

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000019355
Data Deposito	21/07/2021
Data Pubblicazione	21/01/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	573

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	661

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	11	06

Titolo

SALE SODICO DELLA BUDESONIDE 21-FOSFATO PER USO COME ANTINFIAMMATORIO E
ANTIASMATICO - BUDESONIDE 21-PHOSPHATE SODIUM SALT FOR USE AS ANTI-
INFLAMMATORY OR ANTI-ASTHMATIC AGENT

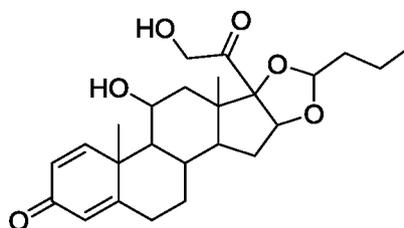
Descrizione dell'invenzione intitolata " BUDESONIDE 21-FOSFATO SALE SODICO PER USO COME ANTINFIAMMATORIO E ANTIASMATICO" per conto della Genetic S.p.A., Via G. della Monica, 26 – 84083 Castel San Giorgio (SA) – Italy

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda la budesonide 21-fosfato sale sodico da utilizzare come agente antinfiammatorio o antiasmatico. L'invenzione riguarda, inoltre, le composizioni farmaceutiche che lo contengono.

BACKGROUND DELL'INVENZIONE

La Budesonide (Bud) (nome chimico $11\beta,21$ -diidrossi- $16\alpha,17\alpha$ -(butilidenebis(ossi))pregna-1,4-diene-3,20-dione), è un glucocorticoide per il trattamento dell'asma, della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), della rinite non infettiva e del morbo di Crohn, rappresentata dalla Formula I.

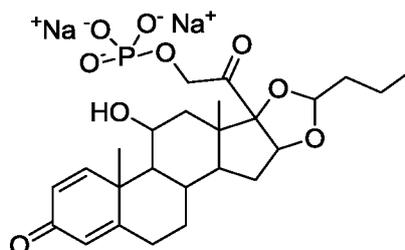


FORMULA I

La budesonide ha un logP di 3.2 e risulta praticamente insolubile in acqua (28 $\mu\text{g/mL}$) [Journal of Chemical and Engineering Data (2010), vol. 55, no. 1, pp. 578–582] al pH fisiologico del tratto intestinale.

Appartiene ai corticosteroidi inalatori (ICS), una classe di composti che rappresenta, ad oggi, lo strumento terapeutico più efficace utilizzato nel trattamento dell'asma, in grado, anche a dosi molto basse, di sopprimere e attivare molti geni rilevanti per il processo infiammatorio nelle vie aeree asmatiche.

Il sale disodico della budesonide 21-fosfato (di seguito indicato come Bud-21 P- Na_2) (Formula II) è stato utilizzato in alcuni studi per la preparazione di formulazioni liposomiali di glucocorticoidi indagati come agenti antitumorali [Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 111 (2008) 101–110; Journal of Controlled Release 127 (2008) 131–136].



FORMULA II

Nella presente invenzione il composto di Formula II è descritto come un composto più solubile in acqua con proprietà antinfiammatorie e antiasmatiche superiori a quelle della budesonide.

DEFINIZIONI

Se non diversamente specificato, ogni abbreviazione o termine scientifico utilizzato nel presente documento è da intendersi nel significato specificamente attribuitogli dagli operatori dello specifico settore scientifico/terapeutico.

In alcuni casi, termini dal significato comunemente ben noto sono qui riportati per chiarezza o per pronta memoria; pertanto, il loro inserimento in questo paragrafo non deve essere inteso come una differenza rispetto al loro significato generale.

Il termine "**eccipiente fisiologicamente accettabile**" si riferisce a una sostanza priva di qualsiasi effetto farmacologico proprio e che non produce reazioni avverse quando somministrato ad un mammifero, preferibilmente a un essere umano. Eccipienti fisiologicamente accettabili sono ben noti nell'arte e sono descritti, ad

esempio nell'Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition 2009, qui incorporato per riferimento

Il termine "**Budesonide 21-fosfato sale sodico**" si riferisce al sale disodico della Budesonide 21-fosfato.

Il termine "**somministrazione simultanea, separata o sequenziale**" si riferisce alla somministrazione del primo e del secondo composto contemporaneamente o in modo tale che i due composti agiscano contemporaneamente nell'organismo del paziente o alla somministrazione di un composto dopo l'altro composto in modo tale da fornire un effetto terapeutico. In alcune forme di realizzazione i composti vengono assunti con un pasto. In altre forme di realizzazione, i composti vengono assunti dopo un pasto, cioè 30 minuti o 60 minuti dopo un pasto. In altre forme di realizzazione, un composto viene somministrato a un paziente per un periodo di tempo seguito dalla somministrazione dell'altro composto.

Il termine "**dose terapeuticamente efficace**" si riferisce alla dose di principio attivo sufficiente per ottenere il trattamento o la prevenzione della malattia. La determinazione delle dosi efficaci rientra nelle capacità degli esperti del ramo in base al raggiungimento di un effetto desiderato. La dose efficace dipenderà da fattori che includono, ma non sono limitati a, il peso di un soggetto e/o il grado della malattia o condizione indesiderata di cui soffre un soggetto.

I termini "**trattamento**" e "**prevenzione**" si riferiscono all'eradicazione/miglioramento o alla prevenzione/ritardo nell'insorgenza, rispettivamente, del disturbo in trattamento o di uno o più dei sintomi ad esso associati, nonostante il fatto che il paziente possa essere ancora afflitto dal disturbo sottostante.

I termini "approssimativamente" e "circa" utilizzati nel testo sono riferiti al range dell'errore sperimentale che è insito nell'esecuzione di una misura sperimentale.

I termini "comprendente", "avente", "includente" e "contenente" sono da intendersi

come termini aperti (cioè il significato “comprendente, ma non limitato a”) e sono da considerarsi come un supporto anche per termini come “consistere essenzialmente di”, “consistente essenzialmente di”, “consistere di” o “consistente di”.

I termini “consiste essenzialmente di”, “consistente essenzialmente di” sono da intendersi come termini semi-chiusi, il che significa che non è incluso nessun altro ingrediente che incide sulle nuove caratteristiche dell'invenzione (eccipienti opzionali possono quindi essere inclusi).

I termini “consiste di”, “consistente di” sono da intendersi come termini chiusi.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La budesonide è praticamente insolubile in acqua, mentre risulta facilmente solubile negli alcoli. Per questo motivo le soluzioni idroalcoliche vengono solitamente preparate sciogliendo un'adeguata quantità del principio attivo in solventi quali gli alcoli idrosolubili. Tuttavia, le soluzioni così preparate hanno una bassa stabilità poiché grandi quantità di budesonide si decompongono in breve tempo. Inoltre, fino ad oggi sono state preparate formulazioni di budesonide sotto forma di sospensioni acquose in cui la fase solida tende nel tempo a depositarsi sul fondo del contenitore, richiedendo quindi additivi chimici o agitazione vigorosa. Questi sono i motivi che rendono la budesonide non adatta ad essere erogata da un nebulizzatore elettrico.

Il sale disodico della budesonide 21-fosfato (di seguito indicato come Bud-21 P- Na_2) (Formula II) è stato utilizzato in alcuni studi per la preparazione di formulazioni liposomiali di glucocorticoidi indagati come agenti antitumorali.

Journal of Controlled Release 127 (2008) 131–136 riporta che la budesonide sodio fosfato (BUP), incapsulata in liposomi a lunga circolazione (LCL), aveva la più alta attività antitumorale e che ciò è probabilmente dovuto alla maggiore potenza della BUP incapsulata in LCL rispetto agli altri tre glucocorticoidi (GC) impiegati

(prednisolone, desametasone e metilprednisolone disodio fosfato). L'elevata potenza delle formulazioni LCL-BUP comporta il rischio di insorgenza di forti effetti collaterali. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 111 (2008) 101–110 riporta che tra i quattro tipi di LCL-GC studiati, vale a dire: budesonide sodio fosfato (BUP), desametasone disodio fosfato (DXP), metilprednisolone disodio fosfato (MPLP) e prednisolone fosfato (PLP), LCL-BUP mostra la più alta attività antitumorale, che è probabilmente correlata alla forte potenza di questo glucocorticoide nel ridurre la produzione di fattori pro-angiogenici e pro-infiammatori nei tumori.

