

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 485**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/7042 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61K 31/7064 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011** **E 11177357 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017** **EP 2556832**

54 Título: **Uridina y análogos de uridina para el uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (100.0%)
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE

72 Inventor/es:

IDZKO, MARCO y
SORICHTER, STEPHAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 640 485 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

Uridina y análogos de uridina para el uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La presente invención se refiere a una nueva indicación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) para uridina y análogos de uridina.

5 La COPD es un problema sanitario importante y es la cuarta causa más común de muerte en los países desarrollados. La COPD representa un espectro de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, incluyendo bronquitis crónica y enfisema pulmonar. Además de los efectos extrapulmonares significativos que pueden contribuir a la gravedad de los pacientes individuales, el componente pulmonar de la COPD se caracteriza por una limitación del flujo aéreo que no es totalmente reversible. La limitación del flujo aéreo habitualmente es progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a partículas o gases nocivos. Anormalidades fisiológicas en la COPD pueden incluir, p. ej., hipersecreción mucosa y disfunción ciliar, distensión y anomalías de intercambio de gases. La distensión permanente anormal de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales acompañada por destrucción de la pared alveolar y con fibrosis obvia se define como enfisema pulmonar. En cuanto a la terapia de la COPD, hasta ahora ningún fármaco ha demostrado eficacia para detener el deterioro de la función pulmonar. La terapia farmacológica se dirige más bien a mantener el control de síntomas y prevenir la exacerbación y existe una necesidad de nuevas alternativas terapéuticas.

20 Los nucleótidos de uridina, los ésteres de fosfato de uridina, habían sido propuestos previamente para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la fibrosis quística, que es una forma hereditaria de fibrosis. La promoción de la depuración mucociliar por el trifosfato de uridina (UTP) fue sugerida en el documento WO 99/32085 en vista de un tratamiento de la fibrosis quística. El documento WO 99/09998 se dirigía a un método para hidratar secreciones mucosas pulmonares al administrar difosfato de uridina (UDP) o análogos del mismo y trata, p. ej., la fibrosis quística y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El UDP y el UTP actúan sobre receptores purinérgicos pertenecientes a la familia P2Y. El UDP es, p. ej., un potente agonista del receptor P2Y6 y el UTP activa el receptor P2Y2.

30 El documento WO 2007/002945 divulga agonistas del receptor P2Y6 para tratar enfermedades pulmonares. Los compuestos propuestos como agonistas del receptor P2Y6 son derivados de purina o pirimidina que tienen un residuo de furanosa o carbociclo y al menos un residuo de fosfato.

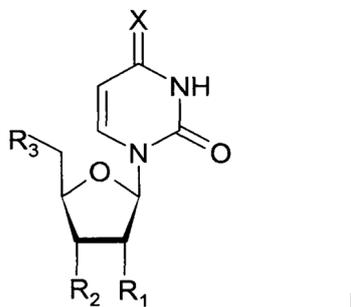
35 Sin embargo, se ha sugerido recientemente que la señalización purinérgica representa un papel en la patogénesis de la COPD y la inflamación alérgica de las vías respiratorias. El bloqueo del receptor P2 evitaba el desarrollo de enfisema en ratones expuestos a tabaco al reducir el aflujo a los pulmones de las células inflamatorias y se observó que los ratones deficientes en receptor P2Y2 tenían una inflamación pulmonar reducida después de la exposición aguda a humo (Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, J Immunol. 1 de julio de 2010;185(1):688-97). De forma similar, el cloqueo del receptor P2Y6 o la deficiencia del receptor P2Y6 reducían características principales del asma experimental (Paula Vieira R y cols., P2Y6 Receptor Contributes to Airway Inflammation and Remodeling in Experimental Allergic Airway Inflammation, Am J Respir Crit Care Med. 21 de abril de 2011). Una activación de estos receptoras podría así ser contraproducente y todavía existe una necesidad de compuestos que se puedan aplicar para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la fibrosis quística.

45 El nucleósido uridina, que no soporta grupos fosfato, se aplicó anteriormente en el tratamiento para la reducción de la toxicidad mitocondrial provocada por una terapia antirretroviral muy activa (HAART) en el ser humano y se describió que era segura y eficaz (Walker UA y Venhoff N, Uridine in the prevention and treatment of NRTI-related mitochondrial toxicity, Antivir Ther. 2005;10 Supl 2:M117-23; EP 1365755 B1). Recientemente, también se presentó de la uridina y su análogo 4-tiouridina en vista de su papel protector en la inflamación pulmonar aguda. Se describió que la uridina suprime la inflamación de vías respiratorias asmáticas basándose en un modelos de ovoalbúmina (OVA)-alumbre y un modelo de inflamación de las vías respiratorias inducida por ácaro del polvo doméstico (HDM) en ratones (Müller T y cols., Local administration of uridine suppresses the cardinal features of asthmatic airway inflammation, Clin Exp Allergy. oct 2010; 40(10):1552-60). Se demostró que la 4-tiouridina tiene efectos antiinflamatorios similares a los de la uridina (Evaldsson C y cols., 4-thiouridine induces dose-dependent reduction of oedema, leucocyte influx and tumour necrosis factor in lung inflammation, Clin Exp Immunol. febrero 2009;155(2):330-8). Los experimentos se efectuaron usando un modelo de inflamación pulmonar aguda inducida por Sephadex, que muestra similitud en el perfil inflamatorio con el asma clínica.

