

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 391**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013** **E 13718559 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2844253**

54 Título: **Tritocualina para uso en el tratamiento de la fibrosis quística**

30 Prioridad:

30.04.2012 EP 12305487

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

10.05.2016

73 Titular/es:

**ORPHAN SYNERGY EUROPE - PHARMA (100.0%)
29 bis, Rue du Fauburg Saint-Jacques
75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

COSTANTINI, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 569 391 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

Tritocualina para uso en el tratamiento de la fibrosis quística

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la biología, farmacia y medicina. Se refiere en particular a la tritocualina para uso en el tratamiento de la fibrosis quística o cualquier otra enfermedad fibrótica asociada con la IL-8. La invención se refiere también al método para el tratamiento de la fibrosis quística o cualquier otra enfermedad fibrótica asociada con la IL-8 mediante la administración de tritocualina. La invención se puede utilizar para mejorar la condición de los individuos con cualquier enfermedad fibrótica asociada con la IL-8, y en particular la fibrosis quística y cualquier complicación de la misma.

10 Antecedentes de la invención

La fibrosis quística afecta a 70.000 niños y adultos en todo el mundo (Fundación de la fibrosis quística). Aunque más de 1400 mutaciones diferentes pueden llevar a defectos en el CFTR (regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística), la mutación más común es una deleción del residuo de fenilalanina en la posición 508 de la proteína (DF508 CFTR). Esta mutación es responsable de más del 90 por ciento de los casos de fibrosis quística en todo el mundo.

15 La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones del gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que codifica una proteína transmembranal presente en una variedad de tipos de células y organelas. La mutación más común del gen CFTR es una deleción de 3 pares de bases que da como resultado la deleción de la fenilalanina en la posición 508, conocida como la mutación F508del de CFTR. Aunque la fibrosis quística se caracteriza típicamente por la presencia de insuficiencia pancreática e infecciones pulmonares recurrentes en niños, se ha identificado un amplio espectro clínico en adultos. La infección bacteriana crónica de las vías respiratorias, la mucosa espesada de las vías respiratorias, y la bronquiectasis caracteriza al pulmón con fibrosis quística. El exceso de mucosidad es causado en gran parte por la afluencia de neutrófilos, atraídos al sitio por el aumento de la expresión de quimiocinas tales como interleucina-6 (IL-6) e interleucina- 8 (IL-8), por productos bacterianos y citocinas inflamatorias.

20 Por ejemplo, la IL-8, producida por macrófagos, células epiteliales, y fibroblastos, es una potente quimiocina y activadora de los neutrófilos humanos y se considera que es una importante citocina proinflamatoria en la patogénesis de la fibrosis quística (E. Puchelle, S. De Bentzmann, C. Hubeau, J. Jacquot, and D. Gaillard, "Mechanisms involved in cystic fibrosis airway inflammation," *Pediatric Pulmonology*, vol. 32, no. 23, pp. 143-145, 2001). La IL-8 es inducida transcripcionalmente por una amplia variedad de estímulos incluyendo el factor-alfa de necrosis tumoral (TNF- α), el shock hiperosmótico y productos bacterianos. La fibrosis quística causa un fenotipo pro-inflamatorio masivo en el pulmón, que se manifiesta en las vías respiratorias por altos niveles de IL-8 y otras citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Bhattacharyya S. et al., *J. Biol. Chem.* 2011 April 1; 286(13):11604-11615). Por lo tanto, parece que la IL8 es una importante citocina inflamatoria que desempeña un papel clave en la fibrosis quística, en particular en los síntomas nasales y bronquiales de la fibrosis quística.

