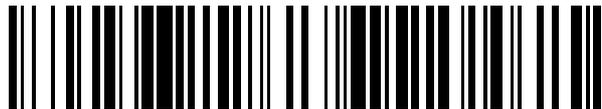


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 750**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2016 PCT/EP2016/064161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17067677**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2016 E 16732559 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3325012**

54 Título: **Composición que contiene monoterpeno para el tratamiento de pólipos nasales**

30 Prioridad:

23.10.2015 DE 102015013667

26.10.2015 DE 102015013921

12.11.2015 DE 102015119541

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

04.06.2020

73 Titular/es:

**MARIA CLEMENTINE MARTIN KLOSTERFRAU
VERTRIEBSGESELLSCHAFT MBH (100.0%)**

Gereonsmühlengasse 1-11

50670 Köln , DE

72 Inventor/es:

UNKAUF, MARKUS;

WOLLENBERG, BARBARA y

PRIES, RALPH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 764 750 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

Composición que contiene monoterpeno para el tratamiento de pólipos nasales

La presente invención se refiere al campo técnico del tratamiento o la terapia de pólipos nasales (designados médicamente y sinónimos también de *Polyposis nasi et sinuum* o abreviadamente solo como *Polyposis nasi*).

5 Particularmente, la presente invención se refiere a una composición, particularmente a una composición farmacéutica o a un medicamento, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) y al correspondiente uso de esta composición o este medicamento para el fin terapéutico citado.

Además, la presente invención se refiere a una combinación de principios activos, particularmente en forma de un kit (kit de piezas), para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

10 Finalmente, la presente invención se refiere al uso de cineol, particularmente 1,8-cineol, para la regulación de la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señales de Wnt/beta-catenina, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), o al uso de cineol, particularmente 1,8-cineol, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de afecciones que están relacionadas con y/o inducidas por y/o favorecidas por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señales de Wnt/beta-catenina, particularmente de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

15 Los pólipos nasales son particularmente proliferaciones blandas generalmente benignas de la mucosa nasal que generalmente sobresalen hasta las fosas nasales. Brotan por así decir de la mucosa de la nariz, con la que están unidos por una especie de tallo. Muchos pólipos nasales son solo de pocos milímetros de tamaño y no perjudican, o apenas, mientras que otros pueden crecer hasta entidades extendidas que pueden entonces incluso obstruir las cavidades nasales. Ya que esto limita la respiración nasal, la afección puede ser muy molesta y limitar enormemente la calidad de vida. Los pólipos nasales pueden conducir, aparte de a la incapacidad de respiración nasal, además también a una pérdida de olfato y a otras afecciones de los senos paranasales, como se declara a continuación.

20 Los pacientes con pólipos nasales están afectados así normalmente por una respiración nasal limitada: estos pacientes no reciben suficiente aire por la nariz y respiran de ese modo más a menudo por la boca. Los afectados roncan por ello frecuentemente y padecen a menudo de trastornos del sueño, de forma que su capacidad de rendimiento está limitada en conjunto. Además, el aire respirado por la boca no se filtra, de forma que se eleva el riesgo de infección general. Los afectados tienen a menudo la sensación de tener constantemente la denominada nariz taponada, lo que también puede conducir a una voz nasal. Además, estos pacientes padecen a menudo de inflamaciones recurrentes de los senos paranasales (*Sinusitis*) y cefaleas sordas. Además, su capacidad olfativa puede estar limitada y de ese modo también el sentido del gusto, lo que a su vez conlleva una pérdida de la calidad de vida. Los pólipos nasales en los niños pueden causar además inflamación del oído medio (*Otitis media*).

25 Los pólipos nasales son pues en general desde el punto de vista patofisiológico engrosamientos pedunculados grises pálidos de mucosa inflamada y edematosa crónica en las fosas nasales, que destacan principalmente de la zona etmoidal, el meato nasal medio y el cornete nasal medio, es decir pues proliferaciones benignas que proceden de una mucosa nasal permanentemente inflamada. Estos engrosamientos están compuestos en general por mucosa que proviene particularmente de las células etmoidales o de los senos maxilares. Se observan microscópicamente depósitos de fluido y células inflamatorias endógenas. Como localización original, podría identificarse la mucosa del cornete nasal medio así como del meato nasal medio, estando aún sin resolver por qué el cornete nasal inferior en general no tiende a la formación de pólipos.

30 Los pólipos nasales se caracterizan histológicamente por edema y/o fibrosis, una vascularización disminuida así como un número disminuido de glándulas y terminaciones nerviosas en el epitelio a menudo dañado. En la revisión histológica de pólipos nasales puede describirse una separación bruta en pólipos eosinófilos, que corresponden al 65 a 90 % de los casos de pacientes, y pólipos neutrófilos. En la eosinofilia de tejido aumentada subyace una migración transendotelial incrementada y una inhibición de la muerte celular programada en eosinófilos.

35 Clínicamente, la *Polyposis nasi et sinuum* caracterizada por una inflamación dominada por eosinófilos está acompañada en hasta un 25 % de los casos con intolerancia al ácido acetilsalicílico. En hasta un 40 %, la *Polyposis nasi et sinuum* está asociada a un asma bronquial. En caso de aparecer estos factores conjuntamente, se habla de la tríada de Samter o Widal. Se describen también relaciones aseguradas entre la *Polyposis nasi et sinuum* eosinófila y el síndrome de Churg-Strauss, una inmunovascularitis eosinófila.

40 El mecanismo de generación exacto de los pólipos nasales es todavía desconocido: un pólipo nasal crece normalmente desde uno de los senos paranasales a las fosas nasales. Principalmente, los pólipos nasales se generan en los senos maxilares (*Sinus maxillaris*) o las células etmoidales (*Cellulae ethmoidales*). Aparecen por los conductos excretores y se encuentran la mayoría de veces en el meato nasal medio bajo el cornete nasal medio.

45 Los pólipos nasales están ciertamente ampliamente extendidos. Sin embargo, las causas exactas de su generación están aún sin resolver. Hasta ahora, es conocido que existen algunas afecciones basales en que los afectados desarrollan más frecuentemente pólipos nasales (p. ej., pacientes con *Asthma bronchiale*, de los que hasta un 40 %

padecen también pólipos nasales, o bien pacientes con reacción alérgica con relación al ácido acetilsalicílico, de los que aproximadamente un 25 % desarrollan pólipos nasales).

5 Parecer ser también un factor de riesgo adicional para la formación de pólipos nasales una tendencia general (disposición) de la mucosa a inflamaciones. Como otros factores de riesgo para la generación de pólipos nasales se consideran además la alergia anteriormente mencionada contra analgésicos, *Asthma bronchiale*, bronquitis, síndrome de Kartagener y mucoviscidosis (fibrosis quística).

10 Para detalles adicionales del cuadro clínico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) puede remitirse por ejemplo también a Pschyrembel, Medizinisches Wörterbuch, 257ª edición, 1993, Verlag Walter de Gruyter, palabras clave "pólipos nasales" y "Polyposis nasi", así como a Roche Lexikon Medizin, 3ª edición, 1993, Urban & Schwarzenberg Verlag, palabras clave "pólipo nasal" y "poliposis".

El tratamiento de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente un tratamiento duradero, a base de métodos de terapia convencionales se demuestra a menudo como difícil y poco eficaz, particularmente a causa de las altas tasas de recidiva, y está ligado para los pacientes afectados la mayoría de veces con efectos secundarios e incomodidades indeseados.

15 Dependiendo de lo intensas que sean las molestias por los pólipos nasales, se lleva a cabo una terapia conservadora, particularmente medicamentosa, o un tratamiento operatorio de los pólipos nasales.

Ya que los pólipos nasales crecen lentamente, a menudo los pacientes se acostumbran a los síntomas y buscan ayuda médica en general solo en un punto temporal relativamente tardío. Con las formas de terapia convencionales, pueden aliviarse ciertamente las molestias agudas.

20 Así, por ejemplo, una eliminación operatoria de los pólipos nasales puede mejorar rápidamente con frecuencia las molestias agudas; no obstante, se forman pólipos nasales de nuevo en aproximadamente un 75 % de los pacientes tratados de este modo en los primeros años después de la eliminación. Por tanto, se proporcionan en el estado de la técnica también después de una operación de pólipos nasales corticosteroides tópicos de larga duración (p. ej., como pulverizador nasal que contiene cortisona) o bien también para aplicación sistémica (acompañada de una pluralidad de efectos secundarios indeseados) para reducir los pólipos que aparecen de nuevo en la nariz (lo que a menudo sin embargo no se consigue).

30 Las afecciones poco pronunciadas pueden tratarse en cambio en primer lugar de forma conservadora mediante administración tópica y/o sistémica de corticosteroides o glucocorticoides. Los corticosteroides o glucocorticoides actúan inhibiendo la inflamación y alivian de este modo las reacciones inflamatorias, entre las que se cuentan también la hinchazón de la mucosa nasal. Con tal terapia de corticosteroides, los corticosteroides se han de aplicar regularmente durante varios meses. Con frecuencia, los síntomas mejoran solo después de varias semanas de la aplicación.

