

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 990**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/55** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61P 17/16** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2003 E 03744970 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1494698**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para tratar y prevenir la necrosis**

30 Prioridad:

**26.03.2002 IL 14892402**

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

**21.02.2014**

73 Titular/es:

**NATHAN, ILANA (HELENA) (100.0%)  
SIRPAD ST. 5  
84965 OMER, IL**

72 Inventor/es:

**NATHAN, ILANA y  
LICHTENSTEIN, ALEXANDRA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 443 990 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**

Composiciones y procedimientos para tratar y prevenir la necrosis

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a composiciones para usar en un procedimiento para tratar y prevenir la necrosis celular. Más específicamente, las composiciones para dicho uso previenen o tratan la necrosis mediante la inhibición de la actividad de la elastasa intracelular que actúa en células que sufren necrosis.

10

**Antecedentes de la invención**

[0002] La elastasa es una serina proteasa que cataliza la degradación de proteínas, incluyendo la elastina, una proteína estructural principal del tejido conjuntivo de mamíferos. La técnica ha sugerido que la inhibición de la elastasa puede ser eficaz en el tratamiento de diferentes afecciones y enfermedades.

15

[0003] Por ejemplo, el documento US 4.683.241 indica que se cree que la elastasa tiene una función importante en la etiología de enfermedades inflamatorias del tejido conjuntivo. Esta patente describe una clase de ésteres fenólicos que presentan acción inhibitoria de la elastasa.

20

[0004] El documento US 5.216.022 describe el uso de ésteres aromáticos de dialcanoatos de fenileno como inhibidores de la elastasa neutrófila humana (conocida también como elastasa leucocitaria), para el tratamiento de numerosas afecciones mediadas por la elastasa neutrófila.

25

[0005] J.B. Herbert y col., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 260, no. 2 (1992), pág. 808-816 describe las actividades bioquímicas y farmacológicas de SR 26831 como un inhibidor de elastasa patente y selectivo de lesión pulmonar aguda y crónica mediada por elastasa leucocitaria.

30

[0006] El documento US 6.159.938 indica que la inhibición de la elastasa vascular endógena puede ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad vascular pulmonar y otras afecciones relacionadas.

[0007] La necrosis es el procedimiento relativamente incontrolado de muerte celular después de perturbación del entorno celular, que da como resultado la rotura celular. La necrosis se puede tratar usando oxígeno a alta presión.

35

**Resumen de la invención**

[0008] La presente invención se dirige a la reivindicación 1.

40

[0009] Los autores de la invención han encontrado de forma inesperada que la elastasa intracelular está implicada en la muerte celular necrótica, y que la inhibición de dicha enzima dentro de las células afectadas puede servir como una herramienta eficaz para tratar y/o prevenir la necrosis celular y enfermedades asociadas con la misma.

45

[0010] En el presente documento se describe un procedimiento para tratar y prevenir la necrosis de células y enfermedades asociadas con la misma, que comprende inhibir la actividad enzimática de una o más enzimas elastasa dentro de dichas células.

50

[0011] El procedimiento mencionado antes comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes inhibidores de elastasa, en el que dichos agentes inhiben la actividad enzimática de la elastasa intracelular en las células que se van a tratar.

55

[0012] Los autores de la invención también han encontrado sorprendentemente que la inhibición de la elastasa dentro de las células afectadas puede desplazar la necrosis celular, al menos parcialmente, a muerte celular apoptótica. Por lo tanto, se describe un procedimiento para tratar y prevenir la necrosis celular y enfermedades asociadas con la misma, que comprende:

inhibir la actividad enzimática de la elastasa dentro de dichas células; e

60

inhibir la muerte celular apoptótica.

[0013] La presente invención también se dirige a la reivindicación 4. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas mencionadas antes comprenden uno o más inhibidores de elastasa que son capaces de entrar en las células que se van a tratar, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

65

**[0014]** De acuerdo con una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas mencionadas antes comprenden además uno o más inhibidores de apoptosis.

**[0015]** También se describe en el presente documento el uso de uno o más inhibidores de elastasa junto con uno o más inhibidores de apoptosis en la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir la necrosis de células y enfermedades asociadas con la misma, en el que dichos inhibidores de elastasa son capaces de entrar en dichas células.

**[0016]** Los inhibidores de la actividad de elastasa usados de acuerdo con la invención para tratar y prevenir la necrosis celular y enfermedades asociadas con la misma, son capaces de entrar en las células diana, de modo que dichos inhibidores ejercen sus acciones inhibitorias dentro de dichas células.

**[0017]** Preferiblemente, la necrosis se puede tratar o prevenir de acuerdo con la presente invención, en células seleccionadas del grupo que consiste en células neuronales, células de Purkinje, células piramidales del hipocampo, células gliales, células de origen hematopoyético (tales como linfocitos y macrófagos), hepatocitos, timocitos, fibroblastos, células del miocardio, células epiteliales, células epiteliales bronquiales, glomérulos, células epiteliales pulmonares, queratinocitos, células gastrointestinales, células epidérmicas, células óseas y de cartílagos.

**[0018]** Preferiblemente, las enfermedades asociadas con la necrosis celular, que se pueden tratar y/o prevenir de acuerdo con la presente invención, se seleccionan del grupo que consiste en leucemias, linfomas, asfixia, hernia encarcelada, diabetes mellitus, tuberculosis, endometriosis, distrofia vascular, lesión por frío, complicaciones por carga de hierro, complicaciones del tratamiento con esteroides, daño cerebrovascular, gangrena, úlceras de decúbito, hepatitis, hemoglobinuria, septicemia viral, quemaduras, hipertermia, enfermedad celíaca, síndrome compartimental, procolitis necrotizante, lesión de la médula espinal, distrofia muscular, tirosemia, enfermedad metabólica hereditaria, enfermedad de micoplasma, infección por ántrax, infecciones virales, enfermedad de Anderson, enfermedad mitocondrial congénita, fenilcetonuria, infarto placentario, sífilis, necrosis aséptica, necrosis avascular, alcoholismo y necrosis asociada con la administración y/o autoadministración de, y/o exposición a, cocaína, fármacos (por ejemplo, paracetamol, antibióticos, adriamicina, AINE, ciclosporina), toxinas químicas tales como tetracloruro de carbono, cianuro, metanol, etilenglicol y gas mostaza, productos agroquímicos tales como organofosfatos y paraquat, metales pesados (plomo, mercurio), otros organofosfatos de guerra.

#### **Breve descripción de los dibujos**

##### **[0019]**

La figura 1 representa gráficamente el porcentaje de células necróticas y apoptóticas observadas después de tratamiento con y sin oligomicina y anticuerpo dirigido contra Fas.

La figura 2 es una representación fotográfica de los resultados de la electroforesis en gel en sustrato de gelatina para los lisatos de células U-937 tratadas/no tratadas con oligomicina y/o anticuerpo dirigido contra Fas durante 3 h.

La figura 3 es una representación fotográfica de los resultados de la electroforesis en gel en sustrato de gelatina obtenidos para los lisatos de células U-937 tratadas/no tratadas con KCN 0,5 mM durante 3 h.

La figura 4 es una representación fotográfica de un gel electroforético en sustrato de gelatina, que demuestra que el tratamiento de un lisato celular con KCN producía la aparición de una banda de actividad de proteasa (hilera B). Esta banda desaparecía cuando se administraba KCN en presencia de inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M (hilera C).

La figura 5 presenta resultados que demuestran el efecto del inhibidor de elastasa III en la necrosis inducida por KCN en células PC-12. El panel A representa en un diagrama la proporción de células vivas, necróticas y apoptóticas después de diferentes tratamientos. Los valores numéricos para estas proporciones se dan en la tabla que acompaña. El panel B representa en una gráfica el porcentaje de supervivencia de células PC-12 después de tratamiento con KCN en presencia/ausencia de inhibidor de elastasa III.

La figura 6 representa en un diagrama la proporción de células U-937 vivas, necróticas y apoptóticas después de tratamiento con KCN en presencia/ausencia de inhibidor de elastasa III. Los valores numéricos para estas proporciones se dan en la tabla que acompaña.

La figura 7 ilustra gráficamente los efectos del inhibidor de elastasa III (panel B) y elastinal (panel C) en la apoptosis/necrosis inducida por Fas en células U-397.

La figura 8 ilustra gráficamente el porcentaje de células PC-12 necróticas y apoptóticas detectadas después de tratamiento con/sin oligomicina y/o STS.

La figura 9 demuestra el efecto de un inhibidor de elastasa en la apoptosis inducida por STS en células PC-12.

La figura 10 ilustra gráficamente el efecto de un inhibidor de elastasa en la necrosis inducida por STS en células PC-12.

La figura 11 demuestra el efecto de un inhibidor de elastasa en la necrosis inducida por KCN en células PC-12.

La figura 12 ilustra gráficamente el efecto de un inhibidor de elastasa en necrosis inducida por STS en células U-937.

#### Descripción detallada de realizaciones preferidas

**[0020]** El término "necrosis", como se usa en el presente documento, abarca estados de necrosis celular, así como estados intermedios, que presentan características necróticas y apoptóticas. El término "elastasa", como se usa en el presente documento, se refiere a una o más formas de dicha enzima.

**[0021]** Los compuestos que presentan perfil inhibidor de elastasa, que se denominan en el presente documento agentes inhibidores de elastasa, o inhibidores de elastasa, son conocidos en la materia, y los describen, por ejemplo, Stein y col. [*Biochemistry* 25, pág. 5414 (1986)], Powers y col. [*Biochim. Biophys. Acta.* 485, pág. 156 (1977)], documentos US 4.683.241, US 5.216.022, y US 6.159.938. Los inhibidores de elastasa también están disponibles en el comercio, p. ej. en Sigma-Aldrich o Calbiochem-Novabiochem Corporation.

**[0022]** Los inhibidores de elastasa usados de acuerdo con la presente invención se formulan junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que son cargas sólidas, semisólidas o líquidas, inertes, no tóxicas, diluyente, material de encapsulación o agentes auxiliares de formulación de cualquier tipo. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a sujetos humanos y otros mamíferos por cualquier vía aceptable, y preferiblemente por vía oral, parenteral o tópica.

**[0023]** Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cargas o aditivos tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa y manitol, aglutinantes tales como carboximetilcelulosa y gelatina, humectantes tales como glicerol, agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico y almidón de patata, absorbentes y lubricantes. Las formas farmacéuticas sólidas se pueden preparar con recubrimientos y lacas de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia.

