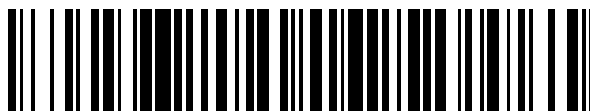


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 174**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/166** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/GB2015/050999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15150793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15723546 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3125876**

54 Título: **Nuevo uso de N,N-bis-2-mercaptoetil isoftalamida**

30 Prioridad:

**04.04.2014 GB 201406115**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**EMERAMED LIMITED (100.0%)  
Trinity House Charleston Road Ranelagh  
Dublin 6, IE**

72 Inventor/es:

**HALEY, BOYD EUGENE y  
KLINGBERG, RAGNAR AXEL THEODOR**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

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

**ES 2 659 174 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**

Nuevo uso de N,N-bis-2-mercaptoetil isoftalamida

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo uso de un compuesto quelante de metal pesado conocido.

**Antecedentes y técnica anterior**

10 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad del pulmón obstructiva caracterizada por un flujo del aire deficiente de forma crónica, dificultad para respirar, tos y producción de esputo.

15 Se cree que, a nivel mundial, EPOC afecta a cerca de 600.000.000 individuos. Una abrumadora mayoría de los pacientes con EPOC son fumadores o exfumadores.

20 Se sabe que EPOC tiene muchas posibles causas, siendo la más común el consumo de tabaco. Otras causas incluyen la contaminación del aire, en particular, de la combustión de combustibles (p.ej., humo de leña). Se cree asimismo que dicho trastorno tiene un componente genético.

Se entiende que EPOC está causado por la exposición a largo plazo de estos factores irritantes, que dan lugar a una respuesta inflamatoria en los pulmones. Esto tiene como resultado la constricción de los bronquios y el deterioro del tejido pulmonar (enfisema).

25 A pesar de que se considera que EPOC es una enfermedad que se puede prevenir en gran medida (por ejemplo, reduciendo la exposición a los patógenos que la producen), sigue siendo todavía la tercera causa de mortalidad más común en el mundo.

30 El tratamiento de los pacientes supone un importante desafío. Los tratamientos de primera línea actuales incluyen la inhalación de broncodilatadores y corticosteroides. Sin embargo, por lo general el flujo reducido de aire en los pacientes de EPOC no mejora de una forma significativa con la administración de las medicaciones que se emplean hoy en día, lo que significa que, a menudo, se recurra a medidas más drásticas, incluyendo terapia de oxígeno o incluso trasplante de pulmón. El empeoramiento de los síntomas suele exigir la hospitalización.

35 Como consecuencia de la falta de tratamientos eficaces, la carga económica que supone EPOC es enorme, habiéndose estimado en 2,1 billones \$ en 2010. Es probable que el coste socio-económico de EPOC aumente a medida que aumente la esperanza de vida en los países desarrollados y en vías de desarrollo. En la UE, el coste directo del tratamiento de los 2 millones de pacientes más afectados es en torno a 30.000 millones de € al año (15.000 € por paciente al año). El coste directo del tratamiento de los 20 millones de personas afectadas restantes es en torno a 10.000 millones de € (500 € por paciente al año). El coste total es por tanto en torno a 40.000 millones de €, sin incluir los costes indirectos adicionales que se deben a la pérdida de productividad. Las comorbilidades son habituales en EPOC, lo que aumenta aún más el coste del tratamiento.

45 Por lo tanto, existe una enorme necesidad no satisfecha clínicamente de contar con nuevos y/o mejores tratamientos para EPOC. Asimismo, existe una clara necesidad de mejores terapias con las que se pueda apuntar a los procesos patológicos clave con el potencial para modificar la progresión de la enfermedad y reducir el número de pacientes que evolucionan a estadios más graves de la enfermedad.

50 N,N-bis-2-mercaptoetil isoftalamida (NBMI) fue descrito por primera vez en la patente estadounidense número US 6.586.600 B2. Su uso como suplemento de la dieta y para aliviar el estrés oxidativo se describe en la solicitud de patente estadounidense 2010/0227812. Se sabe que NBMI es un potente quelante de metales pesados, incluyendo mercurio, cadmio y plomo. Véase también Patel et al, Toxicology Mechanisms and Methods, 22, 383 (2012).

55 Se han descrito análogos de NBMI, entre otros, en la patente estadounidense US .426.368 B2 y las solicitudes de patente internacional WO 2011/038385 y WO 2012/121798.

Sin embargo, en ninguno de los documentos mencionados se describe el posible uso de NBMI o compuestos relacionados en un posible tratamiento de EPOC.

60 Se sabe de forma general que, en los pacientes EPOC, tiene lugar un mayor estrés oxidativo dentro de los pulmones y sistémicamente, tanto como resultado de la carga oxidativa del propio humo del cigarrillo como por una mayor liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) desde células inflamatorias activadas como resultado.

65 Las células eucariotas intracelulares poseen sistemas enzimáticos que regeneran ascorbato desde su producto oxidado, dihidroascorbato (DHA), evitando así la oxidación irreversible de productos transformados que carecen de función antioxidante (véase p.ej., Corti et al, Arch. Biochem. Biophys., 500, 107 (2010)). Por lo tanto, este

mecanismo es esencial para mantener las concentraciones de ascorbato celular y puede tener lugar tanto enzimáticamente, a través de la acción de dehidroascorbato reductasas, como glutarredoxina (véase Saaranen et al, *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 15 (2010)) y proteína disulfuro isomerasa (Nardai et al, *J. Biol. Chem.*, 276, 8825 (2001)), como no enzimáticamente, a través de su reducción mediante GSH (véase Winkler et al, *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 333 (1994)).

Un reciente estudio ha demostrado que la infusión de ascorbato aumenta la resistencia a la fatiga del músculo esquelético en pacientes con EPOC (véase p.ej., Rossman et al, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 305, (2013)).

Los autores de la invención han observado que NBMI no solamente es capaz de inhibir la liberación de marcadores antiinflamatorios clave, como interleuquina-6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y factor-alfa de necrosis de tumor (TNF- $\alpha$ ), conocidos por su expresión en pacientes EPOC (véase por ejemplo Rubini, et al, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 12, 315 (2013), Thorleifsson et al, *Respir. Med.*, 103, 1548 (2009) y Tang, J. *Interferon Cytokine Res.*, 34, 162 (2014) and Dadvand et al, *Eur. Respir. J.*, (2014), Feb 20), sino también, de manera sorprendente, han observado que NBMI es capaz de regenerar ascorbato dentro del fluido del revestimiento de las vías respiratorias. Asimismo, se ha observado que NBMI puede ejercer esta acción funcionando como donador de electrones para el reciclado de ascorbato. Los autores de la invención han observado asimismo de manera sorprendente que NBMI puede administrarse a los pacientes para tratar EPOC terapéuticamente mejorando los síntomas y modificando/anulando la progresión de la enfermedad sin dar lugar a ningún efecto secundario adverso significativo.

### **Divulgación de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona NBMI, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un derivado de la misma, para su uso en un método para el tratamiento de EPOC. Dicho uso comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de NBMI a un paciente que necesita dicho tratamiento.

El término "EPOC" debe entenderse como inclusivo de las afecciones a las que se hace referencia en la bibliografía de forma diversa como "enfermedad de pulmón obstructiva crónica" (COLD por sus siglas en inglés) o enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas (COAD)", caracterizadas por ejemplo por un flujo del aire deficiente de forma crónica, dificultad para respirar, tos y producción de esputo.

