro lado, determinados sustratos pueden unirse tan firmemente a la enzima, que bloquean la triada catalítica y de ese modo inhiben la actividad catalítica de la enzima.

Un tercer mecanismo de acción es la sustitución del hidrógeno en el puente de H entre His 57 y Asp 102 mediante un deuterón. La modificación en la energía de enlace y la distancia de enlace conduce de manera eficaz a una rotura de este enlace en la triada catalítica. Las consecuencias de una ruptura de enlace de este tipo se han investigado exhaustivamente mediante simulaciones de dinámica molecular (MD) y mostraron claramente que mediante una rotura del enlace se pierde la conformación catalíticamente productiva de la triada (E Lau y T C Bruce, Consequences of Breaking the Asp-His Hydrogen Bond of the Catalytic Triad: Effects on the Structure and Dynamics of the Serine Esterase Cutinase, Biophysical Journal vol. 77, 1999 85-98).

La alta especificidad del óxido de deuterio como inhibidor de elastasa según la invención, que se muestra anteriormente en detalle para la HNE, se consigue por un lado mediante los mecanismos de acción individuales enumerados, por otro lado sin embargo sobre todo mediante la interacción intensificadora de todos los mecanismos. La HNE se diferencia de las tripsina, metalo y quimotripsinaproteasas en relación con la especificidad por el sustrato porque para la HNE ésta no está determinada adicionalmente por motivos de unión alejados de S1 (es decir S2-S4). Por tanto, en los puentes de H y sus modificaciones mediante la sustitución de deuterio en la región de S1 de la HNE recae una importancia esencialmente mayor para la unión a sustrato específica que en las tripsina, quimotripsina y metaloproteasas. De esta manera, D2O puede inhibir específicamente la acción de la HNE. El mecanismo de acción descrito para HNE puede aplicarse a otras elastasas.

Según la invención, mediante la administración de D2O se consigue que las energías de enlace y las distancias de enlace de los enlaces de puente de hidrógeno estabilizantes de elastasas, sobre todo de la HNE, se modifiquen mediante la sustitución de átomos de hidrógeno por átomos de deuterio. Mediante esta mayor intensidad de enlace se modifica la conformación de la enzima, lo que conduce a la inactivación parcial o completa de su actividad catalítica. En otras palabras, la actividad enzimática de la HNE se inhibe completa o parcialmente. La especificidad por elastasas, o por HNE, se consigue mediante la triada característica descrita (Ser 195/His 57/Asp 102) y la modificación de la conformación de la enzima (mediante sustitución de átomos de hidrógeno por átomos de deuterio). Por consiguiente, D2O es según la invención un inhibidor de elastasa eficaz y específico, sobre todo un inhibidor de la HNE, y por consiguiente es eficaz en la profilaxis y/o terapia de enfermedades, que están asociadas con una actividad elastasa inespecífica o incontrolada, sobre todo la actividad de la elastasa de neutrófilos humana.

La presente invención se refiere a óxido de deuterio para su utilización en la profilaxis y/o terapia de enfermedades pulmonares asociadas a la elastasa, seleccionadas de entre el grupo constituido por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, bronquitis crónica, fibrosis pulmonar, síndrome respiratorio agudo, enfisema pulmonar y hemorragia, impidiéndose o inhibiéndose la actividad de la elastasa.

En una forma de realización preferida, en el caso de la elastasa se trata de la elastasa de neutrófilos humana (HNE).

Una forma de realización dada a conocer se refiere a la utilización de óxido de deuterio como inhibidor de elastasa y en particular como inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana (HNE) para la profilaxis y/o terapia de enfermedades asociadas a HNE.

Una forma de realización dada a conocer se refiere a la utilización de óxido de deuterio como inhibidor de elastasa y en particular como inhibidor de la elastasa de neutrófilos humana (HNE) para la producción de un fármaco para la profilaxis y/o terapia de enfermedades asociadas a HNE.

En lo sucesivo, el término "utilización según la invención" comprende la utilización de D2O como inhibidor de elastasa y en particular como inhibidor de HNE así como la utilización de D2O como inhibidor de elastasa y en particular como inhibidor de HNE para la profilaxis y/o terapia de enfermedades asociadas a HNE.

Los términos "profilaxis y/o terapia" designan según la invención cada una de las medidas adecuadas para el tratamiento de una enfermedad asociada a la elastasa o HNE, que o bien representan un tratamiento preventivo de una enfermedad de este tipo que surja o de sus síntomas que surjan o que se evite una recaída de una enfermedad de este tipo, por ejemplo tras un periodo de tiempo de tratamiento terminado (profilaxis) o bien representan el tratamiento de los síntomas de una enfermedad ya declarada de este tipo (terapia).

Por "enfermedades asociadas a la elastasa" o "enfermedades asociadas a HNE" debe entenderse según la invención un cuadro clínico patológico, que se refleja mediante una reacción enzimática incontrolada o inespecífica o una actividad de una elastasa o de la elastasa de neutrófilos humana (HNE), teniendo lugar la reacción o actividad de la enzima en particular en un grado demasiado elevado.

Un "inhibidor" en el sentido de la invención designa una sustancia que impide, retarda o inhibe la reacción enzimática o la actividad de una elastasa y en particular de la enzima elastasa de neutrófilos humana (HNE). Un impedimento o inhibición de la HNE es preferentemente reversible. Los términos "sustancia", "compuesto", "molécula" y "principio activo" se utilizan como sinónimos en el sentido de la invención.

Una forma de realización preferida de la presente invención se refiere a continuación a la utilización según la invención de óxido de deuterio, en la que se impide o se inhibe la actividad de la elastasa y en particular de la elastasa de neutrófilos humana (HNE).

Por el término "impedir" o "impedimento" según la invención debe entenderse que la actividad enzimática de la elastasa y en particular de la elastasa de neutrófilos humana (HNE) se ralentiza (retarda) y/o se reduce, preferentemente hasta aproximadamente el 5%, preferentemente hasta aproximadamente el 10%, de manera igualmente preferible hasta aproximadamente el 20%, más preferentemente hasta aproximadamente el 30%, de manera igualmente más preferible hasta aproximadamente el 40%, aún más preferentemente hasta aproximadamente el 50%, lo más preferentemente hasta aproximadamente el 60% con respecto a la actividad enzimática de la elastasa y en particular de la HNE sin la administración de D2O.

El término "inhibir" o "inhibición" según la invención significa que la actividad enzimática de la elastasa y en particular de la elastasa de neutrófilos humana (HNE) se ralentiza (retarda) y/o se reduce, preferentemente más de un 50%, de manera igualmente preferible hasta aproximadamente un 60%, además preferentemente hasta aproximadamente un 65%, preferentemente hasta aproximadamente un 70%, de manera igualmente preferible hasta aproximadamente un 80%, más preferentemente hasta aproximadamente un 90%, de manera igualmente más preferible hasta aproximadamente un 95%, aún más preferentemente hasta aproximadamente un 98%, lo más preferentemente hasta un 100% con respecto a la actividad enzimática de la elastasa y en particular de la HNE sin administración de

D2O.

Una forma de realización dada a conocer se refiere a la utilización de D2O para la profilaxis y/o terapia de enfermedades asociadas a la elastasa y en particular asociadas a HNE, en las que se trata de enfermedades inflamatorias, enfermedades pulmonares, enfermedades cardiacas y/o enfermedades vasculares y/o enfermedades alérgicas.

En el caso de las enfermedades inflamatorias dadas a conocer se trata preferentemente de una inflamación de la piel, de la mucosa nasal, de la mucosa bucal, en particular de enfermedades aftosas de la mucosa bucal, de la conjuntiva, de los senos paranasales o rinitis alérgica, asma, vasculitis cutánea, vasculitis pulmonar, peritonitis o choque septicémico.

En el caso de las enfermedades inflamatorias dadas a conocer se trata preferentemente de una inflamación de la piel, seleccionada de entre el grupo constituido por dermatosis neutrofílicas, tales como pustulosis palmoplantar, dermatosis pustulosa subcórnea (enfermedad de Sneddon-Wilkinson), dermatosis ampollosa autoinmunitaria, penfigoide, tales como penfigoide ampolloso, penfigoide vulgar, penfigoide vegetante y penfigoide foliáceo.

En el caso de las enfermedades pulmonares en el sentido de la presente invención se trata preferentemente de una enfermedad pulmonar, seleccionada de entre el grupo constituido por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, bronquitis crónica, fibrosis pulmonar, síndrome respiratorio agudo, enfisema pulmonar y hemorragia.

En el caso de las enfermedades cardiacas y/o enfermedades vasculares dadas a conocer se trata preferentemente de una enfermedad cardiaca y/o enfermedad vascular, seleccionada de entre el grupo constituido por infarto de miocardio, isquemia cerebral, insuficiencia cardiaca y síndrome coronario agudo.

En el caso de las enfermedades alérgicas dadas a conocer se trata preferentemente de una enfermedad alérgica, seleccionada de entre el grupo constituido por alergia al polvo, alergia a los ácaros, alergia al polen de las plantas y asma alérgica.

La profilaxis y/o terapia eficaz de enfermedades asociadas a la elastasa y en particular asociadas a HNE puede conseguirse en particular mediante la administración de un principio activo farmacéutico, más concretamente de un inhibidor, que teniendo en cuenta el tipo de su administración, presenta preferentemente todas las propiedades siguientes:

- a) en el caso de inhibidores de elastasa y en particular inhibidores de HNE que van a administrarse por vía tópica: una aplicabilidad local mediante administración tópica a lo largo de un periodo de tiempo de cualquier duración y con una elevada cinética de transporte percutánea del principio activo (lo correspondiente es aplicable a la administración parenteral);
- b) en el caso de inhibidores de elastasa y en particular inhibidores de HNE que van a administrarse mediante un aerosol: capacidad de transporte al pulmón o a la nariz en cada tamaño de partícula deseado para el control arbitrario o selectivo del principio activo (inhibidores de elastasa o de HNE) dentro del tejido pulmonar;
- c) una distribución en su mayor parte homogénea del principio activo en la región del sitio de acción así como que se eviten concentraciones excesivas locales;
- d) un enriquecimiento preferido del inhibidor de elastasa y en particular del inhibidor de HNE en la región del cuerpo en cuestión, en la medida de lo posible unido a un retardo del transporte a la circulación sanguínea, es decir a los vasos sanguíneos;
- e) una acción inhibidora, es decir una acción que impide o inhibe la actividad de la elastasa y en particular de la HNE en la zona del cuerpo en cuestión;
- f) una amplia tolerancia del inhibidor de elastasa y en particular el inhibidor de HNE en el tejido circundante no afectado patológicamente así como a la circulación sanguínea para evitar efectos secundarios, en particular en cuanto a reacciones inmunitarias.

El D2O, como principio activo o inhibidor de elastasa y en particular inhibidor de HNE, presenta ventajas considerables con respecto a los inhibidores de elastasa y en particular inhibidores de HNE conocidos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la elastasa o HNE, sobre todo mediante sus siguientes propiedades:

- 1) mediante la posibilidad de aplicar D2O por vía tópica sobre la piel, debido al elevado transporte cutáneo, percutáneo e intracutáneo del D2O en la piel puede alcanzarse una concentración suficientemente elevada para la eficacia terapéutica (de más del 20% con respecto al contenido de agua total de una célula) de D2O en la epidermis o dermis de la piel, sin que otros órganos del cuerpo se expongan a concentraciones de D2O

similarmente elevadas, tal como puede tener lugar en la administración sistémica. Con ello se soluciona un problema decisivo, discutido en el estado de la técnica, de alcanzar concentraciones de D2O terapéuticamente eficaces en el sitio de acción (más del 20% de D2O con respecto al contenido de agua total de la célula) sin fuertes efectos secundarios para otros órganos o tejido cutáneo circundante sano. La base para esto es el transporte dirigido de D2O a través del estrato córneo de la piel hasta la epidermis o dermis;

- 2) el estado de agregación del D2O en el caso de una administración tópica puede ser líquido, gaseoso o sólido. El transporte a la piel puede tener lugar mediante el contacto directo del D2O o una formulación que contiene D2O con la piel e indirectamente mediante difusión a través de una capa intermedia (por ejemplo aire, membrana porosa, red polimérica);
- 3) para la administración de D2O líquido puro solo (D2O puro), debe explicarse que el D2O presenta una ventaja única con respecto a todos los demás principios activos farmacéuticos líquidos. Puede transportarse a la piel como agua normal (H2O) y mediante la intensidad y el sentido del gradiente osmótico y una manipulación de estas dos magnitudes puede adaptarse además la profundidad de penetración del D2O en la piel a la finalidad terapéutica;
- 4) para la administración de D2O como aerosol, debe explicarse que la tensión superficial del D2O es prácticamente idéntica a la del H2O y se permite la generación de aerosoles de D2O con tamaños de partícula controlables de manera dirigida en el intervalo de 0,1 a 10 µm. Para ello pueden utilizarse, por ejemplo, pero no exclusivamente, procedimientos establecidos de la técnica de pulverización mecánica. Mediante la selección dirigida del tamaño de partícula pueden hacerse pasar los aerosoles de D2O por medio de inhalación a prácticamente cualquier región del pulmón. Allí se acumularía en primer lugar en los alveolos y a continuación se transportaría como agrupación de moléculas o molécula individual de D2O a través de la barrera al tejido pulmonar. Por tanto mediante la selección de tamaño de las partículas de D2O es posible una introducción dirigida (optimización del sitio de acción) del principio activo D2O para determinadas regiones del pulmón.
- 5) para la administración de D2O como aerosol debe explicarse además que los aerosoles de D2O presentan una ventaja única con respecto a todos los demás principios activos farmacéuticos líquidos que pueden aerosolizarse. Mientras que en todos los demás casos deben añadirse excipientes para transportar al pulmón el principio activo farmacéutico de manera estable a través del aerosol, esto no es necesario en el caso del D2O, dado que ya puede aerosolizarse de manera óptima como molécula pura sin aditivos. Por tanto se excluyen las segregaciones que perjudican la eficacia en el pulmón, tal como pueden aparecer en otras mezclas de sustancias (principio activo/excipiente) en el transcurso de la aerosolización así como los efectos secundarios provocados por los excipientes. Por "aerosolizable" o "capacidad de aerosolización" debe entenderse la posibilidad básica de convertir una sustancia por medio de procedimientos, que son estado de la técnica, en un aerosol con un tamaño de partícula controlable.