**[0024]** Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen disoluciones, emulsiones, suspensiones y jarabes farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, la forma farmacéutica líquida puede contener diluyentes inertes usados habitualmente en la materia, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, propilenglicol y aceites. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, agentes aromatizantes y de perfume.

**[0025]** Las preparaciones inyectables adecuadas para la administración parenteral se proporcionan en forma de disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, estériles, farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstituir en disoluciones o dispersiones estériles inyectables antes de usar. Los ejemplos de excipientes o vehículos acuosos o no acuosos adecuados incluyen agua, disolución de Ringer y disolución isotónica de cloruro sódico. También se pueden usar aceites estériles como medio de suspensión adecuado. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en las mismas.

**[0026]** Las formas farmacéuticas para administración tópica o transmucosa de inhibidores de elastasa de acuerdo con la invención incluyen pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones y pulverizadores. Además del principio activo, las pastas, cremas y geles pueden contener excipientes tales como grasas, aceites, ceras, parafinas, almidón, derivados de celulosa, polietilenglicoles, talco, óxido de cinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y pulverizadores pueden contener excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos cálcicos y mezclas de los mismos.

**[0027]** También se describen en el presente documento el uso médico o farmacéutico de composiciones tópicas y transmucosa que contienen inhibidores de elastasa (y opcionalmente agentes antiapoptóticos).

**[0028]** Se pueden preparar otras formulaciones adecuadas encapsulando el principio activo en vesículas de lípidos o matrices poliméricas biodegradables, o uniendo dicho principio activo a anticuerpos monoclonales. Los procedimientos para formar liposomas son conocidos en la materia.

**[0029]** Los niveles de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar para

así obtener una cantidad del inhibidor de elastasa que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular (es decir, una cantidad terapéuticamente eficaz). La forma farmacéutica seleccionada dependerá de la actividad del inhibidor de elastasa particular, la vía de administración, la gravedad de la afección que se está tratando y otros factores asociados con el paciente que se está tratando. Los regímenes de dosis típicos están en el intervalo de 0,1-200 mg/kg.

**[0030]** También se describe en el presente documento el tratamiento o prevención de la necrosis celular mediante la inhibición de la actividad enzimática de elastasa(s) intracelular(es), y además, la inhibición de la muerte celular apoptótica. Preferiblemente, la inhibición de la muerte celular apoptótica se realiza mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiapoptótico, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en [R]-N-[2-heptil]-metilpropargilamina (R-2HMP), vitamina E, vitamina D, inhibidores de caspasa y la sal biliar hidrófila del ácido ursodesoxicólico. También se pueden usar otros procedimientos conocidos en la materia para inhibir la apoptosis, por ejemplo, mediante la regulación de la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas, de acuerdo con la presente invención. Dichos procedimientos los describen, por ejemplo Li y col. [*Acta. Anaesthesiol Sin*, 38(4), p. 207-215 (2000)].

## Ejemplos

### Protocolo experimental

#### 1. Modelos de necrosis in vitro

##### Necrosis inducida por estaurosporina y anticuerpo dirigido contra Fas

**[0031]** Se sembraron células U-937 promonocíticas humanas en fase logarítmica en una concentración de  $4 \times 10^5$ /ml. Después las células se lavaron dos veces y se volvieron a sembrar en medio RPMI-1640 exento de glucosa (Beit Haemek, Israel) complementado con piruvato 2 mM (Beit Haemek, Israel) y FCS dializado al 10% (Gibco, BRL) durante 1 h.

**[0032]** La línea celular PC-12 de feocromocitoma de rata se propagó en medio DMEM (Gibco, BRL), complementado con suero de ternero inactivado por calor al 5%, suero de caballo inactivado por calor al 10%, y L-glutamina 2 mM. Se sembraron células PC-12 en fase logarítmica en una concentración de  $1,2 \times 10^5$ /pocillo en placas de 24 pocillos (Cellstar). Después, las células se lavaron dos veces y se mantuvieron en medio RPMI-1640 exento de glucosa (Beit Haemek, Israel) y complementado con piruvato 2 mM y FCS dializado al 10% durante 1 h. Las células U-937 y PC-12 se incubaron con y sin oligomicina 1  $\mu$ M (Sigma) durante 45 min, y las células se trataron con o sin estaurosporina (STS) 1,25  $\mu$ M (Sigma) durante 7 h adicionales en células U-937 o 5 h en células PC-12. Alternativamente, las células se trataron con o sin anticuerpo dirigido contra Fas 100 ng/ml (Upstate biotechnology, EE.UU.) durante el mismo periodo de tiempo.

##### Necrosis inducida por KCN

**[0033]** Células U-937 y PC-12 cultivadas en medio RPMI-1640 completo se lavaron y sembraron en medio RPMI-1640 exento de glucosa, como se ha descrito antes, y se trataron con o sin KCN 0,5 mM (Merck, Alemania) durante 7 h con células U-937 o 5 h con células PC-12.

##### 2. Ensayo del inhibidor de elastasa

**[0034]** Cuando se añadió inhibidor de elastasa III 200  $\mu$ M (MeOSuc-Ala-AlaPro-Val-CMK de Calbiochem) se administró 30 min antes de la adición de los inductores. El inhibidor se disolvió en DMSO en una concentración 100 mM. La concentración final de DMSO en el sistema era 0,2%, y se añadió a todos los tratamientos. En experimentos separados, se administró un inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M (CE1037, fabricado por Cortech Inc.) 30 min antes de la adición de los inductores. El inhibidor se disolvió en PBS.

##### 3. Ensayo de muerte celular

##### Exclusión con tinta azul de tripán

**[0035]** En cada punto de medición, se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con tinta azul de tripán (Daniel CP, Parreira A., y col. *Leukemia Res.* 11:191-196 (1987)). Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

##### Cuantificación morfológica de la apoptosis y necrosis

**[0036]** Se controlaron las células que sufrían cambios morfológicos asociados con la muerte celular apoptótica o necrótica, como describen McGahon y col. [*Methods Cell Biol.*, 46: p. 153-85 (1995)]. Brevemente, se recogieron y

centrifugaron 1 ml de células. El sedimento se volvió a suspender en una dilución de 20 veces de la mezcla de colorante (compuesta de naranja de acridina 100 µg/ml y bromuro de etidio 100 µg/ml en PBS), se puso en un portaobjetos de vidrio y se observó en un microscopio invertido de fluorescencia. Se puntuaron un mínimo de 200 células para cada muestra.

5

#### Preparación de lisatos celulares

**[0037]** Se recogieron  $4 \times 10^7$  células U-937, tratadas o sin tratar con diferentes inductores, después de 3 h de incubación, se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo y se volvieron a suspender  $10^8$ /ml en tampón de lisis enfriado con hielo (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NP-40 al 0,1 %, DTT 1 mM, leupeptina 100 µM y TLCK 100 µM). Las células se rompieron usando un dispositivo Polytron (4 ciclos de 7 segundos cada uno) en hielo, y el residuo se sedimentó por centrifugación en una ultracentrífuga a 120.000 x g durante 30 min a 4°C. El líquido sobrenadante se usó para estudios posteriores o se almacenó a -70°C. El contenido de proteína de cada muestra se determinó por el ensayo de proteínas (BioRad).

10

15

#### 5. Electroforesis

**[0038]** La electroforesis en un gel de sustrato de gelatina se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Distefano J. F., Cotto C. A., y col. *Cancer Invest.* 6, 487-498, (1988)). Las proteasas se inactivaron de forma reversible por adición de partes alícuotas de 100 µl de los lisatos celulares que contenían 200 µg de proteína en 50 µl de tampón de Tris-HCl 0,625 M, pH 6,8, con SDS al 2,5 %, sacarosa al 10 % y rojo fenol al 0,03 %. Después las muestras se sometieron a electroforesis usando gelatina al 0,1 % copolimerizada en gel de poliacrilamida al 11 %. Después de electroforesis, los geles se sometieron a 3 inmersiones repetidas en tampón de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, que contenía Triton-x-100 al 2,5% (V/V) con el fin de eliminar el SDS y reactivar las proteasas. Los geles se cortaron en rebanadas y se incubaron durante la noche a 37 °C en tampón de glicina-NaOH 0,1 M, pH 7,0, con o sin TPCK 100 µM (inhibidor de serina proteasa similar a quimotripsina) y elastinal 100 µM (inhibidor de serina proteasa similar a elastasa). Las bandas de la actividad de proteasa se revelaron con tinción con negro amido.

20

25

#### **Resultados**

30

##### 1. Apoptosis/necrosis inducida por anticuerpo dirigido contra Fas en células U-937

**[0039]** La figura 1 indica que el tratamiento con anticuerpo dirigido contra Fas inducía aproximadamente 60% de apoptosis comparado con el control. La oligomicina es inactiva por sí misma, sin embargo, la adición de anticuerpo dirigido contra Fas 100 ng/ml a la oligomicina cambió la muerte celular apoptótica a muerte celular necrótica. En estas condiciones, se produjo aproximadamente 70% de necrosis y la apoptosis volvió al nivel del control. Se determinó la morfología nuclear y se analizó por microscopio de fluorescencia después de doble tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.

35

40

##### 2. Inducción de actividad similar a elastasa durante la muerte celular necrótica inducida por anticuerpo dirigido contra Fas en presencia de oligomicina

**[0040]** Se mantuvieron células U-937 en medio exento de glucosa preincubado con o sin oligomicina 1 µM durante 45 min y se trataron con o sin anticuerpo dirigido contra Fas 100 ng/ml durante 3 h. Después de esto, los lisatos celulares se prepararon como se describe en "Protocolo experimental" y se aplicaron a una electroforesis en gel en sustrato de gelatina. Los resultados que se presentan en la figura 2, indican que el tratamiento con anticuerpo dirigido contra Fas y oligomicina producía la aparición de una banda de actividad de proteasa (hilera D), que no se encontraba en las células de control no tratadas (hilera A), las células tratadas con anticuerpo dirigido contra Fas (hilera B) o las células tratadas con oligomicina (hilera C). Esta banda desaparecía en presencia de elastinal 100 µM (hilera D), pero no en presencia de TPCK 100 µM (hilera D), indicando que el tratamiento con anticuerpo dirigido contra Fas y oligomicina inducía una actividad similar a elastasa, pero no una actividad similar a quimotripsina.