Nella presente invenzione Bud-21 P-Na₂ è descritto come un agente antinfiammatorio e antiasmatico con attività superiore a quella della budesonide.

Gli inventori hanno sorprendentemente riscontrato che Bud-21 P-Na₂ è utile nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive e disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni.

Di conseguenza, un primo aspetto della presente invenzione è relativo all'uso di Bud-21 P-Na₂ come agente antinfiammatorio o come agente antiasmatico.

Un secondo aspetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso della composizione farmaceutica comprendente Bud-21 P-Na₂, con almeno un eccipiente fisiologicamente accettabile, come agente antiinfiammatorio o antiasmatico.

In una forma di realizzazione preferita, Bud-21 P-Na₂ e la sua composizione farmaceutica, come sopra definita, sono utili nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come asma, BPCO e fibrosi polmonare (es. fibrosi cistica), malattie infiammatorie della

pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica.

Un terzo aspetto della presente invenzione è rappresentato da un prodotto o un kit per l'uso come sopra definito, contenente budesonide 21-fosfato sale sodico o la sua composizione farmaceutica e uno o più composti farmaceuticamente attivi (preferibilmente antibiotici) per uso simultaneo, separato o sequenziale.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La **Figura 1** mostra l'effetto correlato alle dosi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide sull'edema della zampa da carragenina. L'edema è stato realizzato attraverso la somministrazione sub-plantare di carragenina. Gli animali sono stati pretrattati con una somministrazione intraperitoneale (i.p.) di corticosteroidi un'ora prima dell'induzione dell'edema. Il **pannello A** mostra i risultati ottenuti dopo il trattamento con Bud-21 P- Na_2 alle dosi di 0.1, 0.3 e 1mg/kg. Il **pannello B** mostra i risultati ottenuti dopo trattamento con Bud alle dosi di 0.1, 0.3 e 1mg/kg. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs. gruppo trattato con veicolo, analizzato con test one-way ANOVA seguito dal Fisher's test.

La **Figura 2** confronta gli effetti comparativi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide alla dose di 0.3 mg/kg sull'edema della zampa da carragenina. L'edema è stato indotto in seguito alla somministrazione sub-plantare di carragenina. Gli animali sono stati pretrattati (i.p) con i corticosteroidi un'ora prima dell'induzione.

La **Figura 3** confronta gli effetti comparativi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide sull'infiltrazione cellulare nel modello sperimentale della sacca d'aria. L'infiltrato cellulare è stato misurato dopo 24h dall'iniezione di 10 μg di ovalbumina all'interno della sacca d'aria dorsale realizzata negli animali sensibilizzati; l'infiltrato cellulare è costituito per lo più da polimorfonucleati (PMN) con una significativa

proporzione di eosinofili. I composti sono stati somministrati un'ora prima della somministrazione di OVA nella sacca di aria. * $P < 0.05$ verso il veicolo.

La **Figura 4** confronta gli effetti comparativi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide sulla broncocostrizione in un modello sperimentale di asma allergico. La risposta (Penh) è stata misurata dopo l'esposizione degli animali alla metacolina inalata a concentrazioni crescenti (pannelli A e B) dopo la somministrazione giornaliera dei composti per 4 settimane (dopo il primo stimolo con OVA). Ciascun valore rappresenta la media \pm SEM per $n=5-6$ animali/gruppo. Pannello C: valore basale (senza esposizione alla metacolina); pannello D: picco della risposta (E_{max}); pannello E: area sotto la curva in condizioni basali e dopo somministrazione di metacolina (AUC). I dati sono stati analizzati con il test one-way ANOVA seguito da Fisher's LSD test per comparazioni multiple. * $P < 0.05$ vs. Sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. gruppo OVA non trattato; $\phi P < 0.05$ vs. la dose equimolare di Bud.

La **Figura 5** confronta gli effetti comparativi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide sulla conta totale e differenziata dei leucociti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) in un modello sperimentale di asma allergica. I fluidi dei BAL sono stati raccolti dagli animali non trattati e dagli animali esposti all'OVA dopo la somministrazione giornaliera dei composti per quattro settimane (dopo il primo stimolo con OVA). Le barre rappresentano la media \pm SEM per $n=5-6$ animali per gruppo. Pannello A: leucociti totali nel BAL; pannello B: eosinofili nel BAL; pannello C: neutrofili nel BAL; pannello D: linfociti nel BAL; pannello E: macrofagi nel BAL. I dati sono stati analizzati con il test one-way ANOVA seguito dal Fisher's LSD test per comparazioni multiple. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs. Sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$ vs. gruppo OVA non trattato; $\phi P < 0.05$ vs. la rispettiva dose equimolare di Bud.

La **Figura 6** confronta gli effetti comparativi di budesonide 21-fosfato sale sodico e di budesonide sullo stravasamento valutato con il metodo dell'Evans blue, 30 min dopo la somministrazione intradermica degli agenti flogogeni. Gli animali sono stati pretrattati intraperitonealmente con dosi equimolari dei corticosteroidi un'ora prima dell'induzione dell'edema. Il **Pannello A** mostra i risultati ottenuti dopo trattamento con 2.32 $\mu\text{mol/kg}$ di ciascuno dei composti testati (equivalente a 1.0 mg/kg Bud e 1.3 mg/kg Bud-21 P- Na_2). Il **Pannello B** mostra i risultati ottenuti dopo trattamento con 0.70 $\mu\text{mol/kg}$ di ciascuno dei composti trattati (equivalenti a 0.30 mg/kg Bud e 0.39 mg/kg Bud-21 P- Na_2). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. soluzione di Tyrode; # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ vs. gruppo trattato con veicolo, analizzato dal test one-way ANOVA seguito dal Fisher's test. $\phi P < 0.05$ vs. dose equimolare di Bud.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Come verrà descritto in dettaglio nella Sezione Sperimentale, gli autori della presente invenzione hanno scoperto che Bud-21 P- Na_2 è più potente della budesonide di partenza nel trattamento dell'asma allergico indotto da OVA e nell'edema cutaneo nei topi.

Inoltre, gli autori hanno anche trovato che l'effetto di Bud-21 P- Na_2 è dose-dipendente ed è significativo già nelle prime ore della prima fase acuta dell'edema della zampa.

Di conseguenza, un primo aspetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso di Bud-21 P- Na_2 come agente antinfiammatorio o come agente antiasmatico.

Un secondo aspetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso della composizione farmaceutica contenente Bud-21 P- Na_2 , con almeno un eccipiente fisiologicamente accettabile, come agente antiinfiammatorio o antiasmatico.

La Bud-21 P- Na_2 può essere somministrata come unico principio attivo o in

combinazione con altri composti terapeuticamente attivi, preferibilmente antibiotici.

Secondo una forma di realizzazione preferita, detto antibiotico è scelto dal gruppo comprendente gentamicina, tobramicina, tetraciclina, neomicina, bacitracina, nistatina, levofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, vancomicina, teicoplanina, amikacina, linezolid e fosfomicina.

Preferibilmente, dette composizioni sono in forma di polvere, sospensione o soluzione, più preferibilmente dette composizioni sono somministrate per inalazione, via parenterale (intramuscolare, intradermica, sottocutanea, endovenosa, intraarteriosa, intratecale, intrasinoviale), enterale (orale, sublinguale e rettale), via cutanea, via transdermica, via auricolare (otica) o via intraoculare.

Le composizioni possono essere utilizzate per l'inalazione attraverso le mucose, o possono consistere in una soluzione destinata ad aerosolterapia. In quest'ultimo caso il farmaco può essere somministrato attraverso l'uso di nebulizzatori sotto forma di spray per aerosol o in confezioni pressurizzate. Inoltre, la composizione può consistere di una polvere ad uso inalatorio da insufflare mediante specifici dispositivi.

