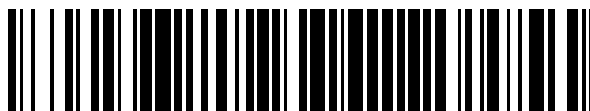


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 907**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012** **PCT/EP2012/003757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013** **WO13034299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012** **E 12780649 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2753330**

54 Título: **Aplicaciones terapéuticas de ectoína**

30 Prioridad:

09.09.2011 DE 102011113059

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

BITOP AG (100.0%)
Stockumer Strasse 28
58453 Witten, DE

72 Inventor/es:

UNFRIED, KLAUS;
SYDLIK, ULRICH;
KRUTMANN, JEAN y
BILSTEIN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 907 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).

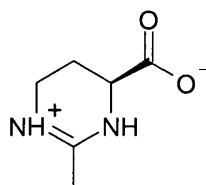
DESCRIPCIÓN

Aplicaciones terapéuticas de ectoína

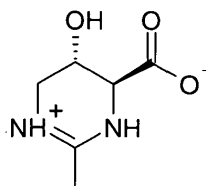
La invención se refiere a composiciones que contienen ectoína, hidroxiectoína o correspondientes sales, ésteres y amidas.

- 5 Los osmolitos o bien solutos compatibles de microorganismos extremófilos forman un grupo conocido de sustancias protectoras de bajo peso molecular. Los extremófilos son microorganismos muy excepcionales, dado que crecen óptimamente o bien con altas concentraciones salinas (hasta 200 g de NaCl/l) y altas temperaturas (de 60 a 110 °C), que conducirían en caso de organismos mesófilos (normales) a daños masivos de estructuras celulares. En los últimos años se ha dedicado por tanto un gran esfuerzo de investigación para identificar los componentes bioquímicos que conducen a la estabilización notable de las estructuras celulares. Aunque muchas enzimas de microorganismos hipertermófilos son estables también bajo altas temperaturas, no se aplica esto generalmente para las estructuras celulares de organismos termófilos e hipertermófilos. A la alta estabilidad frente a la temperatura de estructuras celulares contribuyen en medida considerable las sustancias orgánicas de bajo peso molecular (solutos compatibles, osmolitos) en el medio intracelular. Distintos osmolitos novedosos pudieron identificarse por primera vez en los últimos años en microorganismos extremófilos. En algunos casos pudo mostrarse ya la contribución de estos compuestos a la protección de estructuras celulares - sobre todo enzimas - frente a calor y sequedad (K. Lippert, E. A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1992, 37, 61-65; P. Louis, H. G. Trüper, E. A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1994, 41, 684-688; Ramos *et al.*, Appl. Environm. Microbiol. 1997, 63, 4020-4025; Da Costa, Santos, Galinski, Adv. en Biochemical Engineering Biotechnology, 61, 117-153).
- 20 Para una serie de solutos compatibles han resultado posibilidades de aplicación prácticas en el campo médico, cosmético y biológico. A los solutos compatibles más importantes pertenecen a este respecto la ectoína (ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) y sus derivados. Así se describe por ejemplo en el documento EP 0 887 418 A2 el uso de ectoína e hidroxiectoína (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) para el tratamiento de enfermedades de la piel o como aditivo eficaz para la crioprotección de principios activos biológicos y células. El documento DE 10 2006 056 766 A1 muestra el uso de ectoína para el tratamiento del síndrome de fuga vascular (VLS). Otros ejemplos son la estabilización de vacunas (documento DE 100 65 986 A1) o el uso dermatológico para el tratamiento de neurodermitis (documento DE 103 30 243 A1).

La estructura de la L-ectoína natural (ácido (S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) está representada a continuación:



También la hidroxiectoína se ha descrito como ventajosa para distintos fines. La estructura de la hidroxiectoína natural (ácido (4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) se reproduce a continuación:



- 35 El tratamiento de enfermedades pulmonares que se basan en la acción de materia particulada y enfermedades cardiovasculares es objeto de la patente europea EP 1 641 442 B1. En este documento se describe la inhalación de preparaciones farmacológicas que contienen ectoína o hidroxiectoína para la lucha contra enfermedades de este tipo. Las enfermedades que no se basan en la acción de materia particulada no son sin embargo objeto de la patente.

- 40 En muchos fenómenos inflamatorios desempeñan los granulocitos neutrófilos, de manera abreviada neutrófilos, un papel importante, en particular en la lucha contra patógenos virales y bacterianos. Los neutrófilos se forman en alto número en la médula ósea. Los patógenos se destruyen mediante liberación de especies de oxígeno reactivas y enzimas tales como mieloperoxidasa, elastasa o metaloproteinasas de matriz. Dado que estas reacciones sin embargo están unidas a efectos secundarios sobre el tejido implicado, debe realizarse una regulación estricta, de modo que la inflamación neutrófila no dure más allá de la lucha contra los propios patógenos. De manera correspondiente se activa una cascada de señales que conduce a la apoptosis de los granulocitos neutrófilos. Los mediadores de inflamación provocan sin embargo que se retrase la apoptosis y de esta manera prolongan el tiempo

de vida de los neutrófilos. La acumulación de neutrófilos y monocitos en el sitio de infección representa uno de los componentes principales de una inflamación. El retraso permanente de la apoptosis puede conducir hasta fenómenos inflamatorios crónicos. Ejemplos son una inflamación pulmonar crónica o una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- 5 El centro en el caso de la lucha contra inflamaciones crónicas se encuentra por tanto en la lucha contra la inflamación, que puede atribuirse a la acumulación de los neutrófilos. De manera problemática se hace notar según esto que los neutrófilos, al contrario de otras células implicadas en una inflamación, responden a corticosteroides solo de manera insuficiente. Por tanto serían deseables medicamentos que limitaran la acción anti-apoptótica de mediadores de inflamación, corticosteroides y otras sustancias.
- 10 Sorprendentemente ha resultado ahora que el tratamiento con ectoína o hidroxiectoína anula al menos parcialmente la acción antiapoptótica de los mediadores de inflamación, corticosteroides y otras sustancias y de esta manera restaura la tasa de apoptosis natural de granulocitos neutrófilos, sin embargo sin mostrar una sola acción pro-apoptótica. La invención se refiere por tanto a una composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos para la supresión de señales anti-apoptóticas hacia granulocitos neutrófilos y
- 15 otras células implicadas en inflamaciones tales como macrófagos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, linfocitos, células epitelioides y células dendríticas. La supresión de las señales anti-apoptóticas se encuentra normalmente en relación con el tratamiento o la prevención de inflamaciones, desempeñando las inflamaciones crónicas en este caso un especial papel. Tiene especial importancia la lucha contra inflamaciones que afectan a las vías respiratorias y al pulmón, en particular inflamaciones pulmonares, asma, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), ARDS, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis, sarcoidosis, alergias e hipersensibilidad bronquial.
- 20

La inhibición de la apoptosis de los granulocitos neutrófilos en las reacciones de inflamación sometidas a estudio se atribuye a una activación mediada por membrana de rutas de señalización acopladas a membrana a través de PI3-K (fosfatidilinositol-3-cinasa). Éstas conducen a una activación de la proteína cinasa B (AKT) y finalmente a un

25 aumento del nivel de Mcl-1, de una proteína que actúa de manera anti-apoptótica. Se supone que ectoína reduce la activación de AKT.