60 Aunque se han sugerido el UDP y el UTP para el tratamiento de la COPD y la fibrosis quística, pero realmente podría ser contraproducente, el papel de la uridina para el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) era desconocidos hasta ahora.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que un compuesto de fórmula I es útil para el tratamiento o la prevención de la COPD.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. El compuesto de fórmula I se define como



I

5 en donde X representa O o S, R₁ representa H, OH o -O-(alcanoilo C₁-C₆) y R₂ y R₃ representan independientemente entre sí OH o -O-(alcanoilo C₁-C₆).

En -O-(alcanoilo C₁-C₆), el alcanoilo C₁-C₆ está unido al oxígeno por medio de carbonilo. Si están presentes uno o
 10 varios grupos -O-(alcanoilo C₁-C₆), se prefiere -O-(alcanoilo C₁-C₄), se prefiere más -O-(alcanoilo C₂-C₃) y -O-(alcanoilo C₂) es el más preferido. En -O-(alcanoilo C₁-C₆), el alcanoilo C₁-C₆ puede ser de cadena lineal o ramificado, cuando el número de átomos de carbono permita grupos ramificados. Los sustituyentes R₁, R₂ y R₃ pueden ser idénticos o diferentes. En una realización particularmente preferida de la presente invención, los sustituyentes R₁, R₂ y R₃ son iguales, lo más preferiblemente OH o -O-(alcanoilo C₂). Se prefieren especialmente
 15 compuestos de la fórmula I en los que R₁, R₂ y R₃ representan cada uno OH y X representa O (uridina), en los que R₁, R₂ y R₃ representan cada uno OH y X representa S (4-tiouridina) y en los que R₁, R₂ y R₃ representan cada uno -O-(alcanoilo C₂) y X representa O (triacetiluridina). El compuesto de fórmula I en el que R₁, R₂ y R₃ representan cada uno OH y X representa O (uridina) es el más preferido.

20 Un compuesto de fórmula I también se denomina en la presente el "compuesto activo" o el "compuesto activo de la invención".

El compuesto activo de la presente invención se aplica principalmente para el tratamiento o la prevención de COPD en sujetos humanos, pero también se puede emplear en animales, tales como, p. ej., el perro.

25 El efecto de la uridina y sus análogos como un tratamiento o una medida profiláctica útil de la COPD se puede observar, p. ej. a partir de los Ejemplos 1 y 2. Como el humo de los cigarrillos es un factor de riesgo importante para desarrollar COPD, se efectuaron experimentos en animales para determinar el efecto del tratamiento con uridina en ratones con exposición a humo a corto o largo plazo.

30 Evidencias crecientes apuntan a un papel importante del ATP liberado endógeno en la patogénesis de la COPD, ya que se ha mostrado que los niveles de ATP de las vías respiratorias se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (limitación de las vías respiratorias) y la interferencia con la ruta ATP/P2R inhiben todas las características principales de la COPD (Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of
 35 smoke-induced lung injury and emphysema, J Immunol. 1 de julio de 2010;185(1):688-97, Lucattelli M, Cicko S y cols., P2X7 receptor signalling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema Am J Respir Cell Mol Biol. marzo 2011;44(3):423-9, Lommatzsch M y cols., Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease, Am J Respir Crit Care Med. 1 de mayo de 2010;181(9):928-34). Notablemente, la cantidad de ATP extracelular en BALF de ratones expuestos a humo tratados con uridina se podría reducir ahora significativamente de un modo dependiente de la dosis en comparación con ratones no tratados con uridina (Figura 1b). Por otra parte, el tratamiento con uridina también reducía dependientemente de la dosis el número de
 40 macrófagos y neutrófilos y los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6 (interleucina-6), IFN-γ (interferón-gamma), IL-1-β (interleucina-1 beta), KC (quimiocina derivada de queratinocitos) y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos-2), que se asocian con el comienzo y/o el mantenimiento de la inflamación pulmonar inducida por el humo de cigarrillos en la COPD.