Según la invención, no sólo se muestra el efecto de D2O como inhibidor de elastasa y en particular inhibidor de HNE, sino también, que la administración de una combinación de D2O con un principio activo farmacéutico adicional, preferentemente un inhibidor de proteasas adicional, preferentemente un inhibidor de serina proteasa, pueden aumentar además este efecto. Igualmente, la utilización de D2O puede tener lugar, adicionalmente o en lugar de un principio activo farmacéutico adicional, junto con un principio activo no farmacéutico adicional.

Una forma de realización más preferida se refiere a la utilización según la invención de óxido de deuterio, utilizándose el óxido de deuterio en combinación con al menos un principio activo farmacéutico adicional y/o al menos un principio activo no farmacéutico adicional. Una combinación de este tipo a partir de D2O y al menos un principio activo farmacéutico adicional y/o al menos un principio activo no farmacéutico adicional se denomina a continuación "combinación según la invención".

Todas las utilizaciones y administraciones o vías de administración de D2O según la invención dadas a conocer en esta descripción pueden aplicarse igualmente de manera ilimitada a una combinación según la invención, siempre que no se indique lo contrario.

El término principio activo "farmacéutico" designa en el sentido de la presente invención cada sustancia inorgánica u orgánica cualquiera a la que se le atribuye un efecto farmacológico. También deben considerarse principio activo farmacéutico según de la presente invención el D2O así como otros inhibidores de elastasa y en particular de HNE.

El término principio activo "no farmacéutico" designa en el sentido de la invención cada sustancia aceptable farmacológicamente y terapéuticamente útil, que no sea un principio activo farmacéutico, pero que puede formarse junto con el principio activo farmacéutico en la composición farmacéutica, para influir en, en particular mejorar, las propiedades cualitativas de la composición farmacéutica. Preferentemente, los principios activos no farmacéuticos no muestran ningún efecto o en cuanto a la terapia pretendida ningún efecto digno de mención o al menos ningún efecto farmacológico no deseado.

Los objetivos estratégicos de estas adiciones de principios activos farmacéuticos y/o no farmacéuticos adicionales radican en la potenciación del efecto inhibitor de HNE y/o la mejora de la compatibilidad de D2O.

5 La concentración de principios activos farmacéuticos adicionales utilizados según la invención además del D2O como principio activo farmacéutico con respecto a la disolución total de una combinación según la invención se encuentra en el intervalo de desde al menos 10^{-8} M hasta al menos $5 \cdot 10^{-2}$ M, preferentemente desde al menos 10^{-7} M hasta 10^{-3} M, lo más preferentemente desde al menos 10^{-6} M hasta al menos 10^{-2} M. Un intervalo de concentración preferido en particular se encuentra en el intervalo de desde al menos 10^{-9} M hasta al menos 10^{-2} M.

10 A continuación se exponen principios activos farmacéuticos y no farmacéuticos adicionales preferidos según la invención y su acción, no limitándose la presente invención a los mismos:

15 Principios activos farmacéuticos adecuados son en particular: sulfonamidas, antibióticos (en particular penicilina), corticoides, alquilfluorofosfatos, clorometilcetonas, fluoruros de sulfonilo, trifluorometilcetonas, ésteres de ácido bórico, aldehídos, péptidos de cadena corta (en particular péptidos con menos de 10 aminoácidos), agentes citostáticos, agentes quimioterápicos, principios activos sintéticos y vegetales con acción antiinflamatoria.

20 Principios activos no farmacéuticos adecuados son por ejemplo ácidos o bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, polímeros, copolímeros, copolímeros de bloque, monosacáridos, polisacáridos, lípidos o tensioactivos iónicos y no iónicos, sales farmacológicamente inocuas, por ejemplo cloruro de sodio, aromatizantes, vitaminas, por ejemplo vitamina A o vitamina E, tocoferoles o vitaminas o provitaminas similares que se producen en el organismo humano, antioxidantes, tal como por ejemplo ácido ascórbico, así como estabilizadores y/o conservantes para prolongar la duración de utilización y conservación de un principio activo farmacéutico o formulación y otros principios activos no farmacéuticos o excipientes y aditivos habituales conocidos en el estado de la técnica, así como mezclas de los mismos. Principios activos no farmacéuticos preferidos según la invención
25 adicionales son en particular todas las sustancias que pueden formar geles acuosos, tales como por ejemplo polímeros solubles en agua naturales o sintéticos, que pueden formar redes.

30 Según la invención se exponen principios activos no farmacéuticos adicionales preferidos y su acción, no limitándose la presente invención a los mismos:

- Excipientes y aditivos solubles en agua

35 Mediante la adición de excipientes y aditivos solubles en agua, tales como por ejemplo ácidos, bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, sales y/o sustancias tampón para ajustar el valor de pH, puede mejorarse la compatibilidad fisiológica del D2O en el pulmón. Ejemplos de ácidos inorgánicos preferidos son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, prefiriéndose en particular ácido clorhídrico y ácido sulfúrico. Ejemplos de ácidos orgánicos especialmente adecuados son ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico y en particular preferentemente ácido ascórbico, ácido fumárico y ácido cítrico. Dado el caso pueden utilizarse también mezclas de dichos ácidos, en particular de ácidos que, además de sus propiedades de acidificación, presentan también otras propiedades, por ejemplo utilizándose como aromatizantes o antioxidantes, tales como por ejemplo ácido cítrico o ácido ascórbico. Ejemplos de bases farmacéuticamente
40 aceptables son hidróxidos alcalinos, carbonatos alcalinos e iones alcalinos, preferentemente sodio. Pueden utilizarse mezclas de estas sustancias en particular para ajustar y tamponar el valor de pH, prefiriéndose especialmente a este respecto hidrogenofosfato de potasio y dihidrogenofosfato de potasio así como hidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de sodio. Sustancias tampón preferidas en el sentido de la invención son además PBS, HEPES, TRIS, MOPS así como sustancias fisiológicamente aceptables
45 adicionales con un valor de pK en el intervalo de 5,0 a 9,0.

50 La concentración de estas sustancias, con respecto a la disolución total, se encuentra preferentemente en el intervalo de desde micromolar hasta milimolar, de manera especialmente preferible en el intervalo de 1-100 mM.

- Moléculas no citotóxicas, solubles en agua

60 Mediante la adición de moléculas no citotóxicas, solubles en agua, tal como por ejemplo determinados polímeros (por ejemplo, no limitados a los mismos, dextrano, polietilenglicol, celulosa, ácido hialurónico), copolímeros y copolímeros de bloque, por su elevada capacidad de retención de agua, puede conseguirse un retardo adicional del paso del D2O a la circulación sanguínea. Para el caso de la utilización según la invención de D2O como aerosol, por la capacidad de los polímeros de modificar la densidad y/o viscosidad de D2O, puede modificarse y mejorarse u optimizarse además la estabilidad de las partículas de D2O así como su transporte a los alveolos del pulmón.

65 La concentración de estas sustancias, con respecto a la disolución total, se encuentra en el intervalo de desde milimolar hasta molar, preferentemente en el intervalo de 1-500 mM.

- Moléculas no poliméricas, solubles en agua

5 Mediante la adición de moléculas no poliméricas, solubles en agua, que modifican la densidad y/o viscosidad de D2O, por ejemplo, pero sin limitarse a los mismos, monosacáridos y polisacáridos, en particular glucosa, sacarosa, dextrosa, maltosa, almidón y celulosa, puede modificarse y mejorarse u optimizarse el transporte de D2O (y en el caso de la utilización según la invención de D2O como aerosol modificarse y mejorarse u optimizarse la estabilidad de las partículas de D2O en los alveolos del pulmón).

10 La concentración de estas sustancias, con respecto a la disolución total, se encuentra preferentemente en el intervalo de desde milimolar hasta molar, de manera especialmente preferible en el intervalo de 1,0 mM a 1,5 M.

- Sustancias modificadoras de la tensión superficial de D2O

15 Mediante la adición de sustancias, que modifican la tensión superficial de D2O, por ejemplo, pero sin limitarse a los mismos, lípidos o tensioactivos iónicos y no iónicos, en particular una mezcla de lípidos y tensioactivos, que se denominan en la bibliografía de manera resumida tensioactivos pulmonares, puede modificarse la naturaleza fisicoquímica, en particular la capacidad de agregación de las partículas de D2O, por ejemplo aerosol. Esto, por ejemplo en el caso de la utilización según la invención de D2O como aerosol, puede aprovecharse para una modificación de la estabilidad y del transporte de las partículas al tejido pulmonar. Además las moléculas de este tipo, en combinación con principios activos farmacéuticos difícilmente solubles en D2O, pueden adoptar la función de un solubilizante y por tanto, entre otros, pero sin limitarse a esto, pueden posibilitar el transporte de cantidades mayores de principio activo farmacéutico por dosis, por ejemplo por partícula de aerosol.

25 La concentración de estas sustancias, con respecto a la disolución total, se encuentra preferentemente en el intervalo de desde micromolar hasta milimolar, de manera especialmente preferible en el intervalo de 1-500 mM.

30 El D2O utilizado según la invención se encuentra preferentemente como líquido. Preferentemente, el D2O se encuentra en disolución, preferentemente con H2O (agua) como disolvente, y se denomina en la presente memoria también "disolución de D2O/H2O", cuando contiene H2O, o se denomina "disolución de D2O" o "D2O puro", cuando no contiene nada de H2O. El D2O puro contiene D2O preferentemente en un intervalo de concentración de desde el 98,1 hasta el 100%, preferentemente desde el 98,5 hasta el 99,9%, de manera especialmente preferible del 99,7% con respecto al contenido de agua total de la disolución. Una disolución de D2O/H2O según la invención contiene D2O preferentemente en un intervalo de concentración de desde el 1 hasta el 98%, preferentemente desde el 5 hasta el 95%, además preferentemente desde el 10 hasta el 90%, de manera igualmente preferible desde el 15 hasta el 80%, más preferentemente desde el 20 hasta el 70%, de manera igualmente más preferible desde el 30 hasta el 60%, lo más preferentemente desde el 40 hasta el 50%, refiriéndose estos datos al contenido de agua total de la mezcla de D2O y H2O.

45 La producción de una disolución de D2O/H2O, disolución de D2O y análogas de las mismas según la invención de una combinación según la invención tiene lugar por ejemplo mezclando los componentes, en particular de D2O, dado el caso H2O así como dado el caso del al menos un principio activo farmacéutico y/o no farmacéutico adicional. Además, dado el caso puede añadirse mediante mezclado un disolvente, tal como se describe a continuación. Preferentemente, la adición de H2O o del al menos un principio activo farmacéutico y/o no farmacéutico adicional o del disolvente a D2O tiene lugar en estado de agregación líquido. Sin embargo, la producción puede conseguirse mediante cualquier procedimiento adecuado.

50 Todas las utilizaciones y administraciones de D2O según la invención dadas a conocer en esta descripción pueden aplicarse sin limitación tanto a disoluciones de D2O/H2O como a disoluciones de D2O, siempre que no se indique lo contrario. Igualmente, las utilizaciones según la invención de disoluciones de D2O/H2O así como disoluciones de D2O también se emplean sin limitación en las combinaciones según la invención, sistemas de capas, apósitos y vendajes, formulaciones y aerosoles siempre que no se indique lo contrario.

La utilización según la invención de D2O puede, tal como se describe más detalladamente a continuación, tener lugar igualmente como aerosol, vapor o formulación, en particular como crema, pomada, gel o hidrogel.

60 En una formación de realización dada a conocer, el al menos un principio activo farmacéutico adicional o principio activo no farmacéutico adicional está unido a D2O. "Unido" en el sentido de la presente invención significa que el principio activo farmacéutico o no farmacéutico se hidrata con el D2O.