La reacción de inflamación neutrófila se sometió a estudio en ratas, a las que se alimentaron nanopartículas de carbono por vía intratraqueal. Esto sucede tanto junto con como también sin ectoína. A continuación se sometieron a estudio las ratas en distintos momentos, pudiéndose observar tras dos días una reducción significativa del número

30 de neutrófilos en el grupo con ectoína en comparación con el grupo con placebo. La actividad tras dos días es acorde con la reducción observada de la liberación de cinc-1, de una quimiocina, que desempeña un papel importante en caso de inflamaciones. En primer lugar se realiza la liberación de cinc-1 preferentemente mediante células epiteliales y macrófagos, mientras que en momentos posteriores domina la liberación mediante los neutrófilos existentes finalmente en alto número. La reducción de la liberación de cinc-1 tras dos días en caso de administración de ectoína muestra que en este momento ha disminuido el número de neutrófilos.

35

Igualmente pudo mostrarse que la administración de ectoína en dos dosis tiene 1 y 2 días tras el desencadenamiento de la reacción de inflamación prácticamente el mismo efecto que la administración de la ectoína durante el desencadenamiento de la reacción de inflamación. La ectoína puede usarse por consiguiente no solo de manera preventiva, sino también para el tratamiento de una inflamación ya existente. También en caso de

40 administración repetida de ectoína tras el desencadenamiento múltiple de una reacción de inflamación pudo observarse una reducción del número de neutrófilos así como una reducción del nivel de cinc-1, lo que realza la aplicabilidad en el tratamiento de inflamaciones crónicas.

Se han realizado correspondientes estudios también con granulocitos neutrófilos humanos aislados. Pudo mostrarse que la reducción de la tasa de apoptosis mediante factores pro-inflamatorios tal como nanopartículas de carbono (CNP), LTB₄ o GM-CSF puede compensarse al menos parcialmente mediante administración de ectoína de manera dependiente de la concentración. La administración de ectoína únicamente a los neutrófilos sin tratamiento previo con factores pro-inflamatorios no condujo a un aumento de la tasa de apoptosis. Esto muestra que la ectoína no actúa básicamente de manera pro-apoptótica, sino más bien suprime los mecanismos anti-apoptóticos que se desarrollan durante una inflamación.

45

La actividad anti-apoptótica si bien se detectó por medio de ensayos *in vivo* e *in vitro*, en los que se desencadenó una reacción de inflamación con ayuda de nanopartículas de carbono, sin embargo ésta no se limita a esto, más bien se refiere la presente invención de manera explícita precisamente también a aquellas inflamaciones que no pueden atribuirse a la acción de materia particulada. Mientras que el documento EP 1 641 442 B1 partió aún de que la ectoína lucha solo directamente contra las repercusiones dañinas de materias particuladas, ahora pudo mostrarse

50 que el tratamiento de inflamaciones con ectoína comienza con la restauración de la tasa de apoptosis natural de neutrófilos.

55

Como especialmente ventajosa ha resultado además una combinación de ectoína/hidroxiectoína o bien de correspondientes derivados con corticosteroides, en particular con glucocorticoides tales como dexametasona, budesonida, betametasona, triamcinolona, fluocortolona, metilprednisolona, deflazacort, prednisolona, prednisona,

cloprednol, cortisona, hidrocortisona, fluocortina, clocortolona, clobetasona, alclometasona, flumetasona, fluoprednidenol, fluorandrenolona, prednicarbato, mometasona, metilprednisolona, fluticasona, halometasona, fluocinolona, diflorasona, desoximetasona, fluocinonida, fludrocortisona, deflazacort, rimexolona, cloprednol, amcinonida, halcinonida, difluocortolona, clobetasol o sales, ésteres, amidas, solvatos o hidratos de estos compuestos.

Aunque se conocen corticosteroides como agentes eficaces contra inflamaciones, éstos desempeñan en la lucha contra inflamaciones neutrófilas un papel ambiguo, dado que éstos reducen la apoptosis neutrófila natural. Mediante combinación de un corticosteroide con ectoína/hidroxiectoína se combina por tanto la acción antiinflamatoria ventajosa del esteroide con la restauración de la tasa de apoptosis natural y por consiguiente la reducción de la acción anti-apoptótica indeseada del corticosteroide mediante ectoína/hidroxiectoína. Ejemplos son combinaciones de ectoína o correspondientes derivados con dexametasona y/o budesonida. Las combinaciones ventajosas alternativas son ectoína/hidroxiectoína con GM-CSF, leucotrienos como LTB₄, teofilina (1,3-dimetil-xantina), antagonistas de leucotrienos, inhibidores de fosfodiesterasa (inhibidor de PDE, en particular inhibidor de PDE4), antagonistas de receptor muscarínico, anticolinérgicos tales como bromuro de ipratropio o bromuro de tiotropio u otros fármacos, con los que se reduce de manera indeseada la tasa de apoptosis neutrófila natural.

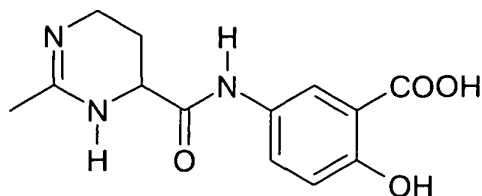
Tiene especial importancia también, en caso de una combinación de corticosteroides con ectoína/hidroxiectoína, el tratamiento de enfermedades pulmonares, en particular inflamaciones pulmonares, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis, sarcoidosis, alergias. A este respecto es práctico prever la composición como composición que puede inhalarse. La composición puede encontrarse a este respecto líquida como solución o sólida, pulverizándose e inhalándose la composición de manera conveniente como aerosol en caso necesario con ayuda de un dispositivo de inhalación.

La administración de corticosteroides y ectoína/hidroxiectoína no debe realizarse en cualquier caso de la misma composición, sin embargo es importante la administración simultánea o rápida, de modo que los principios activos interaccionen funcionalmente de la manera descrita anteriormente. De manera correspondiente se refiere la invención también a un preparado de combinación, que comprende al menos dos composiciones individuales, concretamente una composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos así como otra composición que contiene un corticosteroide. El preparado de combinación representa por consiguiente un kit de componentes de dos composiciones, que solo conjuntamente desarrollan su actividad total. En el caso del corticosteroide puede tratarse en particular de uno de los glucocorticoides mencionados anteriormente.

Como sales compatibles farmacológicamente de la ectoína/hidroxiectoína se tienen en cuenta las sales alcalinas o alcalinotérricas, en particular las sales de potasio, sodio, magnesio y calcio, sin embargo también sales con bases orgánicas, tales como por ejemplo con aminas alifáticas o aromáticas no tóxicas.

Mediante reacción del grupo carboxilo de la ectoína/hidroxiectoína con alcoholes o aminas, pueden obtenerse correspondientes ésteres o amidas que pueden usarse igualmente de acuerdo con la invención. En el caso de una amida puede presentar el átomo de nitrógeno a su vez grupos alquilo saturados o insaturados, de cadena lineal o ramificados. En el caso de hidroxiectoína puede hacerse reaccionar también el grupo hidroxilo con un ácido carboxílico para dar un correspondiente éster.

Ha resultado ventajoso entre otras cosas el uso de la ectoinamida del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. La fórmula estructural está reproducida a continuación:



Se trata por consiguiente de la amida de ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. Preferentemente se trata de la correspondiente amida de la L-ectoína: amida de ácido (S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico. El compuesto se sometió a prueba y mostró una actividad comparable con la propia ectoína (véase la figura 7). Es posible también el uso de la correspondiente amida de hidroxiectoína (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico), preferentemente de L-hidroxiectoína (ácido (4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico), es decir la hidroxiectoinamida del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. También la respectiva amida puede encontrarse en forma iónica o zwitteriónica. La invención se refiere por consiguiente también a los compuestos mencionados o bien sales, ésteres o amidas de estos compuestos y a composiciones que contienen estos compuestos o bien sales, ésteres o amidas. Las composiciones pueden servir para su uso como fármaco, en particular para la supresión de señales anti-apoptóticas en granulocitos neutrófilos, macrófagos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, linfocitos, células epitelioides, células dendríticas u otras células implicadas en inflamaciones.