45 En un modelo murino de exposición crónica a humo, que se caracteriza por el desarrollo de enfisema pulmonar, se mostró adicionalmente que los ratones tratados con uridina mostraban una intersección lineal media significativamente inferior y una superficie específica interna superior del pulmón en comparación con ratones no tratados con uridina (Figura 2). La determinación de la distancia interalveolar promedio (intersección lineal media) se ha convertido en una medida aceptada para confirmar la presencia de enfisema en diversos modelos en animales. La exposición al humo incrementaba así la intersección lineal media en el modelo murino aquí aplicado sobre el control mientras que el tratamiento con uridina podría reducir los efectos perjudiciales del humo.

50 Por lo tanto, la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula I para la prevención o preferiblemente el tratamiento de la COPD. Según la presente invención, el tratamiento de la COPD incluye el tratamiento de los 4 estadios de la COPD (COPD GOLD I-IV) según se definen por the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung

Disease (GOLD), y particularmente también el tratamiento del enfisema. El compuesto activo también es particularmente adecuado para el tratamiento de estadios tempranos de COPD como, p. ej., los definidos por COPD GOLD I-II.

5 El tratamiento con uridina también resultó ser útil en la enfermedad pulmonar. El Ejemplo 3 de la presente invención demostró en un modelo en ratones de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina que el tratamiento con uridina podía reducir significativamente la cantidad de colágeno en el pulmón. Por otra parte, el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-1), que representa un papel en el control extracelular de la actividad catalítica de metaloproteinasas de matriz (MMP), se redujo hasta niveles normales después de la instilación de bleomicina cuando los animales eran tratados con uridina en contraste con los niveles incrementados de TIMP-1 sin tratamiento con uridina (Figura 3). De forma similar, en el modelo en ratones de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, el tratamiento con uridina daba como resultado una regulación a la baja de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1beta (interleucina-1 beta), IL-6 (interleucina-6), KC (quimiocina derivada de queratinocitos) y TNFalfa (factor de necrosis tumoral-alfa) así como una regulación a la baja de macrófagos, linfocitos y neutrófilos en BALF.

15 A partir de la complementación con uridina presentada previamente en la lipoatrofia por VIH, se sabe que el compuesto activo de la presente invención es seguro y muy tolerable.

20 Se puede emplear cualquier vía de administración del compuesto activo de la invención al sujeto del tratamiento. Esto incluye, p. ej., una administración oral, nasal, inhalatoria o intravenosa del compuesto activo, en donde se prefieren una administración oral o inhalatoria del compuesto activo de la invención.

25 La dosificación del compuesto activo de la invención depende de diferentes parámetros, p. ej. el sustrato al que se administra el compuesto activo, el peso corporal y la edad del sustrato, el estado individual del sustrato. la enfermedad y la gravedad de la enfermedad y la vía y la frecuencia de administración. El compuesto activo se puede administrar, p. ej., oralmente en una dosis de 1-1.000 mg/kg al día, preferiblemente 5-500 mg/kg al día, que se puede dividir en varias, p. ej. 3, dosis. Para una administración inhalatoria, la dosis preferida del compuesto activo por inhalación está entre 100 µg-1000 mg. Varias de estas dosis se pueden administrar sucesivamente y/o varias veces al día si es necesario.

30 El compuesto activo de la invención se administra típicamente junto con un excipiente farmacéutico.

35 El compuesto de la invención se puede formular en una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz de uno o más compuestos activos de la invención. El compuesto activo de la invención está contenido típicamente en la composición farmacéutica junto o mezclado con uno o más excipientes farmacéuticos orgánicos y/o inorgánicos que pueden ser fluidos, sólidos o gaseosos. Adicionalmente, pueden estar presentes uno o más de otros compuestos farmacéuticamente activos para el tratamiento de la COPD.

40 Para la preparación de una composición farmacéutica sólida para la administración oral, el excipiente farmacéutico puede incluir específicamente, p. ej., cargas y aglutinantes tales como derivados de celulosa, celulosa microcristalina, lactosa, manitol, xilitol, sacarosa, almidón, polivinilpirrolidona y amilopectina. También pueden estar presentes agentes desintegrantes, lubricantes y deslizantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden revestir además con un revestimiento entérico. Las composiciones farmacéuticas sólidas para administración oral se preparan preferiblemente en forma de comprimidos o cápsulas, p. ej. cápsulas de gelatina dura o blanda. Alternativamente, una composición farmacéutica para administración oral que comprende el compuesto activo se puede preparar como polvo para ser envasado en un recipiente, p. ej. una bolsita. El contenido del recipiente se puede disolver o suspender, p. ej., en agua, zumo o leche para una ingestión fácil.