65 En formas de realización dadas a conocer adicionales, el D2O o la combinación según la invención está contenido en un disolvente adecuado. Un disolvente dado a conocer puede ser un disolvente inorgánico u orgánico. Disolventes adecuados de la presente invención preferentemente deben ser fisiológicamente muy compatibles con

el organismo (en particular mamífero), al que se le administra el principio activo con disolvente, es decir no desencadenar ningún efecto secundario, por ejemplo efectos secundarios tóxicos. Un disolvente dado a conocer en particular es agua destilada. Igualmente se dan a conocer mezclas de etanol-agua; a este respecto la proporción en masa porcentual de etanol en estas mezclas se encuentra preferentemente en el intervalo de entre el 5% y el 99% de etanol, de manera igualmente preferible en el intervalo de desde el 10% hasta el 96% de etanol, más preferentemente entre el 50% y el 92%, lo más preferentemente entre el 69% y el 91% de etanol.

La administración de D2O puede tener lugar según la invención por vía tópica, transdérmica, nasal, rectal, parenteral, a través de una perfusión, de un endoscopio o como aerosol o formulación de polvo seco.

Las administraciones tópicas y transdérmicas tienen lugar mediante la aplicación de D2O sobre la piel, preferentemente como líquido que contiene D2O (disolución de D2O, disolución de D2O/H₂O), gas (aerosol o vapor), formulación, preferentemente como pomada, crema, loción o emulsión, o como gel o hidrogel que contiene D2O. Estas formas de administración pueden tener lugar preferentemente a través de un apósito o un vendaje.

Una administración nasal tiene lugar preferentemente a través de un polvo que contiene D2O o formulación líquida que contiene D2O, que se vierte gota a gota en la nariz o se inspira.

Una administración rectal tiene lugar preferentemente a través de un supositorio que contiene D2O o a través de una inyección de una formulación líquida que contiene D2O.

Una administración parenteral tiene lugar preferentemente como inyección o infusión de una formulación de D2O y comprende por ejemplo administración intravenosa, intraarticular, intraarterial, intralinfática, subcutánea, intracutánea, intrapulmonar, intraperitoneal, intracardiaca, intratecal, intrapleural, intravítrea.

Una administración a través de una perfusión tiene lugar según la invención preferentemente en el caso de enfermedades cardíacas y/o vasculares.

Una administración a través de un endoscopio tiene lugar según la invención preferentemente en el caso de enfermedades pulmonares.

La administración puede tener lugar además por vía inhalatoria, por ejemplo como aerosol o por vía endobronquial (a través de una sonda).

Una administración tópica o transdérmica preferida según la invención de D2O es en particular ventajosa en el caso de las enfermedades inflamatorias de la piel descritas y en el caso de enfermedades alérgicas. En el caso de la administración tópica o transdérmica preferida según la invención pueden utilizarse sobre la piel concentraciones de D2O terapéuticamente eficaces, localmente elevadas y al mismo tiempo reducirse o evitarse completamente las cargas del sistema (es decir de la circulación sanguínea) y los efectos secundarios en tejido cutáneo sano, que no debe tratarse, así como tejido de otros órganos (tal como por ejemplo el hígado o riñón, que pueden provocarse por una concentración elevada de D2O de más del 20% de D2O, con respecto al contenido de agua total de la célula).

Un transporte de D2O desde las células de la piel al sistema puede además evitarse o limitarse con medios que se conocen ampliamente en el estado de la técnica. Ejemplos de estos medios son, entre otros, la manipulación dirigida del gradiente osmótico a través de la piel (es decir entre la parte sistémica y la superficie de la piel) mediante la reducción del potencial hídrico del D2O aplicado por vía tópica por medio de sustancias que son adecuadas para modificar este potencial hídrico, en particular sales fisiológicamente aceptables, tales como cloruro de sodio, polímeros solubles en agua y otras sustancias no farmacéuticas.

La administración tópica de D2O puede tener lugar igualmente a través de un apósito o un vendaje. Por tanto, según la invención se da a conocer en particular la utilización según la invención de D2O, aplicándose el D2O con un o a través de un apósito o un vendaje por vía tópica.

Por "apósitos" o "vendajes" en el sentido de la invención deben entenderse todos los dispositivos que pueden fijarse sobre la piel mediante interacción mecánica o química, fisiorción, adhesión u otros procesos fisicoquímicos, que son adecuados para cubrir una zona seleccionada de entre la piel de manera oclusiva o no oclusiva a lo largo de un periodo de tiempo con una duración adecuada para el tratamiento pretendido y posibilitar y/o favorecer el suministro de D2O a la piel. En el estado de la técnica se conocen ampliamente los apósitos y vendajes que van a aplicarse según la invención como sistemas de aplicación para la liberación local de principios activos sobre la piel (por ejemplo apósitos de calor) así como para la liberación sistémica controlada de principios activos (por ejemplo apósitos de reserva de opiáceos, apósitos de reserva de nitroglicerina). Por "apósito de reserva" o "vendaje de reserva" debe entenderse, además de las propiedades descritas anteriormente, la capacidad del apósito o del vendaje de almacenar D2O y su entrega controlada a la piel a lo largo de un periodo de tiempo de días o semanas. Tales apósitos de reserva o vendajes de reserva están comprendidos a continuación en los términos apósito o vendaje.

En general, para cada liberación controlada de D2O a la piel debe tenerse en cuenta el siguiente problema: la liberación desde un líquido o formulación aplicado directamente sobre la piel tal como pomada, crema o gel puede verse dificultado por el sentido del gradiente osmótico dentro de la piel desde dentro hacia fuera, dado que el D2O en el líquido, pomada, crema o en el gel presenta eventualmente un menor potencial hídrico que el H2O en la piel y en los vasos que se encuentran por debajo de la misma.

Por tanto, una forma de realización dada a conocer de aplicación tópica de D2O es regular y por tanto controlar mediante una manipulación dirigida de las relaciones osmóticas en la región de la piel que va a tratarse la profundidad o el grado de penetración del D2O en la piel, preferentemente hasta la epidermis o hasta la dermis. Esto puede conseguirse mediante la composición seleccionada de entre una combinación según la invención aplicada, añadiendo sustancias que pueden modificar las relaciones osmóticas en la superficie de la piel.

Una posibilidad adicional para la penetración controlada de D2O en la piel consiste en la utilización de una o varias membranas o láminas, que permiten el paso de agua y gases, pero impiden el paso de partículas o moléculas más grandes (incluyendo bacterias, virus, organismos unicelulares). En el estado de la técnica se conocen ejemplos de tales membranas y láminas que pueden utilizarse y presentan numerosas aplicaciones, tal como por ejemplo en materiales textiles con los nombres comerciales GORE Tex® o en la medicina las denominadas biopelículas o apósitos transpirables tales como, por ejemplo, Tegaderm®.

Por consiguiente se da a conocer la utilización de D2O según la invención, aplicándose el D2O por vía tópica con un apósito o un vendaje, utilizándose el apósito o el vendaje en combinación con al menos una membrana o al menos una lámina. Preferentemente la al menos una membrana o la al menos una lámina es una membrana o lámina micro o nanoporosa.

Una disposición dada a conocer a modo de ejemplo para una utilización tópica según la invención de este tipo de D2O está compuesta por los siguientes componentes:

- una membrana o lámina micro o nanoporosa descrita anteriormente, que se aplica directamente sobre la piel,
- seguida de una capa de D2O, que contiene el D2O,
- dado el caso seguida de una denominada capa oclusiva, que impide o regula una evaporación del D2O hacia fuera y al mismo tiempo representa una protección mecánica, que impide el escape de D2O como líquido y
- seguida de un apósito o un vendaje.

Una disposición a modo de ejemplo adicional para una utilización tópica de D2O según la invención de este tipo está compuesta por los siguientes componentes:

- una membrana o lámina micro o nanoporosa descrita anteriormente, que se aplica directamente sobre la piel,
- seguida de una capa de D2O, que contiene el D2O,
- dado el caso seguida de una denominada capa oclusiva, que impide o regular una evaporación del D2O hacia fuera y al mismo tiempo representa una protección mecánica, que impide el escape de D2O como líquido y
- seguida de una membrana o lámina micro o nanoporosa descrita anteriormente.

Cuando sea necesario pueden añadirse naturalmente capas de D2O adicionales, que contienen D2O, y que se separan mediante membranas o láminas, con lo que puede modificarse el efecto de reserva o el paso del D2O a la piel, por ejemplo la cantidad y/o duración de liberación de D2O. El término utilizado "capa de D2O" se refiere a una combinación según la invención líquida de una disolución de D2O, (D2O puro), disolución de D2O/H2O, así como a una formulación según la invención de D2O, en particular como crema, pomada, gel o hidrogel.

Igualmente, también pueden añadirse preferentemente capas que presentan propiedades químicas, eléctricas o térmicas, que son adecuadas para manipular el paso de D2O a la piel y/o la duración de su liberación. Ejemplos de las mismas son capas que son adecuadas para establecer y/o mantener un potencial eléctrico, termoeléctrico, térmico o químico (o una combinación de los mismos) por las capas y la piel que se encuentra bajo las mismas. Esto puede conseguirse por ejemplo mediante electrodos incrustados en las membranas o láminas descritas o que se encuentran sobre las mismas, que pueden alimentarse desde fuera con corriente (tensión continua, tensión alterna o corrientes de alta frecuencia) o que mediante la selección dirigida del material de electrodo generan con la capa de D2O como electrolito potenciales electroquímicos.

La totalidad de tales capas de D2O, capas oclusivas, capas con propiedades químicas, eléctricas o térmicas, membranas y láminas en cualquier número, combinación y disposición adecuados para el propósito de utilización

descritas anteriormente, se denomina a continuación "sistema de capas". Un sistema de capas de este tipo se utiliza preferentemente junto con un apósito (de reserva) o vendaje (de reserva) descrito anteriormente.

Mediante la variación de la morfología (tamaño de poro, grosor de membrana o de lámina, rugosidad superficial y perfil superficial) y las propiedades de superficie (por ejemplo hidrófila o hidrófoba, recubrimientos químicos (unidos covalentemente o unidos de manera adhesiva), grupos funcionales, enlace o intercalación de sustancias inorgánicas u orgánicas) de la membrana o lámina que se encuentra directamente en contacto con la piel puede influirse en o modificarse de manera dirigida el paso del D2O desde un apósito, vendaje o sistema de capas descrito a la piel.

Una variación adicional de la entrada del D2O en la piel es posible mediante la utilización dirigida de sustancias adhesivas, que pueden utilizarse para la fijación mecánica del apósito (de reserva) o del vendaje (de reserva) sobre la piel, pero que no son obligatoriamente necesarios. Las sustancias adhesivas utilizadas en general para aplicaciones tópicas de apósitos y vendajes presentan un carácter más bien hidrófobo, que puede impedir el paso de D2O a través de la capa de sustancia adhesiva. Mediante la adición de aditivos a la preparación de sustancia adhesiva puede conseguirse una modificación de estas propiedades. Como tales "aditivos" se tienen en cuenta sustancias orgánicas y/o inorgánicas y compuestos, que pueden modificar las propiedades de permeación del D2O a través de la capa de sustancia adhesiva. Ejemplos de tales sustancias son, entre otros, polímeros, copolímeros, polímeros de bloque, copolímeros de bloque, tensioactivos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, esteroides y esteroides.

En una forma de realización dada a conocer adicional, la utilización de D2O según la invención tiene lugar preferentemente con un apósito o un vendaje, por vía tópica sobre la piel a través de una disposición, que posibilita el paso de D2O a la piel en su mayor parte o exclusivamente a través de la fase de vapor. Es decir, el D2O utilizado según la invención como líquido se evapora como D2O molecular y entra en contacto con la piel como vapor. Por tanto, las concentraciones del D2O corresponden a las concentraciones descritas anteriormente de un líquido que contiene D2O. El D2O en forma de vapor presenta la ventaja de una penetración especialmente sencilla en la piel. Para provocar esta evaporación es necesaria energía térmica, que puede recibirse o bien de la propia piel o bien de una fuente de calor externa, por ejemplo en el caso de la utilización de un apósito o vendaje descrito o un sistema de capas descrito anteriormente un elemento de calentamiento eléctrico incorporado en los mismos (por ejemplo un elemento de calentamiento de Peltier). Además de esta energía térmica, mediante modificaciones dirigidas, por ejemplo de la selección de la morfología (en particular tamaño de poro y recubrimiento superficial), de una primera membrana o lámina del sistema de capas descrita anteriormente, que se encuentra sobre la piel puede conseguirse que sólo D2O en forma de vapor pueda atravesar la membrana o lámina hasta la piel, mientras que el D2O líquido se retiene. En esta forma de realización también pueden controlarse y/o modificarse la cantidad y la duración de la liberación de D2O a través de la fase de vapor, mediante las variaciones descritas anteriormente del sistema de capas y las correspondientes modificaciones en dado el caso membranas o láminas adicionales utilizadas.