35 Particularmente los pólipos nasales acompañantes de eosinofilia se caracterizan por una grave reacción inflamatoria, que se caracteriza por citocinas (como IL-5) y quimiocinas (como eotaxina y RANTES). Los corticosteroides actúan típicamente con especial contundencia en inflamaciones asociadas a eosinofilia, por lo que el parámetro "eosinofilia" se designa frecuentemente como indicador del empleo de este medicamento. Así, pudo comprobarse que los esteroides inducen la apoptosis de estas células inflamatorias, en los que la fuerza del efecto supresor sobre la producción de IL-5 por linfocitos T podría ser un parámetro decisivo. La terapia sintomática en pólipos nasales pudo establecerse ya mediante estudios con los primeros corticosteroides para administración tópica. En los últimos años, las observaciones clínicas se apoyaron crecientemente en parámetros objetivos (rinomanometría, rinometría, flujo inspiratorio nasal máximo PNIF, tomografía de resonancia magnética). También las tasas de recidiva o el punto temporal de la recidiva después de la operación pudieron mejorarse o posponerse en algunos estudios, en los que sin embargo los exámenes no superan el periodo de un año. La dosificación de esteroides tópicos utilizada en los estudios se encuentra frecuentemente por encima de la dosificación recomendada para rinitis alérgica.

45 Por lo general, sin embargo, se requiere una terapia quirúrgica (p. ej., una infundibulotomía) para tratar eficazmente la reducción de la respiración nasal y la pérdida de olfato. Dichas operaciones se llevan a cabo particularmente de modo endonasal y preferiblemente mínimamente invasivo y pueden llevar a tasas de curación de hasta aproximadamente un 50 % y una mejora de las molestias de hasta aproximadamente un 90 % de los casos. Además de la eliminación de los pólipos nasales, se ensanchan habitualmente además también los conductos excretores de los senos paranasales, de forma que estos ventilan mejor y deberían inflamarse menos fácilmente. Dado que los pólipos nasales y las afecciones de senos paranasales de poliposis crónica tienden a recidivas, son necesarias a menudo con la evolución de la enfermedad varias operaciones. Dichas operaciones de senos paranasales mínimamente invasivas se cuentan entre las intervenciones exigentes en el campo de la otorrinolaringología y están ligadas muchas veces a una estancia hospitalaria de varios días para los pacientes afectados y con un tratamiento posterior intensivo, que particularmente comprende el empleo de corticosteroides tópicos durante varios meses como ensayo de tratamiento para la profilaxis de recidivas. Con una terapia de esteroides posoperatorios de varios meses, parece que se llega también a una curación de heridas mejorada después de una terapia quirúrgica; sin embargo, no se presentan exámenes controlados de curación de heridas después de operaciones sinusales.

Para detalles adicionales de la terapia de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) puede remitirse por ejemplo también a las directrices relevantes "Rinosinusitis" y "Diagnóstico y terapia de sinusitis y Polyposis nasi" de la Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie.

5 Los conceptos de terapia del estado de la técnica recurren pues a métodos operatorios para la eliminación de los pólipos nasales y/o a conceptos de terapia conservadora basada en corticosteroides, en los que estos métodos del estado de la técnica están unidos a incomodidades y efectos secundarios considerables para los pacientes afectados. Particularmente, con los conceptos de terapia del estado de la técnica a menudo no puede reducirse de forma eficaz una recidiva de los pólipos nasales, particularmente también después de estados posoperatorios, de forma que los pacientes afectados deben someterse varias veces a intervenciones operatorias de pólipos nasales recidivantes. 10 Además, los conceptos de terapia conservadora basada en corticosteroides, particularmente en estados posoperatorios, son indeseados precisamente en el tratamiento de niños, particularmente niños pequeños, a causa del perfil de efectos secundarios no desdeñable de estos principios activos.

15 En relación con los conceptos de terapia del estado de la técnica, el documento FR 2956817 A describe una composición para uso terapéutico en la prevención o el tratamiento de queratosis en el estadio de transformación de queratinocitos precancerosos (pre malignos) o cancerosos o de un carcinoma procedente de la transformación de una queratosis, que comprende al menos un componente de aceites esenciales de las plantas *Oregano compactum* o *Aniba rosaeodora*.

20 Además, la publicación científica según T. Nishra et al., "Composition and in vitro cytotoxic activities of essential oil of *Hedychium spicatum* from different geographical regions of western Himalaya by principal components analysis", Natural Product Research, vol. 30, n.º 10, 21 de julio de 2015, páginas 1224 a 1227 se refiere solo a composiciones y exámenes *in vitro* de la actividad citotóxica de aceites etéricos de *Hedychium spicatum* de distintas regiones geográficas de la cordillera del Himalaya occidental mediante análisis de los componentes principales.

25 El problema subyacente de la presente invención consiste por tanto en la provisión de un concepto de terapia novedoso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en el que se eviten al menos en gran medida las desventajas anteriormente reflejadas del estado de la técnica o bien puedan al menos atenuarse.

Particularmente, uno de tales conceptos de terapia frente a los métodos de terapia convencionales debe estar ligado a menos efectos secundarios y/o incomodidades para los pacientes afectados y/o a al menos una eficiencia comparable, preferiblemente incluso una eficiencia mejorada.

30 Para la resolución del problema anteriormente reflejado, la presente invención propone, según un primer aspecto de la presente invención, una composición que contiene cineol, particularmente una composición farmacéutica que contiene cineol según la reivindicación 1; otras configuraciones particularmente ventajosas de la composición según la invención son objeto de las reivindicaciones subordinadas respectivas.

35 Igualmente, la presente invención se refiere, según un segundo aspecto de la presente invención, a un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) o para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) según la reivindicación respectiva (reivindicación 13).

40 Además, la presente invención se refiere, según un tercer aspecto adicional de la presente invención, a una combinación de principios activos, particularmente en forma de un kit (kit de piezas), para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) o para el uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) según la reivindicación respectiva (reivindicación 14).

45 Finalmente, la presente invención, se refiere según un cuarto aspecto nuevamente adicional de la presente invención, a cineol, particularmente 1,8-cineol, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de afecciones que están relacionadas con y/o inducidas por y/o favorecidas por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señales de Wnt/beta-catenina, particularmente de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), preferiblemente de formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), según la reivindicación respectiva (reivindicación 15).

50 Se entiende en las siguientes realizaciones por sí mismas que las configuraciones, formas de realización, ventajas y similares que se declaran a continuación solo en un aspecto de la invención con el fin de evitar repeticiones sean correspondientemente válidas por supuesto también con relación al resto de aspectos de la invención, sin necesidad de una mención especial de ello.

55 En todos los datos referidos al peso relativos o porcentuales citados a continuación, particularmente datos de cantidades, se observa además que estos se seleccionan en el marco de la presente invención por el especialista de forma que la suma con inclusión de todos los componentes o ingredientes, particularmente como se definen a continuación, complete o sume siempre 100 % o 100 % en peso; esto se entiende sin embargo por el especialista mismo.

Por lo demás, es válido que el especialista pueda desviarse de los datos de peso, cantidad e intervalo alegados a continuación según la aplicación o dependiendo del caso individual sin apartarse del marco de la presente invención.

Además, es válido que todos los datos de valores o parámetros o similares citados a continuación puedan estimarse o determinarse en principio con procedimientos de determinación estandarizados o dados explícitamente o de otro modo con métodos de determinación o medida corrientes para el especialista en este campo.

Dicho esto, la presente invención se ilustra de aquí en adelante con detalle.

Es por tanto objeto de la presente invención, según un **primer** aspecto de la presente invención, una composición, particularmente una composición farmacéutica, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en la que la composición contiene como principio activo, particularmente principio activo farmacéutico, preferiblemente 1,8-cineol.

La presente invención o el presente concepto de terapia para el tratamiento de pólipos nasales está ligado con una pluralidad de ventajas y particularidades que se declaran a continuación de modo no limitante, sin pretensión de recopilación exhaustiva:

En el marco de la presente invención puede ponerse a disposición por primera vez un concepto de terapia novedoso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) con el que pueden evitarse o bien al menos atenuarse en gran medida las desventajas reflejadas anteriormente del estado de la técnica. Particularmente, el concepto de terapia según la invención, frente a los métodos de terapia convencional, está ligado con menos efectos secundarios y/o incomodidades para los pacientes afectados, en el que en el marco de la presente invención se pone a disposición una eficiencia al menos comparable, preferiblemente incluso mejorada, en comparación con los conceptos de terapia del estado de la técnica.

Como ha descubierto sorprendentemente la solicitante, pueden lograrse con el principio activo cineol, particularmente 1,8-cineol, en el tratamiento de pólipos nasales resultados casi comparables a con el uso de glucocorticoides, en el que sin embargo el cineol como principio activo natural no presenta los graves efectos secundarios ligados con corticosteroides. Al respecto, el cineol puede utilizarse como monoterapia o bien también en el tratamiento de casos más graves también en combinación con corticosteroides, en el que mediante el uso conjunto o combinado de cineol puede incluso potenciarse su acción o reducirse no desdeñablemente su dosis (y esto a igual eficiencia).

Como se expone a continuación, puede disminuirse significativamente la tasa de recidiva, particularmente en el tratamiento de estados posoperatorios.

Al respecto, ha de considerarse también que el principio activo cineol puede administrarse en el marco de la presente invención por vía tópica (p. ej., intranasal) y/o sistémica (p. ej., oral). Tanto en la aplicación tópica, en que se aporta el cineol en general directamente sobre la mucosa nasal, como en la aplicación sistémica (p. ej., oral), se emplea el perfil de acción antiflogístico de tipo corticosteroide del cineol

Como ha descubierto sorprendentemente además la solicitante, pueden tratarse con el concepto según la invención particularmente formas recidivantes de pólipos nasales de forma más eficaz que con la aplicación de conceptos de terapia convencionales no se han podido tratar hasta ahora o no satisfactoriamente.

Como se declara igualmente a continuación, con el concepto de terapia según la invención pueden tratarse precisamente también en relación con la señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, formas que están relacionadas, particularmente formas recidivantes, de pólipos nasales, que no han podido tratarse hasta ahora satisfactoriamente de forma eficaz mediante conceptos de terapia convencionales del estado de la técnica.