Para evitar dudas, en el contexto de la invención, los términos "tratamiento", "terapia" y "método" y "terapia" incluyen el tratamiento terapéutico, o paliativo, de pacientes que lo necesitan de EPOC y otras afecciones pertinentes mencionadas en el presente documento. "Pacientes" incluye pacientes humanos.

Entre las sales farmacéuticamente aceptables de NBMI que se pueden mencionar se incluyen sales de metal alcalinotérreo y, más en particular de metales alcalinos como litio, sodio, potasio, rubidio, cesio y francio.

Dichas sales se pueden formar por medios convencionales, como por ejemplo, por reacción de NBMI con uno o más equivalentes de una base apropiada, opcionalmente, en un disolvente, o en un medio en el que la sal es insoluble, seguido de la eliminación de dicho disolvente, o dicho medio, aplicando técnicas normales (p.ej., al vacío, por liofilizado o filtración). Las sales se pueden preparar por intercambio de un contra ion de un ingrediente activo en forma de una sal con otro contra ion, por ejemplo, utilizando una resina de intercambio iónico adecuada.

Entre los derivados de NBMI farmacéuticamente aceptables se incluyen derivados glutatona, cisteína, ácido alfa-dihidrolipoico, cistamina, tiolfosfato, 5-tioladenosina, L-homocisteína, co-enzima A, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, yodoacetato, bromoacetato, fluoroacetato o cloroacetato. Dichos derivados pueden prepararse tal como se describe por ejemplo en la solicitud de patente estadounidense 2011/0237776.

NBMI, las sales farmacéuticamente aceptables de la misma y los derivados farmacéuticamente aceptables de la misma se denominan de forma colectiva de aquí en adelante simplemente "NBMI".

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso en un método de tratamiento de EPOC en un paciente administrando NBMI en una dosis farmacéuticamente eficaz suficiente capaz de regenerar ascorbato (p.ej. sistémicamente) en dicho paciente.

Las personas especializadas serán perfectamente conscientes de que en es posible que en la bibliografía se haga referencia de forma diversa a "ascorbato" también como ácido ascórbico, ácido L-ascórbico y/o vitamina C.

Se sabe que EPOC está ligado a la morbilidad y mortalidad por causa respiratoria, cuyo riesgo puede reducirse con NBMI de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un uso en un método para reducir el riesgo (es decir prevención) de morbilidad o mortalidad por causa respiratoria que comprende la administración de NBMI a dicho paciente que presenta síntomas de EPOC.

Entre las personas especializadas, ha de entenderse que el término “morbilidad” incluye cualquier patología, discapacidad o enfermedad y/o mala salud de forma general al menos parcialmente debilitante. Por lo tanto, morbilidad “respiratoria” incluye los estados que se presentan como consecuencia de EPOC, p.ej.

5 Se ha observado que NBMI es útil para aliviar los síntomas de EPOC, incluyendo fatiga (p.ej., fatiga del músculo esquelético), dificultad respiratoria, tos o producción de esputo.

De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un uso en un método de alivio de uno o más síntomas de EPOC en un paciente que padece EPOC, que comprende la administración de NBMI a dicho paciente.

10 Si bien no se limita a ellos, entre los usos de tratamiento que se pueden mencionar de acuerdo con la invención se incluyen los aquellos en los que el paciente es un fumador o exfumador.

15 En los usos descritos en el presente documento, preferentemente, se administra NBMI local o sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, intravenosa o intraarterial (incluyendo intravascular u otros dispositivos/formas de dosis perivasculares (p.ej., stents)), intramuscular, cutánea, subcutánea, intramucosa (p.ej. sublingual o bucal), rectal, transdérmica, nasal, pulmonar (p.ej., por inhalación, traqueal o bronquial), típica o cualquier otra ruta parenteral, en la forma de una preparación farmacéutica que comprende el compuesto en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Los modos de administración preferentes incluyen administración oral (en particular),  
20 intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular o intraperitoneal.

Generalmente, se administrará NBMI en forma de una o más formulaciones farmacéuticas mezcladas con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable que se puede seleccionar considerando debidamente la ruta de administración pretendida y la práctica farmacéutica normal. Dichos vehículos farmacéuticamente  
25 aceptables pueden ser compuestos químicamente inertes o compuestos activos y no pueden tener efectos secundarios negativos o toxicidad en las condiciones de uso. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden impartir también una liberación inmediata o modificada de NBMI.

30 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden estar disponibles en el mercado o haberse descrito si no en la bibliografía, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed., Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania (1995) y Martindale - The Complete Drug Reference (35ª Edición) y los documentos a los que se hace referencia en dicha biografía, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan en el presente documento como referencia. De otra forma, las personas especializadas pueden preparar formulaciones adecuadas al margen de la invención aplicando las técnicas habituales. En la solicitud de patente estadounidense 2010/0227812 se  
35 describen también formulaciones farmacéuticas adecuadas para su uso con NBMI.

La cantidad de NBMI en la formulación dependerá de la gravedad de la afección y del paciente que se va a tratar, así como del (los) compuesto(s) que se emplee(n), si bien puede ser determinada por las personas especializadas al margen de la invención.

40 Dependiendo del paciente que se vaya a tratar, así como de la ruta de administración, se puede administrar NBMI al paciente que lo necesita en diversas dosis terapéuticamente eficaces

45 Sin embargo, la dosis administrada a un ser humano, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para producir una respuesta terapéutica a lo largo de un período de tiempo razonable (tal como se ha descrito). Las personas especializadas en la técnica reconocerán que la selección de la dosis exacta y la composición, así como el régimen de administración más apropiado estarán influidos también, entre otros, por las propiedades farmacológicas de la formulación, la naturaleza y la gravedad de la afección que se vaya a tratar y el estado físico y la agudeza mental del receptor, así como la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la respuesta del paciente que se vaya a  
50 tratar, y el estadio/gravedad de la enfermedad, así como las diferencias genéticas entre pacientes.

La administración de NBMI puede ser continua o intermitente (p.ej., por inyección de bolo). La dosis puede determinarse también según el momento y la frecuencia de la administración.

55 La posología adecuada de NBMI se encuentra por lo tanto en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100,0 mg, incluyendo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 60 mg, por ejemplo entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 40 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal total del paciente al día.

60 En cualquier caso, el facultativo, u otra persona especializada, será capaz de determinar de forma rutinaria la posología real que sea la más adecuada para cada paciente en particular. Las posologías mencionadas son solo ejemplos del promedio de los casos; puede haber casos particulares, por supuesto, en los que sean más idóneas dosis más altas o más bajas, que entran dentro del alcance de la presente invención.

65 En los usos descritos en la presente invención, puede combinarse también NBMI con uno o más principios activos que son potencialmente útiles o que han sido indicados para su uso en el tratamiento de EPOC. Según esto, es

posible también que dichos pacientes estén recibiendo también (y/o ya) una terapia basada en la administración de uno o más de dichos principios activos, es decir están recibiendo una dosis prescrita de uno o más de dichos principios activos mencionados en el presente documento antes, o además de, y/o tras, el tratamiento con NBMI.