Una administración de D2O preferida según la invención como aerosol es ventajosa en particular en el caso de las enfermedades pulmonares descritas, inflamaciones de los senos paranasales, de la mucosa nasal, rinitis alérgica, asma y asma alérgica y las otras enfermedades alérgicas.

Una administración de D2O preferida según la invención como aerosol tiene lugar a través de la inhalación de D2O. La inhalación de principios activos a través del pulmón de un organismo, preferentemente de un mamífero, es una técnica conocida desde hace años y cada vez más empleada para la liberación local y sistémica de estas sustancias. Se basa en el transporte de partículas en el intervalo de tamaño de desde algunos cientos de μm hasta pocos nm en el flujo de aire al inspirar, seguido de la deposición de las partículas en los alveolos pulmonares (alveolos), desde donde penetran entonces en el sistema y se transportan el sitio de acción dentro del organismo. En algunos casos el propio pulmón es también el sitio de acción. En lo sucesivo se denominan partículas según la invención todas las formaciones, moléculas o macromoléculas que se encuentran en el intervalo de tamaño de desde 0,005 μm hasta 100 μm , independientemente de si presentan un estado de agregación sólido o líquido. Las partículas se formulan a este respecto como aerosol y son respiradas (inhaladas) por el paciente, preferentemente a través de inhaladores adecuados (también denominados nebulizadores).

Por tanto además se da a conocer un aerosol que contiene D2O.

Por aerosol se entienden partículas suspendidas sólidas o líquidas con un diámetro de desde aproximadamente 0,0001 μm hasta aproximadamente 100 μm , en gases en particular en aire, pudiendo variar mucho la composición y la forma de los aerosoles. Los aerosoles pueden producirse artificialmente mediante procedimientos de dispersión y condensación ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Pueden utilizarse sin gas propelente o utilizarse junto con un gas comprimido licuado como gas propelente en pulverizadores. Los aerosoles se utilizan (con y sin gas propelente) a menudo en el campo de la medicina para las denominadas terapias con aerosol para el transporte de principios activos farmacéuticos al pulmón. Siempre que se utilice a continuación el término aerosol, éste se refiere a aerosoles medicinales. Las partículas farmacéuticamente activas más pequeñas en aerosoles son por ejemplo ácidos nucleicos, péptidos o proteínas, las partículas más grandes son por ejemplo partículas de vapor. A menudo los aerosoles se componen de mezclas de partículas de tamaños de partícula diferentes y de este modo representan una distribución de tamaño polidispersa.

La producción de aerosoles utilizados según la invención (con y sin disolvente) puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. A este respecto se conocen numerosos procedimientos convencionales.

5 La inhalación de los aerosoles tiene lugar por vía oral o por vía nasal por el organismo que va a tratarse, en particular un mamífero, y aspiraciones, preferentemente a través de un inhalador. Tras la inhalación de las partículas en el pulmón un determinado porcentaje de las partículas se desvía de la línea de corriente del aerosol y se pone así en contacto con la superficie húmeda de los espacios de aire. Este fenómeno se denomina en general deposición de partículas o deposición y está sujeto a tres mecanismos físicos:

- impactación, basada en la inercia de masa del aerosol, se presenta en partículas con un diámetro a partir de aproximadamente 3 μm ,
- 15 • sedimentación, basada en la fuerza gravitatoria de las partículas, tiene lugar en partículas con un diámetro de aproximadamente 0,5 a 1 μm y
- difusión, basada en el movimiento molecular browniano, aparece en partículas con un diámetro de aproximadamente menos de 1 μm .

20 La elección del tamaño de partícula de los principios activos farmacéuticos que van a transportarse es por tanto un factor decisivo para su mecanismo de deposición en el pulmón.

Los desarrollos más recientes en la técnica de inhalación pueden clasificarse en 2 puntos esenciales:

- 25 1.) la optimización de procedimientos de liberación en el sentido de un control amplio sobre las propiedades físicas de las partículas que van a inhalarse y
- 30 2.) la optimización de las formulaciones de principio activo utilizadas para la liberación en el sentido de una mejora de las propiedades coloidales de las partículas para la inhalación y su eficacia sistémica.

Bajo el punto 1) pueden resumirse todos los desarrollos de sistemas de pulverización o inhalación para cuerpos sólidos, líquidos y gases. Éstos se concentran en los sectores de pulverización mecánica, vaporización etc. con el objetivo de un control en particular del tamaño de partícula y la estabilidad de partícula. Los desarrollos bajo 2) comprenden mejoras del comportamiento de aglomeración de las partículas, sus propiedades de liberación y transporte en los alveolos pulmonares (alveolos) así como de la estabilidad del principio activo en las partículas.

40 Dado que las propiedades fisicoquímicas de las partículas (en particular tamaño, estabilidad, solubilidad en medio acuoso, carga de superficie, propiedades de unión, comportamiento de nucleación, propiedades de interfase) están influidas por el propio principio activo farmacéutico, para principios activos farmacéuticos especiales y sus formulaciones a menudo es necesario todavía una adaptación individual de los procedimientos de liberación. El resultado de un procedimiento de adaptación a menudo de larga duración de este tipo es (en vista del gran número de parámetros que hay que tener en cuenta) casi siempre un compromiso entre (i) las propiedades de inhalación, (ii) las propiedades de transporte de las partículas en el pulmón o en el alveolo pulmonar, (iii) la técnica de inhalación individual de los pacientes y (iv) la eficacia terapéutica en el pulmón o en el sistema.

En conjunto puede resumirse lo siguiente:

- 50 1.) las sustancias gaseosas son idealmente adecuadas para la aplicación a través del pulmón (por ejemplo gases anestésicos en respiración artificial), dado que en la mayoría de los casos pasan sin problemas a través de la barrera pulmonar y prácticamente están disponibles sistémicamente de manera inmediata. No obstante, si también se eliminan a la misma velocidad otra vez del sistema, no presentan por consiguiente ningún efecto de reserva y no permiten la optimización del sitio de acción en el sistema. Por "efecto de reserva" se entiende a este respecto la liberación retardada en el tiempo del principio activo farmacéutico en el sistema, y por optimización del sitio de acción, el enriquecimiento superior al promedio del principio activo farmacéutico en el tejido u órgano que va a someterse a terapia.

- 60 2.) Por el contrario, las partículas líquidas pueden transportar conjuntamente principios activos farmacéuticos, principios activos no farmacéuticos, en particular adyuvantes y permitir un efecto de reserva y una optimización del sitio de acción. No obstante, tales aerosoles líquidos a partir de mezclas de sustancias complejas a menudo presentan problemas de estabilidad que pueden disminuir la eficacia del principio activo en el pulmón o en el sistema.

65 Las partículas sólidas son superiores a las partículas líquidas por su alta estabilidad y pueden producirse con los procedimientos de liberación actuales (pulverizadores o nebulizadores) a lo largo de un amplio intervalo de tamaño. Con ello pueden controlarse de manera dirigida, como en el caso de partículas líquidas, también

las profundidades de penetración de las partículas en el pulmón. Las partículas en el intervalo de tamaño de 1,5 µm y menos pueden alcanzar prácticamente cada tejido pulmonar, mientras que las partículas más grandes penetran principalmente en las zonas de las vías respiratorias que transportan el aire (bronquios).

5 Un sitio objetivo o sitio de acción (*target*) de los principios activos farmacéuticos o sus formulaciones transferidos por medio de inhalación es el propio pulmón, en particular en el caso de las indicaciones médicas ya descritas anteriormente, para las que una administración de D2O como aerosol es adecuada.

10 La administración de un aerosol que puede utilizarse según la invención tiene lugar preferentemente mediante un inhalador, también denominado nebulizador. Como "inhalador" para la presente invención puede utilizarse cualquier inhalador convencional adecuado para aerosoles medicinales. Un "inhalador" puede utilizarse igualmente para la producción de aerosoles según la invención. Las disoluciones de D2O, disoluciones de D2O/H2O según la invención, combinaciones según la invención se alimentan al inhalador, para producir a partir de éstas los aerosoles según la invención, preferentemente sin gas propelente. A este respecto, el inhalador atomiza un volumen definido de la formulación aplicando grandes presiones a través de pequeñas boquillas, para generar así un aerosol según la invención que puede inhalarse. A este respecto, son especialmente adecuados inhaladores, que pueden nebulizar una pequeña cantidad de una disolución de D2O según la invención líquida en una dosificación terapéuticamente adecuada en el transcurso de pocos segundos para dar un aerosol adecuado desde el punto de vista terapéutico e inhalatorio. Tales inhaladores son adecuados en particular para una administración sin gas propelente de los aerosoles o de las composiciones farmacéuticas según la invención. Un nebulizador de este tipo se describe por ejemplo en las solicitudes de patente internacionales WO 91/14468 y WO 97/12687. En un nebulizador de este tipo una disolución de fármaco se convierte por medio una alta presión de hasta 600 bar en un aerosol medicinal, adecuado para la aplicación en las vías respiratorias y el pulmón, y se atomiza. Para la nebulización de una disolución de este tipo se utiliza una boquilla especial, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 94/07607 o el documento WO 99/16530.

15 Los inhaladores adecuados para los aerosoles según la invención comprenden también aparatos de inhalación que funcionan con gas propelente (o nebulizadores). A este respecto los gases propelentes pueden ser por ejemplo FCKW o HFKW. En relación a esto se remite a "Theorie und Praxis der Inhalationstherapie", páginas 31-70, Arcis Verlag (2000), en donde se da a conocer una descripción detallada de nebulizadores que pueden utilizarse así como procedimientos para su aplicación.

20 Ejemplos adicionales de inhaladores adecuados son nebulizadores de boquilla que funcionan con aire comprimido (por ejemplo PARI LC plus, PARI GmbH, Starnberg, Alemania), nebulizadores de boquilla Venturi, nebulizadores de boquilla que funcionan con vapor de agua o nebulizadores por ultrasonidos (por ejemplo AeronebLab, Aerogen, Inc., Stierlin Court, Canadá; eFLOW, PARI GmbH, Starnberg, Alemania). Igualmente adecuados son los inhaladores con un tamaño que pueda llevar consigo el paciente (ser humano), por ejemplo el Respimat®, tal como se describe en el documento WO 97/12687. Una descripción detallada de inhaladores adecuados se encuentra también en "Theorie und Praxis der Inhalationstherapie", páginas 31-70, Arcis Verlag (2000). Todas las referencias expuestas en la descripción de la presente invención se incluyen en su totalidad en la presente invención.

25 Una forma de administración preferida adicional de la presente invención es la administración de D2O a través de un endoscopio (broncoscopia). Esta administración preferida de D2O conduce a un aumento de la cantidad de D2O disponible en los alveolos. Un aumento de este tipo puede ser necesario en las siguientes condiciones:

- 30 1.) los procesos de inspiración y espiración limitan la cantidad máxima de D2O que puede alimentarse a los alveolos mediante inhalación. De este modo, para determinados objetivos terapéuticos, ésta puede encontrarse por debajo de la cantidad considerada como necesaria,
- 35 2.) mediante la acumulación de células a causa de fibrosis o tumor pulmonar, regiones del pulmón pueden estar ya excluidas en su mayor parte del intercambio gaseoso, en este caso el D2O, que se administra como aerosol, no llegaría de manera eficaz hasta los alveolos allí existentes.

40 En estos casos tiene lugar según la invención un contacto preferentemente directo de D2O como líquido con partes de la superficie pulmonar a través de la inyección de D2O en partes del pulmón (por ejemplo con ayuda de un endoscopio). Por "endoscopio" se entiende cualquier aparato adecuado para la administración de D2O en el pulmón de un mamífero.

45 En el contexto de la presente invención se entiende que el término "endoscopio" es sinónimo del término "broncoscopia". En el estado de la técnica se conoce el llenado del pulmón con agua o con disoluciones acuosas y su eliminación posterior y se utiliza en determinadas indicaciones, sobretudo en el marco de una broncoscopia, para el lavado del pulmón (lavado broncoalveolar, BAL). Según la presente invención el D2O se inyecta, preferentemente a través de un endoscopio, en partes del pulmón de tal manera que los alveolos en esta región están llenos en la mayor medida posible con D2O. A continuación se mantiene el D2O durante un tiempo adecuado para la terapia, por ejemplo de 2 a como máximo 36 horas en el pulmón y entonces se vuelve a retirar. La aplicación de D2O puede repetirse, cuando sea necesario, en intervalos de tiempo a lo largo de varios meses, durante preferentemente 2

meses, preferentemente 3 meses, más preferentemente 6 meses, aún más preferentemente 12 meses. La ventaja de esta manera de proceder, denominada a continuación D2O-BAL, es el contacto directo de la superficie de los alveolos con D2O y por consiguiente la penetración máxima de D2O.

5 Formas de realización preferidas según la invención de D2O-BAL están representadas por las utilizaciones de una disolución de D2O según la invención con las siguientes ampliaciones o modificaciones, cuyo efecto se describe. Debe entenderse, que esta enumeración no es limitativa:

10 1.) Adición de H2O a una disolución de D2O según la invención. Mediante esto puede ajustarse la cantidad óptima de D2O para el objetivo terapéutico.