45

50

##### 3. Inducción de actividad similar a elastasa durante la muerte celular necrótica inducida por KCN

**[0041]** Células U-937 se trataron con o sin KCN 0,5 mM durante 3 h y después los lisatos celulares se prepararon como se describe en "Protocolo experimental" y se aplicaron a una electroforesis en gel en sustrato de gelatina. Los resultados, que se presentan en la figura 3, muestran que el tratamiento con KCN producía la aparición de una banda de actividad de proteasa (hilera B), que no se encontró en las células de control no tratadas (hilera A). Esta banda desaparecía en presencia de elastinal 100 µM (hilera B), pero no en presencia de TPCK 100 µM (hilera B), indicando que el tratamiento con KCN inducía actividad similar a elastasa, pero no actividad similar a quimotripsina.

55

60

##### 4. Efecto del inhibidor de elastasa en la inducción de actividad similar a elastasa durante la muerte celular necrótica

**[0042]** Células U-937 se trataron con o sin KCN 5 mM. Se añadió inhibidor de elastasa 200 µM (Cortech) durante 3 h y después los lisatos celulares se prepararon como se describe en "Protocolo experimental" y se aplicaron a una

65

electroforesis en gel en sustrato de gelatina. Los resultados se presentan en la figura 4. Se puede ver que el tratamiento con KCN producía la aparición de una banda de actividad de proteasa (hileras B), que no se encontró en las células de control no tratadas (hileras A). Esta banda desaparecía cuando se administraba KCN en presencia de inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M (hileras C).

5

#### 5. Prevención de necrosis inducida por KCN por el inhibidor de elastasa III en células PC-12

**[0043]** La exposición de células PC-12 a KCN 0,5 mM inducía muerte celular necrótica masiva comparado con el control. La adición de inhibidor de elastasa III que era inactivo por sí mismo, inhibía significativamente la necrosis inducida por KCN (figura 5, B). El efecto protector del inhibidor de elastasa III también se veía cuando se determinaba la supervivencia celular en las mismas condiciones por exclusión con tinta azul de tripán (figura 5, A).

10

#### 6. Efecto inhibidor del inhibidor de elastasa III en la necrosis inducida por KCN en células U-937

**[0044]** El tratamiento con KCN causaba 95 % de necrosis comparado con 10 % en el control. La adición de inhibidor de elastasa III con KCN reducía notablemente la muerte celular necrótica a 21 %, y desplazaba 22 % de la muerte celular necrótica a muerte celular apoptótica. 52 % de las células fueron protegidas de la muerte celular necrótica por este inhibidor. El inhibidor de elastasa III no causaba ningún daño celular (figura 6).

15

#### 7. Efecto inhibidor del inhibidor de elastasa penetrante frente a no penetrante en necrosis inducida por anticuerpo dirigido contra Fas

**[0045]** La figura 7A muestra la apoptosis/necrosis inducida por anticuerpo dirigido contra Fas. En estas condiciones, las células se expusieron a un inhibidor de elastasa penetrante (Cortech Inc.). Esta exposición anuló completamente tanto la muerte celular apoptótica como la necrótica (figura 7B). El inhibidor de elastasa no penetrante elastinal no tenía efecto en este sistema (figura 7C).

25

#### 8. Apoptosis/necrosis inducida por STS en células PC-12

**[0046]** La figura 8 indica que el tratamiento con STS 1,25  $\mu$ M inducía aproximadamente 73 % de apoptosis comparado con el control. La oligomicina es inactiva por sí misma, sin embargo, la adición de STS a la oligomicina cambió la muerte celular apoptótica a muerte celular necrótica. En estas condiciones, se producía aproximadamente 70 % de necrosis y la apoptosis volvía a su nivel de control. La morfología celular se determinó y analizó por microscopio de fluorescencia después de tinción doble con naranja de acridina y bromuro de etidio.

30

35

#### 9. Inhibición de la apoptosis inducida por STS por inhibidor de elastasa en células PC-12

**[0047]** La exposición de células PC-12 a STS 1,25  $\mu$ M inducía la muerte celular apoptótica masiva comparado con el control. La adición de inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M (Cortech Inc.), que era inactivo por sí mismo, inhibía significativamente la apoptosis inducida por STS (figura 9).

40

#### 10. Prevención de la necrosis inducida por STS por inhibidor de elastasa en células PC-12

**[0048]** Como se ve en la figura 10A, la STS 1,25  $\mu$ M con oligomicina 1  $\mu$ M inducía aproximadamente 70 % de necrosis. El inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M era inactivo por sí mismo, pero anuló completamente la necrosis inducida por STS. En las mismas condiciones, el inhibidor de elastasa 100  $\mu$ M redujo notablemente la muerte celular necrótica a 9 %, y desplazó 39% de la muerte celular necrótica a muerte celular apoptótica (figura 10B).

45

#### 11. Efecto inhibidor del inhibidor de elastasa en necrosis inducida por KCN en células PC-12

**[0049]** La exposición de células PC-12 a KCN 0,5 mM inducía la muerte celular necrótica masiva comparado con el control. La adición de inhibidor de elastasa 200  $\mu$ M que era inactivo por sí mismo, inhibía significativamente la necrosis inducida por KCN (figura 11).

50

#### 12. Efecto del inhibidor de elastasa en la necrosis inducida por STS en células U-937

**[0050]** Como se ve en la figura 12, el tratamiento con STS en presencia de oligomicina reducía notablemente la supervivencia celular comparado con el control. El inhibidor de elastasa tenía un ligero efecto por sí mismo, pero inhibía significativamente la muerte celular inducida por STS y oligomicina. El efecto inhibidor se midió durante la incubación prolongada de 48 h. La viabilidad celular se midió por exclusión con tinta azul de tripán. Se obtuvieron resultados similares para la apoptosis (no se muestran los datos).

60

## REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de elastasa que penetra en las células para usar en el tratamiento y/o prevención de la necrosis celular, en el que dicho inhibidor de elastasa inhibe la actividad enzimática de la elastasa intracelular implicada en la muerte celular necrótica en células que sufren necrosis, en el que la necrosis celular está asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en necrosis asociada con la administración y/o autoadministración de, y/o exposición a, cocaína, fármacos tales como paracetamol, toxinas químicas, productos agroquímicos, metales pesados u organofosfatos de guerra; distrofia vascular; complicaciones por carga de hierro; úlceras de decúbito; enfermedad celíaca; infección por ántrax; enfermedad de Anderson; enfermedad mitocondrial congénita; necrosis aséptica; leucemia; linfoma; asfixia; hernia encarcelada; diabetes mellitus; tuberculosis; endometriosis; lesiones por frío; complicaciones del tratamiento con esteroides; daño cerebrovascular; gangrena; hepatitis; hemoglobinuria; septicemia viral; quemaduras; hipertermia; síndrome compartimental; procolitis necrotizante; lesiones de la médula espinal; distrofia muscular; tirosemia; enfermedad metabólica hereditaria; enfermedad de micoplasma; infecciones virales; fenilcetonuria; infarto placentario, sífilis; necrosis avascular; alcoholismo.
2. El inhibidor de elastasa que penetra en las células para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de elastasa desplaza la necrosis al menos parcialmente a muerte celular apoptótica.
3. El inhibidor de elastasa que penetra en las células para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la muerte celular apoptótica se va a inhibir por uno o más inhibidores de la apoptosis.
4. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento y/o prevención de la necrosis celular, en la que dicha composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de elastasa que penetra en las células que inhibe la actividad enzimática de una o más enzimas elastasa implicadas en la muerte celular necrótica en células que sufren necrosis, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en el que la necrosis celular está asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en necrosis asociada con la administración y/o autoadministración de, y/o exposición a, cocaína, fármacos tales como paracetamol, toxinas químicas, productos agroquímicos, metales pesados u organofosfatos de guerra; distrofia vascular; complicaciones por carga de hierro; úlceras de decúbito; enfermedad celíaca; infección por ántrax; enfermedad de Anderson; enfermedad mitocondrial congénita; necrosis aséptica; leucemia; linfoma; asfixia; hernia encarcelada; diabetes mellitus; tuberculosis; endometriosis; lesiones por frío; complicaciones del tratamiento con esteroides; daño cerebrovascular; gangrena; hepatitis; hemoglobinuria; septicemia viral; quemaduras; hipertermia; síndrome compartimental; procolitis necrotizante; lesiones de la médula espinal; distrofia muscular; tirosemia; enfermedad metabólica hereditaria; enfermedad de micoplasma; infecciones virales; fenilcetonuria; infarto placentario, sífilis; necrosis avascular; alcoholismo.
5. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho inhibidor de elastasa desplaza la necrosis al menos parcialmente a muerte celular apoptótica.
6. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende uno o más inhibidores de apoptosis.