Il sistema di erogazione preferito per la somministrazione inalatoria è costituito da un aerosol a dose predefinita formulato come sospensione o soluzione dei diversi costituenti in propellenti idonei per l'allestimento di preparazioni farmaceutiche inalabili.

Le composizioni farmaceutiche adatte per uso orale possono essere somministrate sotto forma di compresse, capsule o sciroppi.

In una forma di realizzazione preferita, Bud-21 P-Na₂ e la sua composizione farmaceutica, come sopra definita, sono utili nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come

asma, BPCO e fibrosi polmonare (es. fibrosi cistica), malattie infiammatorie della pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica.

Un terzo aspetto della presente invenzione è rappresentato da un prodotto o un kit per l'uso, come sopra definito, comprendente: A) Bud-21 P-Na₂ e una sua composizione farmaceutica come sopra definita, e B) almeno un antibiotico, A) e B) essendo due formulazioni separate per uso simultaneo, separato o sequenziale.

Un altro aspetto della presente invenzione riguarda l'uso di Bud-21 P-Na₂ o della sua composizione farmaceutica come sopra definita, per la preparazione di un agente antinfiammatorio o antiasmatico.

In una forma di realizzazione preferita, la presente invenzione riguarda l'uso di Bud-21 P-Na₂ o della sua composizione farmaceutica, come definita sopra, per la preparazione di un medicamento utile per la prevenzione e/o il trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come asma, BPCO e fibrosi polmonare (es. fibrosi cistica), malattie infiammatorie della pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica.

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda un metodo per la prevenzione e/o il trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come asma, BPCO e fibrosi polmonare (es. fibrosi cistica), malattie infiammatorie della pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica comprendente la fase di somministrare ad un soggetto che ne ha bisogno una

quantità terapeuticamente efficace di Bud-21 P-Na₂ o della sua composizione farmaceutica.

La presente invenzione sarà dettagliatamente descritta nella seguente sezione sperimentale.

SEZIONE SPERIMENTALE

Materiali e Metodi

a) Chimica

1. Materiali e Metodi

Tutti i prodotti commerciali sono stati acquistati da Merck-Sigma Aldrich. Gli spettri ¹H (500 MHz) e ¹³C (125 MHz) NMR sono stati acquisiti su uno spettrometro Agilent INOVA; i valori di chemical shifts riportati sono relativi al segnale residuo del solvente (CD₃OD: δ_H = 3.31, δ_C = 49.0). Le correlazioni omonucleari ¹H sono state determinate attraverso esperimenti COSY. Le correlazioni ¹H-¹³C a due e tre legami di distanza sono state determinate mediante esperimenti in gradiente 2D HMBC ottimizzati ad un valore di ^{2,3}J pari ad 8Hz. Gli esperimenti di diffrazione ai raggi X su polveri (XRPD) sono stati eseguiti su di uno strumento Panalytical X'pert PRO. I profili di intensità sono stati raccolti nell'intervallo 2θ di 4–40° utilizzando la radiazione CuKα filtrata al Ni (λ = 1.5406 Å) a 40 kV e 30 mA, con step di avanzamento di 0.02°, ed un tempo di scansione di 120s per ogni step. I pattern di diffrazione sono stati processati utilizzando il software Highscore Plus. Gli spettri IR sono stati acquisiti su uno spettrometro FT-IR Thermo Nicolet 5700.

2. Sintesi della Budesonide 21-fosfato sale sodico (II)

Step 1: Sintesi della Budesonide 21-fosfato

Ad una soluzione di budesonide (10 g, 0.023 moli) in THF anidro (35 mL) a -40 °C è

stato aggiunto difosforil cloruro (8.0 mL, 0.058 moli) e la miscela risultante è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica a -40 °C per 20 min. La reazione è stata, quindi, trattata con acqua e con soluzione satura di bicarbonato di sodio fino a pH ~ 8, mantenendo la miscela sotto agitazione per un'ora a temperatura ambiente. La soluzione è stata, quindi, estratta con acetato di etile; la fase acquosa è stata acidificata usando una soluzione di HCl 1 N ed estratta più volte con acetato di etile. Le fasi organiche combinate sono state lavate con soluzione satura di cloruro di sodio, anidificate con solfato di sodio e concentrate fornendo la budesonide 21-fosfato (10.1 g, 86%). P.F. 219-221 °C LRMS (ES) (M + H)⁺: calc, 510.5; sper, 511.2. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.45 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.21 (t, J = 4.9 Hz, 0.5H), 5.14 (d, J = 7.2 Hz, 0.5H), 5.01 – 4.83 (m, 2H), 4.77 – 4.59 (m, 2H), 4.47 – 4.37 (m, 1H), 2.65 (td, J = 13.4, 5.3 Hz, 1H), 2.37 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.28 – 2.07 (m, 3H), 2.01 – 1.92 (m, 1H), 1.87 – 1.79 (m, 1.5H), 1.77 – 1.67 (m, 1.5H), 1.64 – 1.56 (m, 3H), 1.54 – 1.45 (m, 4H), 1.03 – 0.88 (m, 7H).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 206.14, 204.88, 190.12, 175.51, 160.99, 133.16, 129.17, 123.87, 110.73, 106.88, 101.11, 100.26, 85.59, 84.37, 71.71, 58.41, 55.43, 52.57, 48.30, 47.18, 42.53, 39.49, 37.38, 36.76, 35.60, 34.27, 33.68, 32.95, 22.83, 19.68, 19.32, 19.21, 18.93, 15.63, 15.55.

Step 2: Sintesi della Budesonide 21-fosfato sale sodico

La Budesonide 21-fosfato (5.0 g, 9.79 mmol) è stata sospesa in acqua (100 mL) e titolata con NaOH 2N fino a pH 7,94, ottenendo una soluzione completamente limpida. Quindi il solvente è stato rimosso e il residuo è stato trattato con metanolo (75 mL) mantenendo la sospensione all'ebollizione del solvente per 30 min. Dopo raffreddamento, il solido insolubile è stato filtrato e il solvente è stato rimosso

sottovuoto. Il residuo è stato quindi trattato con dietiletere fornendo Bud-21 P-Na₂ come solido bianco (4.3 g, 79%), P.F. 245-246 °C.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.47 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.18 (dd, J = 13.1, 6.2 Hz, 1H), 4.96 – 4.83 (m, 2H), 4.72-4.62 (m, 2H), 4.41 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 2.64 (dt, J = 13.0, 6.7 Hz, 1H), 2.37 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 2.24 – 2.09 (m, 3H), 1.94 (dd, J = 17.8, 9.7 Hz, 1H), 1.70 (dd, J = 14.1, 6.6 Hz, 1H), 1.60 (dd, J = 12.1, 7.0 Hz, 3H), 1.51 – 1.39 (m, 4H), 1.04 – 0.89 (m, 7H).

¹³C NMR (CD₃OD-d₄): δ 210.89, 209.55, 188.85, 174.28, 159.86, 127.84, 122.55, 109.41, 105.45, 99.88, 98.97, 84.01, 82.92, 70.53, 70.48, 69.96, 69.68, 57.17, 57.08, 54.22, 51.33, 47.07, 45.98, 45.94, 41.34, 40.97, 38.27, 36.17, 35.50, 35.35, 34.34, 33.83, 33.01, 32.47, 31.75, 21.55, 18.44, 17.98, 17.82, 17.54, 14.40, 14.26.

b) Farmacologia

1. Animali

1.1. Protocollo-1

Topi femmine Balb/c (8 settimane di età, Charles River, Calco, Italia) sono stati alloggiati nello stabulario del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli, in Italia in un ambiente controllato (temperatura 21 ± 2 ° C e umidità 60 ± 10%) e forniti di acqua e cibo standard per roditori ad libitum. Tutti gli animali sono stati stabulati per quattro giorni prima dell'inizio degli esperimenti e sono stati sottoposti ad un ciclo di 12 ore di luce - 12 ore di buio. Sono stati condotti esperimenti durante la fase di luce. Le procedure sperimentali sono state approvate dal Ministero italiano secondo la legge e le politiche internazionali e nazionali (Direttiva UE 2010/63 / UE e DL 26/2014 per esperimenti su animali).