5 Dichos principios activos incluyen broncodilatadores de corta actuación (como salbutamol/albuterol, levosalbutamol/levalbuterol, pirbuterol, epinefrina, efedrina y terbutalina), broncodilatadores de acción prolongada (como salmeterol, clenbuterol, formoterol, bambuterol e indacaterol), anticolinérgicos (como tiotropio y bromuro de ipratropio), corticosteroides (como flunisolide, propionato de fluticasona, triamcinolona acetónico, dipropionato de beclometasona y budesonida) y otros fármacos utilizados en el tratamiento de EPOC, entre los que se incluyen  
10 antibióticos a largo plazo (p.ej., macrolidas, como eritromicina), mucolíticos y oxígeno.

Asimismo, es posible co-administrar NBMI con antioxidantes o quelantes, incluyendo vitamina E, vitamina D, cisteína, cistina, ácido lipoico glutatión (SH), ácido dihidrolipoico (DLPA), ácido lipoico (LPA), N-acetilcisteína (NAC), sulfonato de dimercaptopropano (DMPS), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ácido etilendiaminatetraacético  
15 (EDTA) y mezclas de los mismos.

Entre las sales farmacéuticamente aceptables de otros principios activos útiles para el tratamiento de EPOC que se pueden mencionar se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Dichas sales se pueden formar a través de medios convencionales.  
20

Entre las dosis adecuadas de otros principios activos se incluyen las que son útiles en el tratamiento de EPOC y son conocidas entre las personas especializadas en la técnica, e incluyen las enumeradas para los fármacos en cuestión en la bibliografía médica, como por ejemplo, Martindale - The Complete Drug Reference (35ª Edición) y los documentos a los que se hace referencia en ellas, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan al presente documento como referencia.  
25

Siempre que se emplee la palabra "aproximadamente" en el presente documento, por ejemplo en el contexto de cantidades (p.ej., dosis de principios activos), debe apreciarse que dichas variables son aproximadas y, como tales, varían en un 10 %, por ejemplo,  $\pm 5\%$  y, preferentemente,  $\pm 2\%$  (p.ej.  $\pm 1\%$ ) de los números especificados en el presente documento.  
30

Los usos descritos en el presente documento pueden tener la ventaja de que, en el tratamiento de EPOC, pueden ser más convenientes para el médico y/o paciente, más eficaces, menos tóxicos, pueden tener un intervalo de actividad más amplio, pueden ser más potentes, producen menos efectos secundarios o pueden tener otras propiedades farmacológicas útiles con respecto a usos similares (tratamientos) conocidos en la técnica anterior para su uso en dicha terapia.  
35

La invención se ilustra con el siguiente ejemplo en el que:

40 La Figura 1 ilustra en un modelo de oxidación de ascorbato la oxidación de ascorbato en DHA mediante 9,10-fenantrenquinona (9, 10-PQ), seguido del reciclado de DHA mediante NBMI y ditioneitol (DTT).

La Figura 2 ilustra en un modelo de oxidación de ascorbato la oxidación de ascorbato en DHA mediante  $\text{CuSO}_4$ , seguido del reciclado de DHA con NBMI y DTT con la adiciones a 10, 20 y 30 minutos, mostrándose la cinética de oxidación de ascorbato y de reciclado en el panel de la izquierda y el salto inmediato correspondiente y el aumento sostenido en las concentraciones de ascorbato tras la adición de NBMI y DTT que se presenta en el panel de la derecha.  
45

### Ejemplo 1

#### Inhibición de IL-6 y IL-8 utilizando NBMI

Se midió la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina (IL)-6, IL-8 (así como GM-CSF y MCP-1) en medios celulares como respuesta a la exposición de partículas en células A549 y BEAS-2B aplicando el siguiente método.  
55

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células epiteliales de pulmón en placas de 24 pocillos. Tras la pre-incubación con NBMI, se retiró el compuesto anti-oxidante, N-acetil-L-cisteína (NAC), que fue utilizado como control positivo, o vehículo, durante 3 horas del medio.  
60

El medio nuevo que contenía varias partículas (tal como se indica más adelante) en diferentes concentraciones tuvo un volumen total de 0,5 ml durante otras 24 horas más. A continuación, se separaron los sobrenadantes de las células por centrifugación.

65 Se midieron IL-8, IL-6, GM-CSF y MCP-1 en el fluido sin células utilizando el kit de desarrollo de ELISA DuoSet (R&D Systems, Abingdon, RU) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La exposición al medio únicamente sirvió como control negativo. Se llevó a cabo cada uno de los experimentos dos veces con 4 replicados.

5 En general, tanto el dióxido de titanio tipo P25 como el polvo urbano (referencia SRM 1649 b) indujeron la producción de citoquinas pro-inflamatorias en las líneas de células epiteliales del pulmón A549 y BEAS-2B.

Se analizó el efecto de la pre-incubación con 50  $\mu\text{M}$  de NBMI en la formación de citoquinas inducida por partículas a varias concentraciones de las partículas correspondientes.

10 El estudio demostró que NBMI puede reducir la secreción inducida por partículas de citoquinas pro-inflamatorias en ambas líneas celulares, si bien la reducción solamente en algunos casos se redujo a niveles de fondo.

Las concentraciones máximas de IL-8 e IL-6 se consiguieron en sobrenadantes de células A549 expuestas a  $\text{TiO}_2$  P25 a 75  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . A esta dosis, 50  $\mu\text{M}$  de NBMI redujo la secreción de IL-8 en un 29 % e IL-6 en un 38 %.

15 A 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de polvo humano en células A549, la pre-incubación con 50  $\mu\text{M}$  de NBMI redujo la secreción de IL-8 en un 30 % y IL-6 con 38 %.

20 A 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{TiO}_2$  P25 en células BEAS-2B, la pre-incubación con 50  $\mu\text{M}$  de NBMI redujo la secreción de IL-8 en un 49 %, y IL-6 en un 37 %.

A 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de polvo urbano en células BEAS-2B, la pre-incubación con 50  $\mu\text{M}$  de NBMI redujo la secreción de IL-6 en un 47 %.

25 La- pre-incubación con 5 mM de NAC también fue eficaz para reducir la secreción de citoquinas inflamatorias.

### Ejemplo 2

#### Regeneración de ascorbato con el uso de NBMI

30 Se examinó NBMI para ver si podía funcionar como un donador de electrones para el reciclado de ascorbato.

35 Se examinó la cinética de la oxidación de ascorbato, patrocinada tanto por 1  $\mu\text{M}$  9, 10-PQ como por 2  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), aplicando el ensayo de empobrecimiento de ascorbato (Kelly et al, Res. Rep. Health Eff. Inst., 163, 3 (2011)). Se empleó 9, 10-PQ para poder examinar NBMI de forma aislada de sus propiedades de quelación.

40 Se llevaron a cabo todos los experimentos por triplicado en placas de fondo plano de 96 pocillos UV (Greiner bio-one) a un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . Se iniciaron las exposiciones por adición de 20  $\mu\text{l}$  de una reserva concentrada de ascorbato (2 mM) en cada pocillo que contenía 160  $\mu\text{l}$  de agua tratada con resina Chelex-100 (que contenía 10 % DMSO), más 10  $\mu\text{l}$  de agua, solución de reserva de  $\text{CuSO}_4$  a 4 mM o solución de reserva 9, 10-PQ a 2 mM y 10  $\mu\text{l}$  de NBMI (4 mM y 200  $\mu\text{l}$ ).