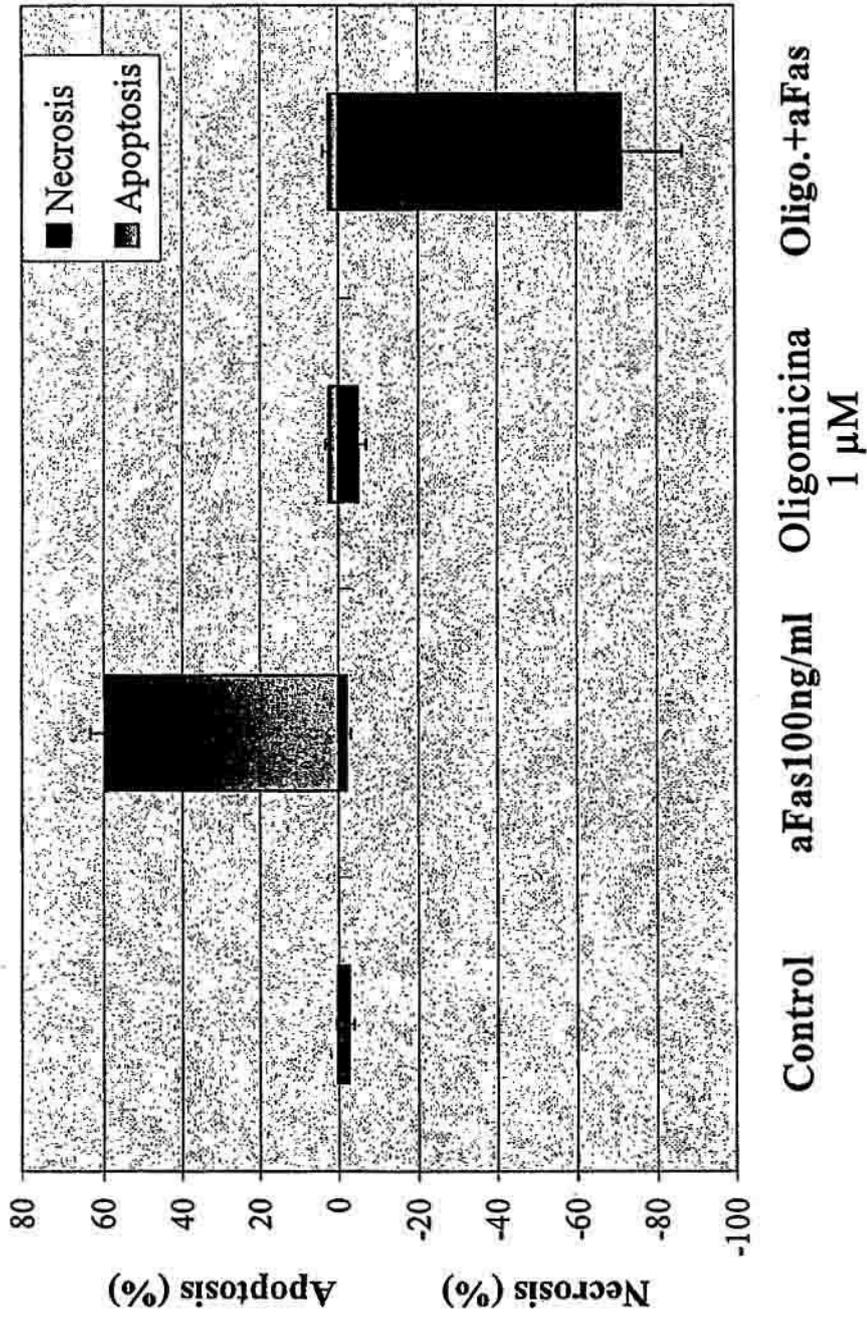


Fig. 1

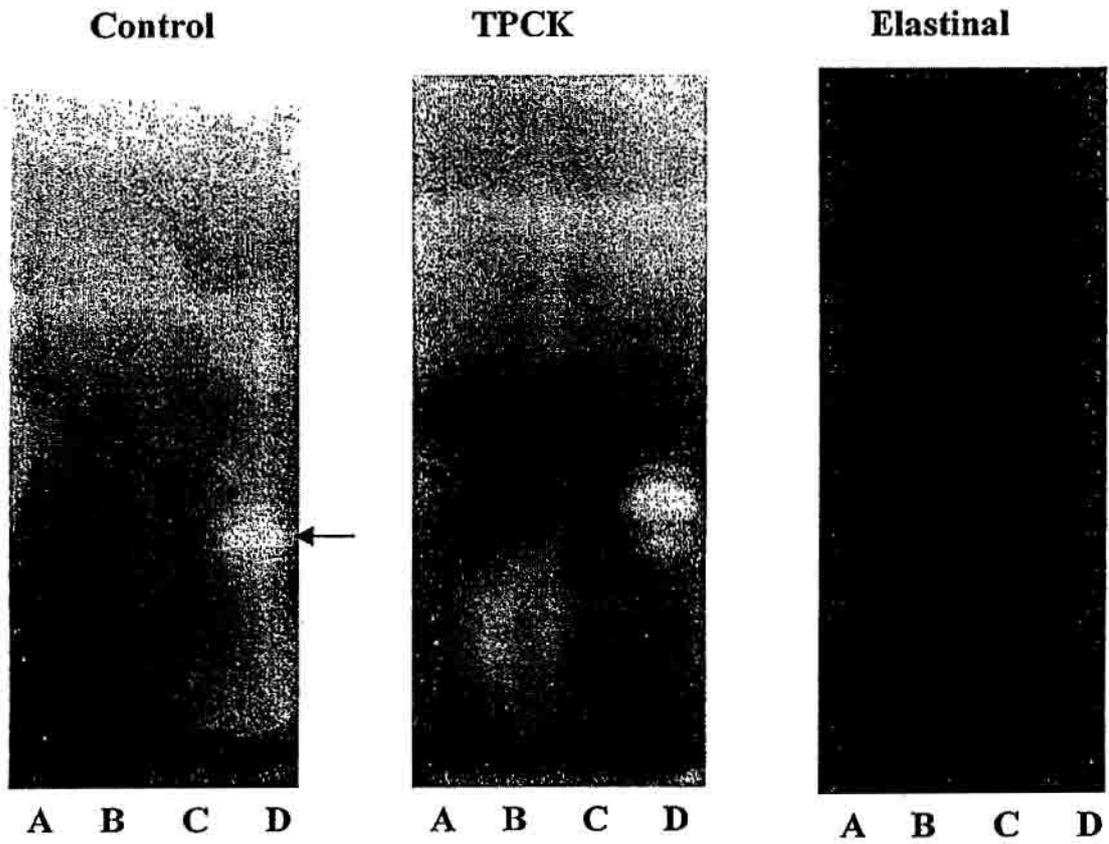


Fig. 2

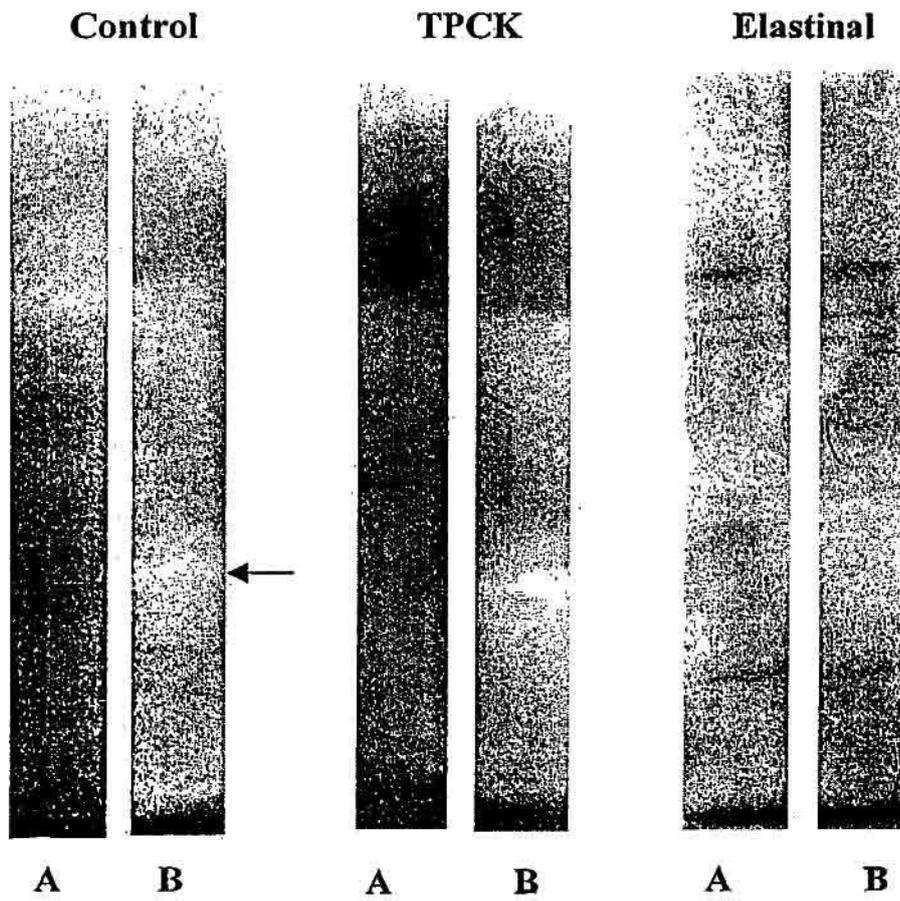


Fig. 3