50 En la preparación de una composición farmacéutica inyectable, el compuesto activo de la presente invención se combina habitualmente con excipientes y aditivos farmacéuticos, tales como, p. ej., reguladores del pH, agentes estabilizantes, agentes tamponadores y agentes de tonicidad. También es posible preparar preparaciones secas para que sean reconstituidas extemporáneamente antes de la inyección.

55 Para la administración nasal, la composición farmacéutica puede contener, p. ej., el compuesto activo de la invención disuelto o suspendido en un excipiente farmacéutico líquido, que preferiblemente es acuoso. Pueden estar presentes aditivos tales como, p. ej., agentes solubilizantes, tensioactivos y/o conservantes.

60 Para la administración inhalatoria, el compuesto activo de la invención se puede aportar, p. ej., a partir de un inhalador de polvo seco o como un pulverizador de aerosol desde un recipiente presurizado, estando el compuesto activo suspendido o disuelto en un propelente adecuado licuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, dióxido de carbono u otro gas adecuado, o a partir de una bomba, un pulverizador o un nebulizador que puede contener una solución o suspensión del compuesto activo. Cuando sea apropiado, el compuesto activo se puede formular junto con aditivos, p. ej. disolventes, tampones, aminoácidos, conservantes o tensioactivos. Se pueden formular cápsulas para el uso en un inhalador o cartuchos, que contienen una mezcla en polvo que comprende el compuesto activo. Un polvo seco para inhalación se podría formular, p. ej., mediante secado por pulverización del

compuesto activo con un azúcar o alcohol sacárico, tal como lactosa, trehalosa o manitol y otros aditivos opcionales, p. ej. tampones y aminoácidos.

5 El compuesto activo de la invención también se puede administrar junto con uno o más de otros compuestos farmacéuticamente activos para el tratamiento de la COPD. Estos otros compuestos farmacéuticamente activos para el tratamiento de la COPD incluyen, p. ej., β_2 -agonistas de acción corta o prolongada tales como fenoterol, levalbuterol, salbutamol (albuterol), terbutalina o formoterol, arformoterol, indacaterol, salmeterol; anticolinérgicos de acción corta o larga tales como bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio o bromuro de tiotropio; metilxantinas
10 tales como aminofilina y teofilina; glucocorticoides tales como beclometasona, budenosida, propionato de fluticasona, prednisona, metilprednisolona e inhibidores de fosfodiesterasa-4 tales como roflumilast.

La presente invención incluye así además formulaciones que comprenden el compuesto activo de la invención y uno o más compuestos farmacéuticamente activos diferentes en una misma preparación, p. ej., un comprimido que comprende ambos compuestos. Igualmente se incluyen en la presente invención la administración concomitante o escalonada en el tiempo del compuesto activo y un compuesto farmacéuticamente activo en 2 formas de dosificación diferentes, p. ej. un comprimido que comprende el compuesto activo de la invención y ningún otro compuesto farmacéuticamente activo para el tratamiento de la COPD y otro comprimido que comprende uno o más compuestos farmacéuticamente activos para el tratamiento de la COPD, pero no el compuesto activo de la presente invención.

20 Los ejemplos posteriores pretenden ilustrar la invención sin limitarla sin embargo.

Figuras

Figura 1. La uridina afecta a la respuesta a la exposición a humo aguda y continua

25 (a) - (c): Ratones C57BL/6 macho se dejaron sin tratar o se expusieron al humo de 5 cigarrillos durante tres días consecutivos. Treinta minutos antes de las exposición al humo los animales recibieron una inyección i.t. de vehículo o diferentes concentraciones de uridina. Una hora después de la última exposición al humo los animales fueron sacrificados y el fluido de BAL se analizó con respecto a (a) el número y la distribución de células, (b) el contenido de niveles de ATP y (c) los niveles de citocina proinflamatoria IL-6, IFN γ , IL-1 β , KC y MIP-2. Los datos se muestran como media \pm EEM, n=5 ratones en cada grupo. *P<0,05, animales expuestos a humo tratados con uridina frente a
30 tratados con vehículo

(d): Los animales se dejaron sin tratar o se expusieron al humo de 5 cigarrillos durante tres días consecutivos, a partir del día 4 la exposición a humo bien se continuó o bien se cambió por aire ambiental. Del día 4 al día 6 los animales recibían una aplicación p.o. de 200 μ l de uridina 10 mM o vehículo (PBS) 30 min antes de la exposición a humo o aire. El día 6, se analizaron las diferencias del BALF. Los datos se muestran como media \pm EEM, n=5
35 ratones en cada grupo.*P<0,05 animales tratados con humo/vehículo frente a tratados con humo/uridina en los mismos momentos.