45 Se prepararon todas las soluciones en agua tratada con resina Chelex-100 (con un contenido de 10 % de DMSO). Esto produjo concentraciones finales en los pocillos de 200  $\mu\text{l}$  de ascorbato, 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  o 1  $\mu\text{M}$  de 9,10-PQ y entre 10 y 200 mM de NBMI.

50 Inmediatamente antes de la adición del ascorbato a cada uno de los pocillos de ensayo, se pre-incubó la placa durante 20 minutos a 37  $^\circ\text{C}$  en un lector de placa (Spectra Max 190). Durante la exposición, se mantuvo la placa a esta temperatura. Tras la adición de ascorbato, se llevó un seguimiento de la concentración que quedaba en cada pocillo cada 2 minutos durante un periodo de dos horas midiendo la absorbancia a 265 nm. Se determinó la concentración de ascorbato tomando como referencia la curva normal, determinando el índice de oxidación de ascorbato realizando una regresión lineal mediante un gráfico de la parte inicial de una concentración frente al tiempo utilizando un software Microcal Software Limited's OriginLab (versión 5.0). Esto se llevó a cabo para cada uno de los triplicados y el índice de empobrecimiento de ascorbato se expresó finalmente como la media en moles de  $1 \times 10^{-9}$  de empobrecimiento de ascorbato  $\pm$  desviación típica.

60 Para los experimentos en los que se midió el impacto de la adición de NBMI sobre el ascorbato, se examinaron los ensayos de empobrecimiento con  $\text{CuSO}_4$  y 9, 10-PQ más adelante en el transcurso del tiempo. Se pusieron en marcha placas con 190  $\mu\text{l}$  durante los primeros 55-60 minutos, tras lo cual se retiraron del lector de placa y se añadieron a cada pocillo 10  $\mu\text{l}$  de o bien NBMI o bien el agente de reducción conocido, solución de reserva DTT, o bien agua. A continuación, se retornó la placa al lector de placa y se llevó un seguimiento de la absorbancia a 265 nm durante otros 60 minutos más.

65 Se determinó el aumento inmediato en las concentraciones de ascorbato medidas, al que se hace referencia como "salto", como medida de la capacidad de reciclado inmediata. Se determinó también el "aumento" sostenido a lo largo de los 60 minutos restantes de incubación. La diferencia entre los dos refleja la capacidad de los compuestos

añadidos para inhibir posteriormente el índice oxidación de ascorbato patrocinada por  $\text{CuSO}_4$ - o 9, 10-PQ.

La Figura 1 presenta la cinética de la oxidación de ascorbato patrocinada por la incubación de 9,10-PQ durante los primeros 60 minutos del experimento. En este momento, se añadió NMBI (200  $\mu\text{M}$ ) y se demostró que tuvo como resultado un aumento de rebote inmediato en ascorbato de 42,8  $\mu\text{M}$ . A continuación, se redujo el índice de oxidación de ascorbato en relación con el periodo de los 60 primeros minutos.

Este aumento de rebote en ascorbato, que indicó el reciclado de DHA de nuevo en ascorbato fue sorprendente y fue significativamente mayor cuando se comparó con el conseguido utilizando (DTT, 200  $\mu\text{M}$ ), que consigue una recuperación inmediata de ascorbato más baja, 5,1  $\mu\text{M}$ , que no fue sostenida.

La Figura 2 presenta la capacidad de NMBI para reciclar DHA en el modelo de ascorbato  $\text{CuSO}_4$  a los 10, 20 y 30 minutos de incubación. Centrándose en estos puntos temporales primeros, el aumento de ascorbato de rebote tras la adición de NMBI resultó marcado sobre todo a la concentración más alta de las dos concentraciones analizadas, apagándose el índice de oxidación posterior, posiblemente como consecuencia de las propiedades de quelación del compuesto.

Se repitieron estos experimentos con la adición de NMBI y DTT (ambos a 200  $\mu\text{M}$ ) a 60 minutos. Esto reveló un "salto" inmediato en la concentración de ascorbato de  $7,93 \pm 6,58 \mu\text{M}$  con DTT en comparación con un aumento de  $24,98 \pm 5,54 \mu\text{M}$  con NMBI. A lo largo de los 60 minutos restantes de incubación, el "aumento" de ascorbato sostenido fue  $10,79 \pm 2,45 \mu\text{M}$  frente a  $25,45 \pm 2,45 \mu\text{M}$  para DTT y NMBI respectivamente.

Estos resultados indican una propiedad de NMBI desconocida hasta ahora y sorprendente, lo que señala que se puede reciclar DHA de nuevo en ascorbato.

### Ejemplo 3

#### Tratamiento de un paciente con EPOC

Una mujer jubilada, residente en los Estados Unidos, diagnosticada médicamente con EPOC varios años antes, experimentaba de forma regular ataques de tos de dos a cuatro veces en periodos de 24 horas, que comenzaban en cualquier hora del día o de la noche y duraban entre aproximadamente 40 y 75 minutos.

Como consecuencia de estos ataques de tos, la respiración de la paciente era superficial, tenía la garganta irritada, tenía la voz ronca, sus niveles de energía eran bajos y tenía una baja calidad de vida.

El tratamiento tres veces al día (en las horas de las comidas) de 100 mg de dosis de NMBI en una cápsula durante un período de ocho días tuvo como resultado una notable mejora de los síntomas. Al octavo día del tratamiento, la paciente no volvió a experimentar ataques de tos y su respiración mejoró de forma significativa.

### Ejemplo 4

#### Estudio I de "ratón fumador" *in vivo*

Los estudios han demostrado que el humo del cigarrillo puede inducir una respuesta inflamatoria de pulmón tanto en ratones C57B1/6 como Balb/c cuando se los expuso a 5-6 cigarrillos al día, 5 días a la semana (véase por ejemplo D'hulst et al, Eur. Respir. J., 26, 204 (2005) y Jung et al, BMC Complement. Altern.. Med., 13, 219 (2013)).

Se desarrolló un modelo de ratón de enfermedad de las vías aéreas inducida por el humo del cigarrillo (HC), en el que se expuso a cuatro grupos de ratones BALB/c a HC (solamente por la nariz) utilizando una máquina fumadora que produce una combinación de humo de corriente lateral y corriente principal con cigarrillos para ensayo con filtro, 7 días a la semana durante 2 semanas.

Como parte del estudio de determinación de la dosis de 14 días, se administró a tres grupos de ratones NMBI por vía subcutánea (5, 30 o 150 mg/kg) antes de cada exposición a HC. Se llevaron a cabo los recuentos de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar (BAL), el análisis de citometría de flujo (FACS) y el análisis de citoquinas en BAL.

#### Materiales y métodos

Se utilizaron en este estudio ratones BALB/c hembra (Harlem laboratories, Países Bajos). Se los alojó en jaulas de plástico con un material de lecho absorbente y se los mantuvo en un ciclo de luz diurna de 12 horas. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Su cuidado y los protocolos experimentales habían sido aprobados por el Comité Regional Ético de Experimentos con animales de Umeå. Los ratones tenían 12 semanas de vida cuando comenzó el protocolo de exposición al cigarrillo.

Protocolo de exposición a HC

5 Se sometió a los animales a inhalar HC (tanto humo de cigarrillo de corriente lateral como de corriente principal). La exposición a HC fue realizada con una máquina fumadora controlada con un microprocesador (TE-10, Teague Enterprises, CA, Estados Unidos) que produce humo de cigarrillos de ensayo (1R5F, Universidad de Kentucky, Lexington, KY, Estados Unidos).