En general pueden procesarse los principios activos de acuerdo con la invención eventualmente también con otros principios activos usando coadyuvantes y aditivos farmacológicamente inocuos para dar preferentemente fármacos que pueden inhalarse. Tales aditivos son en caso de preparaciones líquidas que pueden inhalarse preferentemente agua, eventualmente con adición de otros disolventes, estabilizadores, conservantes, emulsionantes, antioxidantes, cargas o solubilizadores. Como otros principios activos son concebibles antiasmáticos, broncolíticos, sustancias antiinflamatorias no esteroideas (AINE) o expectorantes. Como conservantes se tienen en cuenta: cloruro de benzalconio, clorobutanol, tiomersal, metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico y sus sales, edetato de sodio, alcohol feniletílico, acetato de clorhidrato de clorhexidina, digluconato de clorhidrato de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetilpiridinio, clorocresol, acetato de fenilmercurio, nitrato de fenilmercurio, borato de fenilmercurio, fenoxietanol.

Las formulaciones de la invención pueden incluir igualmente sistemas tampón adecuados u otros coadyuvantes para el ajuste del pH para ajustar y mantener un valor de pH en el orden de magnitud de 4-8, preferentemente de 5 a 7,5. Los sistemas tampón adecuados son citrato, fosfato, trometamol, glicina, borato, acetato. Estos sistemas tampón pueden prepararse a partir de sustancias tales como ácido cítrico, fosfato de monosodio, fosfato de disodio, glicina, ácido bórico, tetraborato de sodio, ácido acético o acetato de sodio.

La concentración de la ectoína/hidroxiectoína o bien correspondientes derivados con respecto a la composición asciende normalmente a del 0,001 % al 50 % en peso, preferentemente a del 0,05 % al 20 % en peso, en particular a del 0,1 % al 10 % en peso.

En el caso de la administración en forma sólida, por ejemplo por medio de inhaladores de polvo, es práctico usar solo vehículos fácilmente reabsorbibles no irritantes tal como lactosa micronizada.

Ensayo 1

Se suspendieron nanopartículas de carbono (CNP, 14 nm, Printex 90, Degussa, Frankfurt, Alemania) con ayuda de un tratamiento de ultrasonido en una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Igualmente se preparó una solución 0,1 mM y una solución 1 mM de ectoína en PBS. Se trataron ratas Fisher 344 hembras por vía intratraqueal con 0,4 ml de la suspensión de partículas CNP. Tras 1 y 2 días tuvo lugar un tratamiento con 0,4 ml de las soluciones de ectoína o bien PBS. En el 3^{er} día se sacrificaron las ratas, los pulmones se lavaron con en cada caso 4 x 5 ml de PBS. Las células de cada animal se suspendieron en 1 ml de PBS y se centrifugaron. Los sedimentos se lavaron 1 vez con PBS y se resuspendieron en 300 µl de solución hipotónica (0,1 % de citrato de sodio, 0,1 % de Triton X 100) que contiene 50 µg/ml de yoduro de propidio (PI). A continuación se realizó la medición de fluorescencia para la determinación de la tasa de apoptosis.

Se obtuvo el resultado representado en la figura 1 (C: control sin tratamiento con CNP; *: diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento con CNP; †: diferencia significativa con respecto a animales tratados solo con CNP y PBS).

Ensayo 2

La acción de ectoína sobre la apoptosis se sometió a estudio por medio de neutrófilos humanos. Se aislaron neutrófilos de 3 donantes sanos, jóvenes macho y 2 donantes sanos, jóvenes hembra y se trataron con las cantidades indicadas de ectoína (mM). El tratamiento se realizó con ectoína únicamente (barras abiertas) o bien con 33 µg/ml de CNP (barras negras). En el grupo control (C) no se administró ectoína. El resultado está representado en la figura 2.

La cuantificación de las células apoptóticas se realizó de la siguiente manera: los neutrófilos se suspendieron en 300 µl de solución hipotónica que contiene yoduro de propidio (PI). La fluorescencia de PI se midió por medio de citometría de flujo (citómetro FACScan, BD Biosciences). Los resultados se representan como porcentaje en ADN hipodiploide (sub-G1), que corresponde al ADN fragmentado, que es característico de células apoptóticas.

La reducción de la tasa de apoptosis provocada por CNP pudo anularse prácticamente mediante la administración de cantidades significativas de ectoína.

(*: diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento con CNP; t: diferencia significativa con respecto a neutrófilos tratados solo con CNP y PBS).

Ensayo 3

La acción de ectoína sobre la apoptosis se sometió a estudio por medio de neutrófilos humanos. Se aislaron neutrófilos de 3 donantes sanos, jóvenes macho y 2 donantes sanos, jóvenes hembra y se trataron previamente durante 2 h con PBS (barras oscuras) o bien con ectoína 1 mM (barras claras). A continuación se realizó el tratamiento con 33 µg/ml de nanopartículas de carbono (ufCB: *ultrafine carbon black*), LTB₄ 300 nM, GM-CSF 20 ng/ml o dexametasona 1 mM o bien ningún tratamiento con factores pro-inflamatorios. El resultado está representado en la figura 3. (†: diferencia significativa con respecto al grupo control; *: diferencia significativa con respecto a neutrófilos tratados solo con factores pro-inflamatorios y PBS, cuantificación de las células apoptóticas de

manera análoga al ensayo 2).

Ensayo 4

La acción de ectoína sobre la apoptosis se detectó de manera análoga al ensayo 3 en pacientes con EPOC y de manera correspondiente pacientes mayores sin EPOC. Los granulocitos neutrófilos se trataron previamente durante 2 h con ectoína 1 mM o bien PBS, a continuación siguió el tratamiento durante 16 h con CNP 33 µg/ml, LTB₄ 300 nM, GM-CSF 20 ng/ml o PBS. Pudo detectarse una apoptosis base más alta, sin embargo los estimulantes inflamatorios redujeron la apoptosis y un tratamiento adicional con ectoína restauró significativamente la tasa de apoptosis. El resultado está representado en la figura 4. (barras oscuras: pretratamiento con ectoína; barras claras: pretratamiento con PBS; *: diferencia significativa con respecto al grupo control sin CNP o mediadores de inflamación; §: diferencia significativa para el tratamiento sin ectoína; cuantificación de las células apoptóticas de manera análoga al ensayo 2).

Ensayos 5-7

Para los ensayos 5 a 7 se obtuvieron granulocitos neutrófilos de muestras de sangre. Los grupos 1 y 2 estaban constituidos por personas procedentes de un estudio de pacientes en desarrollo. Los pacientes macho (edad: de 40 a 80 años) con desarrollo estable de EPOC (GOLD III/IV) y pacientes control sanos en el mismo grupo de edad.

Además se recurrió a voluntarios jóvenes, macho en la clínica (grupo 3).

Ensayo 5

La influencia de ectoína en combinación con el corticosteroide budesonida sobre las tasas de apoptosis de neutrófilos se representa en la figura 5. Se midieron células sub-G1 tras la coloración con yoduro de propidio (citometría de flujo-FACS). Células: neutrófilos primarios, periféricos. Aislamiento de los neutrófilos mediante centrifugación con Percoll®. Cultivo de 2×10^6 neutrófilos en presencia de CNP 33 µg/ml, LTB₄ 300 nM, GM-CSF 20 ng/ml, budesonida 1 µM, ectoína 1 mM y combinaciones de esto durante 16 h. Figura 5A: células acumuladas de todas las muestras (n = 15), figura 5B: células de pacientes con EPOC (n = 5), figura 5C: células de control mayor sano (n = 5), figura 5D: células de voluntarios jóvenes (n = 5).