Figura 2. Determinación morfogeométrica de los efectos de la uridina sobre el avance de los cambios enfisematosos provocados por la exposición a humo de cigarrillos.

Figura 3: la uridina disminuye la fibrosis pulmonar inducida por BLM

40 Se indujo fibrosis pulmonar mediante la aplicación intrapulmonar de BLM a ratones macho C57/Bl6 en día 0. Partiendo del día 14, los animales fueron tratados bien con vehículo o bien con uridina p.o 3x/semana. El día 30 los animales fueron sacrificados y se analizó el recuento de células diferenciales (a), citocina (b) en el fluido de BAL y la cantidad de colágeno en el pulmón. *P <0,05 animales tratados con BLM/vehículo frente a tratados con BLM/uridina.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Exposición a humo de cigarrillos aguda y continua

50 Ratones C57BL/6 macho se expusieron a todo el humo de cinco cigarrillos (cigarrillos con filtro Virginia comerciales: 12 mg de alquitrán y 0,9 mg de nicotina) o aire ambiental durante 20 min a lo largo de tres días consecutivos en jaulas macrolon especialmente diseñadas (Tecniplast, Buguggiate, Italia), según se describió previamente (Cavarra E y cols., Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. agosto 2001;281(2):L412-7, Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition

prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):688-97). El humo se produjo mediante la combustión de un cigarrillo y se introdujo en la cámara con el flujo aéreo generado por un respirador mecánico (7025 Rodent Ventilator, Ugo Basile, Biological Research Instruments, Comerio, Italia), a una velocidad de 250 ml /min. Se usó un segundo respirador mecánico para proporcionar aire ambiental para la dilución (1:8) de la corriente de humo.

En algunos experimentos, se realizó un tratamiento intratraqueal (i.t.) antes de cada exposición a humo: los animales fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de quetamina/xilacina y recibían una inyección i.t. de uridina en un volumen total de 80 μ l (1 mM o 10 mM) o PBS que se usaba como vehículo. Una hora después de la última estimulación con humo, los ratones fueron sacrificados y se realizó un lavado broncoalveolar (BAL).

Para estudiar el efecto de la uridina en la exposición continua a humo de cigarrillos, los ratones fueron expuestos a humo los días 1-3 según se describe anteriormente. A continuación, se aleatorizaron para recibir bien vehículo (PBS) o bien uridina por vía oral (p.o.) (200 μ l 10 mM) 30 min antes de cada una de una serie de tres estimulaciones con humo o aire el día 4-6 (según se describe anteriormente). El día 6, una hora después de la estimulación humo/aire, los ratones fueron sacrificados y se recogió el fluido del lavado broncoalveolar (BALF).

Lavado broncoalveolar en animales

El fluido del BAL se recogió al canular la tráquea bajo anestesia profunda con pentobarbital y lavando el pulmón tres veces con 1 ml de PBS que contenía 0,1 mM de EDTA, según se describió previamente (Idzko M y cols., Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells, *Nat Med.* agosto 2007;13(8):913-9, Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 1 de julio de 2010;185(1):688-97). Se contaron los números de células totales y se realizaron recuentos diferenciales de células sobre preparaciones de Cytospin después de la tinción con Diff-Quick (Medion Diagnostics, Dudinggen, Suiza). Los recuentos diferenciales de células se realizaron sobre >200 células usando criterios morfológicos estándar y análisis por FACS.

Citometría de flujo

Después del recuento y el lavado, las células del BAL se tiñeron durante 30 min con anti-MHC clase II (macrófagos/DC), anti-7/4 (Caltag) FITC (neutrófilos; Abd-Serotec, Düsseldorf, Alemania), anti-CD3 y anti-CD19 cy-chrome (linfocitos) y anti-CD 11c APC macrófagos /DCs (eBioscience, San Diego, CA) en PBS que contenía 0,5% de BSA y 0,01% de azida sódica. Los recuentos diferenciales de células se analizaron mediante citometría de flujo, según se describió previamente (Idzko M y cols., Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells, *Nat Med.* agosto 2007;13(8):913-9 y Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 1 de julio de 2010;185(1):688-97).

Medida de ATP en fluido de BAL

Para medir las concentraciones de ATP en BALF en ratones, se usaron sobrenadantes de BALF recientes, según las instrucciones del fabricante (ATPlite Assay, PerkinElmer, Wellesley MA), pero sin la etapa de lisis celular para evitar cualquier ATP intracelular contaminante, según se describió previamente (Idzko M y cols., Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells, *Nat Med.* agosto 2007;13(8):913-9 Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 1 de julio de 2010;185(1):688-97).