1.2. Protocollo-2

Topi maschi Balb/c SPF (25 ± 2 g, 6 settimane di età) sono stati stabulati presso lo stabulario della Scuola di Medicina di San Paolo (Università Federale di San Paolo, Brasile). Sono stati alloggiati in apposite gabbie in condizioni di temperatura controllata a 22°C con un ciclo luce/buio di 12/12 ore consentendo l'accesso a cibo e acqua ad libitum.

1.3. Protocollo-3

Topi maschi Balb/c SPF (25 ± 2 g, 6 settimane di età) sono stati alloggiati presso lo stabulario della Scuola di Medicina di San Paolo (Università Federale di San Paolo, Brasile) in apposite gabbie in condizioni di temperatura controllata a 22°C con un ciclo luce/buio di 12/12 ore consentendo l'accesso a cibo e acqua ad libitum. Lo studio è stato condotto in accordo con i principi etici per la ricerca sugli animali stabiliti dal Collegio brasiliano per la sperimentazione animale (COBEA). Secondo le regole interne del laboratorio, l'eutanasia viene eseguita se un grave stress correlato agli agenti di test si è sviluppato durante l'esperimento.

2. Composti testati e reagenti

Nel protocollo 1 (edema della zampa) sono stati testati Bud e Bud 21-P Na_2 . Entrambi i composti sono stati somministrati in un volume $100\mu\text{l}$ per via intraperitoneale un'ora prima dell'induzione della reazione infiammatoria. Le dosi testate sono state 0.1, 0.3 e 1mg/kg .

Nel modello della sacca d'aria indotto negli animali sensibilizzati Bud e Bud 21-P Na_2 sono stati testati alla dose di 0.3mg/kg . Entrambi i composti sono stati somministrati in un volume finale di $100\mu\text{l}$ all'interno della sacca d'aria un'ora prima dell'induzione della reazione infiammatoria.

Nel protocollo 2, i composti Bud (PM: 430.53 g/mol) e Bud-21 P Na_2 (PM: 554.48 g/mol) sono stati somministrati alle dosi equimolari di 3, 10 e 30

nmoli/animale/giorno, equivalenti a 1.3, 4.3 e 12.9 $\mu\text{g}/\text{animale}/\text{giorno}$ di Bud, 1.7, 5.5 e 16.6 $\mu\text{g}/\text{animale}/\text{giorno}$ di Bud-21 P Na₂, rispettivamente. I composti sono stati dissolti in 10% di soluzione salina + 90% DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) alle concentrazioni tali che le dosi risultavano dalla somministrazione intranasale di 10 $\mu\text{l}/\text{animale}$ (5 $\mu\text{l}/\text{narice}$) di ciascuna delle soluzioni.

L'ovalbumina estratta da uovo di pollo (OVA; grado V, cat. A5503, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) è stata sciolta in soluzione sterile tamponata con fosfato salino (PBS) (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ed è stato aggiunto Al(OH)₃ (13mg/ml). Questo mix è stato usato per indurre la sensibilizzazione allergica degli animali mediante iniezione sottocutanea. OVA è stato sciolto all'1% in soluzione sterile di PBS e questa soluzione è stata nebulizzata (come challenge immunologico).

Nel protocollo 3, Bud (alle dosi di 1.0 e 0.30 mg/kg) e Bud 21-P Na₂ (alle dosi di 1.3 e 0.39 mg/kg) sono stati somministrati su base molare, dosi equivalenti a 0.70 e 2.32 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ di ciascun composto, rispettivamente. Il veicolo per la dissoluzione dei composti era una soluzione salina sterile (0.9% NaCl) contenente il 12.5% di DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Le soluzioni dei composti sono state allestite a concentrazioni tali che la somministrazione della dose per peso corporeo prevedeva la somministrazione intraperitoneale di 10 ml/kg di ciascuna delle soluzioni.

Bradichinina acetato (BK; cat. B3259, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e il composto 48/80 (C48/80; cat. C2313, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) sono stati preparati rispettivamente in soluzione sterile di Tyrode alle concentrazioni di 60 μM e 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (in questo modo, l'iniezione intradermica di 50 μl di ciascuno degli agenti risultava nelle dosi di 3 nmol e 10 μg per sito di iniezione rispettivamente).

3. Gruppi sperimentali I

3.1 Edema della zampa

L'edema da carragenina nella zampa di topi CD-1 prevede la somministrazione sub-plantare di 50µl di carragenina all'1% e la misurazione dell'incremento del volume della zampa attraverso l'utilizzo dell'idropletismometro. Questo modello sperimentale ha uno sviluppo bifasico (Posadas et al., Br J Pharmacol 2004 May;142(2):331-338). La prima fase, che è acuta, è sostenuta da un incremento della permeabilità accompagnato da una infiltrazione di neutrofili che si sviluppa e si risolve tra le 4 e le 5 ore. La seconda fase si sviluppa dopo 24 ore, è caratterizzata da un'infiltrazione macrofagica e ha le caratteristiche di un'inflammatione subcronica, che raggiunge il massimo dopo 72h e si risolve dopo 5 giorni. Bud e Bud 21-P Na₂ sono stati somministrati in un volume di 100µl per via intraperitoneale un'ora prima dell'induzione della reazione infiammatoria. I composti sono stati testati alle dosi di 0.1, 0.3 e 1mg/kg.

3.2 Sacca d'aria

Questo modello è utilizzato per investigare i meccanismi d'azione di agenti antinfiammatori. Il modello sperimentale richiede un'iniezione di aria sul dorso dell'animale con la formazione di una sacca d'aria che crea una cavità artificiale. All'interno di questa cavità possono essere iniettati agenti infiammatori consentendo una semplice raccolta dell'infiltrato cellulare che può essere analizzato. La sacca d'aria viene realizzata somministrando 5ml di aria dopo tre giorni dalla sensibilizzazione con ovalbumina (OVA). L'iniezione di 10 µg di OVA all'interno della sacca d'aria induce una reazione chemiotattica già dopo 6ore con un picco a 24 ore e che persiste fino a 48 ore. A 24 ore, l'infiltrato cellulare è costituito prevalentemente da polimorfonucleati (PMN) con una significativa proporzione di eosinofili (Anuk M Das et al, Br J Pharmacol. 1997 May; 121(1): 97–104). Bud e Bud 21-P Na₂ sono

stati valutati alle dosi di 0.3mg/kg. Entrambi i composti sono stati somministrati in un volume finale di 100µl all'interno della sacca d'aria un'ora prima dell'induzione della reazione infiammatoria.

4. Gruppi sperimentali II

La tabella mostra i gruppi analizzati:

Gruppo	Trattamento	Dose	n
Sham	DMSO/salina	10 µl/animale, i.n.	5
OVA	DMSO/salina	10 µl/animale, i.n.	6
OVA + Bud 3	Bud	3 nmol/animale/giorno, i.n.	6
OVA + Bud 10	Bud	10 nmol/animale/ giorno, i.n.	6
OVA + Bud 30	Bud	30 nmol/animale/ giorno, i.n.	6
OVA + Bud-21 P-Na ₂ 3	Bud-21 P-Na ₂	3 nmol/animale/ giorno, i.n.	6
OVA + Bud-21 P-Na ₂ 10	Bud-21 P-Na ₂	10 nmol/animale/ giorno, i.n.	6
OVA + Bud-21 P-Na ₂ 30	Bud-21 P-Na ₂	30 nmol/animale/ giorno, i.n.	6

4.1 Induzione dell'iperreattività bronchiale e trattamenti

I topi sono stati sensibilizzati con due iniezioni subcutanee di 0.2 ml di OVA/Al(OH)₃, ad un intervallo di 7 giorni (gli animali Sham ricevevano una sospensione di Al(OH)₃ in PBS senza OVA). Sette giorni dopo la seconda sensibilizzazione (i.e., terza settimana), gli animali sono stati nebulizzati due volte a settimana con una soluzione di OVA all'1% (Sham e gruppi OVA non trattati sono stati trattati con aerosol di PBS) per 20 minuti nelle due successive settimane.