35 La enfermedad pulmonar progresiva en la fibrosis quística (FQ) es debida en gran parte a la inflamación persistente caracterizada por una abundancia de neutrófilos activados. Se ha creído tradicionalmente que la afluencia de neutrófilos en las vías respiratorias en la FQ es una respuesta a una infección crónica con bacterias. Sin embargo, estudios recientes de lavado broncoalveolar (BAL) han documentado niveles elevados de neutrófilos en las vías respiratorias inferiores de algunos niños con fibrosis quística incluso en ausencia de infección detectable. Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que la inflamación está anormalmente regulada en las vías respiratorias de la FQ. Se ha puesto el foco de atención sobre la interleucina IL-8, una quimiocina que representa la mayor parte de la actividad quimiotáctica para los neutrófilos del esputo de FQ y se encuentra repetidamente en concentraciones elevadas en las vías respiratorias de pacientes con FQ. Una fuente potencialmente importante de IL-8 en las vías respiratorias es el epitelio respiratorio. Puesto que el epitelio respiratorio manifiesta también la anomalía fenotípica más importante de la FQ, las células epiteliales de las vías respiratorias en la FQ sobreproducen la IL-8, y esto está ligado a la función anormal del regulador de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). La producción de IL-8 en los cultivos de células epiteliales nasales primarias de FQ y de no FQ en la línea base y después de estimulación con el factor- α de necrosis tumoral (TNF- α) o de la infección por el virus sincitial respiratorio (RSV) se utilizaron como modelos de IL-8 (el epitelio nasal tiene las mismas anomalías de transporte iónico que el epitelio de las vías respiratorias inferiores en la FQ).

50 Los tratamientos de la enfermedad FQ incluyen típicamente antibióticos, fármacos anti-inflamatorios, broncodilatadores, y fisioterapia de tórax para ayudar a luchar contra la infección, la inflamación neutrofílica y la obstrucción, y para aclarar las vías respiratorias. La meta es por lo tanto mantener las funciones pulmonares lo más cerca posible de las normales mediante el control de la infección respiratoria y la desobstrucción de las vías respiratorias de mucosidades. Sin embargo, la naturaleza persistente, viscosa y tóxica de las secreciones de las vías respiratorias en la enfermedad fibrosis quística todavía lleva al deterioro progresivo de la función pulmonar. A pesar de sus serias consecuencias clínicas, no hay ninguna terapia aprobada para el tratamiento de la FQ excepto el

ivacaftor (Kalydeco® de Vertex) registrado recientemente en Estados Unidos y que está en revisión en Europa como un potenciador del regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). El ivacaftor está indicado para el tratamiento de la fibrosis quística (FQ) en pacientes de 6 años de edad y mayores que tienen una mutación G551D en el gen CFTR. El ivacaftor solamente está autorizado para tratar un pequeño subconjunto de pacientes de FQ, aquellos que tienen la mutación G551D en el gen del regulador de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y se cree que sólo el 4 % de pacientes de FQ tienen esta mutación. En adición, la patología relacionada con los senos se trata específicamente de forma deficiente durante la FQ.

No hay disponible hasta ahora, ningún tratamiento de la fibrosis quística que mejore significativamente la calidad de vida de los pacientes durante un largo período de tiempo.

Por consiguiente, existe la necesidad de tratamientos alternativos o adicionales para la FQ y cualquier complicación de la misma.

La 7-amino-4,5,6-trietoxi-3-(4-metoxi-6-metil-7,8-dihidro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-il)-3H-isobenzofuran-1-ona o tritocualina es un fármaco, previamente formulado en comprimidos de 100 mg y comercializado en Europa para el tratamiento de la alergia. La tritocualina no es un producto puro, sino que está disponible como una mezcla de isómeros.

El mecanismo de acción descrito de la tritocualina se refiere a la inhibición de la biosíntesis de la histamina. Más específicamente, la tritocualina es un inhibidor de la enzima histidina Descarboxilasa (HDC), que cataliza la descarboxilación de la histidina *in vivo* para producir histamina, una amina biogénica endógena, más dióxido de carbono. Se propone la inhibición de la producción de histamina en el cuerpo para mejorar los síntomas de alergia y otras enfermedades que resultan de la alta producción de histamina, tales como rinitis, dermatitis, eczema, urticaria, asma,

La tritocualina se ha descrito también en el documento WO2008100539 para el tratamiento de las condiciones de la enfermedad gastrointestinal mejoradas por el control de la histamina, incluyendo la enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), alergia alimentaria, síndrome de Zollinger-Ellison, úlcera péptica, dispepsia, gastroenteritis eosinofílica alérgica, y mastocitosis con síntomas gastrointestinales.

En la solicitud de patente US20100144718, se describe la tritocualina (TRQ) (incluyendo derivados o isómeros de la misma) como un agonista del receptor H4 de histamina (H4R). La solicitud describe además el uso de agonistas de H4R, tales como tritocualina, para tratar enfermedades y/o condiciones patológicas moduladas por los agonistas de H4R. La enfermedad o condición modulada por H4R es más particularmente la enfermedad de obstrucción pulmonar crónica (EPOC) y/o el asma.