15 2.) Utilización de una disolución de D2O según la invención con una concentración de D2O lo más alta posible (preferentemente D2O con una pureza isotópica de más del 95%), que provoca un enriquecimiento correspondientemente alto de D2O en regiones de pulmón enfermas seleccionadas. Esta manera de proceder puede combinarse con la adición de moléculas adecuadas a la disolución de D2O, que modifican claramente las relaciones osmóticas en la interfase alveolar en una dirección, sin embargo sin provocar un choque osmótico. En este caso la mezcla de agua celular (del citoplasma de la capa epitelial alveolar) con el D2O alveolar produciría calor, que se liberaría directamente en la interfase.

20 3.) Adición de sustancias, que son adecuadas, para modificar las relaciones osmóticas entre la disolución de D2O según la invención aplicada y los alveolos. Con ello puede tener lugar un control de la entrada de D2O en las células así como también de la salida de H2O celular a la disolución de D2O alveolar.

25 Según la invención, el D2O utilizado para el D2O-BAL puede utilizarse preferentemente también como combinación según la invención. A este respecto, los principios activos farmacéuticos adicionales o no farmacéuticos adicionales preferidos adecuados incluyen los principios activos ya descritos con detalle anteriormente. Las concentraciones de D2O así como de los principios activos farmacéuticos o no farmacéuticos se refieren a este respecto a los datos de concentración ya mencionados.

30 Una forma de realización preferida adicional de la presente invención se refiere a la utilización de óxido de deuterio, administrándose el óxido de deuterio como formulación.

Además se da a conocer por tanto una formulación que contiene D2O.

35 Preferentemente, una formulación según la invención de este tipo es una pomada, una crema, una loción, una emulsión o un gel o un hidrogel.

40 Una "pomada" según la presente invención es una preparación farmacológica para su utilización externa a partir de una masa de base de sustancias que pueden untarse, tal como vaselina, a la que se le añaden los verdaderos principios activos farmacéuticos y/o no farmacéuticos, por ejemplo mediante mezclado.

45 Por una "crema" en el sentido de la presente invención se entiende una pomada según la invención, que además puede contener componentes adicionales, tales como principios activos cosméticos, por ejemplo aromatizantes, colorantes y/o emulsionantes, por ejemplo lecitina. En general, de una crema se diferencia una loción, haciéndose esta diferenciación en su mayoría dependiendo del grado de viscosidad. Según la invención por crema también se entiende una loción.

50 Por una "emulsión" en el sentido de la presente invención se entiende una macro o microemulsión, a base de o bien agua en aceite o bien aceite en agua.

55 Un "gel" en el sentido de la presente invención es la disolución de una sustancia macromolecular, por ejemplo agarosa, ácido acrílico, ácido algínico, polisiloxano o acrilamida, cuya concentración es tan alta que las macromoléculas disueltas se unen en condiciones adecuadas y dado el caso con adición de sustancias adicionales (por ejemplo sales, ácidos, cargas, sustancias de tampón) para dar una estructura tridimensional con forma de esponja, en cuyas cavidades se encuentra un líquido. De este modo los geles presentan una consistencia relativamente sólida. La viscosidad se encuentra entre líquido y sólido. Un líquido de este tipo es preferentemente D2O puro o una mezcla de D2O y H2O.

60 Como "hidrogel" en el sentido de la invención se denomina un gel, que se caracteriza por una capacidad de captación de agua especialmente alta, en el sentido de la invención se compone preferentemente en un 20-99%, más preferentemente en un 70-99%, y de manera especialmente preferible en un 80-99%, de agua, sin embargo sin mostrar las propiedades reológicas de un líquido clásico. En una forma de realización especialmente preferida el hidrogel es transparente-translúcido y al mismo tiempo de fácil aplicación, sin que su morfología e integridad se vean perjudiquen por la aplicación del gel.

65 La producción de una formulación que puede utilizarse según la invención, en particular una pomada, crema, loción,

emulsión o un gel o hidrogel, se describe a modo de ejemplo en los ejemplos. Siempre que una formulación de este tipo contenga principios activos farmacéuticos y/o no farmacéuticos adicionales, éstos se añaden preferentemente a la formulación mediante mezclado. Sin embargo, puede tener lugar mediante cualquier procedimiento convencional conocido en el estado de la técnica. El experto en la materia conoce tales procedimientos e igualmente las concentraciones que deben elegirse de los componentes o sustancias que deben utilizarse.

Las concentraciones de D2O en una formulación que puede utilizarse según la invención se encuentran preferentemente en los siguientes intervalos:

- 10 • para una crema o pomada preferentemente en el intervalo de desde el 0,1 hasta el 95% en peso, preferentemente desde el 5 hasta el 85% en peso, de manera igualmente preferible desde el 10 hasta el 80% en peso, de manera especialmente preferible desde el 15 hasta el 70% en peso, más preferentemente desde el 20 hasta el 60% en peso y lo más preferentemente desde el 25 hasta el 55% en peso y
- 15 • para una emulsión preferentemente en el intervalo de desde el 1% hasta el 98%
- para un gel o hidrogel preferentemente del 0,1 al 99,8% en peso, preferentemente desde el 10 hasta el 99% en peso, de manera igualmente preferible desde el 15 hasta el 80% en peso, de manera especialmente preferible desde el 20 hasta el 70% en peso, más preferentemente desde el 30 hasta el 70% en peso y lo más preferentemente desde el 35 hasta el 65% en peso.

El experto en la técnica elegirá la concentración adecuada en particular dependiendo de la indicación existente, el estado del organismo (paciente) que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, etc.

25 En una forma de realización dada a conocer una formulación que puede utilizarse según la invención contiene además al menos un disolvente inorgánico u orgánico. Preferentemente el disolvente se selecciona de entre el grupo constituido por etanol, agua y glicerol así como mezclas de los mismos.

30 Un organismo que va a tratarse en el sentido de la presente invención es un organismo animal, sobre todo un vertebrado, en particular un mamífero, sobre todo un ser humano, un caballo, un cerdo, una vaca, una cabra, una oveja, un gato y un perro.

A continuación se explica con más detalle la presente invención por medio de ejemplos y figuras, sin que éstos limiten los objetos de la invención.

35 La figura 1 muestra el impedimento de la conversión del sustrato sintético N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-pNitro-anilida (AAPV) mediante la elastasa de neutrófilos humana (HNE) dependiendo del porcentaje en volumen de D2O en la mezcla de HNE y AAPV. La medición de la conversión de AAPV tuvo lugar de manera espectrofotométrica a una longitud de onda de 405 nm.

40 La figura 2 muestra la tabla 1 y el daño pulmonar agudo (hemorragia) tras la instilación de la serina proteasa elastasa en pulmón de hámster, calculado mediante determinación espectrofotométrica de la concentración de hemoglobina en la disolución de lavado tras un BAL. Se representa la reducción porcentual (% de reducción) del daño pulmonar agudo mediante aerosoles de D2O y H2O, que se dotaron de diferentes principios activos no farmacéuticos adicionales (con respecto al grupo control no tratado con aerosol). La concentración del principio activo no farmacéutico en el aerosol ascendía en cada caso al 1% en peso. La reducción porcentual se calculó a partir de la disminución de la concentración de hemoglobina en la disolución de lavado.

50 La figura 3 muestra la tabla 2 y el daño pulmonar agudo (hemorragia) tras la instilación de la serina proteasa elastasa en pulmón de hámster, calculado mediante la determinación espectrofotométrica de la concentración de hemoglobina en la disolución de lavado tras un BAL. Se representa la reducción porcentual (% de reducción) del daño pulmonar agudo mediante aerosoles de D2O y H2O, que se dotaron de diferentes principios activos no farmacéuticos adicionales (con respecto al grupo control no tratado con aerosol). La concentración del principio activo farmacéutico adicional en el aerosol se indica entre paréntesis. La reducción porcentual se calculó a partir de la disminución de la concentración de hemoglobina en la disolución de lavado.

Ejemplos

60 El D2O utilizado para todos los ejemplos (CU Chemie, Uetingen, Suiza) presentaba una pureza isotópica del 98%. El H2O utilizado estaba destilado y sometido a intercambio iónico. Tanto el D2O como el H2O eran estériles.

Ejemplo 1: Producción de hidrogeles a base de ácido acrílico

65 Se disolvió mediante agitación Carbopol 980 al 2,0% en peso (Fabricante: Noveon, Inc., 9911 Brecksville Rd., Cleveland, OH 44141-3247, EE.UU.) en mezclas básicas separadas en D2O puro, en H2O puro o en una mezcla de D2O y H2O y a continuación se valoró pipeteando disolución de NaOH 10 M hasta un valor de pH de 6,8. A

continuación se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización posterior, durante al menos 24 horas los geles de ácido acrílico (geles de Carbopol) incoloros, transparentes y ópticamente claros (gel de D2O-Carbopol, gel de H2O-Carbopol, gel de D2O/H2O-Carbopol) que se originan mediante la adición de NaOH como consecuencia del entrecruzamiento del poli(ácido acrílico) a través de sus grupos carboxilo con los grupos hidroxilo alcalinos.

5

Ejemplo 2: Producción de hidrogeles a base de siloxanos (silicona)

Se disolvieron mediante agitación un 3,0% en peso de hexametildisiloxano (nombre comercial SILMOGEN CARRIER de DOW Corning) y un 1% en peso de etanol en mezclas básicas separadas en D2O puro, en H2O puro o en una mezcla de D2O y H2O. A continuación se mezclaron inmediatamente estas disoluciones con una razón en peso de 1:2 (disolución de silicona:gel de Carbopol) con agitación intensa con el gel (gel de Carbopol) producido según el ejemplo 1, hasta que se originaron geles (geles de silicona) ópticamente transparentes (gel de D2O-silicona, gel de H2O-silicona, gel de D2O/H2O-silicona). El almacenamiento de los geles tuvo lugar a temperatura ambiente hasta su utilización posterior, durante al menos 24 horas.

10

15

Ejemplo 3: Producción de hidrogel a base de alginatos

Se dispersó mediante agitación un 4,0% en peso de sal de sodio de ácido algínico (alginato de Na) (Fabricante: Röhm GmbH Darmstadt, Alemania) en mezclas básicas separadas en D2O puro, en H2O puro o en una mezcla de D2O y H2O y a continuación se valoró pipeteando disolución de NaOH 10 M hasta un valor de pH de 7,0. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización posterior, durante al menos 24 horas, los geles (geles de alginato) transparentes de color marrón amarillento originados (gel de D2O-alginato, gel de H2O-alginato, gel de D2O/H2O-alginato).

20

Ejemplo 4: Producción de hidrogel a base de PVA

Se disolvió mediante agitación un 20% en peso de poli(alcohol vinílico) (PVA C-25, Shin-Etsu Chemical Co., Japón) en mezclas básicas separadas en D2O puro, en H2O puro o en una mezcla de D2O y H2O. A continuación se sometieron las disoluciones a 5 ciclos de congelación-descongelación ("*freeze-thaw-cycles*"). El resultado fueron geles (geles de PVA) (gel de D2O-PVA, gel de H2O-PVA, gel de D2O/H2O-PVA) con propiedades similares a gomas, que se cortaron en discos de 2 mm de grosor. Se almacenaron los geles a temperatura ambiente hasta su utilización posterior, durante al menos 24 horas.

30

Ejemplo 5: Producción de hidrogel, láminas o placas, a base de agarosa

Se disolvió agarosa al 3,0% en peso en mezclas básicas separadas en D2O puro, en H2O puro o en una mezcla de D2O y H2O y a continuación se calentaron las disoluciones hasta 90°C. El D2O utilizado de la empresa Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania) presentaba una pureza isotópica del 98,5%. Se vertieron las disoluciones calientes in placas de Petri adecuadas hasta una altura de 1,0-1,5 mm y se enfriaron. Los geles así obtenidos (geles de agarosa) (gel de D2O-agarosa, gel de H2O-agarosa, gel de D2O/H2O-agarosa) se almacenaron en condiciones estériles a 4°C.

35

40

Ejemplo 6: Producción de hidrogel, láminas o placas, a base de acrilamida

Se produjeron geles de acrilamida (5% de acrilamida), desgasificando en mezclas básicas separadas de D2O puro, de H2O puro o de una mezcla de D2O y H2O antes de la adición de la acrilamida (con el 2,4% de bis-acrilamida) y se calentó hasta 40°C. Tras la adición de acrilamida y bis-acrilamida, se mezclaron las disoluciones (mezclador de tipo vórtex, 1 min a 200 U/min) y a continuación se añadieron los catalizadores tetrametil-etilendiamina (TEMES; al 1,0%) y persulfato de amonio (AP; al 0,1%), seguido por mezclado de 10 s. Entonces se vertieron los geles en placas de Petri (altura del gel de 1,0-1,5 mm) y se almacenaron durante 2 horas a 40°C. A continuación se lavaron los geles (gel de D2O-acrilamida, gel de H2O-acrilamida, gel de D2O/H2O-acrilamida), utilizándose para el lavado la mezcla de agua análoga como para la hidratación del gel (D2O puro, H2O puro o una mezcla de D2O y H2O). Se almacenaron los geles a temperatura ambiente hasta su utilización posterior, durante al menos 24 horas.