10 Se cargaron automáticamente los cigarrillos en una rueda, se encendieron y se activó el mecanismo de aspiración y expulsión de humo. Se fumó cada uno de los cigarrillos durante 10 minutos y se mantuvo el flujo de aire de la máquina a 12 l/min. Se guardaron los cigarrillos a -20 °C hasta necesitarlos. Se sometió a los ratones a 4 cigarrillos cada 10 minutos x 3 (es decir, 12 cigarrillos durante 30 minutos) una vez al día, 7 días a la semana, durante dos semanas. Se transfirió el humo a una torre de humo (EMMS, RU) proporcionando la misma exposición y de manera simultánea a HC.

15 Se colocó a los ratones en cámaras de plástico y se los sometió a HC con inhalación "solo por la nariz". Se manejó a los ratones de control todos los días y respiraron aire del ambiente, pero no se los sacó de sus jaulas.

Por consiguiente, los 5 grupos de tratamiento son los siguientes:

- 20
1. Exposición diaria a aire limpio air (Grupo de Placebo)
  2. Exposición diaria a HC (Grupo de placebo expuesto a HC)
  3. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 5 mg/kg (Grupo de NBMI 5 mg/kg)
  4. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 30 mg/kg (Grupo de NBMI 30 mg/kg)
  5. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 150 mg/kg (Grupo de NBMI 150 mg/kg)

25 El día 15, se desangró a los ratones y se los sometió a lavado broncoalveolar (BAL). Se lavaron los pulmones cuatro veces a través de un tubo traqueal con un volumen total de 1 ml + 3 x 1 ml solución salina equilibrada de Hanks' desprovista de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (HBSS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

30 A continuación, se centrifugó inmediatamente el fluido del BAL (10 minutos, 4 °C, 1750 rpm). Después de separar el sobrenadante hasta posterior análisis, se resuspendió el aglomerado de células y después se diluyó con 0,5 ml de PBS. Se hizo el recuento de leucocitos manualmente en un hemocitómetro de manera que se pudieran cargar 20.000 células y se centrifugó utilizando una centrifuga Cytospin® (sistema de preparación de células cito-centrifuga Shandon® citospin 3).

35 Se mancharon las preparaciones citocentrifugadas con reactivo May-Grünwald-Giemsa y se realizaron los recuentos diferenciales de células de células inflamatorias pulmonares (macrófagos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos) utilizando criterios morfológicos normales y haciendo el recuento de 300 células por preparación citospin.

40 Se analizaron los mediadores inflamatorios en BAL y el suero en cuanto a la presencia de interleuquina (IL)- 1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL17, Eotaxina, G-CSF, INF $\gamma$ , GM-CSF, KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y TNF $\alpha$ . Todos los análisis de citoquinas fueron realizados de manera simultánea con un kit multiplex (BioPlex™ Pro Mouse Cytokine 23-plex panel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad) y se analizaron en un sistema Bio-Plex™ (Luminex Bio-Plex™ 200 System, Bio-Rad, Hercules, CA).

45 Se analizaron los leucocitos del BAL por citometría de flujo utilizando un BD FACSort™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se resuspendieron las células de BAL en PBS tal como se ha descrito. Se realizó la tinción de anticuerpos en placas de 96 pocillos con  $2,0 \times 10^5$  células/muestra.

50 Se pre-incubaron las células con Ab de bloqueo de FcR (ant-CD16/CD32; clon 2.4G2) para reducir la unión no específica. Los mAb utilizados para identificar subtipos de linfocitos T fueron: CD3-FITC (clon 17A2), CD4-PE (clon H129.19) y CD8a-PECy5 (clon 53-6.7). Se utilizaron los anticuerpos ajustados a isotipo como control negativo. Se llevó a cabo la citometría de flujo utilizando un BD FACSort™ (Becton Dickinson, San José, CA) de acuerdo con el procedimiento normal con un software BD FACSDiva. Todos los anticuerpos se originaron en BD Sciences Pharmingen (San Diego, CA). Se definieron los linfocitos T como CD3 $^+$ .

55 Se presentaron los resultados como la media  $\pm$  error típico de la media (S.E.M.). Se evaluó la importancia estadística a través de métodos paramétricos utilizando un análisis de varianza en dos direcciones (ANOVA) para determinar las diferencias entre grupos, seguido de una prueba *post hoc* de Bonferroni. Cuando fue apropiado, se utilizó ANOVA en una dirección o prueba T desapareada de Student. Se consideró significativo un resultado estadístico con  $p < 0,05$ .

60 Se llevaron a cabo los análisis estadísticos y se prepararon los gráficos con GraphPad Prism (versión 6.0 GraphPad software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

65



Resultados

5 Se pesó a todos los animales diariamente desde el Día 1 hasta el Día 15, 24 horas después de la última exposición al humo. Los ratones no presentaron ninguna diferencia de peso significativa el Día 1. El Día 15, los animales del grupo NBMI 5 mg/kg tenían un peso final más bajo ( $19,5 \pm 0,3$  g) que los ratones expuestos a HC ( $20,3 \pm 0,3$  g,  $p < 0,05$ ). Todos los ratones expuestos a HC, independientemente de la dosis de NBMI, tuvieron una pérdida de peso significativa desde el Día 1 al Día 15.

10 El recuento de células del BAL total en los animales expuestos a HC (Día 15) no fue significativamente más alto que los grupos de control ( $296.700 \pm 43.650$  con HC y  $284.670 \pm 63.200$  células /ml sin HC,  $p > 0,05$ ). La exposición a HC indujo un aumento significativo de neutrófilos en el líquido del BAL ( $940 \pm 250$  con HC y  $260 \pm 160$  células/ml sin HC,  $p < 0,05$ ). El Día 15, los animales en el grupo NBMI 150 mg/kg y el grupo NBMI 30 mg/kg tuvieron un número significativamente menor de neutrófilos que los ratones expuestos a CS solamente.

15 Dos semanas de exposición a HC no aumentaron significativamente los niveles de mediadores inflamatorios a excepción de GCSF en BAL. El grupo NBMI 5 mg/kg presentó unos niveles menores de MIP-1 $\alpha$  en comparación con el grupo de placebo expuesto a HC ( $p < 0,05$ ). No hubo ninguna otra diferencia significativa entre los mediadores inflamatorios analizados.

20 Dos semanas de exposición a HC no aumentaron significativamente los niveles de mediadores inflamatorios en suero. El grupo NBMI 150 mg/kg presentó niveles significativamente menores de IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, Eotaxina, MIP-1 $\alpha$  y RANTES en comparación con el grupo de placebo expuesto a HC. El grupo NBMI 30 mg/kg presentó mayores niveles de IL-10 en suero. No hubo ninguna otra diferencia significativa entre los mediadores inflamatorios analizados.

25 Dos semanas de exposición a HC no aumentaron significativamente los niveles de células CD4 o células CD8 en el fluido del BAL. No hubo ninguna diferencia significativa entre ninguno de los grupos.

30 Los ratones del grupo NBMI 150 mg/kg desarrollaron heridas en el cuello. Los otros dos grupos NBMI no presentaron ningún signo de ulceración ni tampoco los grupos de placebo.