Sumario de la invención

Ha sido descubierto por el inventor que la tritocualina es un modulador capaz de reducir la secreción de IL8 en condiciones inflamatorias donde las células epiteliales, endoteliales, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y/o mastocitos están más particularmente implicados. Todas estas células implicadas en procesos inflamatorios crónicos están presentes en los tejidos pulmonares, nasales y mucosales, células epiteliales de la fibrosis quística (patología multi orgánica), células hepáticas y células pancreáticas.

La tritocualina puede desempeñar por lo tanto un papel clave en la reducción de la secreción de IL8 y desempeñar una potente función anti-inflamatoria en las condiciones de la fibrosis quística.

Sorprendentemente, la modulación por la tritocualina de la IL-8 se activa también independientemente del estímulo inicial de la liberación de IL-8. Este impacto puede ser muy importante en la fibrosis quística donde la infección desempeña un importante papel en el proceso inflamatorio (secreción de IL-8 post infección que mimetiza un estímulo, tal como Lipopolisacárido (LPS)).

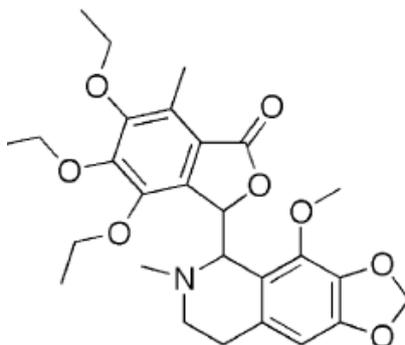
En base a este descubrimiento, la presente invención se refiere a tritocualina para uso en el tratamiento de la fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones.

La presente invención se refiere también al uso de tritocualina, para preparar una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento de una fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones, en el cual se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una tritocualina a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Descripción detallada de la invención

La tritocualina (o TRQ), como se ha mencionado antes, es un fármaco previamente presente en el mercado para el tratamiento de la alergia. Tiene la siguiente fórmula:



En la presente invención, el término tritocualina (o TRQ) incluye enantiómeros, diastereoisómeros y/o cualquier mezcla de los mismos. En efecto, y como se describe en el documento WO2007/117704, la estructura química de la tritocualina presenta dos carbonos asimétricos. Por lo tanto, dependiendo del método de síntesis, se puede producir el ingrediente farmacéutico activo tritocualina como una o dos estructuras diastereoisómeras que consiste cada una en sus dos correspondientes imágenes en el espejo, enantiómeros. Por lo tanto, la tritocualina puede existir como dos o cuatro posibles estructuras isoméricas. Utilizando la convención de designación R y S en cada carbono asimétrico, una de las dos posibles estructuras diastereoisómeras consistirá en los enantiómeros RR y SS, y la otra en los enantiómeros RS y SR. El término tritocualina en la presente invención incluye también cualquier sal farmacéuticamente aceptable o forma hidratada de la misma.

Como se usa en la presente memoria, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a derivados de la tritocualina descrita en donde el compuesto original se modifica para preparar sales de ácido o de base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales convencionales no tóxicas o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales convencionales no tóxicas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, y similares.

Clínicamente, la fibrosis quística (FQ) puede presentar varios tipos de complicaciones.

Por ejemplo, el CFTR deficiente da como resultado una disminución de la secreción de cloruro y un aumento de la reabsorción de sodio y agua a través de las células epiteliales. La reducción resultante de la altura del fluido de revestimiento epitelial y la reducción de la hidratación de la mucosidad produce una mucosidad que es más pegajosa para las bacterias, lo que promueve la infección y la inflamación. Las secreciones en el tracto respiratorio, páncreas, tracto gastrointestinal (GI), glándulas sudoríparas, y otros tejidos exocrinos tienen mayor viscosidad, lo que las hace difíciles de aclaramiento.

La mayor parte de los pacientes con fibrosis quística tienen una enfermedad pulmonar crónica grave y/o insuficiencia pancreática exocrina. Las manifestaciones adicionales incluyen las siguientes: poliposis nasal, pansinusitis, diarrea crónica, pancreatitis, cirrosis u otras formas de disfunción hepática.