En conjunto, la presente invención pone a disposición por tanto un concepto de terapia utilizable eficaz y flexible que recurre a un principio activo natural (a saber, cineol, particularmente 1,8-cineol), con el que no están ligados efectos secundarios indeseados apreciables. Particularmente, el concepto de terapia según la invención puede combinarse de forma más eficaz y flexible también con conceptos de terapia convencionales; así puede utilizarse por ejemplo el concepto de terapia según la invención después de una eliminación quirúrgica de pólipos nasales para reducir la formación de recidivas, o bien puede combinarse el concepto de terapia según la invención con corticosteroides aplicados por vía sistémica y/o tópica, particularmente con la condición de potenciar su forma de acción o reducir su dosis (y por tanto también el perfil de efectos secundarios de estos corticosteroides).

En lo que concierne en el marco de la presente invención al principio activo utilizado cineol, particularmente 1,8-cineol, ha de declararse al respecto lo siguiente:

El 1,8-cineol pertenece a los epoximonoterpenos bicíclicos, más precisamente llamados óxidos de limoneno. Son denominaciones sinónimas de 1,8-cineol de fórmula química molecular $C_{10}H_{18}O$ eucaliptol, 1,8-óxido de limoneno, 1,8-epoxi-p-mentano o 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano. Se trata de un líquido incoloro con olor picante similar al alcanfor con un punto de fusión de +1,5 °C y un punto de ebullición de 176 a 177 °C, que es insoluble en agua pero miscible con la mayoría de disolventes orgánicos. En forma natural, el 1,8-cineol aparece como componente principal

del aceite de eucalipto (el aceite de eucalipto contiene hasta 85 % en peso de 1,8-cineol), pero también en otras plantas, como p. ej. en menta, salvia, tomillo, albahaca y en árbol del té. Además, el 1,8-cineol está contenido por ejemplo en aceite de niaouli, junípero, Piper, cannabis, cajeput, salvia, mirto y otros aceites etéricos. El 1,8-cineol técnico, que es en general de 99,6 a 99,8 %, se obtiene en general mediante destilación fraccionada de aceite de eucalipto. El 1,8-cineol se aplica en el estado de la técnica particularmente como expectorante en catarros bronquiales y otras afecciones de las vías respiratorias principalmente en la medicina veterinaria, pero además también como sustancia aromatizante en la industria de perfumes. Además, el 1,8-cineol se usa en la medicina dental en la revisión de obturaciones radiculares.

Desde el punto de vista farmacológico, el 1,8-cineol actúa en las vías respiratorias superiores e inferiores, particularmente en los pulmones y en los senos paranasales, es expectorante y bactericida. Además, inhibe determinados neurotransmisores que son responsables, p. ej., del estrechamiento de los bronquios (en afecciones pulmonares obstructivas crónicas y asma bronquial puede mejorar por tanto mediante la toma de 1,8-cineol puro la función pulmonar). Debido a su acción de tipo corticosteroide, el cineol puede aplicarse como sustituto o en comedición con corticosteroides. El 1,8-cineol puede aplicarse, como se declara a continuación, en principio tanto por vía tópica, p. ej. (intra)nasal y/o inhalativa, o bien sistémica, particularmente oral (p. ej., en forma de cápsulas).

Como principio activo, el 1,8-cineol posee pues acciones expectorantes así como inhibidoras de la inflamación. En la aplicación sistémica, el 1,8-cineol se resorbe fácilmente y llega a actuar mediante la corriente sanguínea en los órganos respiratorios. El 1,8-cineol puede licuar de este modo por ejemplo secreciones inflamatorias así como moco duro en las vías aéreas y contrarrestar procesos inflamatorios en las vías respiratorias. En el intervalo de las vías aéreas superiores, decrecen la incapacidad de respiración nasal en resfriados y el entumecimiento de la cabeza.

Para detalles adicionales del principio activo 1,8-cineol, puede remitirse por ejemplo a Römpf Chemielexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/Nueva York, 10ª edición, vol. 1, 1996, página 752, palabra clave: "Cineol", así como a la bibliografía allí referida.

Sorprendentemente, la solicitante ha encontrado en adelante en el marco de sus estudios científicos de varios años una indicación médica adicional que con el principio activo de base natural cineol, particularmente 1,8-cineol, puede tratarse más eficazmente y sin efectos secundarios, a saber, pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente también para las formas con tendencia a la formación de recidiva de pólipos nasales.

Particularmente, puede utilizarse en el marco de la presente invención la composición según la invención y/o el cineol para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*). Dichas dolencias no son tratables satisfactoriamente con los métodos de terapia convencionales.

Según una forma de realización especial de la presente invención, se utiliza la composición según la invención y/o el cineol para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de formas que están relacionadas con la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), preferiblemente para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de formas inducidas y/o favorecidas por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

Dichas formas o estados de pólipos nasales no pueden tratarse o someterse a terapia o no siempre satisfactoriamente hasta ahora con los conceptos de terapia convencionales.

La denominada ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, es una de las muchas rutas de transducción de señal mediante las que las células pueden reaccionar ante señales externas. Esta ruta de señalización se nombra según su ligando "Wnt", una proteína señal que ocupa una función importante como mediador local en el desarrollo de distintas células animales.

El acrónimo "Wnt" mismo está fundamentado históricamente y está compuesto por los constituyentes "Wg" por un lado e "Int-1" por otro lado: la parte del acrónimo "W" proviene de la raíz "Wg", que a su vez representa la palabra inglesa "wingless" (sin alas) y designa aquel factor de crecimiento de la familia de Wnt que se descubrió el primero (cuando el gen Wg está mutado, se genera en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* una variante sin alas). La parte del acrónimo "nt" proviene del gen Int, que en el ratón potencia o desencadena el desarrollo de cáncer de mama cuando se activa. En conjunto, se identificaron en total 19 genes Wnt distintos.

En la transducción de señal de la ruta de señalización de Wnt participan numerosas proteínas. Es esencial para el desarrollo embrionario normal (embriogénesis) y se observa también en determinadas formas de cáncer. Según el nivel de conocimientos actual, la proteína señal Wnt se une al receptor "Frizzled" (junto con el correceptor "LRP" [proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad]), que activa la proteína "Dishevelled (DVL)", que a su vez actúa inhibiendo un complejo proteico (compuesto por GSK-3 [una proteína cinasa], la proteína supresora tumoral APC y la proteína axina 1) que normalmente descompone la beta-catenina. Ya que ahora se inhibe la degradación de beta-catenina, se acumula ésta en el citoplasma y en el núcleo celular. En el núcleo celular, la beta-catenina forma con TCF/LEF un complejo proteico y activa de este modo genes diana específicos. El gen APC es un gen supresor tumoral que se encontró por primera vez mutado en un tipo determinado de cáncer intestinal, sin embargo, este gen puede mutar también en otros tipos de cáncer; el gen APC codifica la proteína APC, que en la ruta

de señalización de Wnt participa en la degradación de beta-catenina.

La ruta de señalización de Wnt es importante en muchos procesos en el marco del desarrollo embrionario (embriogénesis), como p. ej. en la formación de los ejes corporales y la formación de los órganos primordiales. En células adultas en cambio, es por lo general inactiva, pero en células tumorales puede presentarse de nuevo activado.

5 En células en que la ruta de señalización de Wnt está inactiva, se presenta beta-catenina unida en un complejo que conduce a la descomposición continua de beta-catenina; de este modo se impide que la beta-catenina active la transcripción de determinados genes. Este complejo, que se designa también como complejo de destrucción, está compuesto por distintas proteínas, figurando entre las más importantes, axina, proteína cinasa GSK-3 y la proteína supresora tumoral APC. Cuando la beta-catenina se presenta en este complejo, puede unirse y ubiquitinarse por beta-TrCP; esta ubiquitinación conduce a que la beta-catenina se descomponga en el proteosoma. Pero cuando "Wnt" se une a su receptor "Frizzled" y al correceptor "LRP", activa la proteína "DVL" que inhibe el complejo de destrucción; la beta-catenina se libera y no puede descomponerse más, y se acumula y llega también al núcleo celular, donde se une conjuntamente con otras proteínas a un factor de transcripción que de esta modo se activa, lo que a su vez da como resultado la transcripción de distintos genes (p. ej., ciclina D1 y MYC).

10 En este contexto pues, la solicitante ha encontrado de forma completamente sorprendente que las formas o configuraciones relevantes de la afección subyacente (es decir, pólipos nasales [*Polyposis nasi et sinuum*]) están relacionadas con la ruta de señalización de Wnt en cuestión, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, y ciertamente en particular en cuanto que las formas relevantes de la afección (es decir pólipos nasales) están relacionadas con la activación de la ruta de señalización en cuestión y en este sentido se inducen, y ciertamente en particular en cuanto que la afección se acelera o favorece en su evolución de modo desventajoso para los pacientes.

15 Particularmente, la solicitante ha encontrado de forma completamente sorprendente que el cineol utilizado en el marco de la presente invención como sustancia activa, particularmente 1,8-cineol, es capaz de influir en la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, y particularmente de inhibir, lo que está acompañado de una proliferación celular reducida con relación a las formas relevantes en cuestión de la afección (es decir, pólipos nasales) y por tanto de un pronóstico de evolución más favorable para los pacientes afectados. En otras palabras, se encontró en el marco de la presente invención por primera vez y de forma completamente sorprendente que el cineol, particularmente 1,8-cineol, funciona como inhibidor o supresor de la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, lo que conduce a una eficiencia farmacológica correspondiente respecto a la afección subyacente (es decir, pólipos nasales).