Ejemplo 5Estudio II de "Ratón fumador" *In vivo*

35 A partir de los resultados del estudio descrito en el Ejemplo 4 anterior, se llegó a la conclusión de que dos semanas de inhalación del humo de cigarrillo posiblemente no fueran un período suficiente para inducir una respuesta inflamatoria.

40 Así pues, se llevó a cabo un estudio de 90 días tras el estudio para determinar la dosis de 14 días empleando esencialmente el mismo aparato y el mismo protocolo que se ha descrito en el Ejemplo 4 anterior.

En esta ocasión, los 5 grupos de tratamiento fueron los siguientes:

- 45
1. Exposición diaria a aire limpio (Grupo de Placebo; Gr. 1)
  2. Exposición diaria a HC (Grupo placebo expuesto a HC; Gr. 2)
  3. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 30 mg/kg (Grupo NBMI 30 mg/kg; Gr. 3)
  4. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 60 mg/kg (Grupo NBMI 60 mg/kg; Gr. 4)
  5. Exposición diaria a HC; tratado con NBMI con una dosis de 150 mg/kg (Grupo NBMI 150 mg/kg; Gr. 5)
- 50

El día 91, se pesó a los animales y se los anestesió con pentobarbital sódico (90 mg/kg peso corporal, i.p.). Se realizó la traqueotomía a los ratones con una cánula de calibre 18 y se los ventiló mecánicamente de manera casi sinusoidal con un ventilador veterinario pequeño (flexiVent™, SCIREQ®) a una frecuencia de 3 Hz y un volumen de corriente de ( $V_T$ ) de 12 ml/kg peso corporal. Se aplicó una presión de espiración final positiva de 3 cm H<sub>2</sub>O.

55 Se llevó un seguimiento del gasto cardiaco a través de la evaluación de la mecánica respiratoria. Se paralizó a los ratones con pancuronio (0,1 mg/kg peso corporal, i.p. (proveedores locales)) antes de realizar 4 maniobras del suspiro a  $3 \times V_T$  al comienzo del experimento para establecer un mecanismo respiratorio basal estable y para asegurar una historia de volumen similar antes del experimento.

60 Se midió la mecánica del pulmón dinámica aplicando una respiración normalizada sinusoidal utilizando un modelo de compartimento único y regresión lineal múltiple proporcionando resistencia respiratoria ( $R_{RS}$ ), elastancia ( $E_{RS}$ ) y distensibilidad ( $C_{RS}$ ). La medida de  $R_{RS}$  refleja tanto el estrechamiento de los conductos de las vías respiratorias como alteraciones en los pulmones. La medida de  $C_{RS}$  y  $E_{RS}$  refleja únicamente episodios en la periferia pulmonar, en particular, el cierre de las vías respiratorias que conduce a un des-reclutamiento de unidad pulmonar. En cambio, un cambio selectivo de  $C_{RS}$  es indicativo de un sitio de acción más distal.

65

Se realizaron evaluaciones más exhaustivas de la mecánica del pulmón aplicando una técnica de oscilación forzada (FOT) de acuerdo con Jonasson et al., *Respir. Res.*, 9, 23 (2008) y *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 165, 229 (2009). Los parámetros obtenidos de las medidas FOT en este estudio fueron: resistencia newtoniana ( $R_N$ ), amortiguamiento del tejido (G), que está íntimamente relacionado con la resistencia del tejido y refleja la disipación de energía en los tejidos pulmonares; y elastancia de tejido (H), que caracteriza la rigidez del tejido y refleja el almacenamiento de energía en los tejidos.

Se determinaron las curvas de presión dinámica-volumen (PV) inflando los pulmones a una presión máxima de 30 cm H<sub>2</sub>O, permitiendo una exhalación pasiva utilizando un ventilador Flexivent controlado por ordenador para medir el volumen y la presión. Se compilaron los resultados individuales de cada animal. Se realizaron por triplicado todas las medidas PV. Se obtuvieron bucles PV por inflación y deflación gradual y lenta de los pulmones. Se llevaron a cabo los bucles PV para niveles PEEP de 3 cm H<sub>2</sub>O. Se calculó el factor de forma (k) del miembro descendiente del bucle PV ajustando los datos a la ecuación de Salazar-Knowles. Se cree que el valor del parámetro k cambia característicamente tanto con fibrosis como con enfisema. Se obtuvieron asimismo, la distensibilidad casi-estática (Cst) y elastancia (Est) y el volumen de aire inspirado suficiente para alcanzar 20 ml de agua.

Se llevó a cabo el lavado broncoalveolar (BAL) esencialmente tal como se ha descrito en el Ejemplo 4 anterior, como un análisis de citometría de flujo de células desde BAL y el análisis de mediadores inflamatorios en BAL y suero.

Se homogeneizó el tejido pulmonar congelado junto con 1 ml de BBS en un tubo de 2 ml utilizando un molino de mezclado (Retch mm400) durante 2 minutos a 4 °C. Inmediatamente después de la homogeneización, se centrifugó el tubo durante 15 minutos (1500 rpm, 4 °C). Se separó el sobrenadante y se salvó para determinar la concentración de proteínas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Proteins A280). Después del análisis del contenido de proteínas, se salvaron cantidades equivalentes de proteína de cada muestra para el análisis del factor beta de crecimiento transformante (TGFβ) 1-3. Se analizó TGFβ 1-3 simultáneamente utilizando un kit multiplex (inmunoensayo Bio-Plex Pro TGF-β 3-Plex) en homogenato de tejido pulmonar de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad) y se analizaron en un sistema Bio-Plex™ (Luminex Bio-Plex™ 200 System, Bio-Rad, Hercules, CA).

Los animales que fueron sometidos a un análisis histológico no fueron sometidos a una prueba de la función respiratoria con el fin de preservar la integridad del tejido. Se extirpó el lóbulo del pulmón derecho y se fijó en 4 % de paraformaldehído hasta que quedó embebido en parafina. Después de embeberlo en parafina, se cortó el tejido en secciones de 3 μm de espesor y se montó en portaobjetos cargados positivamente. Para evaluar la infiltración de células inflamatorias, se desparafinaron las secciones, se deshidrataron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Un patólogo profesional especializado en animales pequeños del Instituto Nacional Veterinario (SVA) de Uppsala, Suecia, llevó a cabo la evaluación histopatológica de las secciones teñidas

Se llevó a cabo el análisis estadístico, esencialmente, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4 anterior.

## Resultados

En la Tabla 1, a continuación, se indica el número de ratones utilizado en los diferentes análisis. Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones.

Tabla 1

	Fisiología de las vías respiratorias, BAL y suero	Histología y suero
Gr. 1	9	3
Gr. 2	7	3
Gr. 3	9	3
Gr. 4	8	3
Gr. 5	7	3

Durante la exposición de 90 días, 5 de los ratones murieron. En la mayoría de los casos, se realizó la eutanasia dado el empeoramiento del estado de salud, como por ejemplo una gran disminución del peso y el letargo, véase tabla 5. Durante los análisis, 6 de los ratones fueron significativamente atípicos y por tanto se los excluyó de los datos expuestos (Tabla 2).