Tre ore dopo il challenge (nebulizzazione di OVA) e ogni giorno durante le successive 4 settimane (dopo il primo challenge di OVA), i topi sono stati trattati per via intranasale (10 µl/animale con 5 µl/narice) con i composti o il veicolo e l'ultima dose è stata somministrata prima dell'ultima valutazione delle resistenze alla fine della sesta settimana.

4.2 Iperreattività polmonare/funzione Penh

La reattività delle vie aeree in animali coscienti e che respiravano spontaneamente è stata misurata alla fine della quarta settimana (ovvero, dopo 2 settimane di challenge con OVA + trattamenti), 24 ore dopo l'ultimo challenge OVA/PBS attraverso la pletismografia di tutto il corpo (Buxco Europe Ltd, Winchester, Regno Unito), come precedentemente descritto (Santos et al., 2014). Gli esperimenti sono stati condotti in una stanza non rumorosa da un investigatore ignaro della natura dei trattamenti. La soluzione salina (50 µl/topo per 60 s) e quindi l'agonista muscarinico metacolina (MCh) a concentrazioni crescenti (3.12, 6.25, 12.5 e 25.0 mg / ml in PBS) sono state nebulizzate attraverso un'entrata della camera principale per 3 minuti ciascuna per indurre broncocostrizione e le letture sono state prese e monitorate per 6 minuti dopo ogni nebulizzazione. Dopo 20 minuti, i valori rientrano in quelli basali. Il ritardo nel rientro ai valori basali (Penh) è stato utilizzato come indicatore di broncocostrizione e conseguente aumento delle resistenze delle vie aeree: $Penh = [(tempo\ di\ scadenza / tempo\ di\ rilassamento) - 1] / (flusso\ di\ espirazione\ massimo / flusso\ di\ inspirazione\ massimo)$.

4.3 Raccolta del fluido BAL e campioni di sangue

Dopo la valutazione di Penh, i topi sono stati anestetizzati con isoflurano per via inalatoria (5% v/v in O₂) e sono stati raccolti campioni di sangue dall'aorta addominale discendente. I topi sono stati quindi sottoposti ad eutanasia mediante dissanguamento (sono stati raccolti campioni di sangue da ciascun animale per il conteggio delle cellule dei leucociti) e il lavaggio broncoalveolare (BAL) è stato eseguito esponendo e cannulando la trachea con un tubo di polietilene (diametro esterno di 1 mm) collegato a una siringa. I polmoni sono stati lavati utilizzando 300 µL di soluzione PBS contenente eparina (20 UI / mL). Sono state ottenute le aliquote

di lavaggio BAL recuperate e la stessa procedura è stata ripetuta altre quattro volte. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione (1000 g per 10 minuti) e il pellet cellulare è stato risospeso in 200 μ L di soluzione di PBS. Il conteggio totale delle cellule è stato determinato utilizzando una camera di Neubauer e il conteggio differenziale è stato effettuato in preparazioni centrifugate ad alta velocità (Fanem Mod 2400; San Paolo, Brasile) e colorate con colorante May-Grünwald. I leucociti sono stati classificati in base a normali criteri morfologici.

5. Gruppi sperimentali III

Le tabelle riportano i gruppi sperimentali:

Esperimento #1

Trattamento	Dose	n
Veicolo	10 ml/kg; i.p.	5
Bud	1.0 mg/kg; i.p.	5
Bud-21 P-Na ₂	1.3 mg/kg; i.p.	5

Esperimento #2

Trattamento	Dose	n
Veicolo	10 ml/kg; i.p.	5
Bud	0.30 mg/kg; i.p.	5
Bud-21 P-Na ₂	0.39 mg/kg; i.p.	5

5.1 Induzione dell'edema cutaneo e trattamenti

L'edema cutaneo è stato valutato nei topi secondo il metodo precedentemente descritto da Costa et al. (2006), *Vasc. Pharmacol.*; 45: 209-214 e Yshii et al (2009), *Toxicol.*; 53: 42-52. I topi sono stati anestetizzati con uretano (25% p/v, 10 ml/kg, i.p.), è stata rasata la pelle dorsale e successivamente trattati i.p. con il veicolo e i composti. Cinquantacinque minuti dopo, un volume di 100 μ L di soluzione di colorante blu Evans (0,25% in soluzione salina sterile) è stato iniettato per via endovenosa (i.v.) attraverso la vena della coda. Cinque minuti dopo, BK e C48/80 sono stati

iniettati per via intradermica (i.d.) nella parte dorsale della pelle a un volume fisso di 50 μ l utilizzando uno schema randomizzato. Lo stesso volume di soluzione Tyrode 50 μ l è stato iniettato come controllo. Trenta minuti dopo, è stato prelevato un campione di sangue di 1 ml tramite puntura cardiaca e i topi sono stati sacrificati mediante un'overdose di uretano seguita da lussazione cervicale. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 6.000 g per 4 minuti per ottenere il plasma. La pelle dorsale è stata rimossa e i siti iniettati sono stati perforati utilizzando una perforatrice per sughero di 8 mm di diametro. Anche un sito cutaneo non iniettato distante dai siti di iniezione è stato perforato e preso come controllo negativo. Il colorante è stato estratto da ciascun pezzo di pelle e campioni di plasma (100 μ l) utilizzando formammide e l'assorbanza delle soluzioni risultanti è stata misurata a 620 nm. Lo stravasamento plasmatico dovuto a ciascun agente (espresso in μ l/sito) è stato calcolato come rapporto tra l'assorbanza di ciascun rispettivo pezzo di pelle, corretta dal valore del bianco e le soluzioni del campione di plasma, opportunamente aggiustate dai fattori di diluizione [Vasc. Pharmacol. (2006); 45: 209-214]. Per omogeneizzare i dati dovuti alla variabilità dei diversi gruppi di animali (variazioni tra gruppi), i dati sull'edema sono espressi come risposta al cambiamento di volume relativo alla risposta media di Tyrode (controllo) di ciascun esperimento.

6. Analisi statistica

I dati sono espressi come media aritmetica \pm SEM da singoli animali. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism v5.01. I risultati sono stati analizzati utilizzando one-way ANOVA, seguito dal test di confronto multiplo di Dunnett; le differenze tra medie di gruppo con valori di $P < 0,05$ sono state considerate significative.

7. Risultati

1. Gruppo sperimentale I

Prima fase dell'edema

La somministrazione di carragenina induce negli animali di controllo un aumento significativo del volume della zampa già dopo due ore raggiungendo la risposta massima a 4 ore. I risultati ottenuti mostrano una differenza in termini di attività farmacologica tra i due farmaci testati nella prima fase. I risultati sono riassunti come:

1. Bud-21 P-Na₂ mostra un effetto antiinfiammatorio dose-dipendente (**Figura 1**).
2. Bud-21 P-Na₂, alla dose di 0.1mg/kg, inibisce del 50% la formazione dell'edema e il massimo dell'inibizione (70%) lo si ottiene alla dose di 0.3 o 1mg/kg. Questo effetto è evidente già nella parte iniziale dell'edema e persiste per tutta la prima fase.
3. Bud induce un profilo di attività significativo nell'inibire lo sviluppo dell'edema. È da notare che l'inibizione massima è di circa il 50% ma non è correlata alla dose (**Figura 1**).
4. Alla dose di 0.3 mg Bud-21 P-Na₂ mostra un inizio più rapido dell'effetto poiché un'inibizione significativa è già presente dopo 2 ore e rimane costante per tutta la prima fase. Al contrario Bud, alla stessa dose, raggiunge lo stesso livello di inibizione di Bud-21 P-Na₂ solo dopo 6 ore (**Figura 2**).

Seconda fase dell'edema

Dopo un'apparente risoluzione dell'edema 6 ore dopo la somministrazione di carragenina, si sviluppa una seconda fase attraverso una reazione più prolungata e duratura che raggiunge un plateau dopo 72 ore. Sebbene i farmaci siano stati somministrati solo quando è stata indotta la reazione infiammatoria, la loro azione

farmacologica si riflette anche nella seconda fase. Tutti i farmaci testati inibiscono significativamente l'edema con un profilo simile (**Figura 1**).

