



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 639**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07846967 .3**  
96 Fecha de presentación : **03.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2101778**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **Ectoína para el tratamiento de fugas vasculares.**

30 Prioridad: **01.12.2006 DE 10 2006 056 766**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.10.2011**

73 Titular/es: **BITOP AKTIENGESELLSCHAFT FÜR  
BIOTECHNISCHE OPTIMIERUNG  
Stockumer Strasse 28  
58453 Witten, DE**

72 Inventor/es: **Schwarz, Thomas y  
Lentzen, Georg**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 365 639 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

Ectoína para el tratamiento de fugas vasculares

- 5 La invención se refiere a ectoínas para el tratamiento profiláctico o terapéutico de trastornos de la función endotelial, concretamente fugas vasculares.

10 Compuestos químicos orgánicos de bajo peso molecular aislados a partir de organismos extremófilos tienen una influencia extraordinaria sobre la estabilidad térmica, química y física de compuestos orgánicos complejos y estructuras celulares complejas. Tales compuestos orgánicos se denominan osmolitos o solutos compatibles y se han introducido entretanto en numerosas preparaciones cosméticas.

15 A los solutos compatibles pertenecen azúcares, compuestos de azufre, polioles, aminoácidos y derivados de aminoácidos, así como derivados de tetrahidropirimidina, tales como ectoína e hidroxiectoína. Se sintetizan a partir de microorganismos extremófilos en condiciones de estrés y sirven para la estabilidad de las estructuras celulares de estos microorganismos en condiciones térmicas, químicas y físicas extremas. Un ejemplo de ello son los microorganismos halófilos, que deben adaptarse al contenido en sal variable en el entorno salino y sobrevivir en el mismo.

20 Ejemplos de solutos compatibles que pueden utilizarse en la práctica son, por ejemplo, ectoína e hidroxiectoína.

25 El documento EP-A-0 553 884 describe derivados de tetrahidropirimidina purificados y composiciones farmacéuticas que contienen estos derivados. Son adecuados para proteger al ADN frente a daños por principios activos que se unen al ADN, carcinógenos, mutágenos y radiación.

Además, de la ectoína y sus derivados se conoce el efecto estabilizador sobre estructuras de proteínas y ácidos nucleicos, que puede llevar a la estabilización de material biológico y preparaciones farmacológicas.

30 Según el documento WO-00/076528, la ectoína e hidroxiectoína son adecuadas para aumentar la eficacia de los principios activos que contienen proteínas. En este sentido los principios activos que contienen proteínas son anticuerpos e inmunotoxinas. Se menciona la inmunotoxina anti-CD30 Ki-4.dgA.

35 Según el documento WO 00/076528 la sustancia que contiene proteínas es el verdadero principio activo. Se recurre a ectoínas o solutos compatibles únicamente para aumentar la efectividad, es decir como adyuvantes puros. En este sentido, el uso ha de entenderse también para la reducción de actividades citotóxicas, en particular del síndrome de fuga vascular (VLS, *vascular leak syndrome*). En el caso del síndrome de fuga vascular, una lesión en células endoteliales conduce, entre otras cosas, a una pérdida de albúmina en el espacio intracelular, lo que conduce a una acumulación creciente de fluido intrastical y a la formación sobre todo de edemas, hipotensión y taquicardias.

40 El síndrome de fuga vascular aparece con frecuencia en relación con la liberación de inmunotoxinas en condiciones de estrés, por ejemplo en el caso de choque septicémico y septicemia graves, pero también en relación con la conexión de lactantes y niños pequeños a máquinas de corazón-pulmón artificial, en el caso de quemaduras y del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*).

45 La interleucina-2 es una citocina importante que se utiliza terapéuticamente por ejemplo en determinadas formas de cáncer. No obstante, la utilización de este medicamento altamente eficaz está fuertemente limitada debido a los efectos secundarios tóxicos que aparecen. En este caso ha de mencionarse el síndrome de fuga vascular, que también aparece en caso de otras inmunotoxinas. Como desencadenante del síndrome de fuga vascular actúa por ejemplo también el fuerte tóxico vegetal ricina.