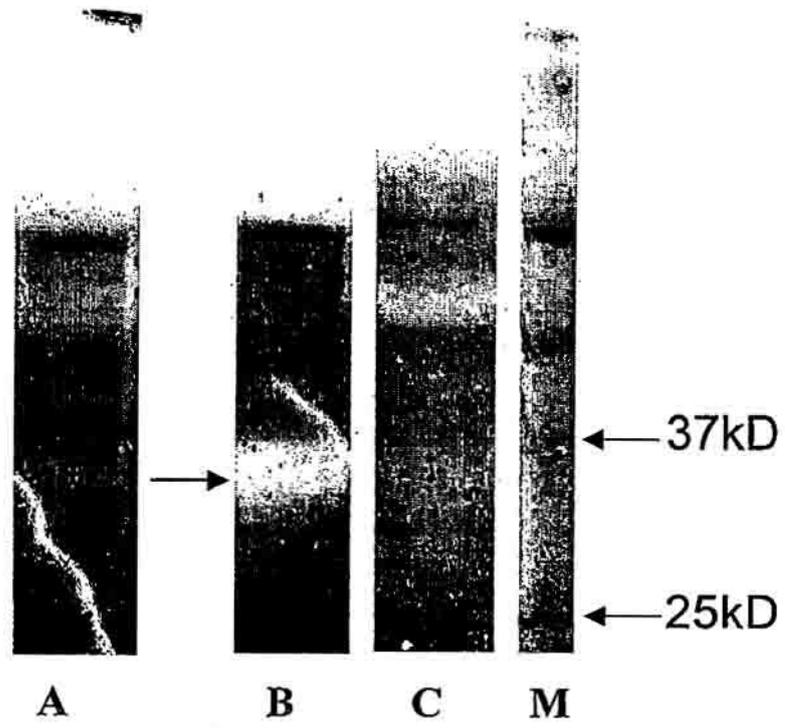
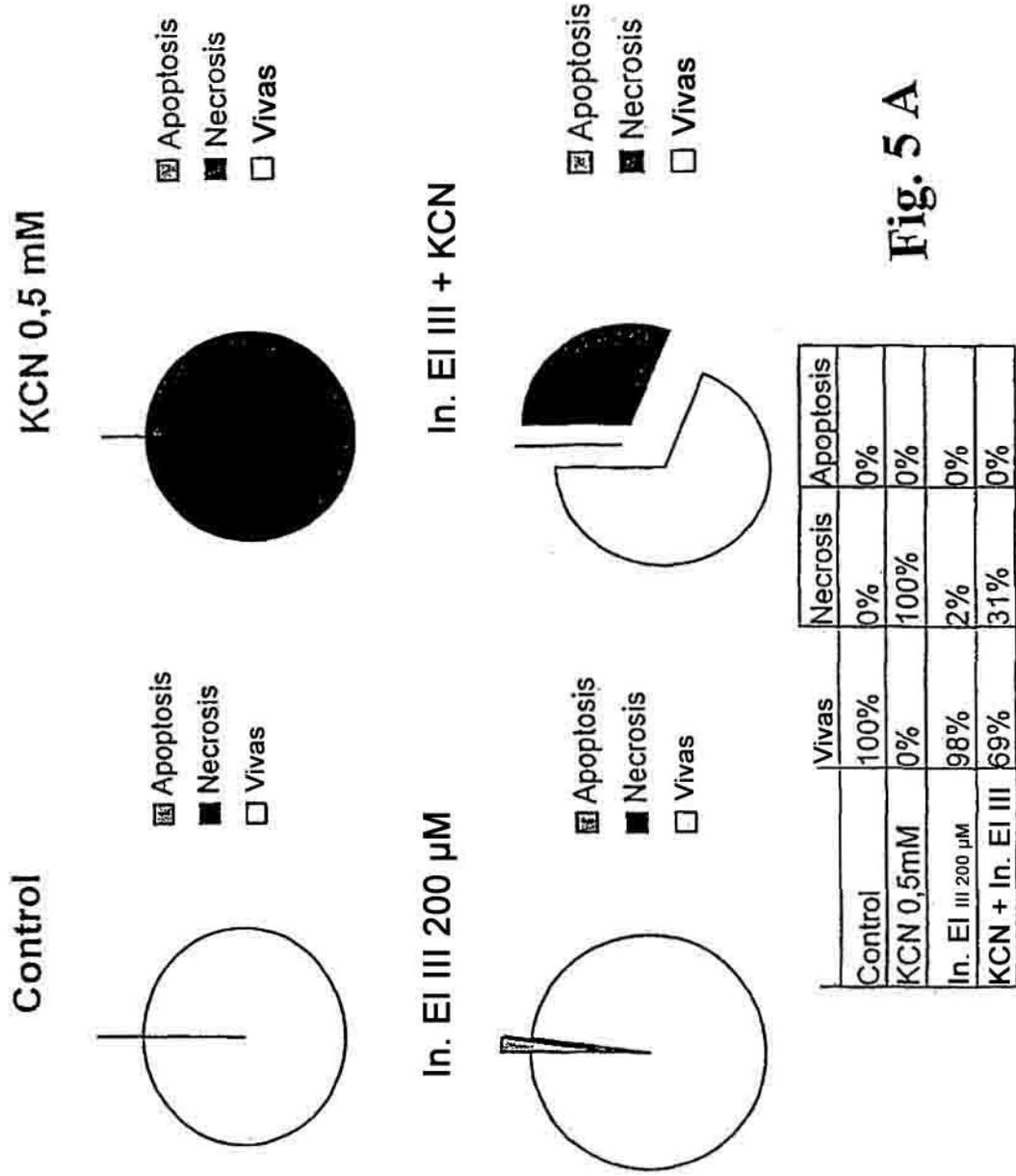


Fig. 4



**Fig. 5 A**

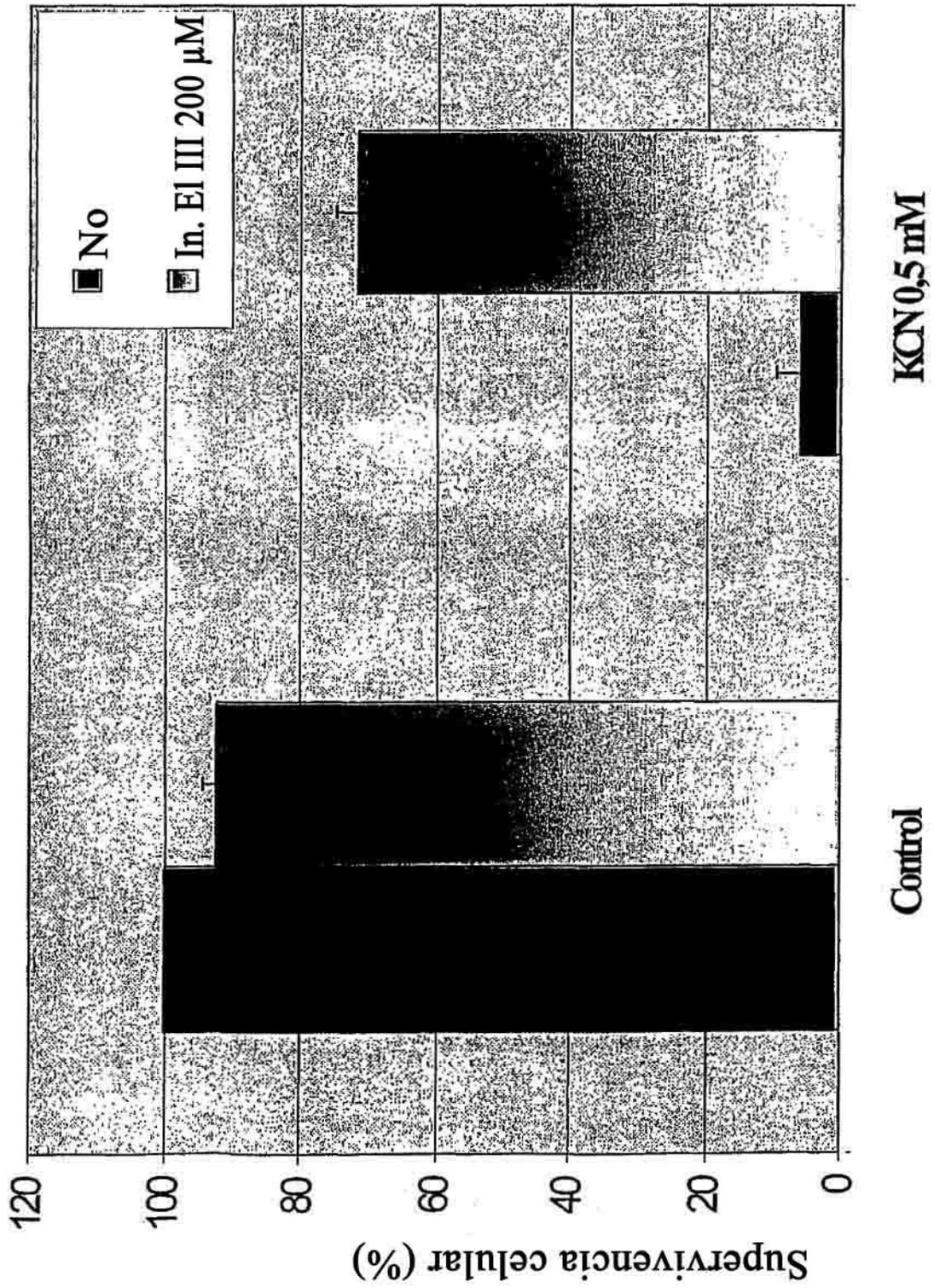
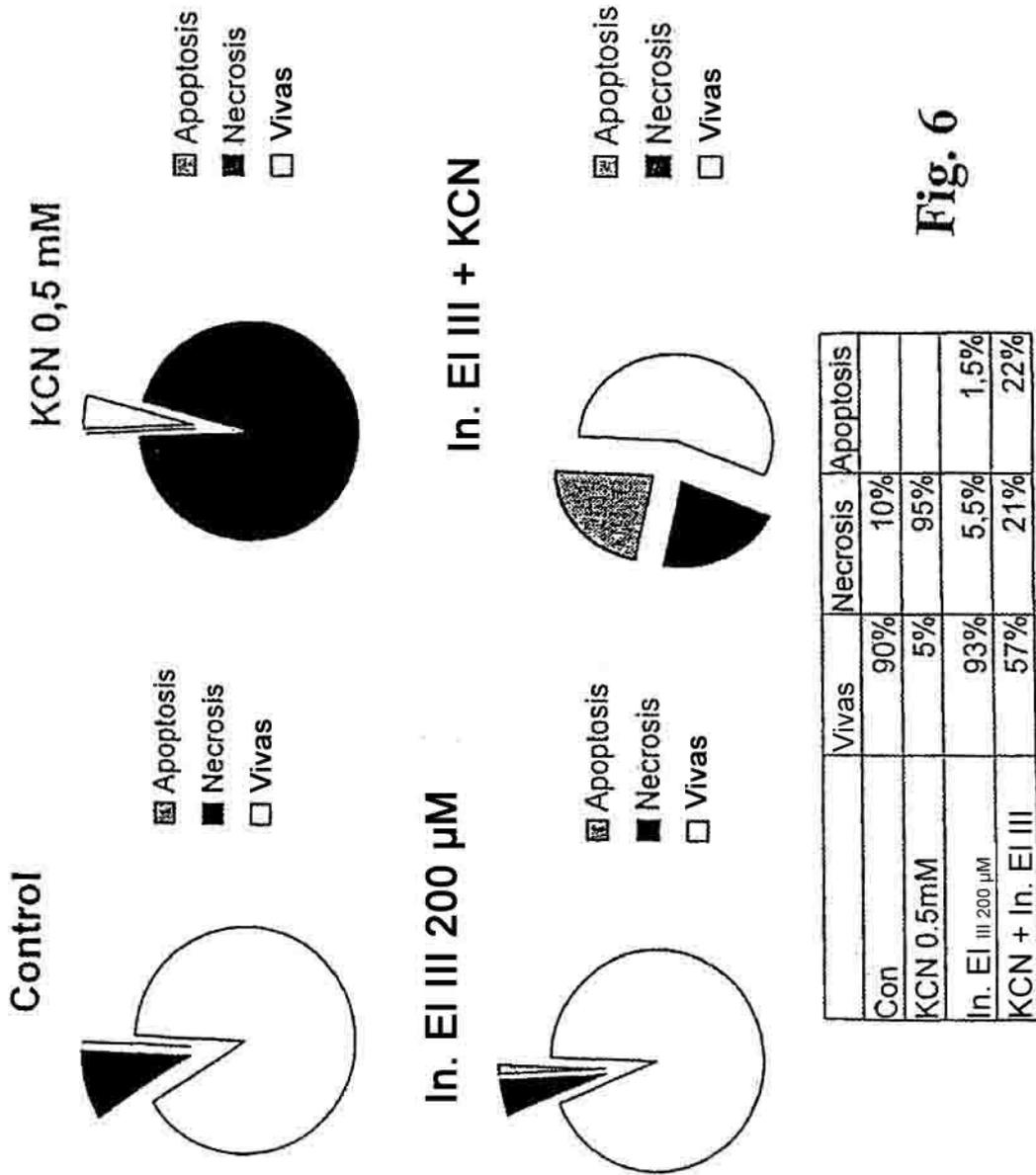