20 En este contexto, los exámenes llevados a cabo por parte de la solicitante han mostrado que el cineol, particularmente 1,8-cineol, conduce a una inhibición de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina, sin querer limitarse a esa teoría, particularmente en presencia de cineol se presenta una reducción de la beta-catenina activa, en la que se trata de una proteína activadora transcripcional básica de la ruta de señalización subyacente. En este contexto, el cineol o 1,8-cineol conduce, igualmente sin querer limitarse a esa teoría, a un nivel o contenido menor de proteína cinasa GSK-3 fosforilada, lo que conduce a una actividad potenciada de GSK-3 y por tanto a una degradación potenciada de beta-catenina, acompañado de una inhibición o inactivación de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina subyacente.

25 En GSK-3 se trata de una proteína cinasa activa constitutiva que se inhibe particularmente mediante la fosforilación en serina 9 (GSK-3-alfa) o serina 21 (GSK-3-beta). La disminución de la fosforilación de GSK-3 conduce en el marco de la cascada de señales subyacente de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina por tanto a una activación de GSK-3 como proteína cinasa activa constitutiva, lo que a su vez conduce a una fosforilación potenciada y por tanto una inactivación o degradación de beta-catenina. Como consecuencia, la inactivación inducida o causada por cineol de la inactivación de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina con relación a la afección para tratar (es decir, pólipos nasales) da como resultado una proliferación celular disminuida y por tanto una supresión o curación o atenuación con respecto a la afección subyacente (es decir, pólipos nasales). Para ello, puede remitirse también a las siguientes configuraciones.

30 Además, el presente uso de cineol con respecto a la afección subyacente (es decir, pólipos nasales), igualmente sin querer limitarse a esa teoría, conduce también a una localización endolisosómica disminuida de GSK-3, lo que apoya su inhibición disminuida a causa del tratamiento con cineol y lo que a su vez conduce a una inactivación adicional de beta-catenina.

35 El cineol utilizado según la invención conduce por tanto con respecto a la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina subyacente, por así decir de modo doble, a una correspondiente inhibición de la cascada de señalización subyacente, acompañada con la eficiencia anteriormente citada con relación a la afección para tratar (pólipos nasales).

40 La solicitante ha encontrado igualmente de forma completamente sorprendente que, con respecto a la afección subyacente (es decir pólipos nasales), igualmente sin querer limitarse a esta teoría, la aplicación de cineol conduce a una disminución de la actividad o disminución de la expresión de al menos un gen que está relacionado particularmente con la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina, preferiblemente el gen Wnt (designado también como sinónimo de gen WNT). En este contexto, el cineol funciona particularmente como regulador, preferiblemente inhibidor y/o supresor,

5 para los genes o productos génicos en cuestión, particularmente proteínas, particularmente para al menos un gen Wnt y/o proteína Wnt (designada también como sinónimo de proteína WNT). En general, la regulación, particularmente la inhibición y/o supresión, puede realizarse sobre los niveles de gen, transcripción, traducción y/o proteína. En este contexto, la solicitante ha encontrado de forma completamente sorprendente que una actividad disminuida de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina conduce particularmente a una progresión celular disminuida con respecto a la afección subyacente (es decir, pólipos nasales).

10 En resumen, se encontró por tanto por primera vez según la invención que el cineol, particularmente 1,8-cineol, es capaz de inhibir la actividad Wnt/beta-catenina con relevancia farmacológica para la afección subyacente (pólipos nasales). Según la invención, se muestra por primera vez un nuevo mecanismo farmacológico del principio activo natural cineol. El mecanismo de acción encontrado para cineol con la eficiencia acompañante para la afección subyacente relevante (es decir pólipos nasales) se justifican mediante los estudios y exámenes llevados a cabo por parte de la solicitante de modo notable, como se refiere detalladamente a continuación en el marco de los ejemplos de realización.

15 Según una forma de realización especial adicional de la presente invención, la composición y/o cineol según la invención se utilizan para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de las formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) que están relacionadas con la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, preferiblemente para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de las formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) inducidas y/o favorecidas por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina.

20 Como se cita a continuación pues, el empleo de cineol, particularmente 1,8-cineol, en el marco del concepto de terapia según la invención, reduce o minimiza la formación de recidivas de modo más eficaz.

Según una forma de realización especial más de la presente invención, la composición y/o el cineol según la invención se utilizan para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de estados posoperatorios.

25 Particularmente, en este contexto la composición o el cineol según la invención puede utilizarse como sustituto o comedición de corticosteroides, en los que mediante el empleo de cineol se puede impedir o al menos minimizar eficazmente la formación de recidivas.

Particularmente, la composición y/o el cineol según la invención pueden utilizarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente formas recidivantes, después de eliminación quirúrgica precedente de los pólipos nasales.

30 Según una forma de realización especial más de la presente invención, la composición y/o el cineol según la invención pueden utilizarse para disminuir el riesgo o probabilidad de formación de recidivas, particularmente en estados posoperatorios y/o estados después de eliminación quirúrgica precedente de los pólipos nasales.

35 Particularmente, la composición y/o el cineol según la invención pueden utilizarse para la profilaxis de recidivas, particularmente en estados posoperatorios y/o estados después de eliminación quirúrgica precedente de pólipos nasales.

40 Según la invención, se prefiere cuando la composición según la invención contiene cineol como sustancia pura, particularmente libre de otros terpenos, preferiblemente con una pureza de al menos 95 % en peso, particularmente de al menos 96 % en peso, preferiblemente de al menos 97 % en peso, particularmente preferiblemente de al menos 98 % en peso, muy preferiblemente de al menos 99 % en peso, aún más preferiblemente de al menos 99,5 % en peso con relación al cineol. De este modo, pueden impedirse o excluirse eficazmente efectos secundarios indeseados a causa de la eventual presencia de otros ingredientes, particularmente impurezas.

En otras palabras, se prefiere según la invención cuando en el marco de la composición según la invención el cineol se presenta y/o se utiliza como sustancia pura o cuando el cineol está libre de otros terpenos y/o no contiene otros terpenos.

45 En el marco de la presente invención, se prefiere por tanto cuando el cineol utilizado presenta una pureza de al menos 95 % en peso, particularmente al menos 96 % en peso, preferiblemente al menos 97 % en peso, particularmente preferiblemente al menos 98 % en peso, muy preferiblemente al menos 99 % en peso, aún más preferiblemente al menos 99,5 % en peso respecto al cineol.

50 Según una forma de realización especialmente preferida, la composición según la invención contiene el cineol como 1,8-cineol o el cineol se presenta como 1,8-cineol.

Según una forma de realización especial, el cineol puede presentarse en forma rodeada por liposoma y/o empaquetada en liposoma. De este modo, se consigue una eficiencia especial y el cineol se protege de modo especial.

Se prefiere cuando la composición según la invención contiene el cineol como principio activo único, particularmente como principio activo farmacéutico único, y/o cuando el cineol se utiliza como principio activo único, particularmente

como principio activo farmacéutico único. De este modo, pueden evitarse efectos secundarios e interacciones indeseados.

5 Según una forma de realización especial más de la presente invención, puede proporcionarse que la composición según la invención no contenga agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y/o que esté libre de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y/o que se utilice y/o administre el cineol sin y/o en ausencia de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE). De este modo, pueden evitarse efectos secundarios indeseados de los AINE e interacciones no previsibles con el cineol.

En el marco de la presente invención, la composición según la invención contiene cineol en cantidades eficaces, particularmente farmacéuticamente eficaces.

10 La cantidad de cineol en la composición según la invención puede variar en amplios límites, particularmente dependiendo de la forma de terapia (por ejemplo, tópica o sistémica) y la gravedad y particularidad de la afección para tratar. Particularmente, puede proporcionarse según la invención cuando la composición según la invención contiene el cineol, respecto a la composición, en composiciones relativas en el intervalo de 0,0001 a 80 % en peso, particularmente de 0,001 a 75 % en peso, preferiblemente de 0,005 a 70 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 60 %
15 en peso, particularmente preferiblemente de 0,05 a 55 % en peso, muy preferiblemente de 0,1 a 50 % en peso. De este modo, se garantiza una buena eficiencia por un lado y una buena compatibilidad por otro lado. No obstante, puede proporcionarse el desvío de los valores citados, sin apartarse del marco de la presente invención; esto se encuentra a discreción del especialista en cada caso individual.

20 Particularmente, puede proporcionarse según la invención cuando la composición según la invención contiene el cineol, con respecto a la composición, en cantidades relativas de al menos 0,0001 % en peso, particularmente de al menos 0,001 % en peso, preferiblemente de al menos 0,005 % en peso, preferiblemente de al menos 0,01 % en peso, particularmente preferiblemente de al menos 0,05 % en peso, muy preferiblemente de al menos 0,1 % en peso.

25 Además, puede proporcionarse particularmente según la invención cuando la composición según la invención contiene el cineol, con respecto a la composición, en cantidades relativas de como máximo 80 % en peso, particularmente como máximo 75 % en peso, preferiblemente como máximo 70 % en peso, preferiblemente como máximo 60 % en peso, particularmente preferiblemente como máximo 55 % en peso, muy preferiblemente como máximo 50 % en peso.