El tratamiento con budesonida conduce a una reducción de la tasa de apoptosis de neutrófilos. Se distingue que el pretratamiento de las células con ectoína 1 mM previene significativamente los efectos anti-apoptóticos de la budesonida. El efecto se produjo en todos los grupos como también en la totalidad de los grupos. El efecto pudo mostrarse en caso de granulocitos neutrófilos que no se trataron con sustancias de acción pro-inflamatoria. Sin embargo también en caso de la combinación de sustancias de acción pro-inflamatoria (CNP, LTB₄, GM-CSF) con budesonida impidió la ectoína la acción antiapoptótica de manera exitosa.

Ensayo 6

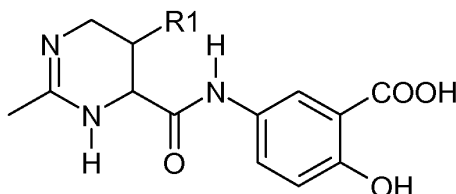
La influencia de ectoína en combinación con budesonida sobre las señales anti-apoptóticas puede deducirse de la figura 6. Las correspondientes señales a través de la proteína cinasa B (Akt) y Mcl-1 se realizaron con muestras seleccionadas de neutrófilos por medio de medición de la fosforilación de Akt y del nivel de proteína Mcl-1, como células sirvieron neutrófilos humanos primarios, periféricos. Aislamiento de los neutrófilos mediante centrifugación con Percoll®, el cultivo de 2×10^6 neutrófilos en presencia de CNP 33 µg/ml, budesonida 1 µM, ectoína 1 mM y combinaciones de esto durante 6 h. Se realizó un aislamiento de proteínas, una inmunotransferencia tipo Western, luminiscencia sobre películas de rayos X en material de en cada caso 3 pacientes con EPOC y 3 personas del correspondiente control mayor. El resultado muestra claramente el efecto anti-apoptótico de budesonida, que activa la ruta de señalización Akt y eleva la cantidad de proteína Mcl-1 anti-apoptótica. La ectoína puede contrarrestar este efecto, también en presencia de CNP.

Ensayo 7

La influencia de distintas sustancias de prueba adicionales sobre la tasa de apoptosis de neutrófilos humanos está representada en la figura 7. Se midieron células sub-G1 tras la coloración con yoduro de propidio (citometría de flujo-FACS). Células: neutrófilos primarios, periféricos humanos. Aislamiento de los neutrófilos mediante centrifugación con Percoll® y cultivo de 2×10^6 neutrófilos en presencia de CNP 33 µg/ml, budesonida 1 µM, ectoína 1 mM, urea 1 mM, ectoinamida 1 mM y combinaciones de esto durante 16 h. Las células proceden de voluntarios jóvenes (grupo 3), n = 5, bud = budesonida. Dos sustancias de ensayo adicionales (urea y la ectoinamida de ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico) se sometieron a prueba en cuanto a su capacidad para impedir efectos anti-apoptóticos sobre neutrófilos. Las dos sustancias no tenían influencia sobre la tasa de apoptosis de fondo. La ectoinamida pudo impedir la reducción de la tasa de apoptosis que se produjo mediante nanopartículas de carbono (CNP) con o sin budesonida, por el contrario urea no.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, un éster o una amida de estos compuestos para su uso en un procedimiento para la supresión de señales anti-apoptóticas hacia granulocitos neutrófilos, macrófagos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, linfocitos, células epitelioides, células dendríticas u otras células implicadas en inflamaciones, en donde la supresión de las señales anti-apoptóticas se realiza en el tratamiento o la prevención de una inflamación que afecta a las vías respiratorias o al pulmón y en donde en el caso de la inflamación se trata de una inflamación pulmonar crónica que no se basa en el efecto del polvo en suspensión, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis o sarcoidosis.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la composición contiene al menos un corticosteroide.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, **caracterizada porque** el corticosteroide es un glucocorticoide.
4. Composición para su uso según la reivindicación 3, **caracterizada porque** el glucocorticoide es dexametasona, budesonida, betametasona, triamcinolona, fluocortolona, metilprednisolona, deflazacort, prednisolona, prednisona, cloprednol, cortisona, hidrocortisona, fluocortina, clocortolona, clobetasona, alclometasona, flumetasona, fluoprednido, fluorandrenolona, prednicarbato, mometasona, metilprednisolona, fluticasona, halometasona, fluocinolona, diflorasona, desoximetasona, fluocinonida, fludrocortisona, deflazacort, rimexolona, cloprednol, amcinonida, halcinonida, diflucortolona, clobetasol o una sal, un éster, una amida, un solvato o un hidrato de uno de los compuestos mencionados anteriormente.
5. Composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, un éster o una amida de estos compuestos para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de enfermedades pulmonares, excepto aquellas que se basan en el efecto del polvo en suspensión, **caracterizada porque** la enfermedad pulmonar es una enfermedad pulmonar crónica, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis o sarcoidosis.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, que contiene un corticosteroide.
7. Composición para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** la composición es una composición que puede inhalarse.
8. Preparado de combinación de composiciones para su aplicación en un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades pulmonares, en donde la enfermedad pulmonar es una inflamación pulmonar crónica, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis o sarcoidosis y las composiciones están previstas para la administración rápida, que está constituido por al menos
 - una primera composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, un éster o una amida de estos compuestos y
 - una segunda composición que contiene un corticosteroide.
9. Compuesto con la fórmula estructural



o una sal, un éster o una amida de este compuesto, con R1 = H, OH o OR2 con R2 = alquilo, cicloalquilo o arilo, preferentemente alquilo C₁ a C₁₀, cicloalquilo C₁ a C₁₀ o arilo C₁ a C₁₀.

10. Compuesto según la reivindicación 9, **caracterizado porque** es R2 = alquilo C₁ a C₁₀, cicloalquilo C₁ a C₁₀ o arilo C₁ a C₁₀.
11. Composición que contiene un compuesto y/o una sal, un éster o una amida según las reivindicaciones 9 o 10 para su uso como fármaco.