Fig. 5B



**Fig. 6**

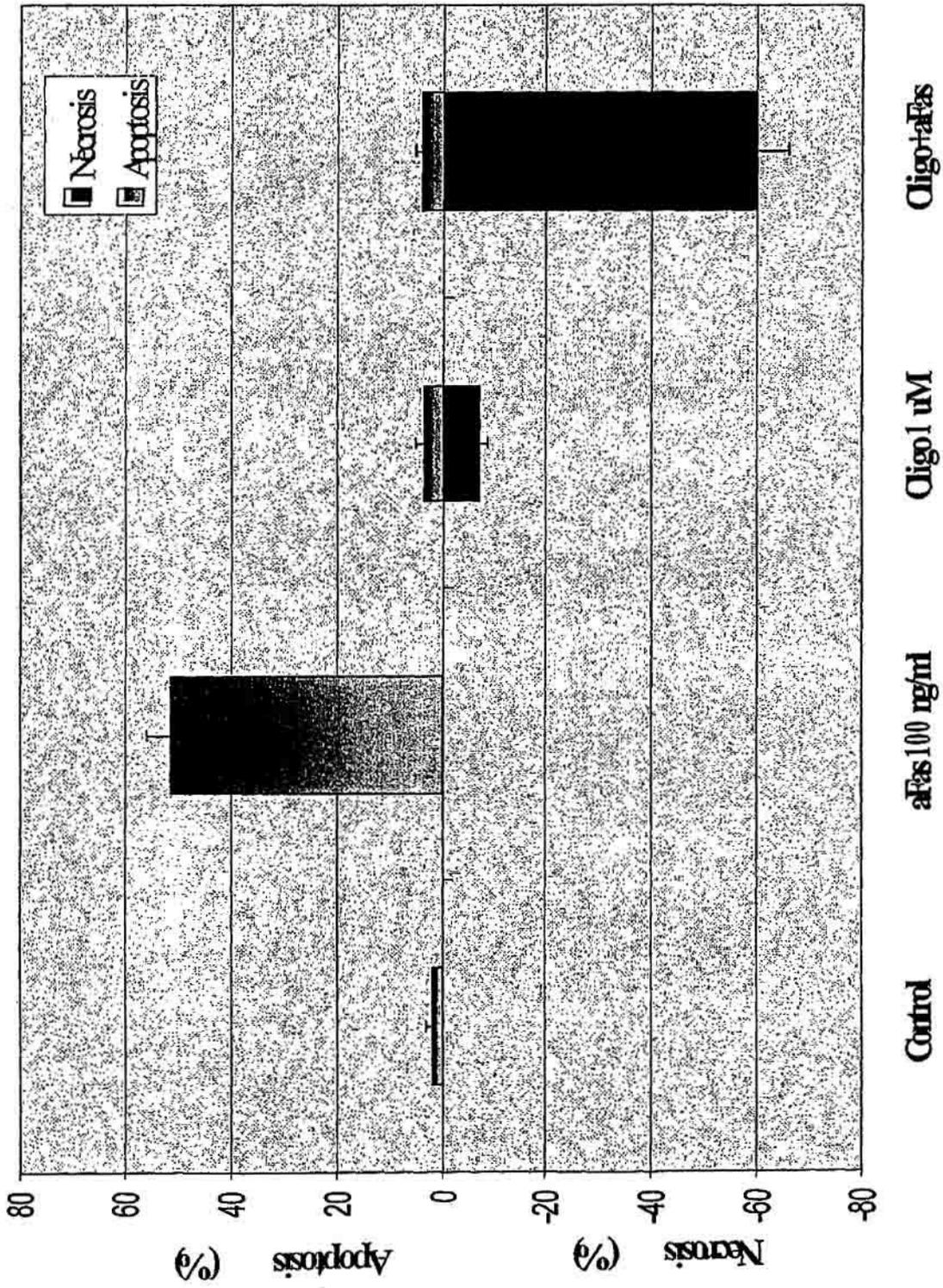
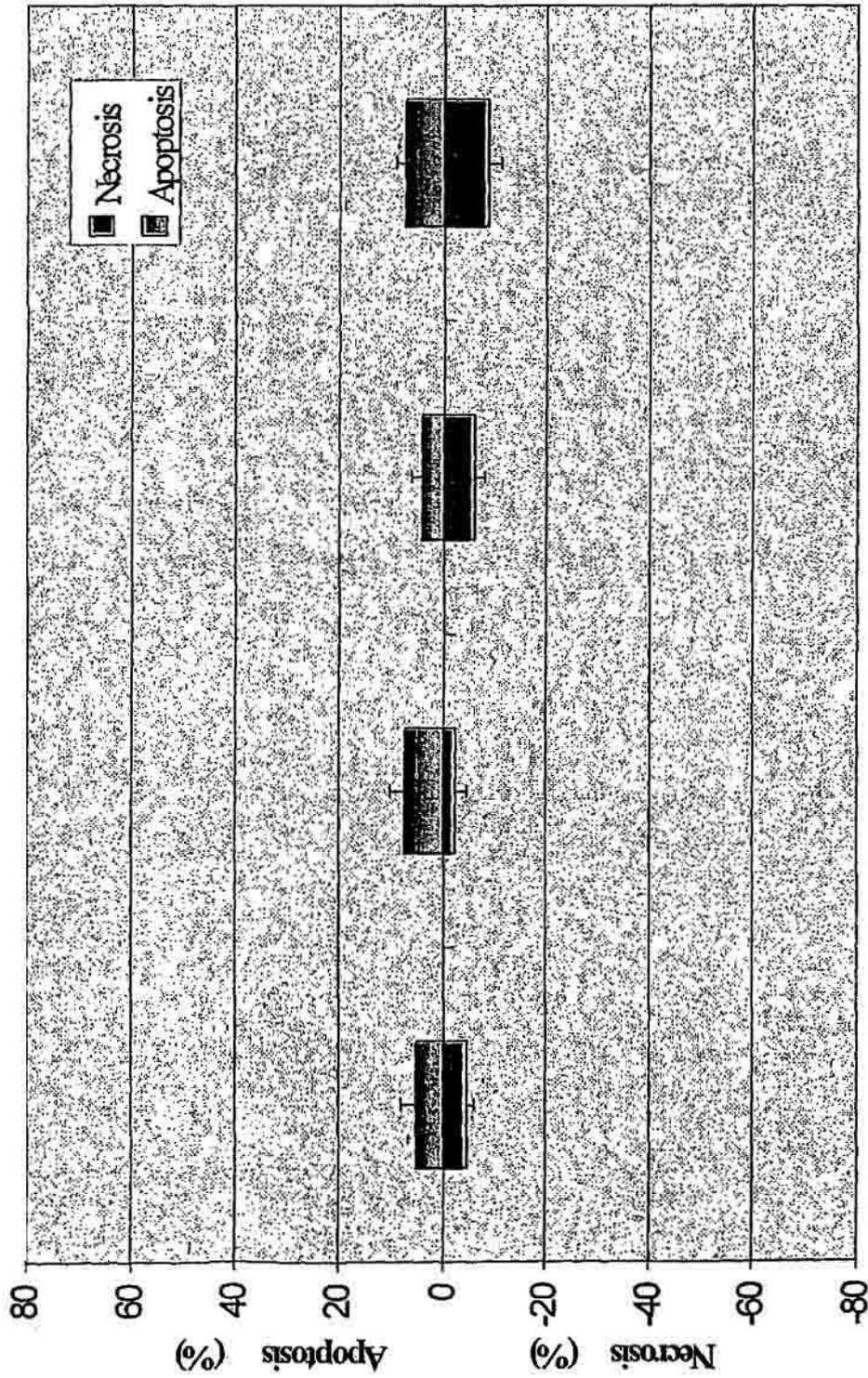