Los pacientes con fibrosis quística pueden tener también enfermedad sinusal: los iones cloruro no pueden ser excretados, el sodio se absorbe excesivamente, y el agua circula pasivamente. Esto deseca la superficie mucosal y altera la viscosidad de la envoltura de mucosidad normal, lo que solo puede llevar a la obstrucción de las vías sinusales. Pueden existir anomalías adicionales en los pacientes de FQ, incluyendo disfunción ciliar, aumento de los mediadores inflamatorios, y aumento de la colonización con *Pseudomonas aeruginosa*, todas las cuales afectan además al aclaramiento y aireación normal de los senos. La infección e inflamación sinusal crónica son el resultado neto.

La mayor parte de las muertes asociadas con la fibrosis quística resultan de una enfermedad pulmonar progresiva y en fase final. En los individuos con fibrosis quística, los pulmones son normales en el útero, en el momento del nacimiento, y después del nacimiento, antes del inicio de la infección y de la inflamación. Poco después del nacimiento, muchas personas con fibrosis quística adquieren una infección pulmonar, lo que provoca una respuesta inflamatoria que lleva a la persistencia bacteriana con producción del factor quimiotáctico de neutrófilos interleucina IL-8 procedente de la degradación de las células epiteliales y de la elastina que contribuye a la persistencia de la inflamación y de la infección, al daño estructural, deterioro del intercambio gaseoso, y, finalmente, enfermedad pulmonar en fase final y muerte temprana.

La mayor parte de los pacientes con fibrosis quística (90-95 %) tienen insuficiencia de la enzima pancreática y

presentan trastornos digestivos con poca ganancia de peso en asociación con frecuentes deposiciones y dolor de cólico después de comer. La insuficiencia pancreática disminuye la absorción de los contenidos intestinales, la adhesión y la obstrucción intestinal mecánica.

5 La diabetes es una complicación común de la FQ en adultos. La principal causa de la diabetes relacionada con la FQ es la destrucción del páncreas debido a la fibrosis. Las células de los islotes que producen insulina están por lo tanto agotadas. En realidad, la mayor parte de los adultos que viven con FQ tienen algún grado de diabetes o intolerancia a la glucosa.

También son frecuentes los problemas hepatobiliares en la fibrosis quística incluyendo la cirrosis biliar focal específica, que resulta de la obstrucción biliar y de la fibrosis periportal progresiva.

10 En una realización particular, la invención se refiere a tritocualina para uso en el tratamiento de la enfermedad de fibrosis quística y/o complicaciones asociadas, y dichas complicaciones incluyen más específicamente infección, trastorno inflamatorio (más específicamente en el tracto respiratorio, páncreas, tracto gastrointestinal (GI), glándulas sudoríparas, u otros tejidos exocrinos), enfermedad pulmonar crónica grave, insuficiencia pancreática, poliposis nasal, pansinusitis, diarrea crónica, pancreatitis, cirrosis u otras formas de disfunción hepática, enfermedad sinusal
15 (p. ej., infección y/o inflamación sinusal crónica), diabetes, o problemas hepatobiliares (p. ej., cirrosis biliar focal, obstrucción biliar y fibrosis periportal progresiva).

En una realización particular, la invención se refiere a tritocualina para uso en el tratamiento de la enfermedad de fibrosis quística y/o de cualquiera de las complicaciones asociadas de las vías respiratorias o nasales, tales como enfermedad pulmonar (p. ej., enfermedad pulmonar crónica severa), poliposis nasal, pansinusitis, o enfermedad
20 sinusal (p. ej., infección y/o inflamación sinusal crónica).

La invención proporciona además métodos para el tratamiento de la fibrosis quística o de sus complicaciones (identificadas anteriormente) en un sujeto que necesite dicho tratamiento, en donde dichos métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de tritocualina.

25 La invención proporciona además el uso de tritocualina para la preparación de un medicamento o una composición farmacéutica destinado al tratamiento de la fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones (identificadas anteriormente).

Dentro del contexto de la invención, el término "tratamiento" designa el tratamiento preventivo, curativo y paliativo, así como el cuidado de los pacientes, la mejora de la calidad de vida, reducción del sufrimiento, mejora de la esperanza de vida, desaceleración del progreso de la enfermedad, alivio de los síntomas, reducción de los efectos
30 de la enfermedad, por ejemplo, causando la regresión, o restaurando o reparando una función perdida, desaparecida o defectuosa, etc.

Además, el tratamiento se puede llevar a cabo en combinación con otros agentes o tratamientos.