Tabla 2

	Excluido debido al empeoramiento del estado de salud durante el HC	Excluido del conjunto de datos (analizado estadísticamente)
Gr. 1	-	2
Gr. 2	2	1

Gr. 3	-	3
Gr. 4	1	-
Gr. 5	2	-

- 5 Todos los ratones expuestos a HC resultaron visiblemente afectados por la exposición. Sufrieron rugosidad de la piel y pérdida de la fuerza muscular. Los animales que recibieron NBMI (Gr. 3 y Gr. 4.) parecieron en cierto modo más sanos que los demás grupos que recibieron placebo (observación del técnico en animales). El sitio de inyección para la administración s.c. de NBMI fue alterada para evitar la escaras y ulceración. A pesar del esfuerzo, los ratones en el Gr. 5 desarrollaron heridas y prominencias en el cuello. Los otros dos grupos NBMI no presentaron signos de ulceración, ni tampoco los grupos de placebo. Los animales de control recibieron DMSO en la misma concentración que NBMI en el Gr. 5.
- 10 Los animales expuestos a HC presentaron una significativa diferencia de peso con respecto a los animales de control el Día 90. Los ratones de control aumentaron un 15 % el peso corporal ( $2,8 \pm 0,2$  g), mientras que los animales expuestos a HC no aumentaron el peso corporal en un grado significativo ( $-0.1 \pm 0,3$  g). Los animales que recibieron NBMI tuvieron todos ellos una ganancia de peso en comparación con el peso de partida (Gr. 3:  $1,0 \pm 0,4$  g, Gr. 4:  $0,7 \pm 0,2$  g y Gr. 5:  $0,6 \pm 0,2$  g).
- 15 El recuento total de células del BAL en los animales expuestos a HC el Día 90 fue significativamente mayor que en los grupos de control ( $246.700 \pm 21.980$  células/ml con HC y  $152.000 \pm 20.540$  células/ml sin HC,  $p < 0,01$ ). La exposición a HC indujo un aumento significativo de macrófagos en fluido de BAL ( $229.300 \pm 21.400$  células/ml con HC y  $134.200 \pm 18.600$  células/ml sin HC,  $p < 0,01$ ).
- 20 La exposición a HC no aumentó el número de neutrófilos y linfocitos infiltrados en el fluido del BAL en comparación con el grupo de control (Gr. 1). Los animales que recibieron NBMI (30, 60 y 150 mg/kg) no tuvieron un número de macrófagos significativamente más bajo en el fluido del BAL. Sin embargo, hubo una tendencia a un menor número de neutrófilos en el Gr. 4 y el Gr. 6 y un menor número de linfocitos en los grupos tratados con NBMI.
- 25 Noventa días de exposición a HC no aumentó significativamente los niveles de linfocitos T auxiliares ( $CD4^+/CD3^+$ ) o linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+/CD3^+$ ) en los fluidos del BAL según el análisis FACS. Los porcentajes de ambos tipos de linfocitos no se alteraron significativamente tras el tratamiento con NBMI. Sin embargo, dado que disminuyeron los linfocitos tras el tratamiento con NBMI, se produjo un significativo descenso de linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+/CD3^+$ ) en el fluido del BAL en los animales tratados con NBMI en comparación con el Gr. 2.
- 30 Noventa días de exposición a HC indujo cambios estructurales en el pulmón en comparación con los animales de control (Gr. 2 frente a Gr. 1), tal como queda de manifiesto por las alteraciones inducidas por HC tanto en las vías respiratorias superiores como las inferiores al aumentar  $E_{RS}$  y H junto con un descenso de  $C_{RS}$ . El coeficiente de histéresis  $\eta$  disminuido con HC reflejó una menor heterogeneidad en los pulmones.
- 35 Una dosis mayor de NBMI (Gr. 4 y Gr. 5) aumentó la resistencia de las vías respiratorias inferiores y superiores ( $R_{RS}$  y G) significativamente.
- 40 Se midieron las curvas PV en ratones expuestos a HC (Gr. 2) y se compararon con los ratones expuestos a temperatura ambiente (Gr. 1). La exposición a HC supuso que los pulmones quedaran más rígidos y fue necesaria mayor presión para inflar el pulmón. Los animales que recibieron NBMI (30, 60 y 150 mg/kg) no presentaron un cambio significativo de la función respiratoria en comparación con el grupo de placebo (Gr. 2). Cst, Est y k no resultaron afectados por la exposición al humo.
- 45 Noventa días de exposición a HC no aumentaron significativamente los niveles de mediadores inflamatorios en BAL y en suero. En el grupo NBMI 150 mg/kg (Gr. 5), los niveles de MIP-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) y GM-CSF ( $p < 0,01$ ) disminuyeron en el suero en comparación con el grupo placebo expuesto a HC (Gr. 2). No hubo ninguna otra diferencia significativa entre los mediadores inflamatorios analizados.
- 50 Los animales expuestos a HC (Gr. 2) no presentaron un mayor nivel de TGF $\beta$  en el homogenato de pulmón en comparación con el grupo de control (Gr. 1). Los animales que recibieron NBMI no presentaron ningún cambio significativo de la cantidad de TGF $\beta$  1-3 en comparación con el grupo que placebo que recibió HC (Gr. 2).
- 55 El diámetro interior bronquial y los alveolos de todos los pulmones presentaron algunos macrófagos. En los grupos tratados, los macrófagos fueron significativamente más numerosos y presentaron un pigmento amarillento citoplásmico o gránulos de pigmento negro. El pigmento negro pudo ser posiblemente el hollín de la exposición al cigarrillo y el pigmento amarillento podría ser la lipofuscina.
- 60 El bajo número de leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos) se observó ocasional en el septo alveolar, y también sub-pleural en las áreas del pulmón periférico en los animales expuestos a HC. El número de macrófagos ligeramente elevado en los grupos expuestos al cigarrillo fue sutil y los pulmones permanecieron bien

bajo el umbral de inflamación. Los cambios observados no fueron suficientemente intensos como para causar signos clínicos.

5 Los animales de control en este estudio presentaron una función de las vías respiratorias significativamente mejor y una ganancia de peso mayor que los ratones expuestos a HC, pero el aumento de las células celulares en el fluido BAL no fue significativamente diferente del Gr. 2. Los ratones de control recibieron el mismo tratamiento que el Gr. 2 aparte de su exposición a humo HC. Sin embargo, todos los animales compartieron el mismo alojamiento en el laboratorio.

10 Conclusión

Los ratones expuestos a HC presentaron una pérdida de peso (o ausencia de un mayor peso), aumento de macrófagos y pulmones más rígidos, en combinación con un descenso de la distensibilidad respiratoria.

15 El tratamiento con NBMI (Gr. 3 y Gr. 4) mejora el estado de salud de los ratones expuestos a HC diariamente durante 90 días. El efecto positivo del tratamiento queda corroborado por un mayor peso y por la tendencia a disminuir el número de linfocitos y un descenso de células CD8<sup>+</sup> en el fluido del BAL en comparación con el grupo de placebo expuesto a HC (Gr. 2).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. N,N-*bis*-2-mercaptoetil isoftalamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
2. Un compuesto para su uso, tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la dosis de N,N-*bis*-2-mercaptoetil isoftalamida o de la sal de la misma que se administra es capaz de regenerar ascorbato sistémicamente.
- 10 3. Un compuesto para su uso, tal como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tratamiento reduce el riesgo de morbilidad respiratoria y/o de mortalidad en un paciente.
- 15 4. N,N-*bis*-2-mercaptoetil isoftalamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en un método para aliviar uno o más síntomas de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un paciente que la padece.
- 20 5. Un compuesto para su uso, tal como se reivindica en la reivindicación 4, en donde el síntoma es fatiga del músculo esquelético y/o tos/producción de esputo.
6. Un compuesto para su uso, tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método de tratamiento es para un paciente que es fumador o un exfumador.
- 25 7. Un compuesto para su uso, tal como se reivindica en la reivindicación 6, en donde el paciente está recibiendo también terapia que comprende la administración de un principio activo seleccionado entre un broncodilatador, un fármaco anticolinérgico o un corticosteroide.