50 El síndrome de fuga vascular, con frecuencia designado también como *capillary leak syndrome* o síndrome de fuga capilar, puede aparecer también en el caso de procedimientos quirúrgicos graves, por ejemplo tras trasplantes de médula ósea, operaciones de derivación cardiopulmonar y linfocitosis hemofagocítica. Edemas pulmonares, tales como los que aparecen por ejemplo en el caso de lesión pulmonar aguda y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), pueden ir acompañados asimismo de una fuga vascular masiva.

60 Síntomas individuales típicos del VLS son por ejemplo hiperbaria, hipoalbuminemia, edema pulmonar, edema generalizado así como la verdadera fuga vascular. Síntomas similares se presentan en el caso de choque septicémico, SIRS, fiebres hemorrágicas, por ejemplo la fiebre del Dengue, fiebre por virus ARBO, en el caso de infecciones por virus del ébola y de Marburgo así como también otras enfermedades febriles tropicales.

65 Causas del SIRS pueden ser heridas, quemaduras, hemorragias graves, isquemia, anafilaxis o también una pancreatitis hemorrágica necrosante. A este respecto, además de una fuga vascular aparecen temperaturas corporales fuertemente reducidas o elevadas, frecuencia cardíaca elevada, taquipnea, dado el caso con una anoxia y un recuento leucocitario reducido o elevado. Se trata de un cuadro clínico que se asemeja a una septicemia, sin

que pueda detectarse una infección.

En el caso de todos los síntomas y evoluciones de la enfermedad descritos se trata de una alteración de la barrera de células endoteliales, que separa entre sí los correspondientes compartimentos del organismo. Si esta barrera se altera por una noxa exógena o endógena, pueden escapar fluido y biomoléculas del sistema vascular hacia el tejido circundante, se llega a los síntomas descritos y los cuadros clínicos resultantes.

Los mecanismos que conducen al aumento de permeabilidad de las células endoteliales, dependen de un mediador. De este modo, por ejemplo, el aumento de la permeabilidad de células endoteliales relacionadas con Il-2 se debe a la inducción de la apoptosis de las células endoteliales. El lipopolisacárido (LPS), un componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas, media el aumento de permeabilidad de células endoteliales mediante la modulación de proteínas asociadas a uniones tight/gap, pero también mediante la inducción de una apoptosis de células endoteliales. Por el contrario, la histamina, un mediador muy temprano de la inflamación sistémica, está relacionado con un aumento de la permeabilidad de células endoteliales principalmente mediante la modulación de proteínas de uniones tight/gap.

En particular, la hidroxiectoína estabiliza la barrera endotelial mediante la estabilización de los componentes de membrana. Mediante la "exclusión preferencial" se expulsa hidroxiectoína de la envuelta de hidratos de los distintos componentes de membrana y conduce por consiguiente a una compactación de las proteínas y otros componentes de membrana (lípidos, etc.). Éstos son ahora escasamente alcanzables para las noxas (nivel de receptor, por ejemplo receptor de Il-2) y las rutas de señalización secundarias se activan menos intensamente, puede evitarse una inducción de la apoptosis.

Esta compactación estabiliza también los componentes de membrana (complejos de proteína) que forman las uniones tight (la unión entre las células endoteliales). Éstos pueden verse menos influidos por la histamina o LPS que aparece en el sistema vascular, con lo cual se mantiene más fuertemente la unión entre las células. Por consiguiente, en caso de carga de LPS/histamina también se estabilizan la barrera de células endoteliales.

De manera correspondiente, las ectoínas son adecuadas tanto para la protección frente a, como para el tratamiento de una vasculitis y en particular de alteraciones de la función endotelial o disfunciones endoteliales, denominadas la mayoría de las veces en lo sucesivo fuga vascular o VLS. Además se obtiene también una eficacia en el caso de una alteración funcional de la acción de barrera de las células epiteliales.

Se encontró que la ectoínas, concretamente la propia ectoína y la hidroxiectoína, como únicos principios activos pueden contrarrestar las fugas vasculares. Estas sustancias son adecuadas también para la profilaxis y el tratamiento del VLS.