30 Habitualmente, se proporciona que la composición según la invención contenga el cineol junto con al menos un portador fisiológicamente inocuo (excipientes) o que se utilice el cineol junto con al menos un portador fisiológicamente inocuo (excipientes). Al respecto, pueden utilizarse en principio todos los portadores fisiológicos inocuos (excipientes). Particularmente, se prefiere cuando el portador (excipiente) utilizado es miscible con 1,8-cineol y/o soluble en el mismo y/o cuando el portador (excipiente) se presenta a 20 °C y presión atmosférica en estado agregado líquido o sólido. Son ejemplos de portadores (excipientes) miscibles con 1,8-cineol y/o solubles en el mismo, particularmente a 20 °C y presión atmosférica, por ejemplo, compuestos del grupo de aceites grasos, preferiblemente triglicéridos, particularmente preferiblemente triglicéridos de cadena media (Medium Chain Triglycerides, MCT), muy
35 preferiblemente triglicéridos con ésteres de ácido graso C₆-C₁₂.

En el marco de la presente invención puede proporcionarse la aplicación de la composición según la invención por vía tópica o bien sistémica o acondicionar la composición según la invención para aplicación tópica o sistémica.

En otras palabras, esto significa que, en el marco de la presente invención, el cineol se aplica por vía tópica o sistémica o el cineol se acondiciona para aplicación tópica o sistémica.

40 Como ya se ha declarado anteriormente, la composición o el cineol según la invención pueden aplicarse en el marco de la terapia según la invención en principio por vía tópica (por ejemplo, intranasal y/o inhalativa) y/o tópica (p. ej., sistémica), y ciertamente dependiendo de la terapia individual o de la forma para terapia, de la gravedad de la afección, de los pacientes respectivos, etc.

45 Según la invención, se proporciona pues la aplicación de la composición y/o el cineol según la invención por vía tópica, particularmente intranasal o inhalativa, y/o el acondicionamiento de la composición y/o el cineol según la invención para aplicación tópica, particularmente intranasal o inhalativa.

50 En el caso de aplicación tópica, la composición y/o el cineol según la invención pueden aplicarse en forma de una forma galénica de administración intranasal. Esto significa que la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse en una forma galénica de administración intranasal. Por ejemplo, la composición según la invención puede aplicarse en forma de pulverizadores nasales, gotas nasales, geles nasales, pomadas nasales, enjuagues nasales, cremas nasales, inhaladores o similares, preferiblemente pulverizadores nasales. Esto significa que la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse en forma de pulverizadores nasales, gotas nasales, geles nasales, pomadas nasales, enjuagues nasales, cremas nasales, inhaladores o similares, preferiblemente pulverizadores nasales.

55 Según otra variante de la presente invención, puede aplicarse sin embargo la composición y/o el cineol, como se declara anteriormente, también por vía sistémica, particularmente oral o parenteral (p. ej., intravenosa, intraarterial,

intramuscular, subcutánea, etc.; por ejemplo, en forma de una forma galénica parenteral como inyección, infusión, etc.), preferiblemente oral. Es decir, la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse en este caso para aplicación sistémica, particularmente oral o parenteral, preferiblemente oral.

5 Al respecto, la composición y/o el cineol según la invención pueden aplicarse particularmente en forma de una forma galénica de administración oral, es decir, la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse en este caso en una forma galénica de administración oral.

10 En esta forma de realización, la composición y/o el cineol según la invención pueden aplicarse particularmente como formas galénicas sistémicas gastrorresistentes pero solubles en el intestino delgado, preferiblemente como cápsulas, grageas, píldoras, comprimidos o similares, es decir, la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse en esta forma de realización como formas galénicas sistémicas gastrorresistentes pero solubles en el intestino delgado, preferiblemente como cápsulas, grageas, píldoras, comprimidos o similares. Además, en esta forma de realización, la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse particularmente también como inyección, infusión o similar.

15 Particularmente, dependiendo del tipo de presentación (es decir sistémica y/o tópica) y la gravedad y particularidad de la afección para tratar, así como otros factores y hechos terapéuticos, la dosis diaria de cineol aplicada puede variar en amplios intervalos. Particularmente, el cineol puede administrarse con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 1 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 5 a 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 10 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 50 a 1.500 mg/día. Esto significa que la composición y/o el cineol según la invención pueden acondicionarse para administración con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 1 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 5 a 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 10 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 50 a 1.500 mg/día. No obstante, puede proporcionarse en principio el desvío de los valores citados, sin apartarse del marco de la presente invención. Esto se encuentra a discreción del especialista en cada caso individual.

25 En aplicación sistémica, las cantidades utilizadas de cineol pueden variar igualmente en amplios intervalos. Particularmente, puede proporcionarse la administración del cineol por vía sistémica con una dosis diaria en el intervalo de 10 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 50 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 100 a 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 150 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 200 a 1.500 mg/día, y/o se puede acondicionar la composición y/o el cineol según la invención para administración con una dosis diaria en el intervalo de 10 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 50 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 100 bis 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 150 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 200 a 1.500 mg/día. En principio, puede proporcionarse sin embargo el desvío de los valores citados, sin apartarse del marco de la presente invención (lo que se encuentra a discreción del especialista en cada caso individual).

35 También en aplicación tópica, pueden variar en amplios intervalos las dosis de cineol utilizadas. Particularmente, puede proporcionarse en aplicación tópica la administración del cineol por vía tópica con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 2.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 0,5 bis 1.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 1 a 1.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 2 a 1.500 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 5 a 1.000 mg/día, o se puede acondicionar la composición y/o el cineol para administración con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 2.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 0,5 bis 1.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 1 a 1.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 2 a 1.500 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 5 a 1.000 mg/día. En principio, puede proporcionarse sin embargo el desvío de los valores citados, sin apartarse del marco de la presente invención (lo que se encuentra a discreción del especialista en cada caso individual).

45 Habitualmente, la composición según la invención puede contener además al menos otro ingrediente, particularmente al menos un coadyuvante y/o un aditivo. Esto significa que el cineol según la invención se utiliza con al menos otro ingrediente, particularmente al menos un coadyuvante y/o aditivo. En este contexto, el al menos otro ingrediente, particularmente coadyuvante y/o aditivo, se selecciona particularmente del grupo de coadyuvantes de procesamiento, estabilizantes, emulgentes, antioxidantes, hidratantes, espesantes, desinfectantes, ajustadores del pH, sustancias tamponadoras del pH, conservantes, antisépticos, colorantes, sustancias aromáticas, aromatizantes, fragancias, diluyentes, aglutinantes, humectantes, vitaminas, oligoelementos, sustancias minerales, micronutrientes y/o aceites etéricos así como sus combinaciones.

55 Según una forma de realización especial de la presente invención, la composición y/o el cineol según la invención pueden utilizarse como complemento, preferiblemente en combinación, con corticosteroides, particularmente corticosteroides sistémicos o tópicos. Esto significa que en estas formas de realización la composición y/o el cineol según la invención pueden utilizarse como terapia de complemento (coterapia), preferiblemente como terapia de combinación, con corticosteroides, particularmente corticosteroides sistémicos o tópicos.

En el marco de la presente invención, puede proporcionarse por tanto que pueda utilizarse la composición y/o el cineol según la invención, particularmente en coterapia o en combinación con corticosteroides, para la reducción de la

necesidad o para la sustitución de corticosteroides en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

5 Particularmente, puede proporcionarse en el marco de la presente invención que pueda utilizarse la composición y/o el cineol según la invención, particularmente en coterapia o en combinación con corticosteroides, para el incremento de la eficacia y/o la reducción de la dosis de corticosteroides en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

10 Como se enuncia anteriormente, en el marco de la coterapia con corticosteroides, puede incrementarse su efecto y disminuir su dosis. Consecuentemente, puede proporcionarse particularmente en coterapia con corticosteroides la utilización de la composición y/o el cineol según la invención, particularmente en coterapia o en combinación con corticosteroides, para disminuir o evitar los efectos secundarios de los corticosteroides en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

15 Según otra forma de realización especial de la presente invención, puede proporcionarse además la utilización de la composición y/o el cineol según la invención no como complemento, particularmente no en combinación, con agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y/o la utilización de la composición y/o el cineol no como terapia complementaria (coterapia), particularmente no como terapia de combinación, con agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE). De este modo, se impiden los efectos secundarios indeseados de los AINE de modo más eficaz (sobre todo, su uso en el marco del concepto de terapia según la invención no es necesario).

En otras palabras, se proporciona el uso como base de la composición según la invención de cineol, particularmente 1,8-cineol, en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

20 La presente invención se refiere por tanto al uso de un cineol según la invención, preferiblemente 1,8-cineol, como composición que contiene principio activo farmacéutico, particularmente composición farmacéutica, como se ha descrito o definido anteriormente, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) y/o para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

25 Según la invención, es por tanto posible usar cineol, preferiblemente 1,8-cineol, como principio activo farmacéutico para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) y/o para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

30 Es a su vez un objeto adicional además de la presente invención, según un segundo aspecto de la presente invención, un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) o para el uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en el que el medicamento contiene como principio activo, particularmente principio activo farmacéutico, cineol, preferiblemente 1,8-cineol.

35 El término medicamento (designado también como sinónimo de fármaco, medicación, terapia o similar), como se usa en el marco de la presente invención, se entiende muy ampliamente y comprende no solo medicamentos o fármacos como tales (es decir, desde el punto de vista de la legislación farmacéutica), sino ante todo también los llamados productos médicos pero además también productos homeopáticos y suplementos nutricionales. En otras palabras, la composición que contiene cineol según la invención puede presentarse pues según la invención en forma de un medicamento (fármaco), producto médico, producto homeopático, suplemento nutricional o similar.

40 Para detalles adicionales de este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes de aspectos de la invención restantes, que con relación a este aspecto de la invención son correspondientemente válidas.