Fig. 7A



**In. EI III 200 μM In. EI III + aFas In. EI III + Oligo In. EI III + OI + aFas**

**Fig. 7B**

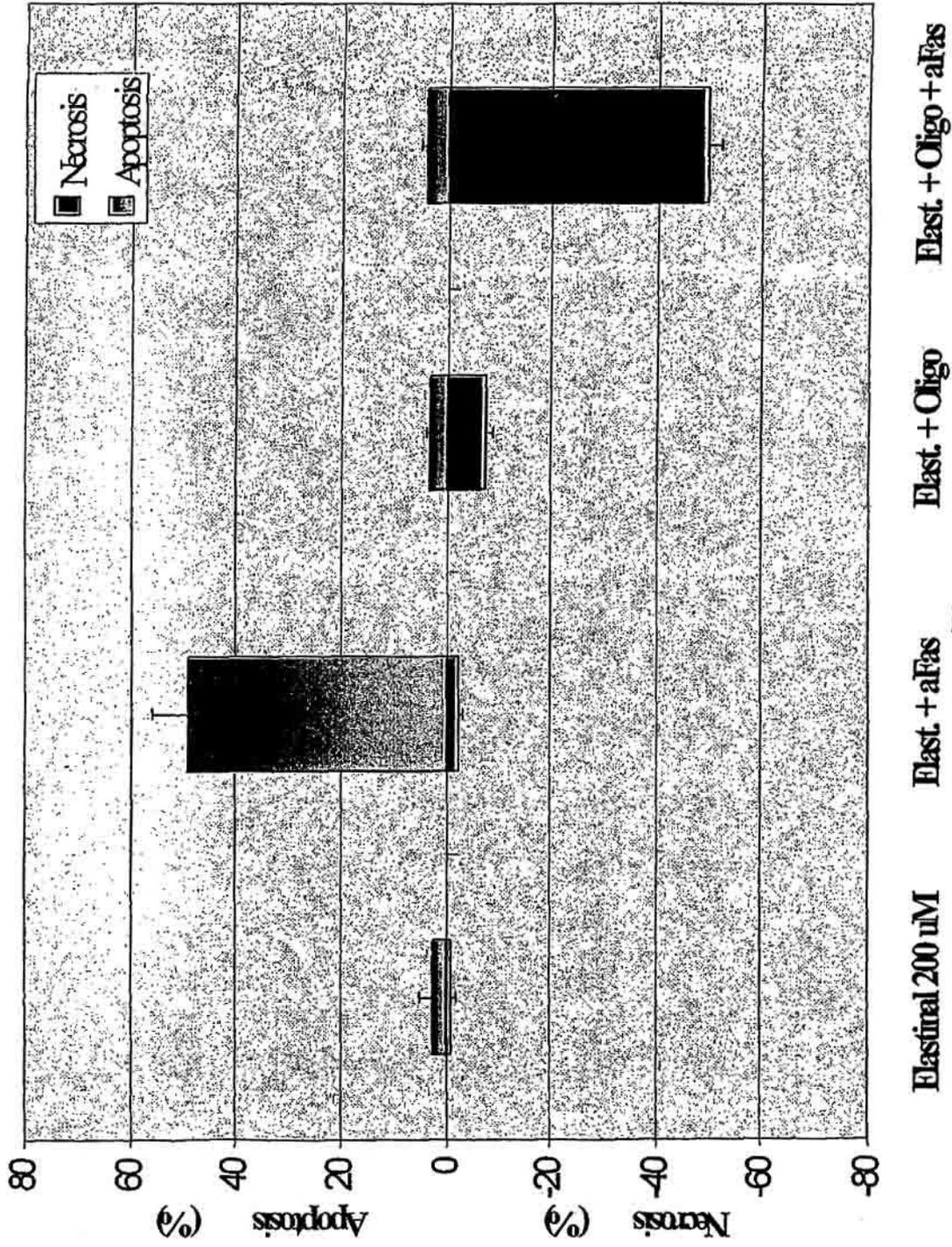
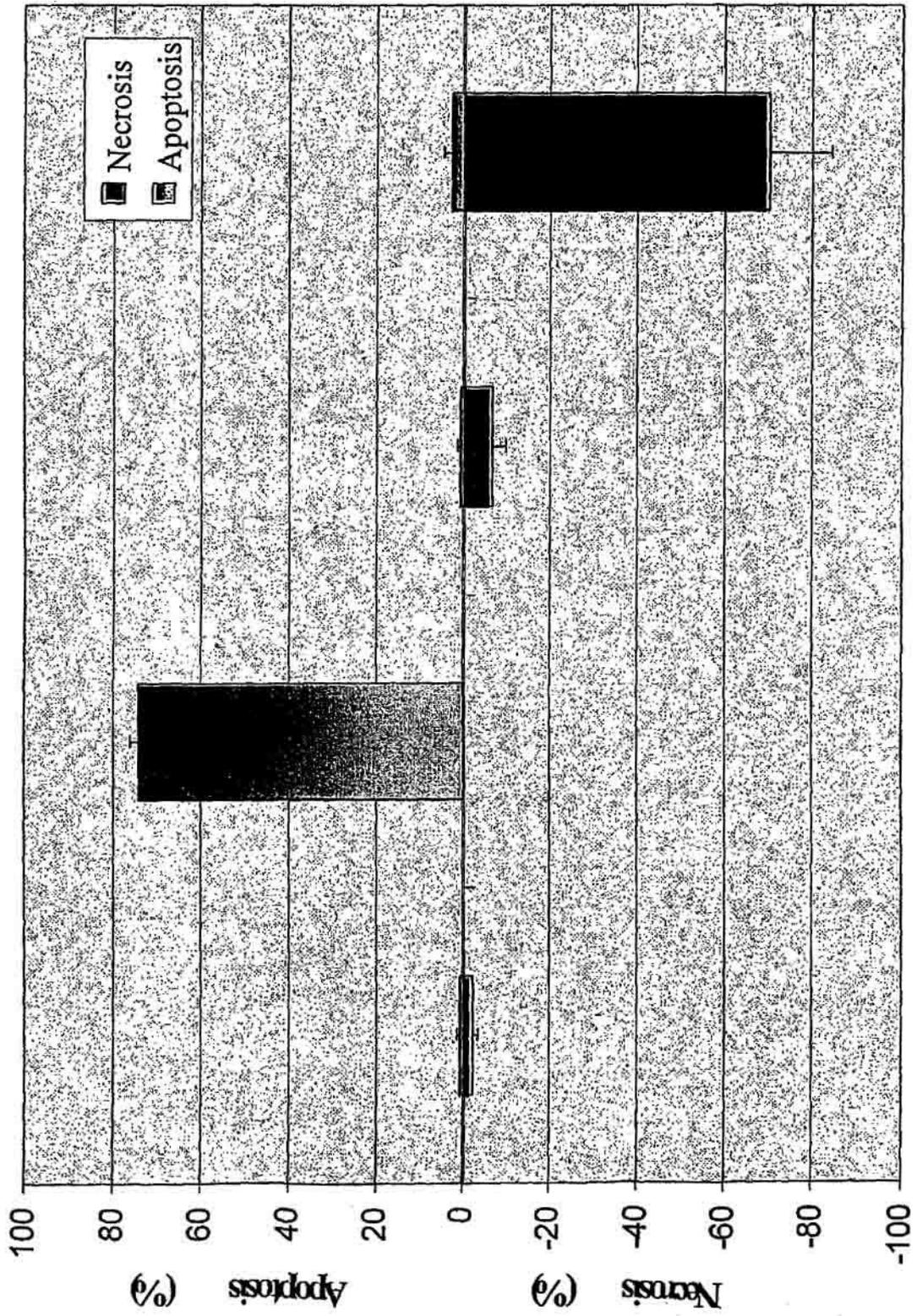