Medida de citocinas en fluido de BAL

Las concentraciones de citocinas en BALF se midieron usando estuches de ELISA disponibles comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN) según las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias entre las muestras se calculó usando ANOVA, seguido por la prueba de comparación de Bonferroni. Las diferencias se consideraban significativas si $p < 0,05$.

Los datos del Ejemplo 1 se presentan en la Figura 1.

Ejemplo 2

Exposición crónica a humo de cigarrillos

La metodología de la exposición crónica a humo se ha descrito previamente (Cavarra E y cols., Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* agosto 2001;281(2):L412-7 Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 1 de julio de 2010;185(1):688-97). Brevemente, ratones C57BL/6 macho se expusieron bien al humo de 3 cigarrillos al día (cigarrillos con filtro Virginia comerciales: 12 mg de alquitrán y 0,9 mg de nicotina), 5 días a la semana o bien a aire ambiental (controles) durante 4 o 7 meses, respectivamente. Cuando se indicaba, los animales recibían un tratamiento oral mediante sonda con uridina (0,6 mg/kg) 45 min antes de la exposición al humo.

Histología

Al final del período de tiempo respectivo, los animales fueron sacrificados; se realizó un BAL seguido por resección de los pulmones. Los pulmones fueron fijados intratraquealmente con formalina (5%) a una presión de 20 cm de H₂O. El volumen pulmonar se midió mediante desplazamiento de agua. A continuación, todos los pulmones se deshidrataron, se depuraron en tolueno y se embebieron bajo vacío en parafina. Se realizaron dos secciones transversales de 7 µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Dos patólogos que ignoraban el protocolo de exposición llevaron a cabo una evaluación morfológica y morfométrica. La valoración morfométrica incluía la determinación de la distancia interalveolar promedio (intersección lineal media: Lm) (Cicko S y cols., Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke-induced lung injury and emphysema, *J Immunol.* 1 de julio de 2010 1;185(1):688-97) que representa el tamaño promedio del espacio aéreo (conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos) y de la superficie específica interna de los pulmones (ISA). Lm es la longitud de una línea de prueba situada sobre cortes histológicos del pulmón, dividida por el número de veces que la línea cruza las paredes alveolares (no las superficies). Campos con bronquios, bronquiolos grandes o vasos sanguíneos se excluyeron de las medidas. La siguiente fórmula se usó para el cálculo de la Lm: $Lm = \text{la longitud total de 50 líneas} / \text{el número de intersecciones de alveolos}$.

Este valor de Lm se usó para calcular la ISA (que representa la superficie de intercambio de gas), necesaria para evaluar el grado de enfisema, a partir de la ecuación $4V/Lm$, donde V es el volumen pulmonar después de la fijación. Para la determinación de la Lm para cada par de pulmones, se evaluaron 40 campos histológicos tanto verticalmente como horizontalmente.

El examen de estos números de los campos significaba que se evaluaba prácticamente toda la superficie pulmonar.

Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias entre las muestras se calculó usando ANOVA, seguido por la prueba de comparación de Bonferroni. Las diferencias se consideraban significativas si $p < 0,05$.

Los datos del Ejemplo 2 se presentan en la Figura 2.

Ejemplo 3

Modelo en ratones de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (BLM)

La inducción de la fibrosis pulmonar inducida por BLM se realizó como se describió previamente (Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, y cols. IL-1 α /myd88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117(12):3786-3799). A continuación, animales C57/Bl6 macho se trataron con la uridina p.o. (200 µl 10 mM) o vehículo 14 días después de la instilación de BLM 3 días a la semana. Al día 30 los animales fueron examinados con respecto a las características típicas de una lesión pulmonar inducida por BLM. Por lo tanto, se recogió el BALF y el recuento diferencial de células se analizó como se describió anteriormente.

Medida de citocinas en fluido de BAL

Las concentraciones de citocinas en BALF se midieron usando estuches de ELISA disponibles comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN) según las recomendaciones del fabricante.

Cantidad de colágeno en el pulmón

La cantidad de colágeno pulmonar se midió en el tejido pulmonar usando en ensayo de Sircol según las recomendaciones del fabricante (Biocolor, Life-Science, RU).

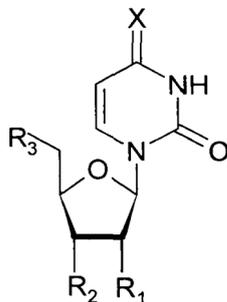
5 Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias entre las muestras se calculó usando ANOVA, seguido por la prueba de comparación de Bonferroni. Las diferencias se consideraban significativas si $p < 0,05$.

10 Los datos del Ejemplo 3 se presentan en la Figura 3.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula



5 en el que X representa O o S, R₁ representa H, OH o -O-(alcanoilo C₁-C₆) y R₂ y R₃ representan independientemente entre sí OH o -O-(alcanoilo C₁-C₆) para el uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

10 2. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula I representa uridina, triacetiluridina o 4-tiouridina, preferiblemente uridina.

3. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el compuesto se administra junto con un excipiente farmacéutico.

15 4. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto se administra junto con uno o más de otros compuestos farmacéuticamente activos para el tratamiento de la COPD.

20 5. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto se administra oralmente.

6. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto se administra inhalatoriamente.

25 7. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto se administra intravenosamente.

8. El compuesto para el uso según la reivindicación 5, en donde el compuesto se administra en una dosis de 1-1000 mg/kg al día, preferiblemente 5-500 mg/kg al día.

30 9. El compuesto para el uso según la reivindicación 6, en donde la dosis del compuesto por inhalación está entre 100 µg-1000 mg.

35 10. El compuesto para el uso según la reivindicación 6 o 9, en donde el compuesto se administra junto con un propelente.

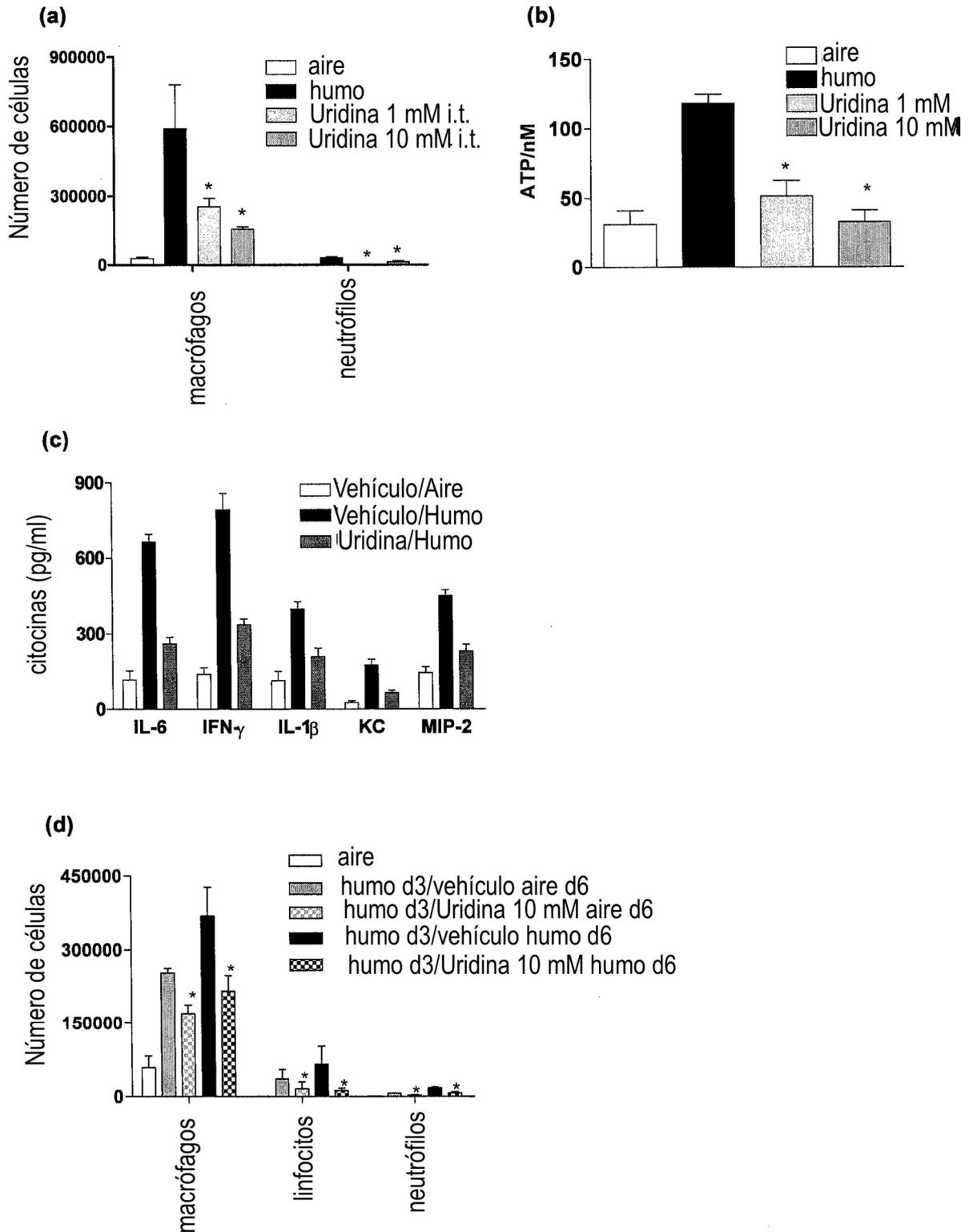