45

50

Ejemplo 7: Producción de una crema que contiene D2O

A 50 gramos de Asche Basiscreme (Fabricante: Asche Chiesi GmbH, Hamburgo, Alemania) se les añadió lentamente a 40°C con agitación continua D2O, hasta que se alcanzó un porcentaje en peso del 38% de D2O (con respecto al peso de partida de la crema) en la mezcla homogénea. A continuación se enfrió la crema hasta temperatura ambiente y se almacenó cerrada herméticamente.

60

Ejemplo 8: Generación de aerosoles de D2O

El D2O utilizado para todos los ejemplos (CU Chemie, Uetingen, Suiza) presentaba una pureza isotópica del 98%. El H2O utilizado estaba destilado y sometido a intercambio iónico. Tanto el D2O como el H2O eran estériles. Para la aerosolización se utilizó un nebulizador universal Pari LC Plus (PARI GmbH, Starnberg, Alemania) en combinación

65

con un compresor universal de Pari, que generó 200 mg/min de aerosol polidisperso con un tamaño de partícula medio (mediana del diámetro de masa) de 2,5 µm para H₂O puro y D₂O puro y de 2,5-4,5 µm para H₂O o D₂O con principios activos no farmacéuticos y/o farmacéuticos adicionales (presión de funcionamiento de 2,0 bar, cantidad de caudal del aire del compresor era de 6,0 l/min). La medición del tamaño de partícula tuvo lugar por medio de dispersión de la luz dinámica en una cubeta de caudal. La generación de aerosol tuvo lugar a una temperatura de 37°C mediante regulación de la temperatura correspondiente del nebulizador en un termostato de baño de agua.

Ejemplo 9: Impedimento de la enzima elastasa de neutrófilos humana (HNE)

Se incubó HNE junto con el sustrato sintético N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-pNitro-anilida (AAPV). A este respecto, se determinó la conversión de AAPV fotométricamente a 405 nm. Se utilizó el siguiente esquema de incubación:

- Muestra 1) HNE en D₂O con AAPV en D₂O;
- Muestra 2) HNE en D₂O con AAPV en H₂O;
- Muestra 3) HNE en H₂O con AAPV en D₂O;
- Control: HNE en H₂O con AAPV en H₂O.

A este respecto se incubaron la enzima y el sustrato en cada caso durante 60 min con H₂O o D₂O antes de que se añadieran conjuntamente HNE y AAPV. Se varió la cantidad de D₂O en los ensayos a lo largo de un intervalo de desde el 10 hasta el 100%, para comprobar la dependencia de la inhibición de la conversión de AAPV mediante HNE. La ilustración 1 muestra la inhibición de la conversión de AAPV como función de la cantidad de D₂O (% en volumen) en la mezcla. A partir de esto se determinó una dosis efectiva media con un contenido en D₂O de aproximadamente el 40% en volumen. Al 100% de D₂O en la mezcla se logró una inhibición de la conversión de AAPV de aproximadamente el 70%.

Ejemplo 10: Eficacia de la instilación de D₂O en un modelo animal de COPD

Para la investigación del efecto de D₂O en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se dividieron hámsteres dorados/sirios macho (peso medio de 118 g ± 4 g) en dos grupos (grupo de ensayo y grupo control) cada uno de 10 hámsteres. En primer lugar se anestesió a los animales de ambos grupos por vía intraperitoneal (ketamina 95 mg/kg y xilazina 17 mg/kg) y a continuación se les intubó por vía endotraqueal por medio de laringoscopia directa. El grupo de ensayo recibió 250 µl de una disolución de NaCl al 0,9% a base de D₂O (98,5% de enriquecimiento de deuterio) instilada, mientras que en el grupo control se utilizaron 250 µl de una solución salina isotónica correspondiente a base de H₂O. Cada animal recibió tras el final de esta instilación en un plazo de tiempo de 30 minutos una segunda instilación, que era idéntica para ambos grupos: 100 µl de elastasa de neutrófilos humana (HNE, 500 µg/ml en disolución de NaCl al 0,9% estéril). Se sacrificó a los animales 4 horas (6 animales por grupo) o 24 horas (4 animales por grupo) tras la última instilación (fenobarbital 70 mg/kg por vía intraperitoneal).

Para los animales sacrificados 4 horas tras la instilación, se realizó un BAL (lavado broncoalveolar). Para el BAL, se instilaron 2,5 ml de disolución de NaCl al 0,9% repetidamente (en total 3 veces) y a continuación se determinó espectrofotométricamente la concentración de hemoglobina en el instilado. El valor así obtenido se utilizó como medida del daño del pulmón (hemorragia) por la elastasa de neutrófilos humana (HNE). Para el grupo control se obtuvo un valor de hemoglobina medio de 320±50 mOD (mili-densidad óptica). Para el grupo de ensayo se midió un valor de hemoglobina medio de 170±20 mOD. Esta reducción de la concentración de hemoglobina en el BAL corresponde a una inhibición del daño pulmonar agudo (hemorragia) provocado por elastasa del 47%.

Para los animales sacrificados 24 horas tras la instilación se extirpó el pulmón, se fijó en formalina y se incrustó en parafina. Se practicaron cortes longitudinales histológicos del pulmón en la dirección del hilio pulmonar, se tiñeron y se hizo visible el hierro por medio de una reacción histoquímica (reacción de azul de Berlín), que sirvió como medida de la gravedad de la hemorragia inducida por HNE. La investigación microscópica de los cortes aportó los siguientes descubrimientos:

Grupo control: cantidad elevada de células teñidas de azul (macrófagos, que habían internalizado restos de sangre) como expresión de una hemorragia marcada.

Grupo de ensayo: cantidad significativamente reducida de células teñidas de azul como expresión de una hemorragia reducida.

Ejemplo 11: Eficacia de aerosoles de D₂O en un modelo animal de COPD

Se dividieron hámsteres dorados/sirios macho (peso medio 105 g ± 8 g) en dos grupos (grupo de ensayo y grupo control) cada uno de 6 hámsteres. En primer lugar se anestesió a los animales de ambos grupos por vía intraperitoneal (ketamina 95 mg/kg y xilazina 17 mg/kg) y a continuación se les intubó por vía endotraqueal por medio de laringoscopia directa. Ambos grupos recibieron 100 µl de elastasa de neutrófilos humana (500 µg/ml en

disolución de NaCl al 0,9% estéril) instilada. A continuación se pasó a los animales a jaulas separadas y se les trató con un tratamiento continuo con aerosol de D2O (grupo de ensayo) o aerosol de H2O (grupo control) (producido según el ejemplo 8) en el aire respirable (humedad atmosférica del 60%) durante 24 horas. Tras este tratamiento se sacrificó a los animales (fenobarbital 70 mg/kg por vía intraperitoneal) y se realizó un BAL (lavado broncoalveolar). Para el BAL se instilaron 2,5 ml de disolución de NaCl al 0,9% repetidamente (en total 3 veces) y a continuación se determinó espectrofotométricamente la concentración de hemoglobina en el instilado. Se utilizó el valor así obtenido como medida para el daño del pulmón (hemorragia) por la elastasa de neutrófilos humana (HNE). Para el grupo control se obtuvo un valor de hemoglobina medio de 300 ± 50 mOD (mili-densidad óptica). Para el grupo de ensayo se midió un valor de hemoglobina medio de 120 ± 20 mOD. La reducción de la concentración de hemoglobina en el grupo de ensayo corresponde a una inhibición del daño pulmonar agudo (hemorragia) provocado por elastasa del 60%.

Ejemplo 12: Comprobación de la eficacia de aerosoles de D2O, que se mezclaron con principios activos no farmacéuticos, en un modelo animal de COPD

Se dividieron hámsteres dorados/sirios macho (peso medio $105 \text{ g} \pm 8 \text{ g}$) en dos grupos (grupo de D2O y grupo de H2O) cada uno de 8 hámsteres. A continuación se dividieron ambos grupos en subgrupos de 2 hámsteres cada uno, es decir 4 grupos de D2O y 4 grupos de H2O. Además se estableció un tercer grupo (grupo control) de 2 hámsteres. En primer lugar se anestesió a los animales de los tres grupos por vía intraperitoneal (ketamina 95 mg/kg y xilazina 17 mg/kg) y a continuación se les intubó por vía endotraqueal por medio de laringoscopia directa. Ambos grupos recibieron 100 μl de elastasa de neutrófilos humana (500 $\mu\text{g/ml}$ en disolución de NaCl al 0,9% estéril con H2O) instilada. A continuación se pasó a los animales de los grupos de D2O y de H2O a jaulas separadas (en cada caso 2 hámsteres por jaula) y se les sometió a un tratamiento continuo con aerosol de D2O (grupo de D2O) y aerosol de H2O (grupo de H2O) (producido según el ejemplo 8) en el aire respirable (humedad atmosférica del 60%) durante 4 horas. Los aerosoles de D2O o H2O contenían en la disolución de partida (es decir la disolución antes de la aerosolización) utilizada para su generación según el ejemplo 8, en cada caso adicionalmente una de las siguientes sustancias con las concentraciones indicadas entre paréntesis: dextrano 4000 (1,0% en peso), polietilenglicol 4000 (1,0% en peso), albúmina sérica bovina (1,0% en peso), desoxicolato de sodio (1,0% en peso). Se trató a los animales con los aerosoles correspondientes (D2O o H2O) durante 4 horas, la humedad atmosférica relativa en la jaula ascendió a este respecto al 60%. Tras este tratamiento se sacrificó a todos los animales (incluidos los 2 animales del grupo control que no se trató con aerosol) (fenobarbital 70 mg/kg por vía intraperitoneal) y se realizó un BAL (lavado broncoalveolar). Para el BAL se instilaron 2,5 ml de disolución de NaCl al 0,9% repetidamente (en total 3 veces) y a continuación se determinó espectrofotométricamente la concentración de hemoglobina en el instilado. El valor así obtenido se utilizó como medida para el daño del pulmón (hemorragia) por la elastasa de neutrófilos humana (HNE). La tabla 1 facilita la reducción porcentual del daño pulmonar agudo provocado por HNE a partir de la respectiva concentración de hemoglobina.

Ejemplo 13: Comprobación de la eficacia de aerosoles de D2O, que se mezclaron con principios activos farmacéuticos adicionales, en un modelo animal de COPD

Como principios activos farmacéuticos adicionales se seleccionaron, de entre el grupo de los broncodilatadores, el beta-agonista albuterol (sulfato de albuterol) y el anticolinérgico ipratropio (bromuro de ipratropio) así como del grupo de los esteroides el glucocorticoide dexametasona y se sometieron a prueba en combinación con aerosoles de D2O con respecto a su eficacia en el tratamiento de COPD. Se dividieron hámsteres dorados/sirios macho (peso medio $105 \text{ g} \pm 8 \text{ g}$) en dos grupos (grupo de D2O y grupo de H2O) cada uno de 6 hámsteres. A continuación se dividieron ambos grupos en tres subgrupos de 2 hámsteres cada uno, es decir 3 grupos de D2O y 3 grupos de H2O. Además se estableció un tercer grupo (grupo control) de 2 hámsteres. En primer lugar se anestesió a los animales de los tres grupos por vía intraperitoneal (ketamina 95 mg/kg y xilazina 17 mg/kg) y a continuación se les intubó por vía endotraqueal por medio de laringoscopia directa. Ambos grupos recibieron 100 μl de elastasa de neutrófilos humana (500 $\mu\text{g/ml}$ en disolución de NaCl al 0,9% estéril) instilada. A continuación se pasó a los animales de los grupos de D2O y H2O a jaulas separadas (en cada caso 2 hámsteres por jaula) y se les sometió a un tratamiento continuo con aerosol de D2O (grupo de D2O) y aerosol de H2O (grupo de H2O) (producido según el ejemplo 8) en el aire respirable (humedad atmosférica del 60%) durante 4 horas. Los aerosoles de D2O o H2O contenían en la disolución de partida (es decir la disolución antes de la aerosolización) utilizada para su generación según el ejemplo 8, en cada caso adicionalmente una de las siguientes sustancias con las concentraciones indicadas entre paréntesis: sulfato de albuterol (1,5 mg/ml), bromuro de ipratropio (1,5 mg/ml), dexametasona (0,5 mg/ml). Se trató a los animales con los aerosoles correspondientes (D2O o H2O) en el aire respirable durante 4 horas, la humedad atmosférica relativa en la jaula ascendía a este respecto al 60%. Tras este tratamiento se sacrificaron todos los animales (incluidos los 2 animales del grupo control que no se trató con aerosol) (fenobarbital 70 mg/kg por vía intraperitoneal) y se realizó un BAL (lavado broncoalveolar). Para el BAL se instilaron 2,5 ml de disolución de NaCl al 0,9% repetidamente (en total 3 veces) y a continuación se determinó espectrofotométricamente la concentración de hemoglobina en el instilado. El valor así obtenido se utilizó como medida para el daño del pulmón (hemorragia) por la serina proteasa (elastasa). La tabla 2 muestra la reducción porcentual del daño pulmonar agudo provocado por HNE a partir de la respectiva concentración de hemoglobina.