Fig. 7C



Control STS 1.25 uM Oligo 1 uM Oligo+ STS

Fig. 8

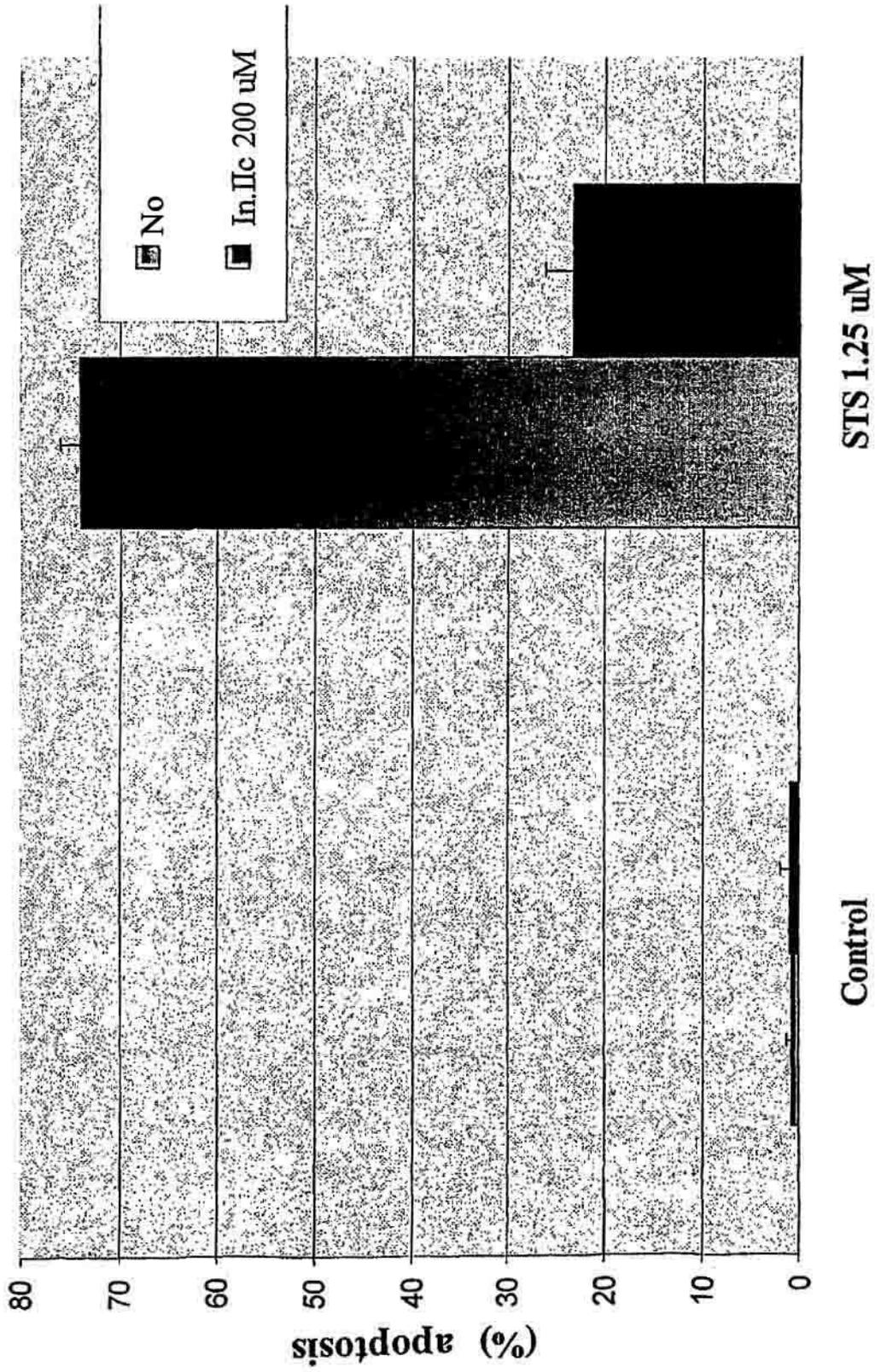


Fig. 9

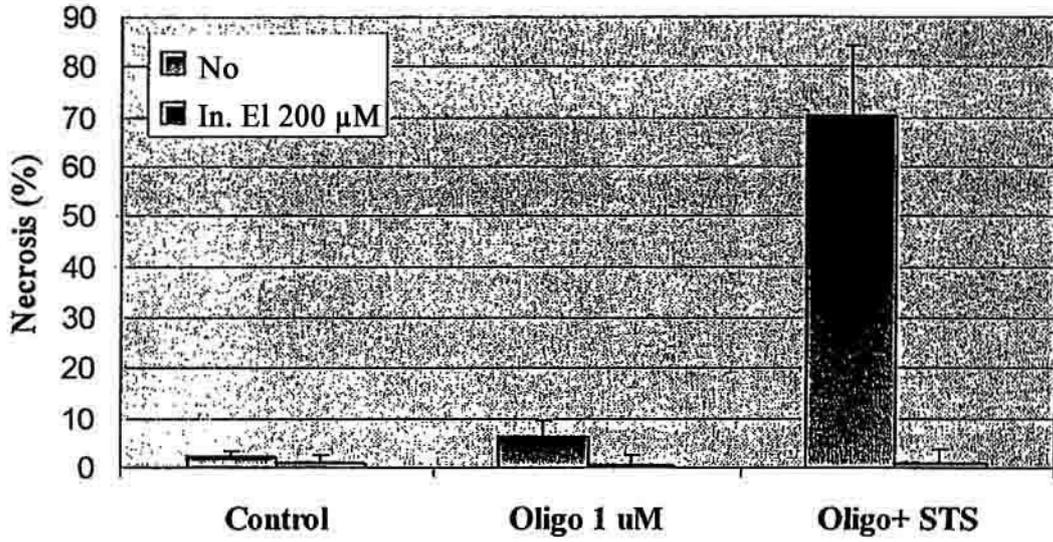


Fig. 10A

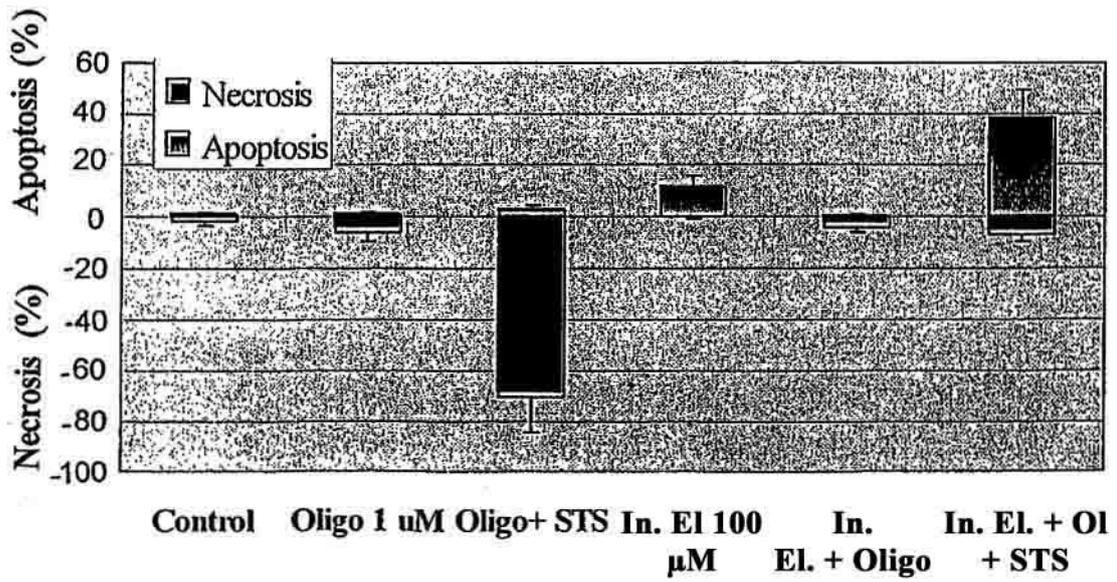


Fig. 10B

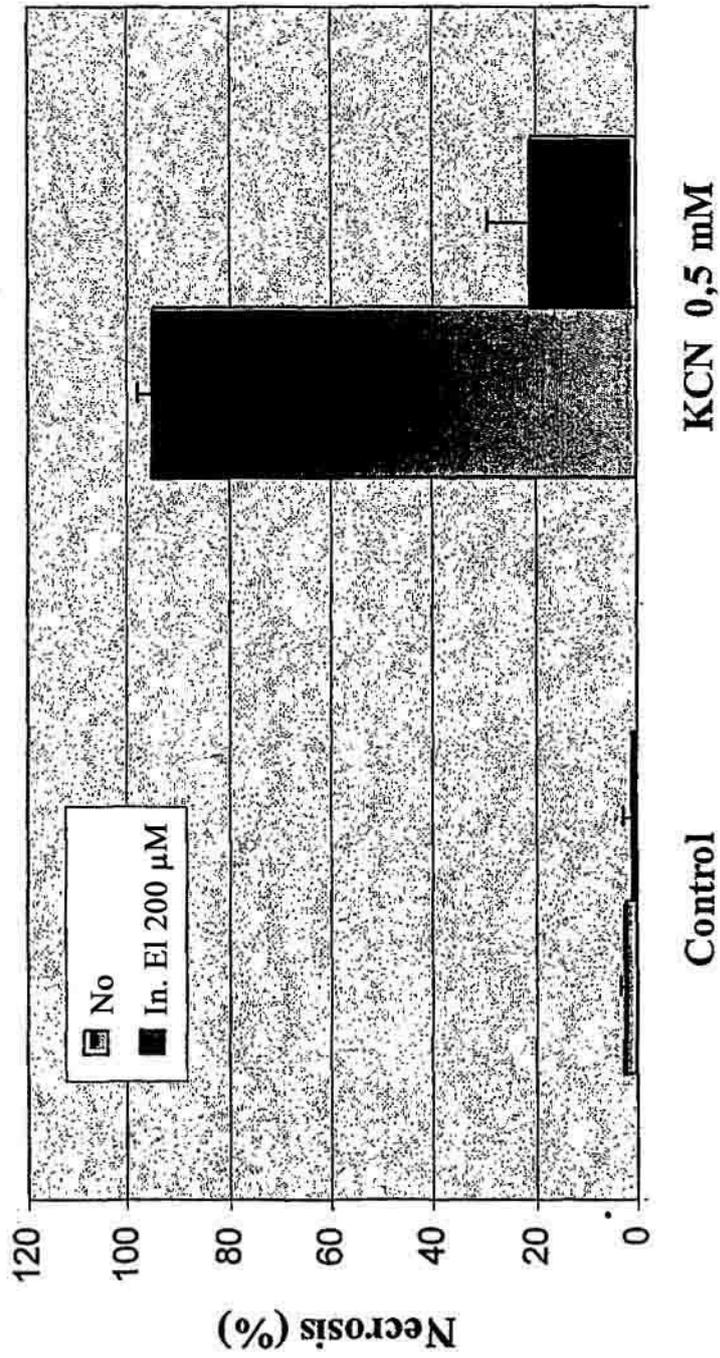


Fig. 11

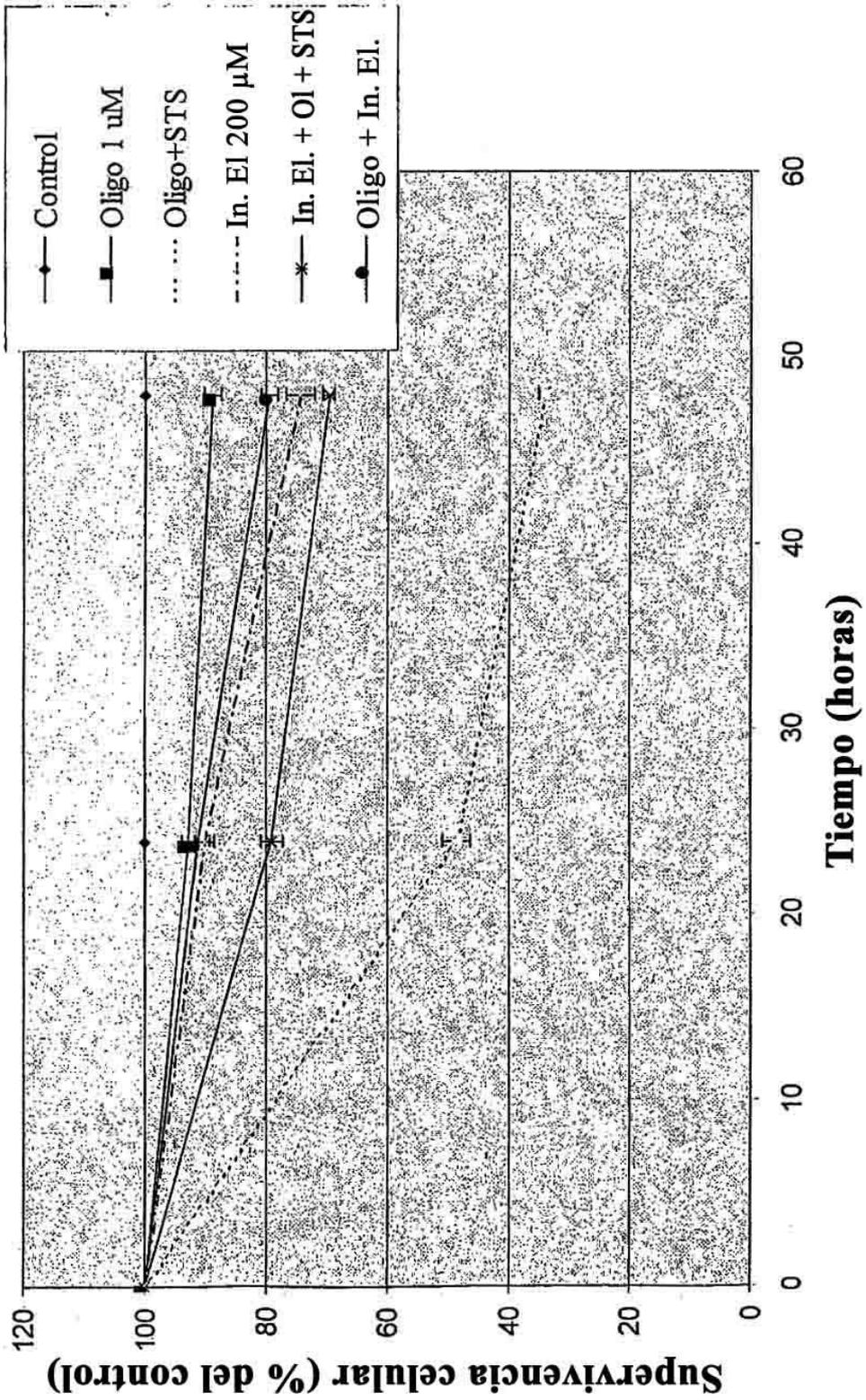


Fig. 12