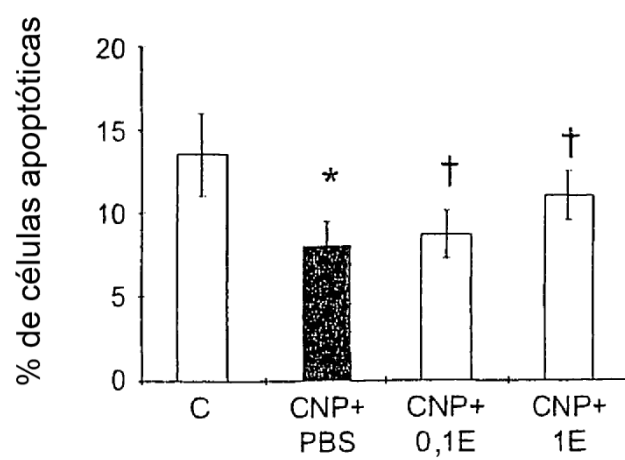


Fig. 1

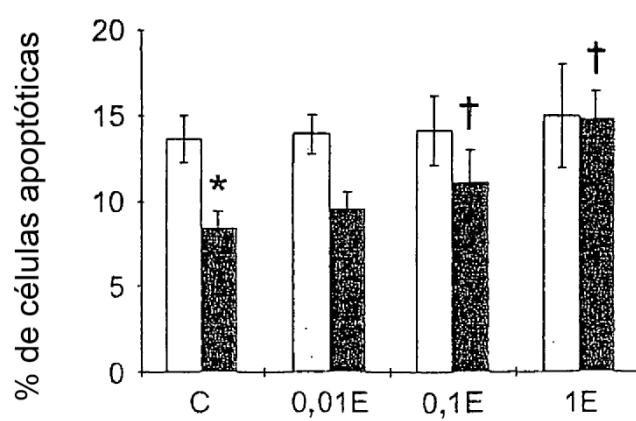


Fig. 2

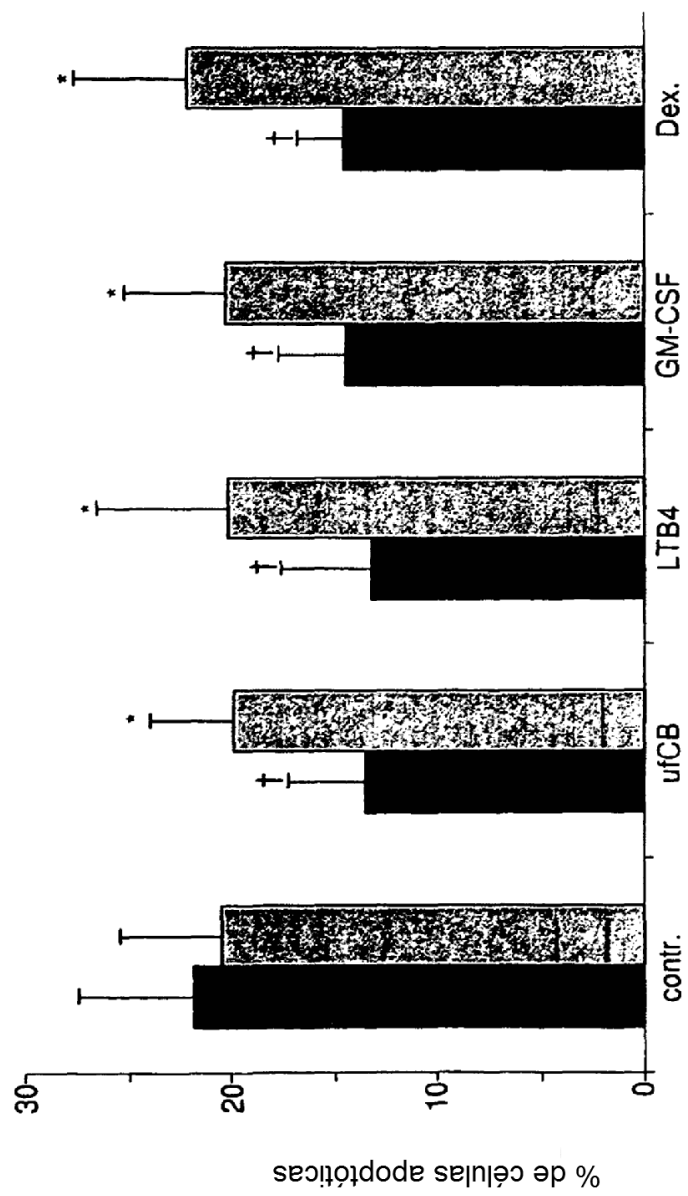