35 Como se usan en la presente memoria, los términos "sujeto", "individual," "animal," y "paciente," utilizados aquí de modo intercambiable, se refieren a mamíferos, incluyendo los seres humanos, y también incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, conejos, animales mamíferos de granja, animales mamíferos para deportes, y animales mamíferos de compañía. En muchas realizaciones, los sujetos serán seres humanos. Los modelos animales pueden ser de interés para investigaciones experimentales, proporcionando un modelo para el tratamiento de una enfermedad humana.

40 El término "efecto terapéutico deseable" significa tratar a un sujeto con tritocualina para prevenir o mejorar una enfermedad y/o condición patológica.

El término "cantidad eficaz" significa una cantidad de tritocualina o composición según la presente invención, eficaz para producir el efecto terapéutico deseado.

Una dosis de tritocualina administrada a un sujeto puede ser aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/día. En otra realización, la dosis de tritocualina administrada a un sujeto puede ser
45 aproximadamente 1 g/día. En una realización adicional, la dosis de tritocualina administrada a un sujeto puede ser aproximadamente 2 g/día. En otra realización más, la dosis de tritocualina administrada a un sujeto puede ser aproximadamente 3 g/día. En otra realización, la dosis de tritocualina administrada a un sujeto puede ser aproximadamente 1 mg-4 g/día. Los expertos pueden adaptar las dosis administradas. Resulta evidente que se pueden realizar administraciones repetidas, posiblemente en combinación con otros agentes activos o cualquier
50 vehículo que sea farmacéuticamente aceptable (p. ej., tampones, soluciones salinas, isotónicas, en presencia de agentes estabilizantes, etc.).

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance de un criterio médico razonable, adecuados para utilizar en contacto con los tejidos del sujeto sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u
55 otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

5 La tritocualina utilizada dentro del marco de esta invención generalmente se formula en una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la presente invención trata de una composición farmacéutica que comprende tritocualina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de la fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones (como se han definido anteriormente).

10 Se puede administrar tópicamente, intravenosamente, subcutáneamente, por inhalación o utilizando un nebulizador o en una forma disponible oralmente tal como comprimidos o cápsulas, más específicamente oralmente o por inhalación. La administración se puede llevar a cabo por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, preferiblemente oralmente, por inhalación o inyección, que es sistémica o local (formas inhaladas intranasales y/o bronquiales). La inyección se administra típicamente por vía intra-ocular, intra-peritoneal, intra-cerebral, intravenosa, intra-arterial, sub-cutánea o intra-muscular. La administración en aerosol de la tritocualina puede dar como resultado en una distribución más homogénea del ingrediente activo en el pulmón, de tal modo que se obtiene una administración profunda al pulmón. De este modo, la dosis de aplicación podría ser reducida a la presencia sostenida de tritocualina en el sitio de acción en el pulmón.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden tritocualina según la invención se pueden presentar por lo tanto en la forma de comprimidos, soluciones o suspensiones inyectables o frascos multi-dosis, cápsulas, píldoras, sellos, polvos, supositorios o cápsulas rectales, soluciones o suspensiones.

20 El vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar de soluciones tampón, disolventes, aglutinantes, estabilizantes, emulsionantes, etc. Las soluciones tampón o disolventes son en particular fosfato de calcio, sulfato de calcio, lactosa, celulosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón, azúcar extrafino e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (para liberación retardada). Los aglutinantes son por ejemplo almidón, gelatina y soluciones de envase tales como sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa, etc. También se pueden utilizar gomas naturales o sintéticas, tales como en particular alginato, carboximetilcelulosa, metil celulosa, polivinilpirrolidona, etc.

25 Otros excipientes son por ejemplo celulosa, estearato de magnesio, ciclodextrinas o una mezcla de los mismos. Se pueden incorporar agentes estabilizantes a las formulaciones, tales como por ejemplo polisacáridos (goma arábiga, agar, ácido algínico, goma guar y goma tragacanto, quitina o sus derivados y éteres de celulosa). Los disolventes o soluciones son por ejemplo solución de Ringer, agua, agua destilada, tampones de fosfato, soluciones salinas fosfatadas, y otros fluidos convencionales.

30 Otros aspectos y ventajas de esta invención se aclararán después de la lectura de los siguientes ejemplos, que se deben considerar como ilustrativos y no limitantes.