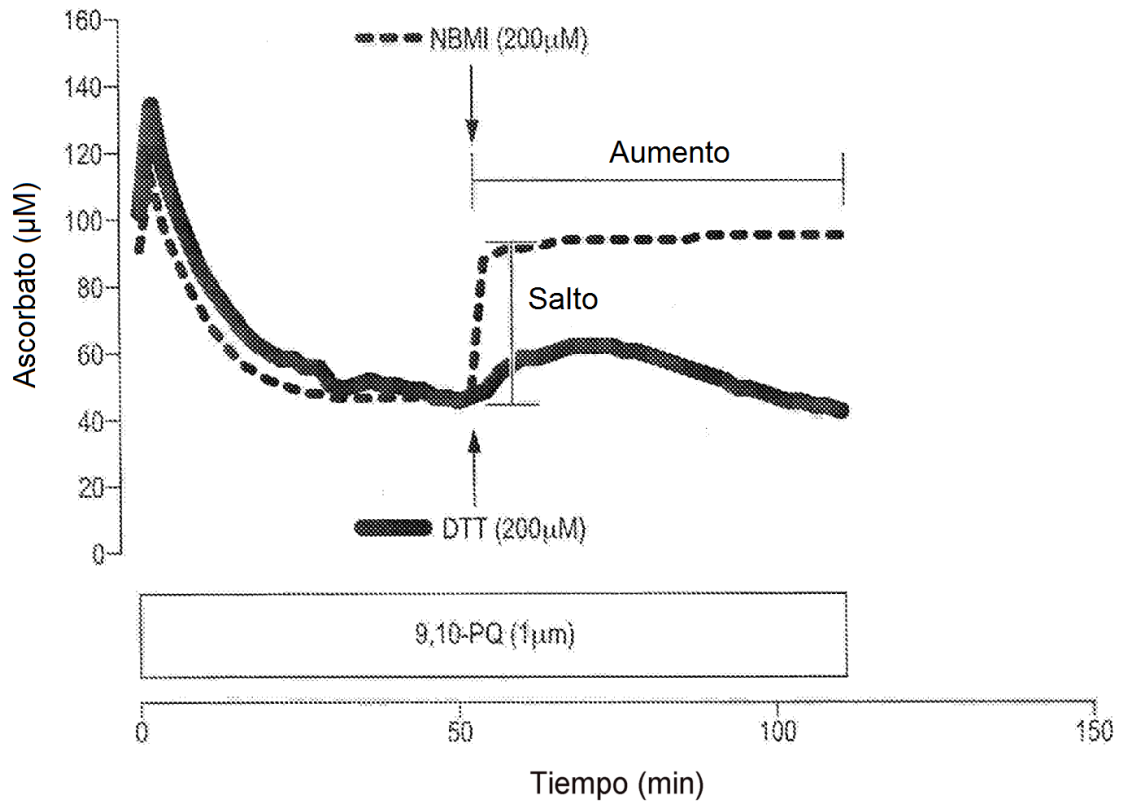


FIG. 1

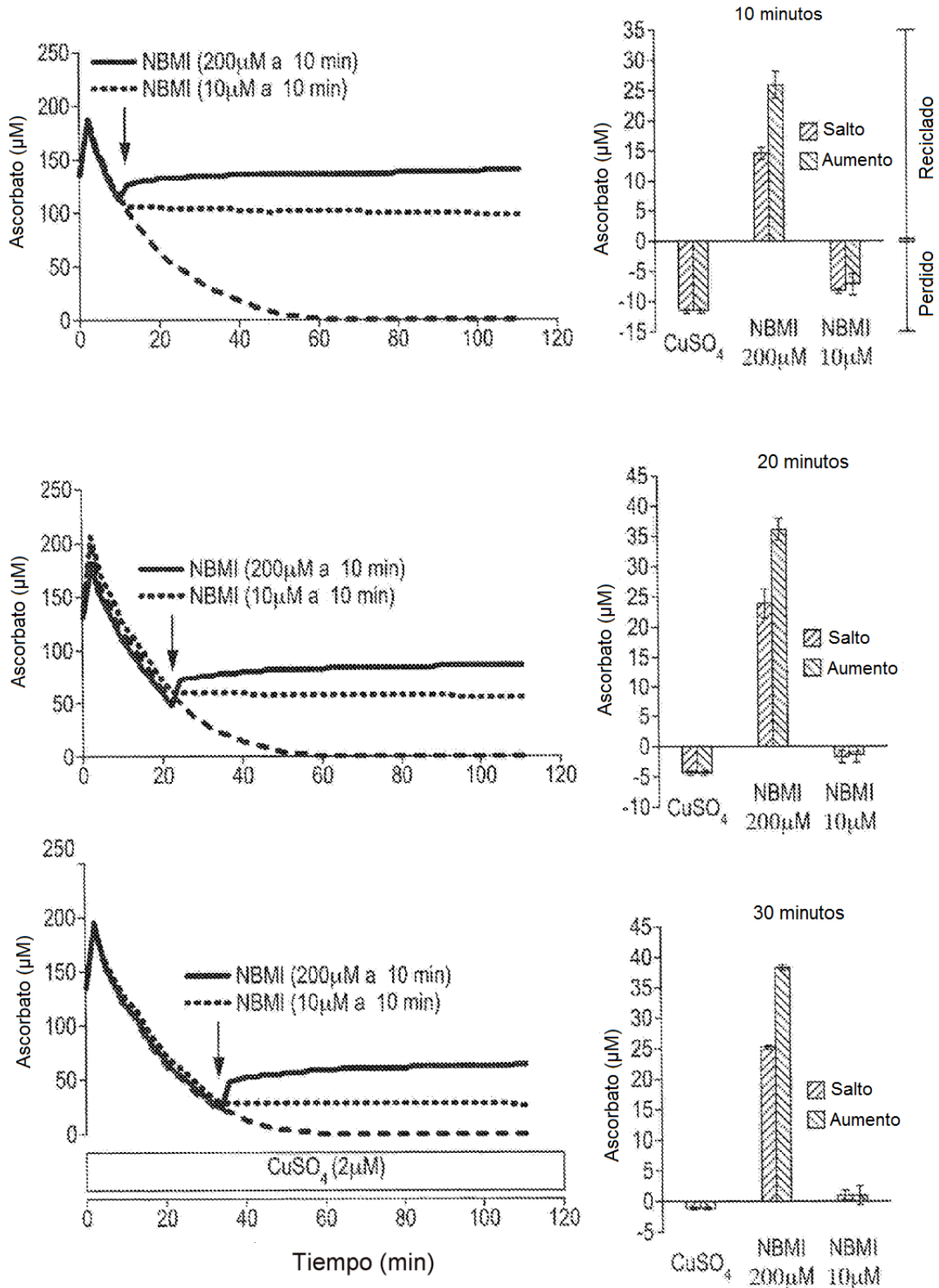


FIG. 2