Fig. 3

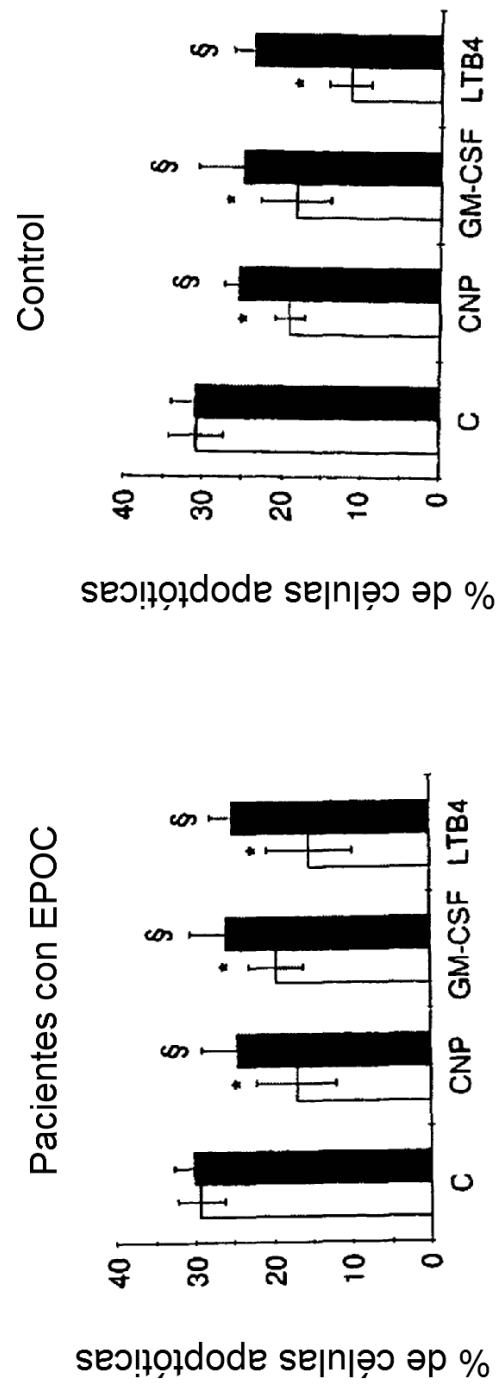


Fig. 4

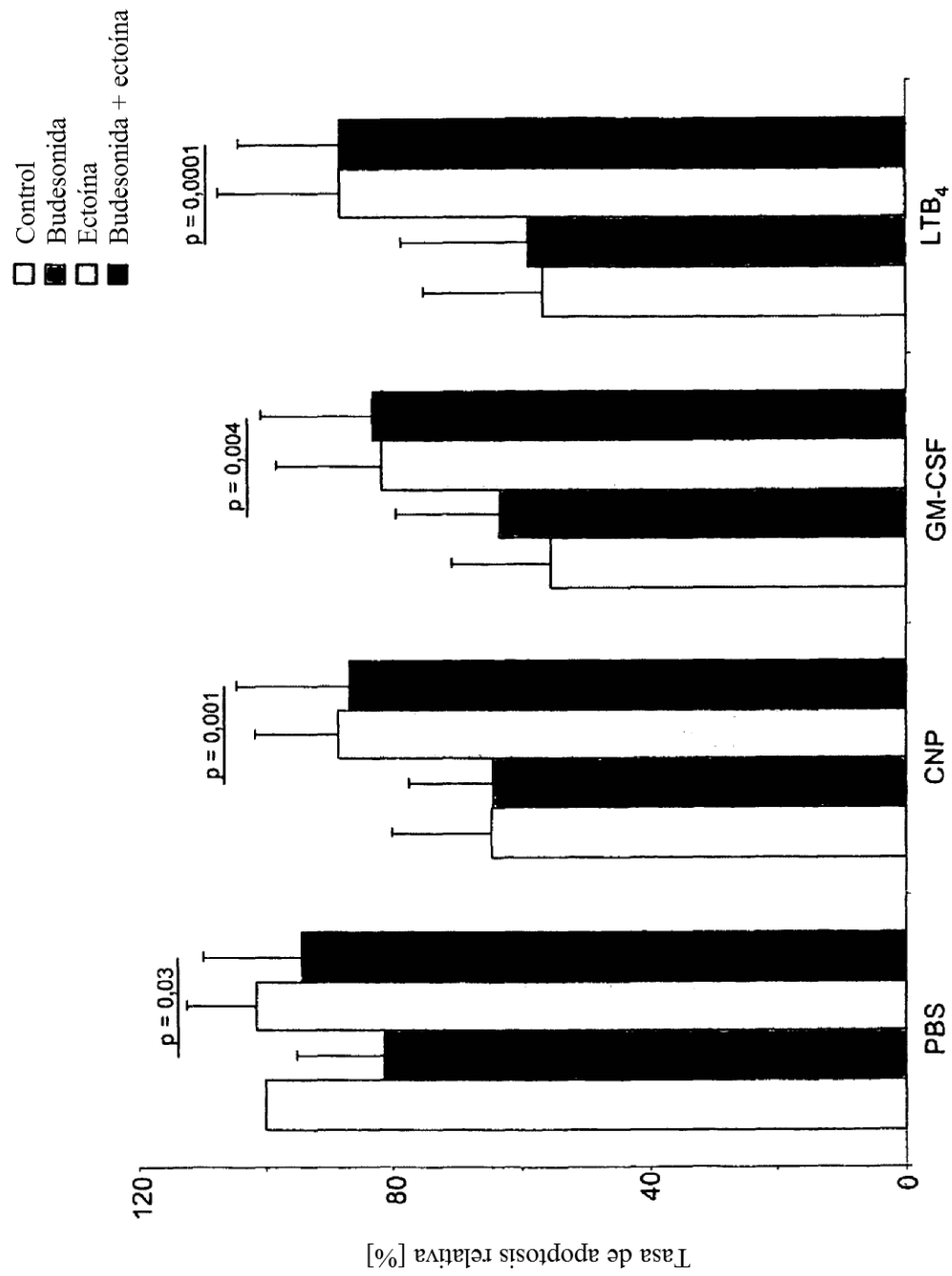


Fig. 5 A

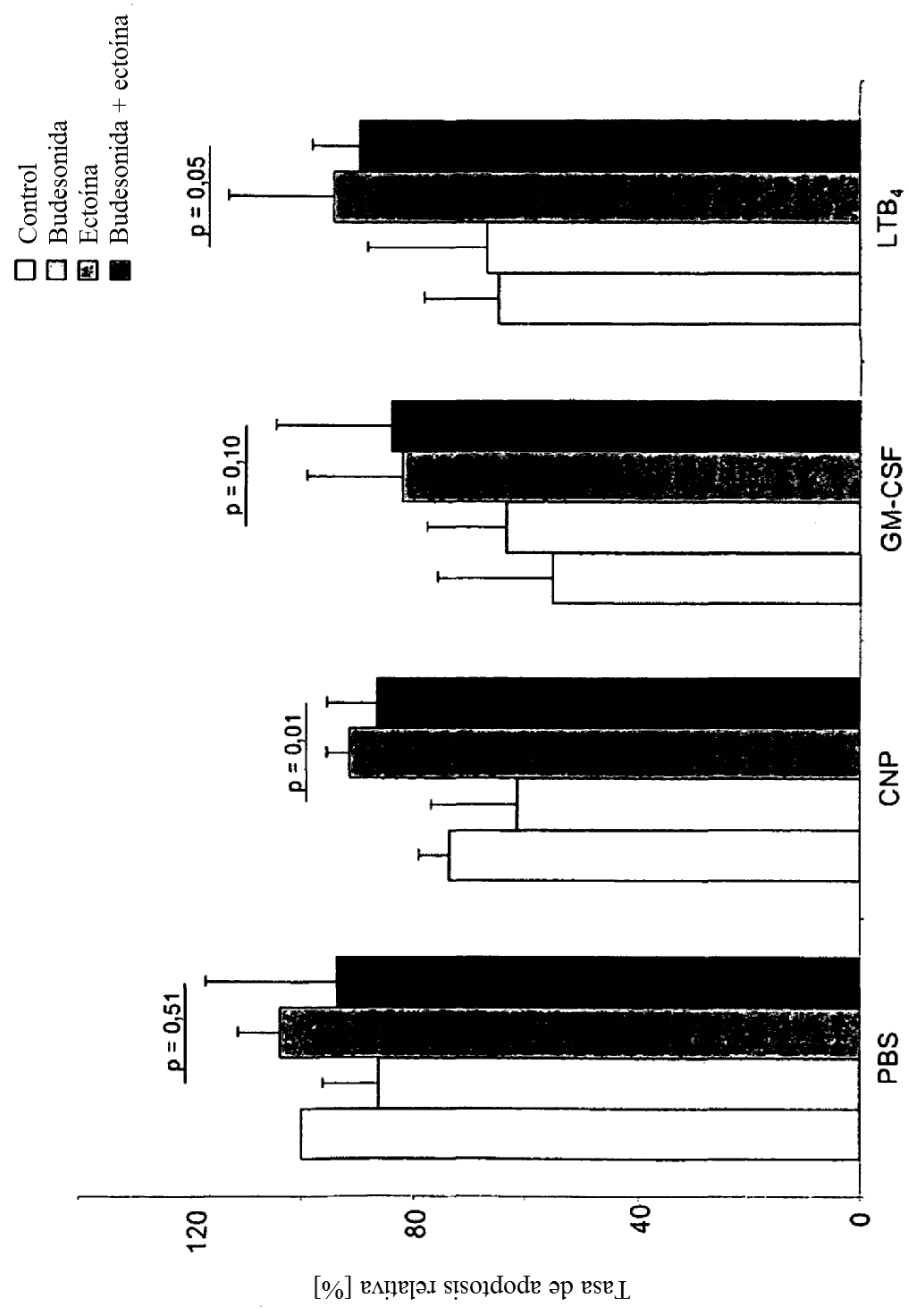