Además, es a su vez objeto adicional de la presente invención, según un tercer aspecto de la presente invención, una combinación de principios activos, particularmente en forma de un kit (kit de piezas), para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*),

45 en el que la combinación de principios activos comprende determinados componentes espacialmente separados pero relacionados funcionalmente y/o para comedición o terapia de combinación

(a) cineol, particularmente 1,8-cineol, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica para aplicación tópica o sistémica que contiene cineol, por un lado, y

(b) al menos un corticosteroide, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica para aplicación tópica o sistémica que contiene corticosteroide.

50 Para detalles adicionales de este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes de aspectos de la invención restantes, que con relación a este aspecto de la invención son correspondientemente válidas.

En el marco de la presente invención, se ha mostrado que el cineol, particularmente 1,8-cineol, puede usarse para la regulación, preferiblemente inhibición y/o supresión, de la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, preferiblemente para la regulación y/o disminución de la fosforilación de

la proteína cinasa GSK-3, particularmente en la serina 9 (GSK-3-alfa) y/o la serina 21 (GSK-3-beta), en el marco de la ruta de señalización de Wnt o para la activación de la proteína cinasa GSK-3 y/o la desactivación y/o fosforilación de la beta-catenina en el marco de la ruta de señalización de Wnt, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), preferiblemente formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

De este modo, pueden tratarse con el concepto de terapia según la invención estados patológicos muy específicos o especiales selectivos, que no son accesibles sin más por formas de terapia convencionales, al menos no con tal efectividad específica o selectiva.

Finalmente, es a su vez otro objeto de la presente invención, según un **cuarto** aspecto de la presente invención, cineol, particularmente 1,8-cineol, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico en afecciones que están relacionadas con y/o inducidas por y/o favorecidas por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, particularmente de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), preferiblemente de formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).

En este aspecto de la invención, se utiliza el cineol particularmente como regulador, preferiblemente inhibidor y/o supresor, de la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, preferiblemente como regulador y/o reductor de la fosforilación de la proteína cinasa GSK-3 en el marco de la ruta de señalización de Wnt o para la activación de la proteína cinasa GSK-3 y/o como desactivador de beta-catenina en el marco de la ruta de señalización de Wnt.

Particularmente, el cineol puede utilizarse en este aspecto de la invención también como regulador, preferiblemente inhibidor y/o supresor, de al menos un gen Wnt y/o proteína Wnt.

También según este aspecto de la invención, pueden tratarse estados patológicos muy específicos o selectivos especiales que no son accesibles sin más por formas de terapia convencionales, al menos no con tal efectividad específica o selectiva.

Para detalles adicionales de este aspecto de la invención, puede remitirse a las realizaciones precedentes de aspectos de la invención restantes, que con relación a este aspecto de la invención son correspondientemente válidas.

Surgen propiedades, aspectos y rasgos ventajosos adicionales de la presente invención a partir de la siguiente descripción de ejemplos de realización representados en las Figuras, como se alega también a continuación con detalle.

La Fig. 1 muestra una tinción con hematoxilina-eosina (HE) de pólipos nasales y mucosa nasal sana (este método de tinción tiñe las estructuras basófilas en azul lila y las estructuras eosinófilas en rosa claro, mientras que las estructuras hidrófobas, como las membranas del aparato de Golgi, quedan sin teñir o transparentes);

la Fig. 2 muestra la reducción dependiente de la dosis de la progresión celular por 1,8-cineol (para determinar si el tratamiento con 1,8-cineol conduce a una inhibición de la viabilidad celular de los pólipos nasales, se utilizó la prueba de MTT. Pudo observarse una proliferación fuertemente creciente de células de pólipos nasales como reacción a una incubación con 1,8-cineol 100 μ M después de 144 horas (Fig. 2A, con dos sujetos de prueba distintos I y II). Sorprendentemente, las células epiteliales cultivadas de la mucosa nasal no se influyeron por el tratamiento con 1,8-cineol, lo que sugiere un mecanismo de acción específico dependiente del contexto de 1,8-cineol (Fig. 2B));

la Fig. 3 muestra la expresión de beta-catenina activa en respuesta al cineol (para examinar el efecto de un tratamiento de 24 horas con 1,8-cineol 100 μ M sobre el nivel de expresión de proteína de beta-catenina activa en tres muestras de tejido distintas de pólipos nasales (A, B, C), se llevaron a cabo análisis de transferencia Western en proteínas totales. El GAPDH se utilizó como control de carga);

la Fig. 4A muestra la expresión de beta-catenina activa y P-GSK-3 (serina 9/21) como reacción al cineol (para examinar el efecto de un tratamiento de 24 horas con 1,8-cineol 100 μ M sobre el nivel de expresión de proteína de beta-catenina activa, fosfo-GSK-3 (serina 9/21) y fosfo-GSK-3 (tirosina 279/216) en cuatro muestras distintas de pólipos nasales (D, E, F, G), se llevaron a cabo análisis de transferencia Western en proteína totales. El GAPDH se usó como control de carga);

las Fig. 4B/C muestran la localización subcelular de P-GSK-3 (serina 9/21) como reacción al cineol (para examinar la localización endolisosómica disminuida de fosfo-GSK-3 (serina 9/21) como reacción a 1,8-cineol 100 μ M, en comparación con medio de control, se llevaron a cabo exámenes inmunohistoquímicos. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI);

la Fig. 5 muestra la expresión de Akt y P-Akt (serina 473) como reacción al 1,8-cineol (se utilizaron análisis de transferencia Western en proteínas totales para mostrar el efecto de 1,8-cineol 100 μ M sobre el nivel de expresión de Akt y P-akt (treonina 308) en cuatro muestras de tejido distintas de pólipos nasales (H, I, J, K). Se usó GAPDH como control de carga);

la Fig. 6 muestra un modelo de inhibición de Wnt/beta-catenina como reacción al 1,8-cineol (en el marco de este trabajo, la solicitante ha mostrado por primera vez que el 1,8-cineol funciona como inhibidor de la actividad de Wnt/beta-catenina y provoca un fuerte descenso de la progresión celular de pólipos nasales. Los datos de la solicitante muestran que el 1,8-cineol influye en la fosforilación inhibitoria y localización endolisosómica de GSK3-beta, en que se trata del regulador básico de la actividad de beta-catenina).

Para detalles adicionales de las formas de realización representadas en las representaciones de las figuras y ejemplos de realización, puede remitirse para evitar repeticiones innecesarias a las realizaciones anteriores, así como a las realizaciones suplementarias posteriores de los ejemplos de realización, que son correspondientemente válidas con relación a la representación de las figuras.

En resumen, puede ponerse a disposición pues en el marco de la presente invención por primera vez un concepto de terapia novedoso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente también formas recidivantes, con que puedan evitarse en gran medida las desventajas del estado de la técnica o bien al menos atenuarse, en el que el concepto de terapia según la invención está ligado a menos efectos secundarios y/o incomodidades para los pacientes afectados frente a métodos de terapia convencionales, en el que en el marco de la presente invención se consigue una eficiencia al menos comparable, preferiblemente incluso mejorada, en comparación con los conceptos de terapia del estado de la técnica. El objetivo del concepto de terapia según la invención es particularmente también una falta de recidiva mantenida o al menos un alargamiento del intervalo sin recidiva, particularmente a consecuencia del efecto antiinflamatorio y de tipo corticosteroide del cineol, particularmente 1,8-cineol. También se llega a una evitación o al menos reducción de la terapia prolongada conocida con corticosteroides (glucocorticoides), particularmente también al mismo tiempo del *Asthma bronchiale* existente.

Son reconocibles y realizables otras configuraciones, modificaciones y variaciones, así como ventajas de la presente invención, por el especialista con la lectura de la descripción sin más, sin apartarse al respecto del marco de la presente invención.

Los siguientes ejemplos de realización sirven únicamente para ilustración de la presente invención, pero sin limitar la presente invención en modo alguno.

Ejemplos de realización

1. El 1,8-cineol regula el perfil de fosfocinasa en células epiteliales procedentes de pólipos nasales y cornetes nasales inferiores de pacientes que padecen rinosinusitis crónica

Palabras clave: 1,8-cineol, cineol, perfil de fosfocinasas, pólipos nasales, rinosinusitis crónica, RSCcPN, rinosinusitis crónica con pólipos nasales

Los resultados de los exámenes más recientes muestran una participación de las fosfocinasas en la patogénesis de rinosinusitis crónica con pólipos nasales (RSCcPN). Así, el estado de fosforilación de proteínas especiales puede contribuir a la formación de pólipos nasales. Basándose en estos resultados, se obtuvieron entonces nuevos conocimientos de una regulación potencial de la fosforilación en pólipos nasales a base de plantas. Actualmente, la rinosinusitis crónica se divide en rinosinusitis crónica con pólipos nasales (RSCcPN) y rinosinusitis crónica sin pólipos nasales (RSCsPN), en la que la RSCcPN afecta a aproximadamente un 1 a 4 % de la población general. Reina el acuerdo general de que todos los casos de rinosinusitis crónica (RSC) están acompañados de inflamaciones sinusales, en el que RSCcPN se entiende como un proceso controlado por Th2 y en contraposición a ello RSCsPN como controlado por Th1. La gestión de RSCcPN comprende una combinación de terapia medicamentosa y medidas quirúrgicas. Habitualmente, se utilizan corticosteroides (glucocorticoides) tanto como tratamiento primario como profilaxis posoperatoria contra recidivas. Los corticosteroides (glucocorticoides) poseen propiedades antiinflamatorias basadas en interacciones proteína-proteína, en los que sin embargo las aplicaciones a largo plazo potencian los efectos secundarios.