Sacca d'aria

La somministrazione di ovalbumina all'interno della sacca d'aria di topi sensibilizzati induce un significativo infiltrato cellulare che raggiunge il suo massimo dopo 24 ore. La somministrazione di tutti i composti inibisce significativamente il reclutamento cellulare come mostrato in **Figura 3**.

2. Gruppi sperimentali II

2.1 Iperreattività polmonare / funzione Penh

La sensibilizzazione indotta da OVA aumenta significativamente la reattività delle vie aeree, come valutato dalla misurazione delle resistenze polmonari in seguito all'esposizione a concentrazioni crescenti di metacolina inalata (profili mostrati in **Figura 4**, *Pannelli A e B*), come evidenziato dall'aumento dell'area sottesa dalle curve concentrazioni effetto della metacolina e resistenze (AUC; *Pannello E*) e risposta massima (E_{max} ; *Pannello D*). Le resistenze basali (i.e., senza esposizione a metacolina) non erano significativamente diverse tra i gruppi.

Entrambi i parametri (AUC e E_{max}) sono stati significativamente ridotti da Bud-21 P- Na_2 alle dosi testate (3, 10 e 30 nmol/animale/giorno), mentre il trattamento con il composto progenitore Bud ha comportato una significativa riduzione di questa risposta solo alla dose più alta (30 nmol/animale/giorno).

2.2 Conteggio cellule nei fluidi BAL

La **Figura 5** mostra che gli animali con asma allergico avevano un numero maggiore di leucociti totali reclutati nello spazio broncoalveolare rispetto al gruppo Sham e che tutti i trattamenti hanno portato ad una riduzione significativa di questi numeri, sebbene la risposta osservata negli animali trattati con Bud alla dose di 3

nmol/animale/giorno fosse ancora significativamente più alta di quella osservata nei topi Sham (pannello A). Negli animali allergici non trattati è stata osservata una migrazione più pronunciata degli eosinofili ai polmoni e tutti i trattamenti (ad eccezione di Bud a 3 nmol/animale/giorno) hanno ridotto significativamente questo reclutamento cellulare (pannello B). Anche il reclutamento dei macrofagi nello spazio broncoalveolare risulta aumentato negli animali allergici non trattati e questa risposta è stata significativamente ridotta da tutti i trattamenti, sebbene le risposte degli animali trattati con Bud a 3 o 10nmol/animale/giorno fossero ancora significativamente superiori a quelli osservati nel gruppo Sham (pannello E). Gli animali allergici non trattati non hanno mostrato un aumento significativo dei neutrofili (pannello C) o dei linfociti (pannello D) nei fluidi BAL, sebbene alcuni dei trattamenti fossero in grado di diminuire o addirittura abolire la migrazione di queste cellule nello spazio broncoalveolare.

3. Gruppi sperimentali III

3.1 Edema cutaneo

Come mostrato nella **Figura 6** (pannelli A e B), sia BK che C48/80 hanno indotto uno stravasamento plasmatico significativo, misurato 30 minuti dopo l'iniezione. Come mostrato nel pannello A, le dosi equimolari (2.32 $\mu\text{mol/kg}$) dei due composti (equivalenti a 1.0 mg/kg Bud e 1.3 mg/kg Bud-21 P- Na_2), somministrate 60 min prima dell'iniezione intradermica degli agenti edematogeni, ha mostrato un effetto simile abolendo, ad esempio, la risposta indotta da BK o riducendo di circa il 50% lo stravasamento plasmatico indotto da C48/80. Tuttavia, come mostrato nel pannello B, quando i composti in esame sono stati somministrati a una dose equimolare inferiore (0.70 $\mu\text{mol/kg}$ equivalente a 0.30 mg/kg di Bud o 0.39 mg/kg di Bud-21 P- Na_2), Bud era inefficace sia sull'edema indotto da BK che su quello indotto da C48/80. Al contrario, Bud-21 P-

Na₂ ha inibito significativamente l'edema indotto da C48/80.

Conclusioni

Il modello dell'edema della zampa di topo consente di distinguere tra una fase acuta immediata seguita da una risposta subcronica. La scoperta che Bud-21 P-Na₂ mostra un effetto precoce rispetto a Bud suggerisce un'insorgenza d'azione più rapida che può risultare utile in future applicazioni cliniche. L'effetto del sale disodico è infatti dose-correlato e significativamente presente già nelle prime ore della prima fase acuta dell'edema. Entrambi i farmaci sono risultati ugualmente attivi sulla seconda fase dell'edema a tutte le dosi testate. Questa attività farmacologica prolungata è coerente con il noto profilo terapeutico di questa classe di steroidi antinfiammatori che coinvolge, nella fase successiva, sia l'effetto genomico che non genomico inclusa la down regulation di diversi fattori di trascrizione delle citochine infiammatorie.

La capacità dei farmaci di agire in presenza di uno stato infiammatorio accertato è confermata dallo studio sperimentale condotto con il modello della sacca d'aria. In questo modello, i composti hanno mostrato uguale efficacia nell'inibire il richiamo cellulare innescato dallo stimolo infiammatorio. La mancanza di differenza, in questo caso, è giustificata dalla somministrazione locale che consente di superare le differenze correlate al diverso profilo farmacocinetico delle due molecole.

Considerando la risposta di broncocostrizione alla metacolina (valutata dalla funzione Penh), i risultati dei Gruppi Sperimentali II mostrano che gli effetti terapeutici benefici osservati con la dose più bassa di Bud-21 P-Na₂ (3 nmol/animale/giorno) erano assenti quando Bud è somministrato a dosi molarie uguali o superiori (cioè 3 e 10 nmol/animale/giorno). Una situazione simile è stata osservata per quanto riguarda il reclutamento dei leucociti nello spazio broncoalveolare (valutato mediante lavaggio),

in particolare gli eosinofili (che sono il principale tipo di leucociti coinvolti nelle risposte allergiche), nonché i macrofagi o addirittura i leucociti totali.

Considerando l'edema cutaneo, i risultati dei Gruppi Sperimentali III mostrano che Bud era inefficace sia su BK che su C48/80. Al contrario, Bud-21 P-Na₂ ha inibito significativamente l'edema indotto da C48/80. I risultati evidenziano gli effetti benefici del pretrattamento con Bud-21 P-Na₂ sull'edema cutaneo di topo rispetto al composto progenitore Bud, quando somministrato ad una dose equimolare (0.70 µmol/kg) alla quale quest'ultimo è privo di effetti.

In conclusione, questi dati dimostrano chiaramente che il Bud-21 P-Na₂ è più potente del progenitore Bud nell'esercitare i suoi effetti benefici nei topi con asma allergico indotto da OVA e nell'edema cutaneo indotto.

Il Rappresentante

Elena Viganò

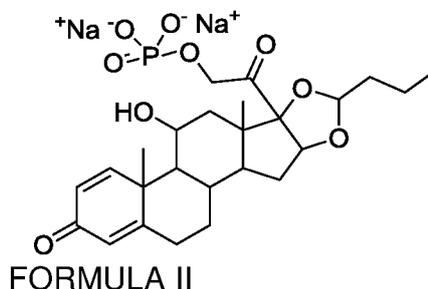


Dragotti & Associati Srl

(Reg. No. 1345 B)

RIVENDICAZIONI

1. Il sale sodico della Budesonide 21-fosfato di Formula (II)



per uso come agente antinfiammatorio e antiasmatico.

2. Una composizione farmaceutica comprendente il sale sodico della Budesonide 21-fosfato, in combinazione con almeno un eccipiente fisiologicamente accettabile, per uso come agente antiinfiammatorio o antiasmatico.

3. La composizione farmaceutica per uso secondo la rivendicazione 2, contenente inoltre almeno un antibiotico, preferibilmente scelto dal gruppo comprendente gentamicina, tobramicina, tetraciclina, neomicina, bacitracina, nistatina, levofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, vancomicina, teicoplanina, amikacina, linezolid e fosfomicina.

4. La composizione farmaceutica per uso secondo le rivendicazioni 2 o 3, in cui detta composizione è in forma di polvere, sospensione o soluzione, preferibilmente detta composizione viene somministrata per inalazione, via parenterale, via enterale, via cutanea, via transdermica, via auricolare (otica) o via intraoculare.