Ejemplo de referencia 14: Comprobación de la eficacia de D2O para el impedimento de la inflamación en tejido de miocardio

En un modelo animal de daño por reperfusión, en conejos de Nueva Zelanda blancos, macho se consiguió mediante ligadura de una arteria coronaria una reducción del riego sanguíneo del tejido muscular cardiaco, que condujo a daño (Bidouard JP *et al.*; SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury. Eur J Pharmacol. 2003; 461:49-52). Mediante toracotomía se cerró una rama lateral de la arteria coronaria izquierda mediante ligadura durante 30 minutos y a continuación se volvió a abrir para alcanzar una reperfusión a lo largo de 120 minutos. Antes de extirpar el corazón se administró un bolo de tinta (tinta china de Pelikan) en la aorta ascendente. Para la investigación del efecto de D2O sobre el daño por reperfusión se dividió a los animales en tres grupos cada uno de 2 animales. Dos grupos recibieron o bien 15 minutos antes (grupo de ensayo 1) o bien 25 minutos después (grupo de ensayo 2) de la reapertura de la arteria coronaria, un tratamiento intravenoso con D2O en forma de una solución salina isotónica, el otro grupo (grupo control) se trató con H2O como solución salina isotónica. Tras extirpar el corazón, pinzar la aorta, fijar en formalina e incrustar en parafina se investigó el corazón para determinar la homogeneidad de la distribución de la tinta en el sistema capilar mediante 3 cortes transversales así como desde el punto de vista inmunohistoquímico. La comprobación inmunohistoquímica de granulocitos tuvo lugar mediante tinción con alfa-naftol-cloroacetato esterasa. En los animales del grupo control se detectó un contenido significativamente más alto de granulocitos y marcado de capilares claramente menor mediante tinta china de Pelikan. Las diferencias histológicas entre los grupos de ensayo 1 y 2 no eran significativas. Por consiguiente pudo comprobarse, que en los grupos tratados con D2O aparecía un daño del músculo cardiaco significativamente menor que en los animales tratados con H2O.

Ejemplo de referencia 15: Comprobación de la eficacia del impedimento con D2O de la inflamación en el cerebro tras una isquemia cerebral

Se investigó el efecto de D2O sobre la isquemia cerebral en un modelo animal. A este respecto se generó en ratas Long-Evans adultas una isquemia cerebral mediante el cierre de ambas arterias carótidas durante una hora, seguida por una reperfusión a lo largo de 24 horas. Tuvo lugar una observación posterior con evaluación de los síntomas neurovegetativos (actividad espontánea, caminar coordinado, estiramiento de las patas delanteras y trepar). A continuación se investigó de manera histológica el daño del tejido cerebral. En dos grupos de ensayo cada uno de 3 ratas se infundió a los animales 15 minutos antes del comienzo de la isquemia e inmediatamente antes de la siguiente reperfusión con solución salina isotónica que contenía o bien D2O (grupo de ensayo) o bien H2O (grupo control).

A este respecto se mostró un efecto significativo sobre la reducción del daño por reperfusión (comprobación histológica análoga al ejemplo 10) sólo en los grupos tratados con D2O tanto con respecto a la existencia de granulocitos en cortes histológicos como con respecto al comportamiento neurológico de los animales tras la operación.

Ejemplo de referencia 16: Eficacia de D2O en penfigoide ampolloso

En un modelo *ex vivo* se tomó el líquido de las ampollas en pacientes con penfigoide ampolloso (Verraes *et al.*, 2001). A continuación se añadió antígeno BP180 marcado radiactivamente, recombinante, el antígeno diana en esta enfermedad, al líquido de las ampollas y se determinó la desintegración autorradiográficamente tras electroforesis en gel. Para el impedimento de la actividad elastasa en el líquido de las ampollas, se añadieron a éste o bien D2O o bien el inhibidor de elastasa clorometilcetona. Como comparación se utilizó un control no tratado. Tanto con clorometilcetona como con D2O puede impedirse la desintegración del antígeno BP180 recombinante, mientras que la proteína del líquido de las ampollas no tratado se degradó casi completamente.

Ejemplo de referencia 17: Eficacia de D2O en psoriasis vulgar

Para la determinación del efecto de D2O en psoriasis vulgar se realizó un ensayo semilateral por medio de un hidrogel. Con respecto al gel se trata de Carbopol 980 al 2% en peso con urea al 1% en peso. El valor del pH del gel se ajustó por medio de disolución de NaOH a 6,5. Se trataron pacientes, que presentaban lesiones comparables en ambos codos. Para la evaluación se utilizó el "índice de gravedad local de la psoriasis" (LPSI) (Henneicke-von Zepelin HH, Mrowietz U, Färber L, Bruck-Borchers K, Schober C, Huber J, Lutz G, Kohnen R, Christophers E, Welzel D. Highly purified omega-3-polyunsaturated fatty acids for topical treatment of psoriasis. Results of a double-blind, placebo-controlled multicentre study. Br J Dermatol. 1993; 129:713-7). Se pidió a los pacientes, que aplicaran el contenido de los tubos marcados con "derecha" e "izquierda" 2x/día sobre las lesiones correspondientes en los codos derecho o izquierdo. En uno de los tubos se encontraba un gel, que se produjo con D2O, en el otro se elaboró el gel con H2O. La distribución tuvo lugar aleatoriamente. Se determinó el LPSI una vez a la semana. Tras 4 semanas de terapia y asignación de las aplicaciones a los lados correspondientes se mostró una disminución significativa del LPSI en las lesiones tratados con D2O en comparación con aquéllas en las que se aplicó el gel de H2O.

Ejemplo de referencia 18: Eficacia de D2O en peritonitis y choque séptico

Se investigó el efecto de D2O en la aplicación en una diálisis peritoneal en un modelo animal de peritonitis infecciosa (Welten AG, Zareie M, van den Born J, ter Wee PM, Schalkwijk CG, Driesprong BA, Mul FP, Hordijk PL, Beelen RH, Hekking LH. *In vitro* and *in vivo* models for peritonitis demonstrate unchanged neutrophil migration after exposure to dialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:831-9.). A este respecto se implantó a ratas Wistar macho un catéter para diálisis peritoneal y se utilizó para la inducción de una peritonitis así como para diálisis peritoneal adicional. Se provocó una peritonitis purulenta mediante inyección de una suspensión de *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^9 ufc en 0,5 ml). Tras 4 horas se realizó un lavado peritoneal o bien con solución salina isotónica o bien con una solución salina isotónica al 30%/H₂O al 70%. Tras la muerte de los animales, como muy tarde tras 24 horas se investigaron histológicamente las colonias bacterianas así como la reacción inflamatoria en el peritoneo. A este respecto se mostró tanto una cantidad reducida de bacterias en el cultivo cuantitativo como una actividad inflamatoria disminuida en los animales tratados con D2O.

Ejemplo de referencia 19: Eficacia de D2O en enfermedades alérgicas

En un ensayo se liofilizó un extracto del ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronissinus* (*D. pter*) y se llevó a D2O. A continuación se investigó el extracto de *D. pter*/D2O en una prueba de Prick en pacientes, que habían reaccionado positivamente al líquido de prueba convencional con *D. pter*. Como control se utilizaron de nuevo la disolución de prueba no tratada, disolución de histamina al 0,1%, que se preparó con H₂O, disolución de histamina al 0,1%, que se preparó con D2O, así como solución salina isotónica. Se mostró que con la utilización de la disolución de prueba de D2O/*D. pter* sólo pudo provocarse una reacción de habón muy reducida, mientras que la reacción de habón con la disolución de *D. pter* no tratada correspondía aproximadamente al control de histamina. No se mostraron diferencias entre las pruebas de Prick de histamina en D2O y H₂O.

De manera correspondiente se produjo una disolución con D2O para su utilización como pulverización nasal. En cada caso se trató a 5 pacientes con rinitis alérgica y sensibilización de tipo 1 comprobada o bien con la pulverización nasal que contenía D2O (solución salina isotónica con la utilización de D2O al 70%) o bien con solución salina isotónica con H₂O. Como parámetros se determinaron el número de ataques de estornudos y se midió la intensidad de la rinorrea acuosa así como el picor nasal por medio de escalas analógicas visuales. Para ello se utilizó un diario de paciente. Tras una duración de ensayo de 14 días y el empleo de los respectivos pulverizados 6x al día, en el grupo tratado con D2O se mostró una reducción significativa de los parámetros planteados en comparación con el grupo de H₂O.

Ejemplo de referencia 20: Eficacia de D2O en la reducción de la inflamación de la mucosa nasal

Se produjo una solución salina fisiológica a partir de D2O (grupo de ensayo) y H₂O (grupo control) y se llenó en recipientes de pulverizador con bomba, tal como se utilizan normalmente para la liberación de pulverizador nasal. Se dividieron voluntarios con enfermedades catarrales, que iban acompañadas de fuertes congestiones nasales, en 2 grupos cada uno de 8 voluntarios. Se determinó el caudal de aire a través de la nariz para cada voluntario inmediatamente antes del tratamiento (tras la eliminación meticulosa de las secreciones) por medio de rinomanometría (valor inicial). A continuación los voluntarios del grupo de ensayo recibieron cada uno una dosis de choque con bomba de solución salina de D2O en cada orificio nasal mientras que los voluntarios del grupo control por el contrario recibieron solución salina de H₂O en la misma cantidad. En cada caso 30 y 60 minutos tras la aplicación se determinó el caudal de aire en cada voluntario por medio de rinomanometría y se calculó la modificación porcentual del caudal de aire con respecto al valor inicial. A partir de estos valores se calculó para el grupo de ensayo y control un valor medio (modificación porcentual media del caudal de aire, <% de L_f >). A este respecto, un valor positivo de <% de L_f > significa un aumento, un valor negativo una reducción del caudal de aire. Para el grupo de ensayo se obtuvo tras 30 min un valor de <% de L_f > = $20 \pm 5\%$ y tras 60 min <% de L_f > = $90 \pm 10\%$. El grupo control obtuvo tras 30 min un <% de L_f > = $10 \pm 5\%$ y tras 60 min un <% de L_f > = $5 \pm 5\%$. Por consiguiente, pudo comprobarse un aumento significativo del caudal de aire y por consiguiente una reducción de la inflamación asociada a ello de la mucosa nasal para el grupo de ensayo (D2O) frente al grupo control (H₂O).

Ejemplo de referencia 21: Eficacia de D2O en la terapia de inflamación aguda de los senos paranasales (sinusitis)

Se prepararon aerosoles a partir de D2O y H₂O, en cada caso mezclados con NaCl 150 mM, según el ejemplo 2. Se dividieron voluntarios con sinusitis aguda en la zona del seno maxilar en dos grupos. El grupo de ensayo inhaló durante 15 minutos el aerosol de D2O, el grupo control el aerosol de H₂O. Durante la inhalación se pidió a los voluntarios que respiraran lo más extensamente posible a través de la nariz. En cada caso, 3 horas después de la inhalación se realizó una investigación rinoendoscópica de los senos paranasales. Se comprobó una reducción significativa de la hinchazón de la mucosa del grupo de ensayo frente al grupo control. Esto condujo en el grupo de ensayo a una mejor salida de las secreciones.

Ejemplo de referencia 22: Eficacia de D2O en rinitis alérgica

Al igual que en el ejemplo 21, se produjo una disolución con D2O para su utilización como pulverización nasal. En cada caso se trató a 5 pacientes con rinitis alérgica y sensibilización de tipo 1 comprobada o bien con la pulverización nasal que contiene D2O (solución salina isotónica con la utilización de D2O al 70%) o bien con solución salina isotónica con H2O. Como parámetros se determinaron el número de ataques de estornudos y se midió la intensidad de la rinorrea acuosa así como el picor nasal por medio de escalas analógicas visuales. Para ello se utilizó un diario de paciente. Tras una duración de ensayo de 14 días y el empleo de los respectivos pulverizados 6x al día, se mostró en el grupo tratado con D2O una reducción significativa de los parámetros planteados en comparación con el grupo de H2O.

Ejemplo de referencia 23: Eficacia de D2O en conjuntivitis alérgica

Para someter a prueba la eficacia de colirios, que se produjeron con D2O, se utilizó un modelo animal correspondiente (Minami *et al.*, Biol. Pharm. Bull 28:473-476, 2005). En ratas Wistar de 6 semanas de edad, mediante inyección de albúmina de huevo junto con alumbre y 10^{10} *B. pertussis* en las plantas de las patas y refuerzo posterior con albúmina de huevo en la zona de la espalda se generó una alergia frente a albúmina de huevo. Antes del experimento se mantuvo a los animales en una jaula climatizada y tras adaptación de 10 minutos se vertieron gota a gota 5 µl de disolución de albúmina de huevo en cada ojo. Se llevó entonces a los animales a una jaula de observación y se contaron los movimientos de rascado en la dirección de los ojos durante un tiempo de 20 minutos. Entonces se determinaron hiperemia y edema conjuntival.