De manera correspondiente, la invención se refiere a un agente para la profilaxis y la inhibición o el tratamiento de fugas vasculares. En el mismo se utilizan ectoínas en particular como únicos principios activos.

Ectoínas en el sentido de la invención son ácidos (4S)-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílicos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La tetrahidropirimidina puede estar sustituida en la posición 5 con un grupo hidroxilo, en particular con un grupo (5S)-hidroxilo. Todas las formas de fugas vasculares se entienden tal como se han expuesto anteriormente en relación con las enfermedades y las manifestaciones clínicas descritas en detalle. Se entiende que en las manifestaciones clínicas no tiene que presentarse el cuadro clínico completo; también puede recurrirse al agente según la invención para la profilaxis o el tratamiento de síntomas individuales, que están relacionados con trastornos de la función endotelial.

Ectoínas reivindicadas son la propia ectoína, ácido (4S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico, y la hidroxiectoína, ácido (4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico.

Según la invención pueden utilizarse varias ectoínas. En el agente según la invención la ectoína puede combinarse, naturalmente, con adyuvantes y excipientes habituales. Puede presentarse como comprimido, cápsula o como disolución para administración oral o parenteral, preferiblemente en forma de una disolución acuosa para inyección. Puede administrarse en dosis de desde 10 hasta 10000 mg, preferiblemente de 20 a 1000 mg y en particular de 50 a 500 mg.

Las ectoínas que se utilizan según la invención, ectoína e hidroxiectoína, pueden combinarse entre sí.

El agente según la invención afecta a cualquier forma del síndrome de fuga vascular en cuyas circunstancias siempre se desencadena. Afecta en particular a las formas de fugas vasculares desencadenadas por toxinas y medicamentos, por ejemplo las formas desencadenadas por la administración de interleucina-2. En cambio, las ectoínas son también adecuadas para contrarrestar el efecto de tóxicos vegetales, tales como ricina, siempre que éstos desencadenen el VLS. Un campo de aplicación adicional es la profilaxis postoperatoria para la prevención de

un síndrome de fuga vascular, por ejemplo en el caso de las indicaciones indicadas al principio, y la profilaxis y el tratamiento del VLS en particular en lactantes y niños pequeños que se tratan con máquinas de corazón-pulmón artificial, así como en caso de hipoxia.

5 Las ectoínas en el sentido de la invención pueden utilizarse en el caso del síndrome del ácido retinoico. En el caso del tratamiento de leucemia promielocítica aguda con ácido retinoico todo trans (terapia ATRA) se producen efectos secundarios en parte muy graves, que manifiestan una serie de síntomas tales como fiebre, aumento de peso, infiltrados pulmonares intersticiales (VLS), derrame pleural y pericárdico, hipertensión arterial episódica e insuficiencia renal aguda, véase R.S. Larson y M.S. Talman, Best Pract. Res. Clin. Haematol. septiembre de 2003; 10 16(3):453-61.

Un campo de aplicación adicional es el síndrome de fuga capilar en el caso de la terapia con acitretina de psoriasis o en el caso de la aparición del síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) en la psoriasis. El tratamiento de la psoriasis con ácido retinoico puede en raros casos desencadenar el VLS con consecuencias potencialmente mortales, véase M.H. Vermeer y S. Pavel, J Am. Acad. Dermatol. 20 de octubre de 2006.

Como complicación en el caso de psoriasis pustulosa y eritrodérmica, ocasionalmente se produce síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), que puede atribuirse al síndrome de fuga capilar en el pulmón, J.S. Sadeh *et al.*, Arch. Dermatol. junio de 1997, 133(6): 747-50.

20 Se supone que el efecto protector de las ectoínas se desarrolla a través de una estabilización de las células endoteliales, es decir los principios activos contrarrestan una vasculitis relacionada con la enfermedad o el tratamiento. Existen indicaciones de que las ectoínas actúan sobre las membranas celulares y ejercen un efecto positivo sobre manifestaciones inflamatorias.

25 Los efectos de las ectoínas alegados en el presente documento se explican en detalle mediante los siguientes ejemplos.