5. Una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4, in cui detta composizione è un aerosol a dose predefinita formulato come sospensione o soluzione degli ingredienti.

6. Il sale sodico della budesonide 21-fosfato per uso secondo la rivendicazione 1 o la composizione farmaceutica per uso secondo le rivendicazioni da 2 a 5 nella

prevenzione e/o nel trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come asma, BPCO e fibrosi polmonare, malattie infiammatorie della pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica.

7. Un prodotto o un kit per l'uso come agente antinfiammatorio o come agente antiasmatico, contenente:

A) sale sodico della budesonide 21-fosfato secondo la rivendicazione 1, o una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 2, e

B) almeno un antibiotico,

A) e B) essendo due formulazioni separate per uso simultaneo, separato o sequenziale.

8. Il prodotto o il kit per uso secondo la rivendicazione 7 nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie infiammatorie acute o croniche, preferibilmente patologie infiammatorie respiratorie, patologie ostruttive, disfunzioni delle vie aeree indotte da allergeni, come asma, BPCO e fibrosi polmonare, malattie infiammatorie della pelle, come psoriasi, artrite reumatoide, lupus, artralgia, malattie infiammatorie neurodegenerative, come sclerosi multipla, neurite acuta o cronica.

Il Rappresentante

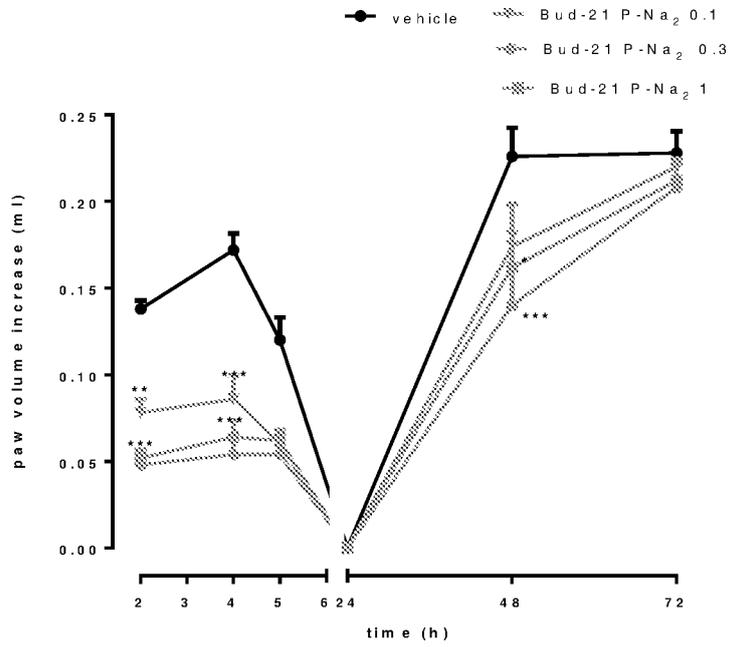
Elena Viganò


Dragotti & Associati Srl

(Reg. No. 1345 B)