Para la investigación de un efecto de D2O sobre los síntomas provocados por albúmina de huevo se vertió gota a gota en un diseño de doble ciego solución salina isotónica a base o bien de H2O o bien de D2O junto con la albúmina de huevo. Tras 20 minutos, en el grupo tratado con D2O, en comparación con los animales tratados con H2O, se mostró una reducción significativa del número de movimientos de rascado en la dirección de los ojos. También se redujo la hiperemia y el edema en el grupo de D2O en comparación con el grupo de H2O. A partir de estos ensayos puede concluirse, que los colirios que contienen D2O consiguen reducir claramente los síntomas de una conjuntivitis alérgica.

Ejemplo de referencia 24: Eficacia de D2O en asma alérgica bronquial

Se expuso el efecto de D2O en asma alérgica en un modelo animal en ratas noruegas marrones de 10 semanas de edad (Roumestan *et al.*, Resp Res 8:35-46, 2007). La sensibilización de los animales tuvo lugar mediante inyecciones intraperitoneales repetidas de ovoalbúmina. A continuación se llevó a los animales a una jaula climatizada y se les trató de manera constante con un aerosol de disolución de isotónica de H2O o D2O durante 6 días. A continuación tuvo lugar una activación del asma mediante un aerosol que contenía ovoalbúmina. Como parámetro se determinó la modificación de la resistencia al paso del aire mediante pletismografía barométrica en los animales vivos tras 24 horas. A este respecto se mostró un aumento significativo de la resistencia al paso del aire en el grupo tratado con H2O. En los animales que se trataron con aerosol de D2O, sólo se produjo un leve aumento de la resistencia al paso del aire. Estos datos hacen suponer la conclusión de que el D2O puede utilizarse en terapia del asma alérgica bronquial.

Ejemplo de referencia 25: Eficacia de gel que contiene D2O tras la aplicación tópica sobre la progresión de vasculitis leucocitoclástica cutánea

La vasculitis leucocitoclástica cutánea se caracteriza por un comportamiento de recidiva. Una característica particular de esta dermatosis es la rotura de los capilares cutáneos mediante un proceso inflamatorio, en el que casi exclusivamente están implicados granulocitos neutrofílicos. Para examinar el efecto de gel que contiene D2O sobre la extensión de las lesiones cutáneas, se trató a pacientes con vasculitis leucocitoclástica cutánea en un ensayo semilateral. De manera aleatoria, se aplicó en cada caso un gel que contenía o bien H2O o bien D2O en la pantorrilla derecha o izquierda 3x al día. Tras una duración de terapia de 4 días se compararon las terapias mediante una puntuación clínica, que valora el número y la manifestación de las lesiones vasculíticas. A este respecto, en las pantorrillas que se trataron con gel de D2O, se mostró una clara reducción de la puntuación clínica.

Ejemplo 26: Eficacia de infusiones de D2O en vasculitis sistémicas en el ejemplo de la granulomatosis de Wegener.

En la patogénesis de la granulomatosis de Wegener, la activación de granulocitos neutrofílicos presenta un significado importante. La actividad patológica puede determinarse mediante determinación de proteinasa 3-anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (PR3-ANCA). En pacientes con enfermedad de Wegener se investigó en un estudio abierto el efecto de una infusión adicional de 500 ml de una solución salina isotónica producida con D2O al 70%, una vez al día durante una semana además de la terapia sistémica individual en 5 pacientes. A este respecto, la determinación del PR3-ANCA en suero antes y después de una semana de la última infusión de D2O sirvió como parámetro control. Cinco pacientes, en los que se utilizó exclusivamente la terapia individual sin infusiones adicionales, sirvieron como comparación. A este respecto se mostró en los pacientes, que además de la

terapia individual recibieron infusiones de D2O, una reducción más fuerte de los valores de PR3-ANCA en comparación con los pacientes tratados de manera convencional. Esto lleva a la conclusión de que la utilización sistémica de D2O en la terapia adyuvante de vasculitis sistémicas es adecuada.

5 **Ejemplo de referencia 27: Eficacia de D2O en la terapia de aftosis benigna con recidiva (RBA)**

10 Se dividieron de manera aleatoria 8 voluntarios con la forma menos grave de RBA (diámetro de las erosiones de redondas a ovaladas de 3-5 mm) en lugares de la mucosa bucal bien accesibles para una inspección óptica (en particular la mucosa de la mejilla y la mucosa en la zona del maxilar inferior) en 2 grupos de cada uno 4 voluntarios (grupo de ensayo y grupo control) y se determinó ópticamente el tamaño (diámetro) de las aftas (valor inicial) con una precisión de 0,5 mm. Para la determinación del tamaño, sólo se tuvo en cuenta la superficie erosionada, cubierta de color gris, la zona del borde de color rojo no se consideró. Los primeros síntomas de la aftosis de los voluntarios de ambos grupos presentaban ya al menos 2 días y como máximo 4 días de antigüedad. El grupo de ensayo recibió 3 veces al día un gel de D2O producido según el ejemplo 1 aplicado por medio de un aplicador adecuado sobre la erosión (afta). Se garantizó, que el gel aplicado cubriera toda la superficie del afta más un borde de 2-3 mm de ancho y al menos tuviera 5 minutos de tiempo para hacer efecto. El grupo control se trató de manera análoga con una aplicación y dosificación idéntica de un gel de H₂O producido según el ejemplo 1. 3 días tras la primera aplicación de gel (es decir tras 9 aplicaciones en total por voluntario) se realizó una nueva determinación en ambos grupos del diámetro de afta. Para el grupo de ensayo pudo comprobarse una reducción media del diámetro con respecto al valor inicial del 30±10%, en el grupo control se observó un aumento medio del diámetro de afta de alrededor del 15±10%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Óxido de deuterio para su utilización en la profilaxis y/o la terapia de enfermedades pulmonares asociadas a la elastasa, seleccionadas de entre el grupo constituido por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, bronquitis crónica, fibrosis pulmonar, síndrome respiratorio agudo, enfisema pulmonar y hemorragia, siendo la actividad de la elastasa impedida o inhibida.
- 10 2. Deuterio para su utilización según la reivindicación 1, en el que la elastasa es la elastasa de neutrófilos humana (HNE).
- 15 3. Óxido de deuterio para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el óxido de deuterio es utilizado en combinación con al menos un principio activo farmacéutico adicional y/o al menos un principio activo no farmacéutico adicional.
- 20 4. Óxido de deuterio para su utilización según la reivindicación 3, en el que dicho al menos un principio activo farmacéutico adicional es seleccionado de entre el grupo constituido por sulfonamidas, antibióticos, en particular penicilina, corticoides, alquilfluorofosfatos, clorometilcetonas, fluoruros de sulfonilo, trifluorometilcetonas, ésteres de ácido bórico, aldehídos, péptidos de cadena corta, en particular con menos de 10 aminoácidos, agentes citostáticos, agentes quimioterápicos, principios activos sintéticos y vegetales con efecto antiinflamatorio.
- 25 5. Óxido de deuterio para su utilización según la reivindicación 3, en el que dicho al menos un principio activo no farmacéutico adicional es seleccionado de entre el grupo constituido por ácidos o bases orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables, polímeros, copolímeros, copolímeros de bloque, monosacáridos, polisacáridos, lípidos o tensioactivos iónicos y no iónicos, sales farmacológicamente inocuas, aromatizantes, vitaminas, tocoferoles, provitaminas, antioxidantes, estabilizadores y conservantes, así como mezclas de los mismos.
- 30 6. Óxido de deuterio para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el óxido de deuterio es administrado por vía tópica, transdérmica, nasal, sistémica rectal, parenteral, a través de una perfusión, de un endoscopio o como aerosol o formulación de polvo seco.
- 35 7. Óxido de deuterio para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el óxido de deuterio es administrado a modo de formulación.
8. Óxido de deuterio para su utilización según la reivindicación 7, en el que la formulación es una pomada, una crema, una loción, una emulsión o un gel o un hidrogel.

Figura 1

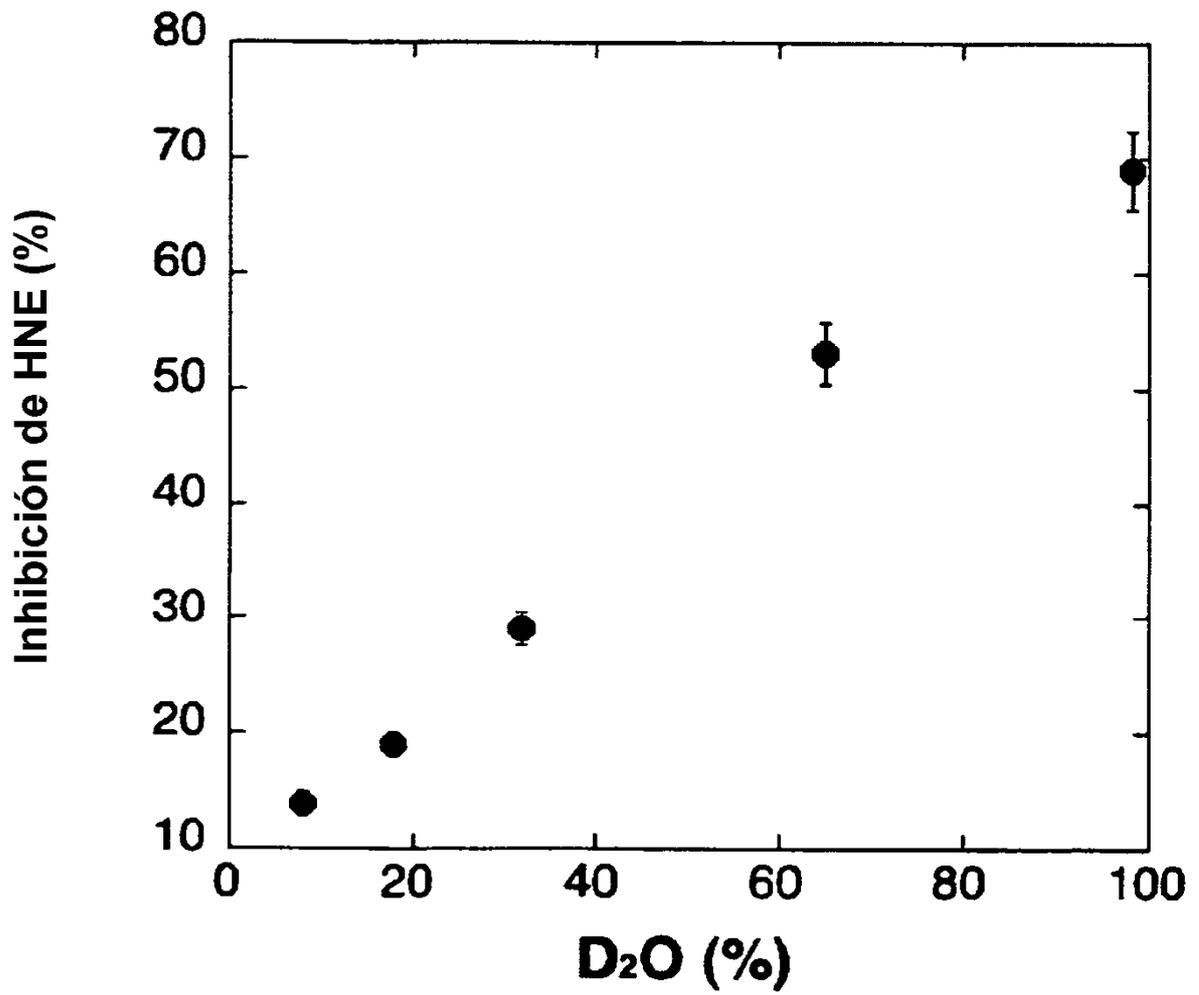


Figura 2

Tabla 1: Efecto de D2O en combinación con principios activos no farmacéuticos sobre un daño pulmonar agudo (hemorragia) tras instilación de HNE en el pulmón

Principio activo	Reducción del aerosol de D2O (%)	Reducción del aerosol de H2O (%)
Dextrano	70±6	10±5
Polietilenglicol	73±7	8±5
Albúmina sérica bovina	40±5	0
Desoxicolato de Na	68±4	8±3

Figura 3**Tabla 2: Efecto de D2O en combinación con principios activos farmacéuticos sobre un daño pulmonar agudo (hemorragia) tras instilación de HNE en el pulmón**

Principio activo	Reducción del aerosol de D2O (%)	Reducción del aerosol de H2O (%)
Sulfato de albuterol (1,5 mg/ml)	75±5	18±3
Bromuro de ipratropio (1,5 mg/ml)	79±6	15±3
Dexametasona (0,5 mg/ml)	73±5	23±4