#### 30 Ejemplo 1

Ensayos *In vitro* para la inhibición del VLS inducido por interleucina-2

Se sometió a ensayo la inhibición del VLS provocado por Il-2 mediante ectoína e hidroxiectoína en un sistema *in vitro* con células endoteliales humanas (células HUVEC). Para ello se determinaron las concentraciones de Proleukin® (empresa Chiron), que conducen a la contracción de las células HUVEC. La contracción de las células HUVEC sirve como indicio del desencadenamiento del VLS, véase Baluna *et al.*, PNAS 3957-3962, marzo de 1999. Este fenotipo observable en el microscopio óptico se basa, al igual que el VLS, en la unión de proteínas de membrana, las integrinas.

40 Se incubaron las células con Proleukin solo o en combinación con ectoína e hidroxiectoína. Como controles para la especificidad de los solutos compatibles se utilizaron adicionalmente trehalosa y glucosa.

Tras de 4 a 6 días se determinó mediante el microscopio el porcentaje de células normales y contraídas de un campo visual. Los resultados se resumen en la figura 1.

45 La figura 1 muestra la inhibición en porcentaje del VLS por medio de células HUVEC tras la administración de Proleukin 2 mM solo o en combinación con hidroxiectoína 20 mM (OH-Ect.), ectoína (Ect.), trehalosa (treha) y glucosa (gluc).

50 Tanto la hidroxiectoína como la ectoína pueden reducir claramente el fenotipo de VLS. Asimismo se muestra un efecto protector, que no está totalmente claro, con glucosa, pero no con trehalosa.

#### Ejemplo 2

55 Efectos de la hidroxiectoína sobre la síntesis de interferón- $\gamma$  inducida por Proleukin de linfocitos humanos.

La interleucina-2, Il-2, conduce al igual que Proleukin a una activación de células inmunoefectoras, que puede medirse, entre otras cosas, en un aumento de secreción de interferón- $\gamma$  de las células NK y linfocitos T.

60 Para ello se aislaron células NK y células T de un donante sano por medio de la técnica MACS (*magnetic cell sorting*, Milteniy). La detección de las células, que expresan los marcadores de superficie CE 56, NKG2D y CD 3, tuvo lugar en análisis de FACS.

65 Se incubaron las células sin aditivos adicionales, con 250 U de Proleukin o con 250 U de Proleukin en combinación con hidroxiectoína 20 mM durante 48 horas. A continuación se determinó la concentración de interferón Y en el sobrenadante de las células por medio de ELISA (determinaciones por triplicado de dos experimentos

independientes). Los resultados muestran que la hidroxiectoína no inhibe la inducción de la síntesis de interferón- $\gamma$ , al contrario, se muestran valores ligeramente elevados (véase la figura 2).

5 Los datos *in vitro* muestran que los solutos compatibles sometidos a prueba provocan una disminución del fenotipo de VLS inducido por Proleukin de las células HUVEC, no estado esto relacionado con una disminución de la actividad en relación con la inducción de interferón de células efectoras humanas primarias.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Agente para su uso para el tratamiento profiláctico o terapéutico de fugas vasculares, caracterizado porque contiene ectoína y/o hidroxiectoína y/o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas como único principio activo/únicos principios activos.
- 10 2. Agente para su uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de una vasculitis y en particular VLS, SIRS, ARDS (síndrome de fuga vascular, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de dificultad respiratoria aguda).
- 15 3. Agente para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, para la profilaxis o el tratamiento de formas de fugas vasculares desencadenadas por toxinas o medicamentos.
4. Agente para su uso según la reivindicación 3, para la inhibición del VLS inducido por interleucina-2.
5. Agente para su uso según la reivindicación 1 ó 2, para el tratamiento del VLS desencadenado por fiebres hemorrágicas.
- 20 6. Agente para su uso según una de las reivindicaciones anteriores, para la administración oral o parenteral a un paciente.
7. Agente para su uso según la reivindicación 6, en forma de una disolución acuosa para inyección.
- 25 8. Agente para su uso según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado porque contiene ectoína y/o hidroxiectoína y/o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas en una cantidad de desde 10 hasta 10000 mg, preferiblemente de 20 a 1000 mg y de manera especialmente preferible de 50 a 500 mg.

Figura 1



Figura 2