Fig. 5 B

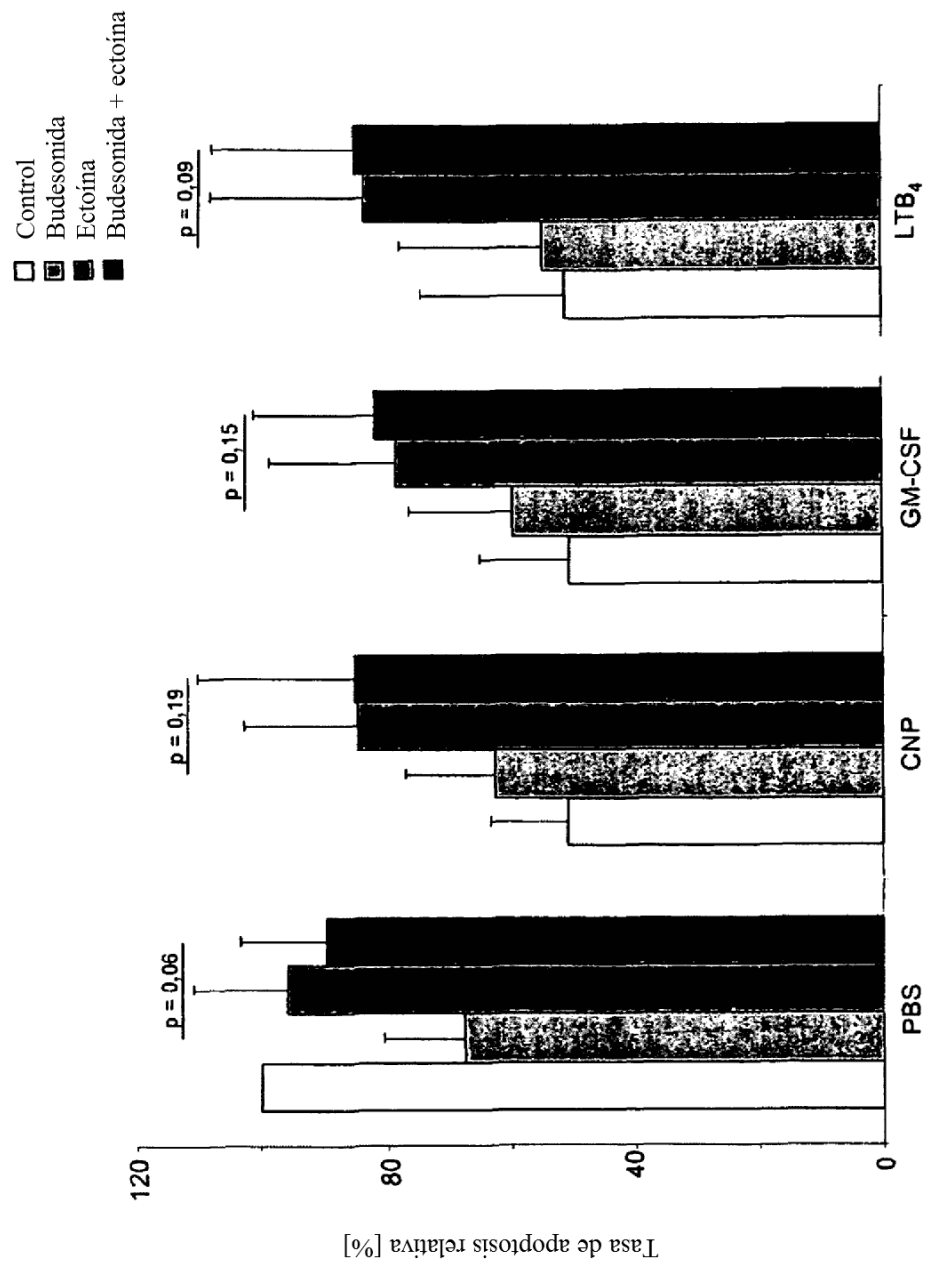


Fig. 5 C

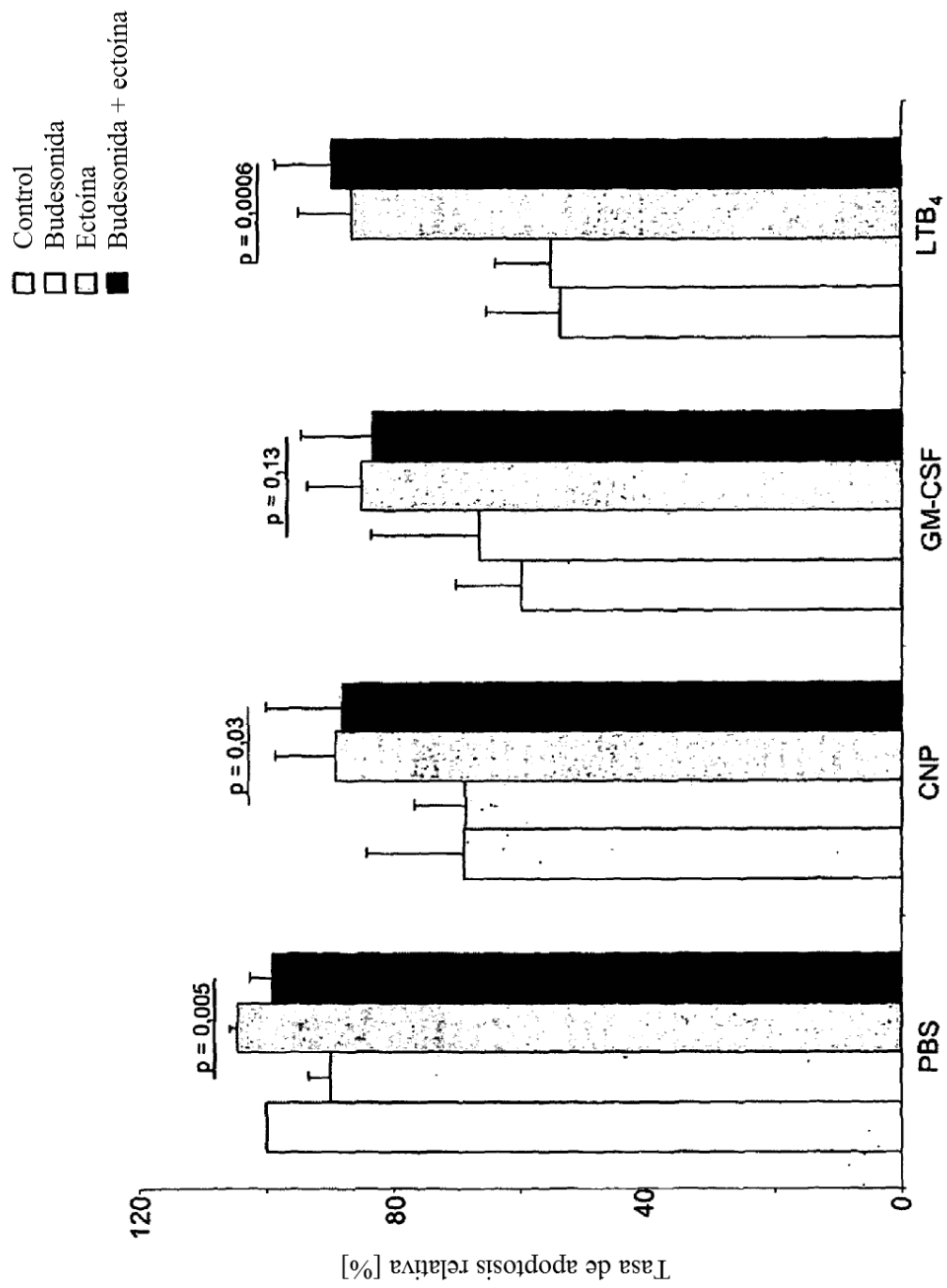


Fig. 5 D