Fig. 1

| Grupos | | | Resultados a los 4 meses | | Resultados a los 7 meses | |
|--------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| | Exposición/Tratamiento | Exposición/Tratamiento | Lm | ISA | Lm | Lm |
| | 0-4 meses | 4-7 meses | (μm) | (cm^2) | (μm) | (μm) |
| 1 | Aire / - | Sacrificio | 39,2±0,8 (8) | 1220±37 (8) | | |
| | Aire / - | Aire / - | | | 38,6±0,9 (8) | 1248±37 (8) |
| 2 | CS / - | Sacrificio | 43,4±1,2* (8) | 1058±31 (8) | | |
| | CS / - | CS / - | | | 45,1±1,2† (8) | 1033±31† (8) |
| 3 | CS / - | CS / uridina | | | 41,0±1,4† (8) | 1157±79† (8) |

Significado de las abreviaturas: Lm = intersección lineal media; ISA = superficie específica interna de los pulmones; CS = exposición a humo de cigarrillos, aire = exposición a aire ambiental, Número entre paréntesis = número de animales usado. * p < 0,05 frente a la exposición a aire (4 meses), † p < 0,05 frente a la exposición a aire (7 meses), ‡ p < 0,05 frente a CS (7 meses)

Fig 2

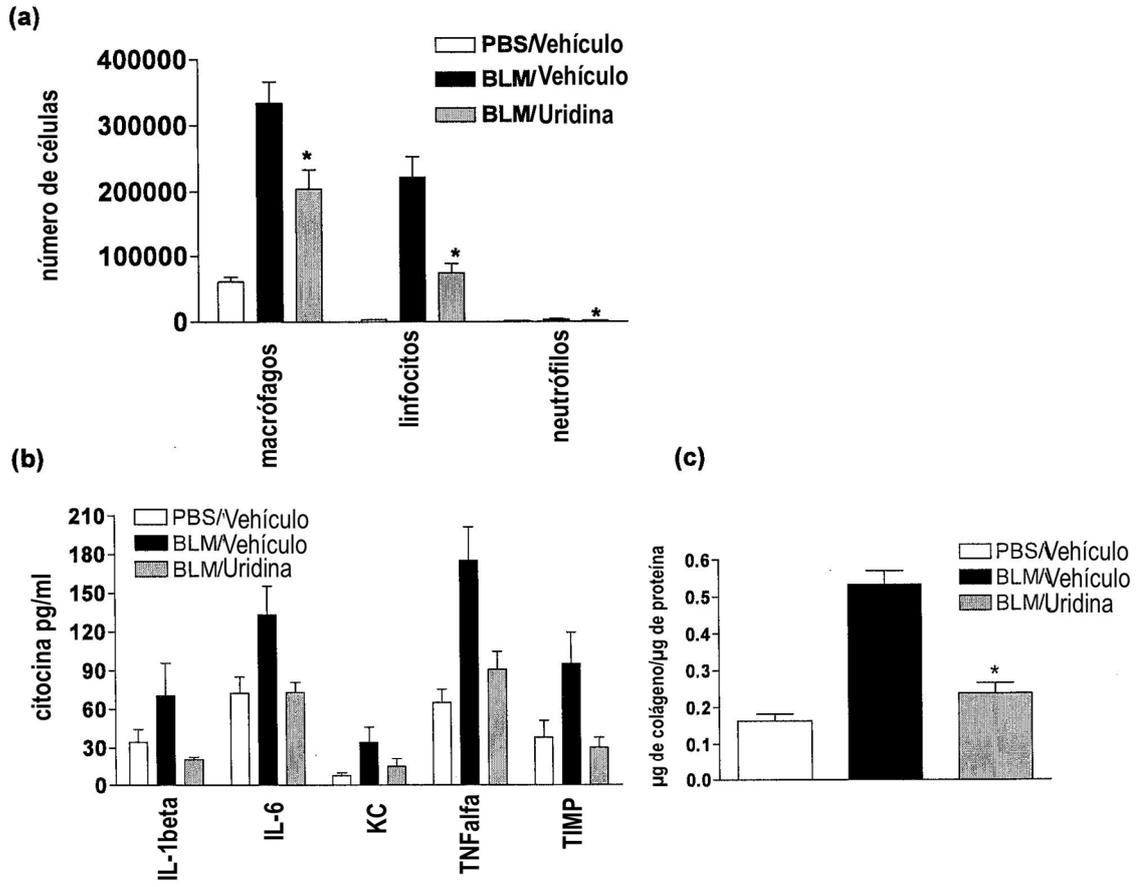


Fig. 3