Ejemplos

Efecto de la tritocualina sobre la liberación de IL8 en un modelo humano *ex vivo* (células epiteliales procedentes de extracción gingival humana mantenidas en supervivencia) después de estimulación de la liberación de IL8

1) Preparación de la mucosa gingival

35 Se mantuvieron en supervivencia *ex vivo* 13 fragmentos de mucosa gingival de diferentes donantes humanos (extracción de las muelas del juicio de voluntarios sanos). Con este fin, se pusieron los fragmentos en insertos suspendidos ellos mismos por encima de los pocillos de cultivo. Se añadió el medio nutriente (antibióticos, FCS - suero fetal de ternera) al fondo de los pocillos, se realizó el pase por difusión lenta de los dos compartimentos por medio de una membrana porosa (0,45 mm). Se mantuvo el conjunto en cultivo de órganos durante 24 horas en una estufa en atmósfera húmeda a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂.

2) Modelo experimental de mucosa gingival estimulada por la sustancia P

Se alcanzó la inflamación gingival por estimulación de la mucosa con un neurotransmisor, sustancia P (10 microM) depositada en el medio de cultivo.

45 Se añadió tritocualina al medio de cultivo (efecto sistémico) a una concentración de 20 microM, 10 minutos después de la aplicación de la sustancia P.

Se establece una comparación de la modulación de la inflamación (dosis de citocina IL8) en:

control de la mucosa gingival

mucosa gingival estimulada por la sustancia P,

mucosa gingival estimulada por la sustancia P y tritocualina

50 Se midió la citocina inflamatoria, IL8, un potente factor quimiotáctico de los neutrófilos, en los sobrenadantes de cultivo, 24 horas después de la deposición de la sustancia P.

3) Ensayo bioquímico de una citocina proinflamatoria

Se midió la IL8 en ng/ml por inmunoensayos (kits Gen Probe, France) con un espectrofotómetro a 450 nm.

4) Resultados y comentarios

5 La sustancia P aumenta significativamente la liberación de IL8: 31,7 ng/ml frente a 29,6 ng/ml en el grupo control ($p = 0,04$).

La tritocualina induce un descenso significativo de la liberación de IL8 cuando el epitelio mucosal fue estimulado por la sustancia P (26,7 ng/ml frente a 31,7 ng/ml en el grupo estimulado por la sustancia P ($p = 0,02$).

10 Las células mucosales humanas fueron previamente estimuladas por la sustancia P, un compuesto pro-inflamatorio establecido capaz de aumentar significativamente la liberación de IL8 sobre las células epiteliales, pero también sobre otras células bronquiales o nasales. En este contexto, la tritocualina ha demostrado así un impacto significativo sobre la liberación de IL8 en el modelo de células epiteliales humanas *ex vivo*. La tritocualina, como una nueva propiedad anti-inflamatoria a través de la reducción de IL8, es por lo tanto particularmente interesante en las condiciones crónicas de las vías respiratorias de la fibrosis quística donde la IL8 está aumentando continuamente.

REIVINDICACIONES

- 1) Tritocualina para uso en el tratamiento de la enfermedad fibrosis quística o de al menos una de sus complicaciones asociadas.
- 5 2) La tritocualina para uso según la reivindicación 1, en donde las complicaciones de la fibrosis quística se seleccionan de infección o trastornos inflamatorios.
- 3) La tritocualina para uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde las complicaciones de la fibrosis quística se seleccionan de infección o de trastornos inflamatorios en el tracto respiratorio, páncreas, tracto gastrointestinal, glándulas sudoríparas, u otros tejidos exocrinos.
- 10 4) La tritocualina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las complicaciones de la fibrosis quística se seleccionan de enfermedad pulmonar crónica grave, insuficiencia pancreática, poliposis nasal, pansinusitis, diarrea crónica, pancreatitis, cirrosis u otras formas de disfunción hepática, enfermedad sinusal diabetes, o problemas hepatobiliares, más específicamente cirrosis biliar focal, obstrucción biliar y fibrosis periportal progresiva.
- 15 5) La tritocualina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el tratamiento de la enfermedad fibrosis quística y/o cualquiera de las complicaciones asociadas de las vías respiratorias o nasales.
- 6) La tritocualina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la tritocualina se administra a un sujeto a la dosis de 1 mg-4 g/día.
- 7) La tritocualina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la tritocualina se administra a un sujeto a la dosis de 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, o 600 mg/día.
- 20 8) La tritocualina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la tritocualina se administra a un sujeto a la dosis de 1 g/día, 2 g/día, 3 g/día o 4 g/día.