Figure 1

A



B

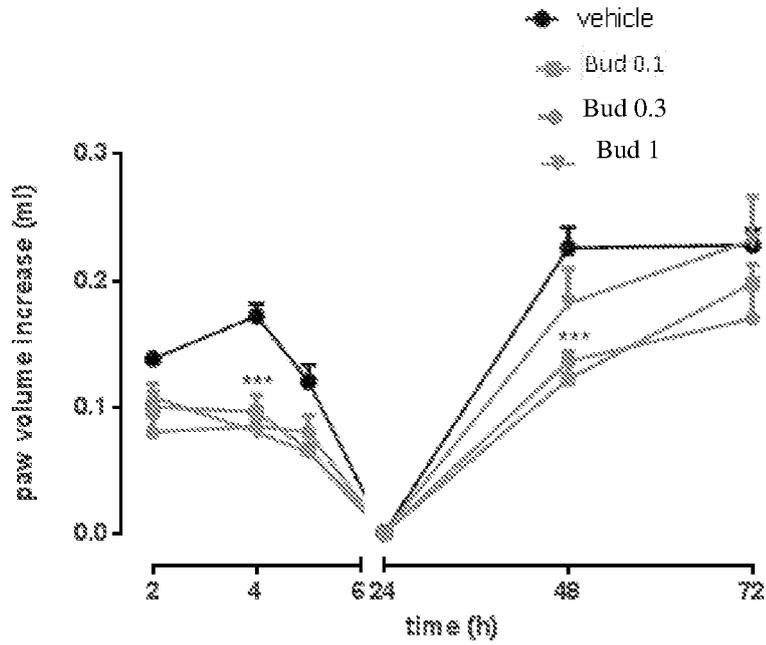


Figure 2

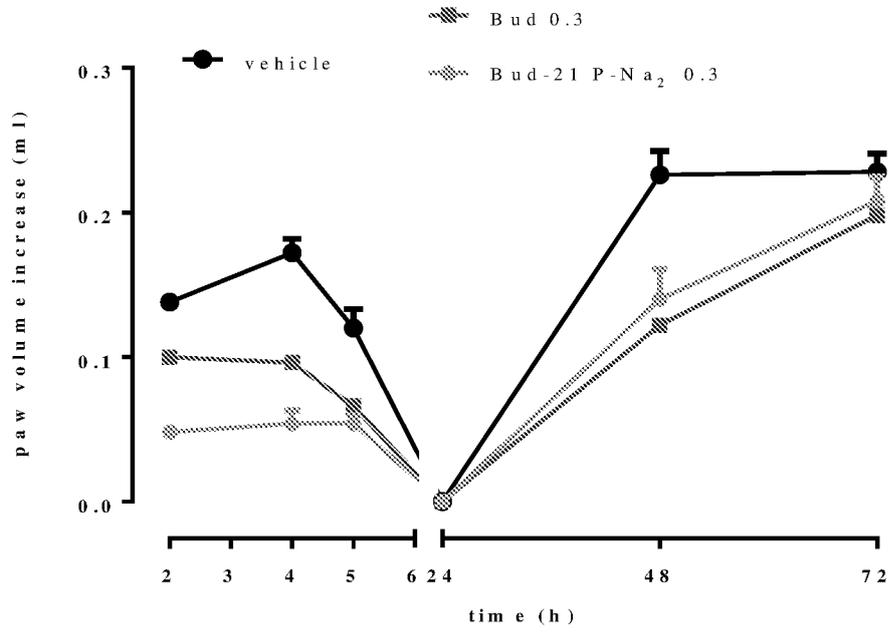


Figure 3

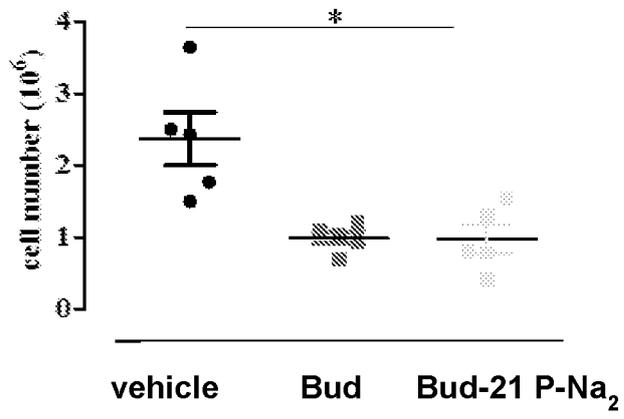


Figure 4

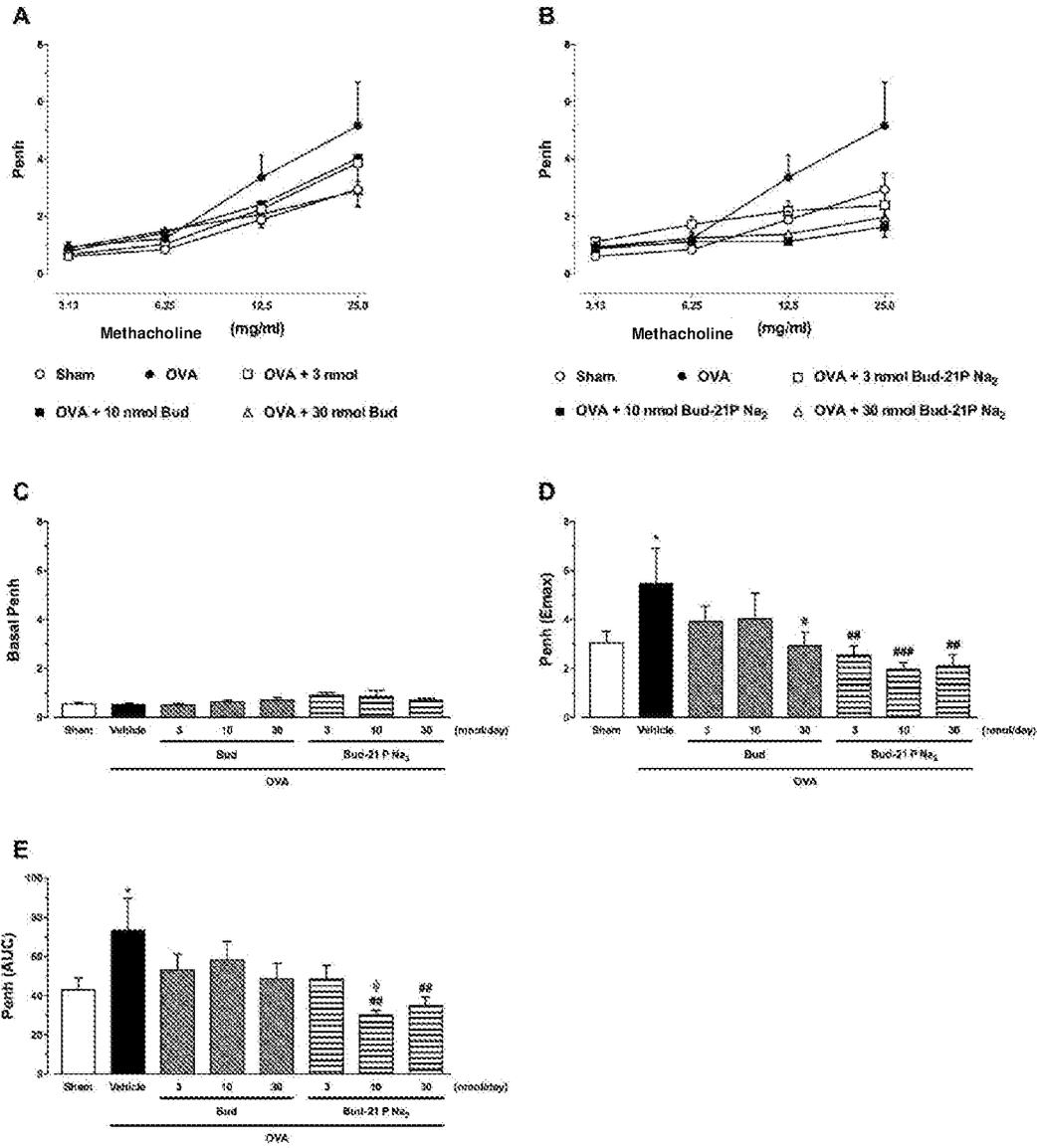


Figure 5

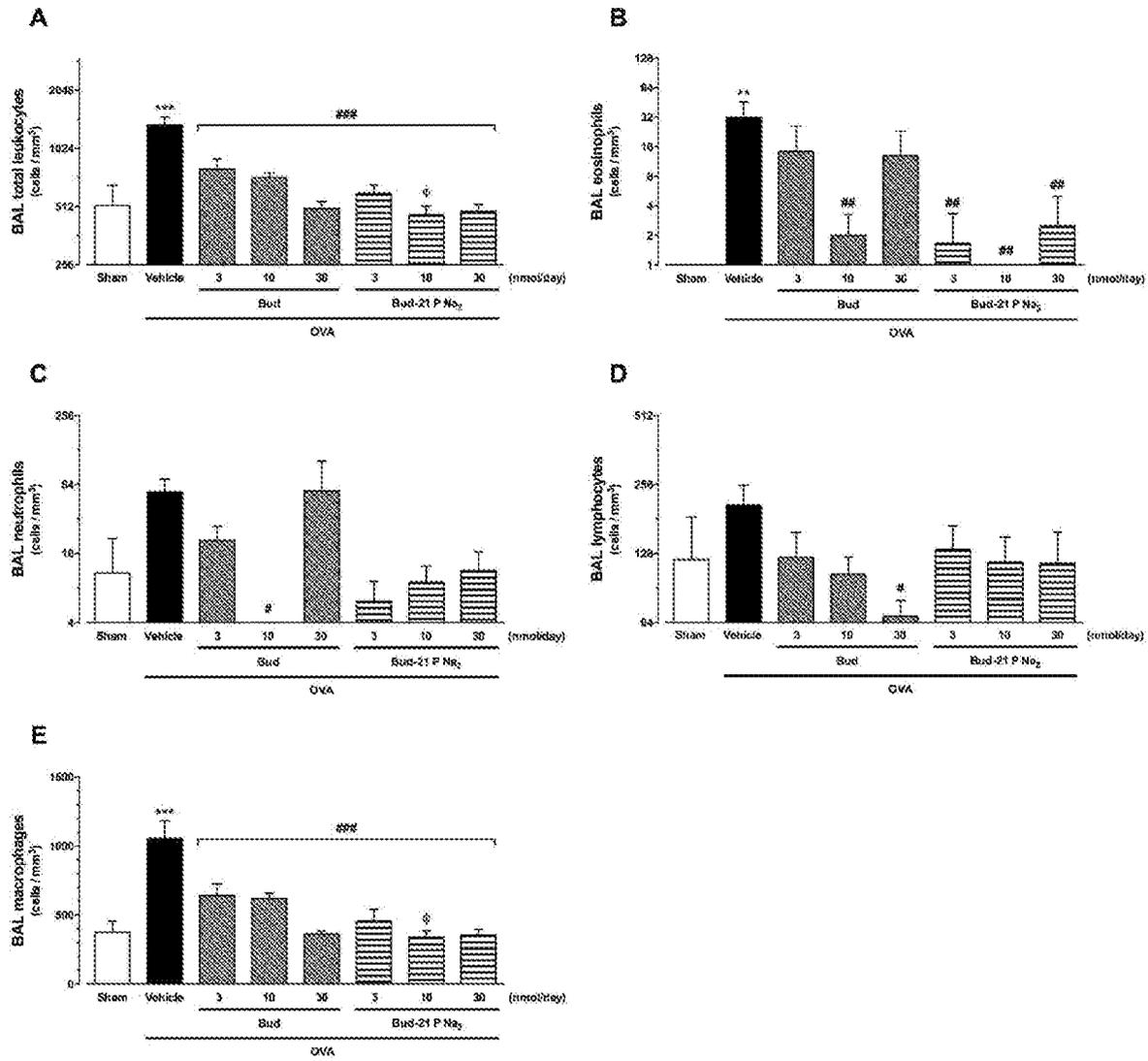
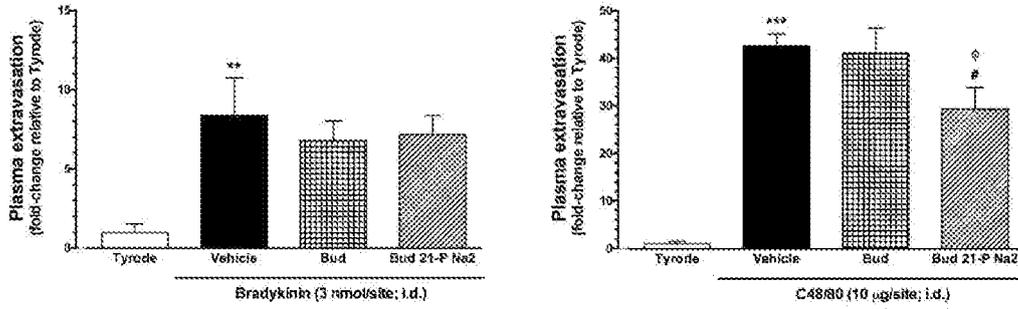


Figure 6

A.



B.