Las medicaciones vegetales podrían reducir estos efectos secundarios. En la medicina natural, se utilizan aceites etéricos a causa de sus propiedades secretolíticas para el tratamiento de personas, el uso clínico está sin embargo limitado a causa de irritaciones de las vías respiratorias después de inhalación o toma. El constituyente principal del aceite de eucalipto, a saber 1,8-cineol, se ha utilizado para el tratamiento de bronquitis aguda y crónica, sinusitis e infecciones respiratorias y en general se ha tolerado bien. En el monoterpeneo 1,8-cineol, se trata de un isoprenoide con propiedades antiinflamatorias que se asemeja a isoprenoides humanos, como glucocorticoides. Recientemente, se descubrieron por parte de la solicitante nuevas propiedades del mecanismo de 1,8-cineol en células epiteliales del tejido de pólipos nasales de pacientes con rinosinusitis crónica. En el marco de estos estudios, la solicitante ha aislado células epiteliales de pólipos nasales y tejidos de los cornetes nasales inferiores de numerosos pacientes e incubado durante un periodo de 24 horas en 1,8-cineol 100 µM. Se aislaron las proteínas y se evaluaron las fosfocinasas con ayuda del "Human Phospho-Kinase Antibody Array" de R&D Systems. De forma interesante, la solicitante ha determinado, en comparación con células epiteliales de cornetes nasales, una expresión modificada de fosfocinasas en células epiteliales nasales de tejido de pólipos nasales. Incluso cuando las células epiteliales nasales de pólipos nasales por un lado y cornetes nasales inferiores por otro lado se exponen a las mismas condiciones inflamatorias crónicas, responden diferentemente al 1,8-cineol. El epitelio de mucosa de la nariz está constantemente expuesto a

factores ambientales, como alérgenos, bacterias o virus, y sirve como primera barrera, en el que sin embargo los resultados de la solicitante comprueban una diferencia fundamental entre células epiteliales nasales de pólipos nasales por una parte y cornetes nasales inferiores por otra parte respecto a la fosforilación de cinasas en respuesta a 1,8-cineol. Con esta base, se evidencian nuevas perspectivas para su uso terapéutico en el marco del tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, particularmente RSCcPN, ya que el cineol representa demostrablemente una alternativa fitoterapéutica a los glucocorticoides.

2. El 1,8-cineol inhibe la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina y la proliferación celular en pólipos nasales

Palabras clave: pólipos nasales, rinosinusitis crónica, GSK-3, beta-catenina, 1,8-cineol

Sumario

10 Antecedentes: Los pólipos nasales representan una neoplasia benigna de la mucosa nasal que conduce a una capacidad de respiración disminuida y una percepción olfatoria reducida. Los mecanismos moleculares que controlan la patogénesis y formación de pólipos nasales no se entienden suficientemente hasta ahora. La solicitante ha examinado en adelante la influencia del óxido de monoterpeneo 1,8-cineol sobre la regulación de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina y el desarrollo celular de pólipos nasales.

15 Material y métodos: La solicitante ha examinado muestras de tejido de pólipos nasales y cornetes nasales inferiores de pacientes con RSCcPN (rinosinusitis crónica con pólipos nasales) y de cornetes nasales inferiores de sujetos de prueba sin sinusitis crónica (mucosa sana) basándose en métodos inmunohistoquímicos y procedimientos de inmunotransferencia. La proliferación y migración celular se examinaron empleando el analizador celular a tiempo real xCELLigence.

20 Resultados: En el marco de este trabajo, la solicitante pudo mostrar por primera vez que el 1,8-cineol actúa como un inhibidor fuerte de la actividad de Wnt/beta-catenina y conduce a un fuerte descenso del desarrollo celular de pólipos nasales. Los datos de la solicitante muestran que el 1,8-cineol influye en la fosforilación inhibitoria de GSK-3-beta, que es el regulador clave de la actividad de beta-catenina.

25 Conclusión: Los resultados de la solicitante posibilitan nuevos conocimientos de la red reguladora responsable de la formación de pólipos nasales y muestran además un nuevo mecanismo de la actividad de 1,8-cineol que representa un nuevo enfoque de tratamiento de este principio activo natural.

Introducción

30 Los pólipos nasales son lesiones vidriosas edematosas patológicas, pero benignas, que provienen de la mucosa nasal de los senos paranasales y las fosas nasales. Los pólipos nasales son una enfermedad extendida con una prevalencia general de 1 a 4 % en Europa, en que se diferencian entre rinosinusitis crónica (RSC) con pólipos nasales (RSCcPN) y sin pólipos nasales (RSCsPN). Numerosos estudios parten de una relación entre RSC y distintos factores, como contaminación del aire, consumo de tabaco o rinitis alérgica de varios años. Además, se habla mucho de una conexión de la RSC con asma bronquial, independiente del tabaquismo individual.

35 El óxido de monoterpeneo 1,8-cineol, en que se trata de la sustancia activa de un medicamento autorizado clínicamente (Soledum®), se aplica habitualmente para el tratamiento de distintas afecciones crónicas y agudas de las vías respiratorias, así como de pacientes con rinosinusitis crónica sin pólipos nasales. Aunque se documenta una respuesta positiva, el mecanismo celular de la influencia sobre el desarrollo y recidivas de pólipos nasales no se entiende todavía.

40 En el marco de los presentes estudios, la solicitante ha examinado la influencia del 1,8-cineol sobre la regulación de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina con las proteínas reguladoras básicas glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) y beta-catenina. La ruta de señalización de Wnt/beta-catenina participa en la regulación de distintas funciones celulares, como diferenciación, proliferación, migración y adhesión celular.

Numerosos estudios parten de un papel activo de la glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) en distintas enfermedades, como Alzheimer, cáncer, inflamaciones, enfermedades cardiovasculares o diabetes. Actualmente, son conocidas dos isoformas distintas de GSK-3, a saber, GSK-3-alfa y GSK-3-beta, que codifican dos genes distintos.

45 En contraposición con otras cinasas, las enzimas son activas constitutivas y se inactivan en respuesta a señales celulares. El complejo APC/axina/GSK-3 desencadena una fosforilación coordinada de beta-catenina, lo que conduce a su ubiquitinación y degradación proteosómica por la ruta de beta-TrCEP/SKP.

50 Se ha mostrado ahora por la solicitante que la actividad de GSK-3 misma se controla por distintos patrones de fosforilación. Aunque la fosforilación de serina 9 en GSK-3-alfa o de serina 21 en GSK-3-beta conduce a una actividad enzimática disminuida, se detecta como respuesta a una fosforilación del resto tirosina 279 en GSK-3-alfa y tirosina 216 en GSK-3-beta una actividad enzimática fuertemente creciente.

En el marco de los estudios de la solicitante, pudo demostrar por primera vez la solicitante que el 1,8-cineol funciona como un fuerte inhibidor de la actividad de Wnt/beta-catenina y conduce a una progresión celular fuertemente disminuida.

Por tanto, los resultados de la solicitante muestran un nuevo mecanismo de actividad del 1,8-cineol y conducen consecuentemente a nuevos enfoques de tratamiento para este principio activo natural.

Materiales y métodos

Muestras de tejido humanas

5 La solicitante ha examinado muestras de tejido de pólipos nasales y cornetes nasales inferiores como controles internos con RSCcPN, que se han extraído en el marco de intervenciones quirúrgicas en los senos paranasales.

10 Todos los pacientes tenían en el pasado molestias en los senos nasales durante un periodo de al menos 3 meses con una duración media de 1,5 años (+/-0,6 años), en las que las terapias conservadoras fallaron. Antes de las intervenciones quirúrgicas, se ensayó en los pacientes en el marco de pruebas de intolerancia cutánea el empleo de extractos estandarizados (Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek, Alemania) de polen, ácaros del polvo domésticos, mascotas y moho. Mediante el examen histopatológico, se determinó RSCcPN eosinófila; no se registró ningún paciente con pólipos neutrófilos o particularmente con mucoviscidosis en el estudio. Ninguno de los pacientes se trató en el periodo de 4 semanas antes de la intervención quirúrgica con corticosteroides sistémicos o tópicos. Además, se extrajeron muestras de cornetes nasales inferiores de pacientes sin sinusitis ni alergias en el pasado como controles internos, que se sometieron a intervenciones quirúrgicas en el septo o una septorinoplastia. El estudio se autorizó por la comisión de ética médica de la Universidad de Lübeck, según declaran las indicaciones de las disposiciones éticas para investigación médica, como se formulan en la declaración de Helsinki de la AMM, y todos los pacientes entregaron un formulario de consentimiento firmado.

1,8-Cineol

20 Se utilizó 1,8-cineol de cápsulas Soledum® (Klosterfrau Healthcare Group, Cassella-med GmbH & Co. KG, Colonia, Alemania).

25 Se almacenó la sustancia pura aislada de aceite de eucalipto, es decir, 1,8-cineol puro con una pureza >99 % (0,6 mg/μl o 600 mg/μl de 1,8-cineol) a 4 °C, mientras que la solución madre se preparó mediante disolución de la sustancia pura en etanol (100 mg/ml) seguido de dilución definitiva con "DMEM alto en glucosa" (Biochrom, Berlín, Alemania; 1 mg/ml).