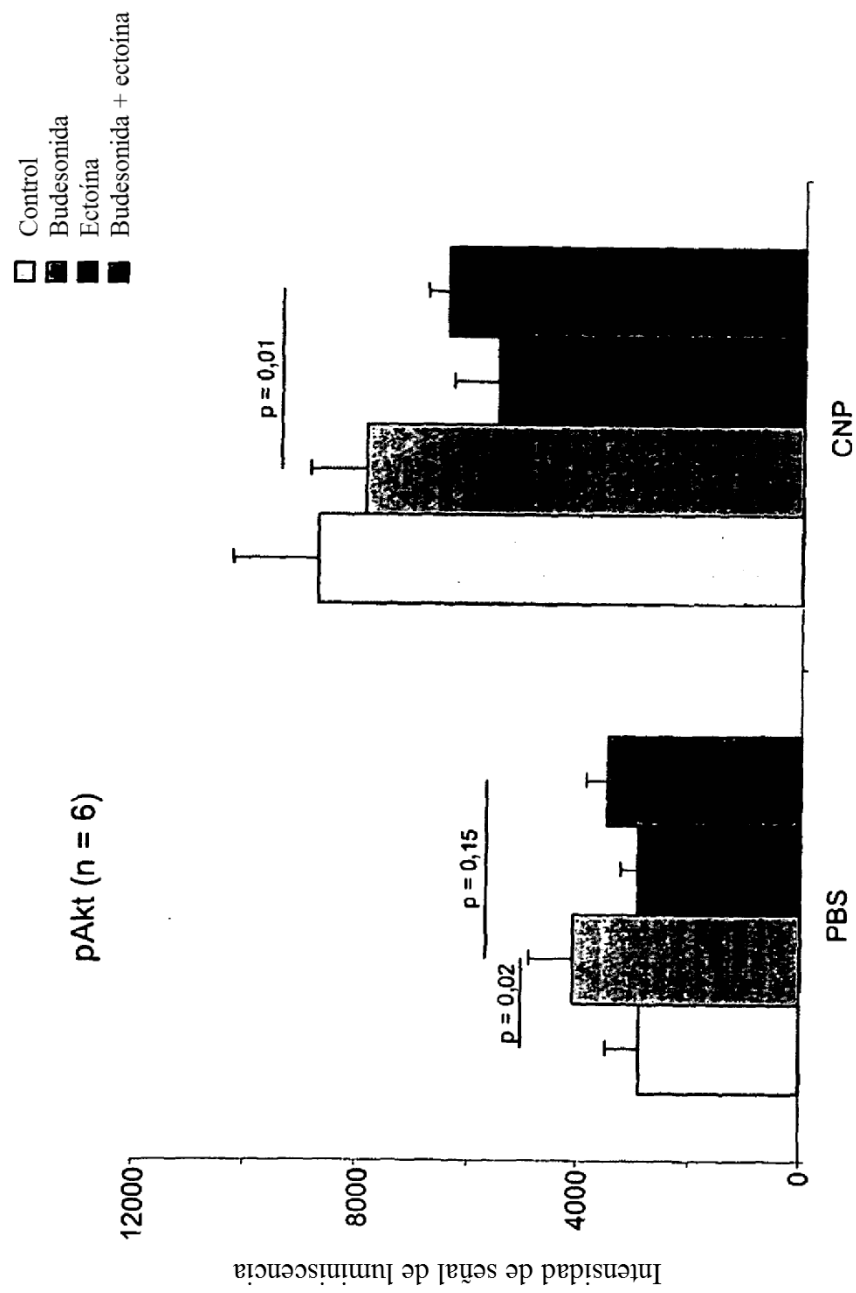


Fig. 6 A

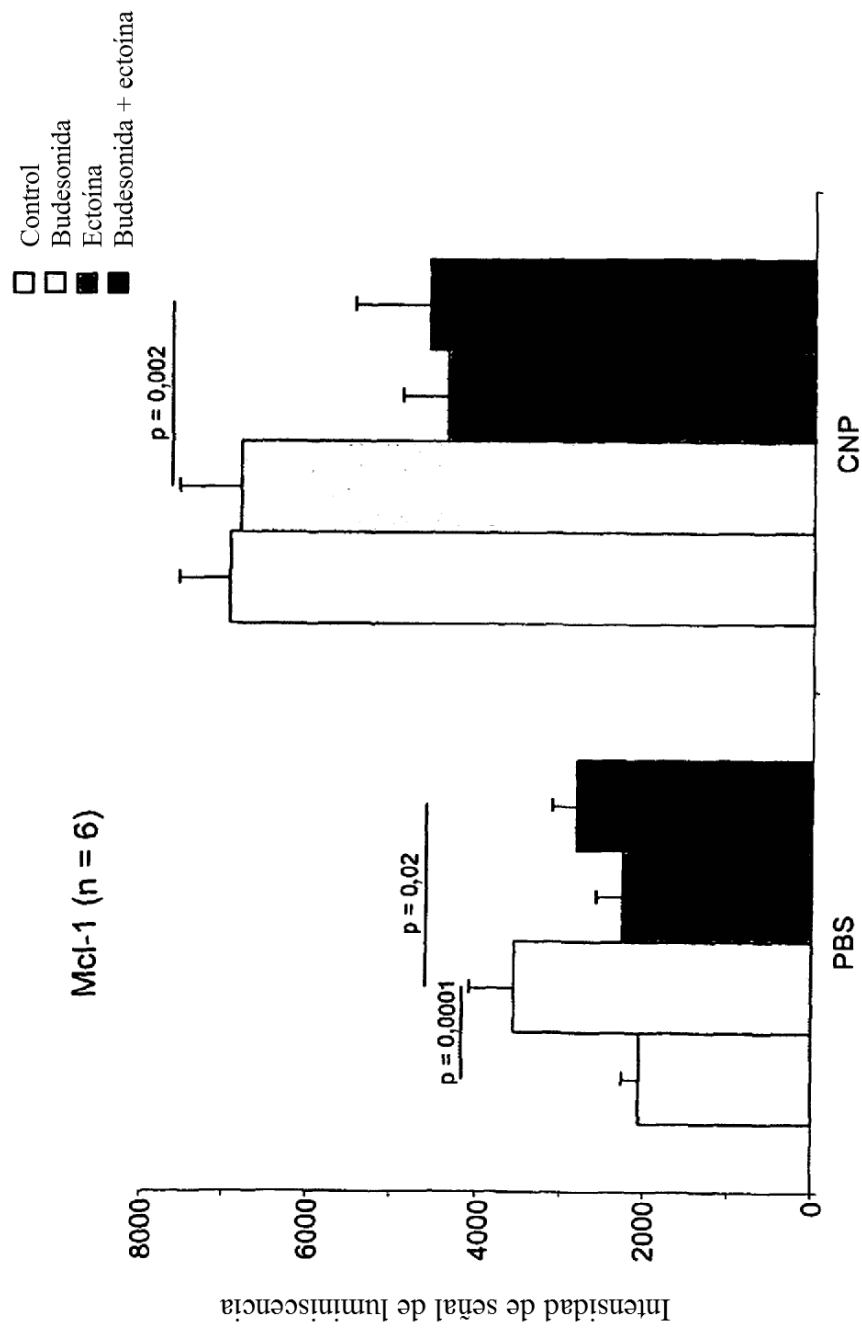


Fig. 6 B

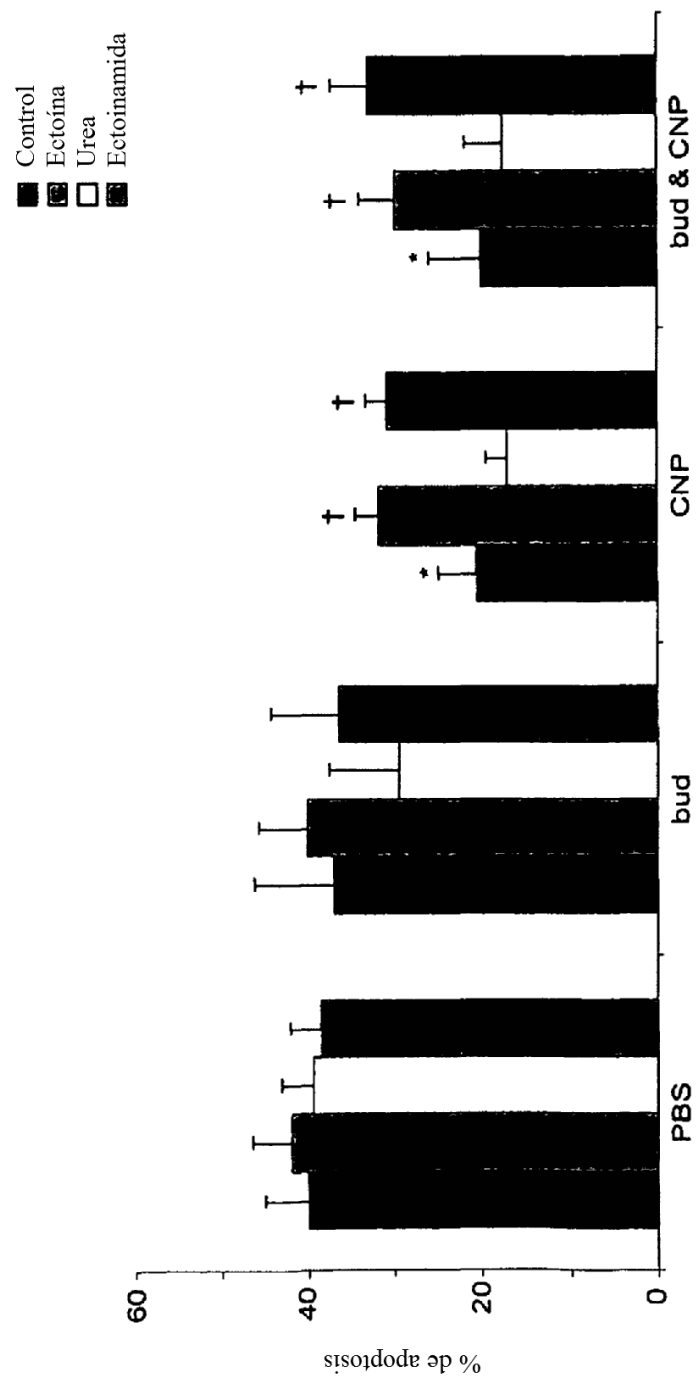


Fig. 7