Preparación de suspensiones celulares individuales

30 Se lavaron muestras de pólipos nasales en tampón PBS y se trituraron cuidadosamente en trozos pequeños en "medio Eagle modificado por Dulbecco rico en glucosa" estéril libre de suero (PAA, Pasching, Austria) con una cuchilla de bisturí, en las que el medio contenía 1 % de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio, 1 % de aminoácidos no esenciales, 2 % de anfotericina B, 2 % de estreptomina y 2 % de penicilina, completado con 10 % de FCS y tampón HEPES 25 mM (todos de PAA, Pasching, Austria). Después se digirieron enzimáticamente las muestras de tejido mediante un tratamiento enzimático y etapas de lavado con colagenasa de tipo II (31,5 mg/ml, GIBCO, Eggenstein, Alemania) y hialuronidasa (3,99 mg/ml, Sigma, Múnich, Alemania) en una primera etapa y con dispasa (33,4 mg/ml, Sigma, Múnich, Alemania) en una segunda etapa respectivamente con agitación a 37 °C durante 120 minutos. Entre los tratamientos enzimáticos y las etapas de lavado se centrifugaron las células. Se lavaron las suspensiones celulares resultantes en PBS (PAA, Pasching, Austria), que contenía 2 % de BSA, y se filtraron respectivamente por un filtro celular de nailon de 70 μm y 60 μm (Falcon, Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Alemania).

Prueba de MTT

40 Se determinó la proliferación celular mediante una prueba celular cuantitativa colorimétrica basada en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Esta prueba determina el recuento de células viables basándose en la conversión mitocondrial de MTT.

45 Se repartieron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos respectivamente 5.000 células. Después de 24 horas de cultivo, se añadieron 4 concentraciones distintas de 5-fluorouracilo o cisplatino a los cultivos o se irradiaron las células con 3 dosis. Después de 48 horas, se añadieron 10 μl del tinte MTT (5 mg/ml) a cada pocillo. Después de 2 horas de incubación con MTT, se disolvieron los cristales y se agitaron cuidadosamente durante 24 horas a temperatura ambiente. Con el empleo de un dispositivo de lectura de ELISA multipocillo, se leyó la absorción de los productos de formazano reducidos en pocillos de control y ensayo a una longitud de onda de 570 nm y 690 nm. La prueba de MTT se llevó a cabo respectivamente tres veces.

Análisis de inmunotinciones

50 Se fijaron con 100 % de metanol cortes de tejido congelados recientes durante 10 minutos. Después de un tiempo de secado de 10 minutos, se lavaron los cortes a temperatura ambiente con TBS (RT-TBS). Después, se incubaron las muestras de tejido para inhibición de peroxidasa endógena durante 15 minutos en RT-TBS con H₂O₂ al 3 %.

Después de una etapa de lavado con RT-TBS, se permeabilizaron las muestras en TBS con 0,3 % de Triton X durante 15 minutos. Se incubaron los cortes a una dilución 1:100 con anticuerpos anti-fosfo-GSK-3-alfa/beta (Cell Signaling

Technology Inc., Massachusetts, EE. UU., números de catálogo 5676 y 9331) durante la noche a 4 °C.

El día siguiente, se lavaron los portaobjetos con RT-TBS y después se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo Polylink secundario. Después del lavado con RT-TBS, se incubaron las muestras con marcador de peroxidasa (HRP) (ambos de DCS Detection line, Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburgo, Alemania).

5 Después del lavado con RT-PBS, se incubaron los cortes en AEC (DCS Chromoline, Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburgo, Alemania). Se detuvo la reacción con RT-TBS. Finalmente, se llevó a cabo una tinción del núcleo celular con hematoxilina de Mayer. Se embebieron los cortes en "medio Dako Faramount" acuoso (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, EE. UU.). Se observaron los cortes inmunoteñidos con un microscopio confocal (Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se tomaron microfotografías.

10 Preparación de lisados celulares

Se lavaron muestras de pólipos nasales en PBS y se homogeneizaron cuidadosamente. Se prepararon extractos celulares y se solubilizaron con el uso de tampón de lisis 16 ("Matriz de citoblastos pluripotentes humanos" (R&D Systems)). Se determinaron las concentraciones de proteína.

Ensayo de proliferación celular

15 Se evaluó la proliferación mediante una prueba de MTT de Sigma-Aldrich ("kit de ensayo de toxicología in vitro") correspondientemente a las instrucciones del fabricante.

Transferencia Western

20 Se desnaturalizaron lisados de tejidos mediante calentamiento durante un periodo de 5 minutos en tampón de muestra de SDS simple (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania). Se determinaron las concentraciones de proteína mediante la prueba de Bradford y se utilizaron respectivamente 30 µg de proteína total para electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Mini-Protean TGX®, Any kD, BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) y a continuación se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Se controló la transferencia mediante tinción de Ponceau.

25 En primer lugar, se bloquearon las membranas con TBS que contenía 0,05 % de TWEEN 20 (TBST) y 5 % de BSA (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubaron durante una noche a 4 °C a una dilución de 1:1.000 con el anticuerpo primario respectivo en PBS-T y 5 % de BSA: anti-GSK-3-alfa/beta (Abcam plc., Cambridge, Reino Unido, número de catálogo ab62368) y anti-fosfo-GSK-3-alfa/beta (serina 9/serina 21), (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, número de catálogo 9331). Después de una etapa de lavado con PBS-T, se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario específico de cabra anti-conejo (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.), que se presentaba a una dilución de 1:3333, en TBS-T con 5 % de BSA durante un periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Se visualizaron las bandas de proteína con ayuda de un kit de conjugado-sustrato basado en fosfatasa alcalina (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.).

35 Para determinar el volumen de carga de cada carril, se incubaron las membranas de nitrocelulosa durante una noche a 4 °C con un anticuerpo primario de GAPDH (Cell Signaling Technology Inc., Massachusetts, número de catálogo: 14C10) a una dilución de 1:1.000. Se lavaron las membranas y se incubaron después con una dilución 1:1.000 de un anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano picante (HRP) específico de especie en PBS-T y 5 % de BSA durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y se visualizaron las bandas de proteína como se describe anteriormente. Se cuantificaron las densidades de píxel y se documentaron mediante Fusion FX7® con empleo de Bio-1D Software®.

Prueba de migración celular mediante xCELLigence

40 Para examinar la influencia del cineol sobre la actividad de migración celular, se usaron placas de migración CIM 16 (Roche, Mannheim, Alemania), en las que se trata de un sistema bicameral separado por una membrana porosa, correspondientemente a las instrucciones de uso del fabricante (Roche Diagnostics). Las células migran al respecto de la cámara superior a través de la membrana y se adhieren a los sensores electrónicos en el lado inferior de la membrana, de modo que dan como resultado un incremento de la impedancia. Las modificaciones se registran automáticamente y continuamente mediante el instrumento de RTCA-DP y la actividad de migración celular puede supervisarse mediante el perfil de índice celular. Antes del relleno de los pocillos con células (60.000 células/pocillo), se recubrió la parte inferior de los pocillos de la cámara superior de las placas CIM 16 con 30 µl de colágeno I (400 mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Alemania). Se midió cada condición de tratamiento en una realización por triplicado.

Resultados

50 El cineol conduce a un desarrollo fuertemente disminuido de pólipos nasales

En comparación con mucosa nasal sana, los pólipos nasales presentan otra morfología que pudo mostrarse mediante tinciones inmunohistoquímicas con hematoxilina-eosina (HE) en cortes de tejido congelados (Figura 1). Con este método de tinción, se teñían las estructuras basófilas en azul lila y las estructuras eosinófilas en rosa claro, mientras que las estructuras hidrófobas como las membranas del aparato de Golgi permanecían sin teñir o transparentes. La

solicitante ha examinado la influencia de 1,8-cineol 100 μM sobre la actividad de proliferación celular de pólipos nasales, en la que se utilizó el analizador celular a tiempo real xCELLigence. Pudo observarse como reacción a una incubación en 1,8-cineol 100 μM después de 144 horas una proliferación fuertemente disminuida de células de pólipos nasales (véase la Figura 2A, con dos sujetos de prueba distintos I y II). Sorprendentemente, las células cultivadas de la mucosa nasal no se influyeron por el tratamiento con 1,8-cineol, lo que sugiere una efectividad específica de contexto del 1,8-cineol (véase la Figura 2B).

Actividad de beta-catenina disminuida en respuesta al tratamiento con 1,8-cineol

Para examinar la influencia del 1,8-cineol sobre la actividad y regulación de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina, la solicitante ha analizado primero el nivel de expresión de beta-catenina activa, en que se trata de la proteína activadora transcripcional básica de esta ruta de señalización. Los datos de la solicitante muestran un fuerte descenso de la beta-catenina activa como reacción al tratamiento con 1,8-cineol en pólipos nasales, comparado con los controles de medio. Como reacción a una incubación de 24 horas con 1,8-cineol 100 μM , la proteína beta-catenina activa desaparecía casi completamente en las muestras de tejido analizadas de pólipos nasales. Estos datos muestran una fuerte inhibición de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina mediante el tratamiento con 1,8-cineol (Figura 3).

Actividad de GSK-3 como respuesta al tratamiento con 1,8-cineol

En una primera etapa, se llevaron a cabo exámenes adicionales para analizar el nivel de fosforilación correspondiente del regulador de beta-catenina GSK-3. En GSK-3, se trata de una proteína activa constitutiva que se inhibe por fosforilación de GSK-3 en serina 9 (GSK-3-alfa) o serina 21 (GSK-3-beta). Para examinar la expresión y nivel de fosforilación de GSK-3-alfa/beta en presencia y ausencia de 1,8-cineol 100 μM , se llevaron a cabo experimentos de transferencia Western.

Los datos de la solicitante muestran claramente que el cineol conduce a una fosforilación disminuida de GSK-3-alfa/beta en serina 9/21, lo que a su vez conduce a una actividad potenciada de GSK-3 y por tanto a una degradación potenciada de beta-catenina (Figura 4A). Además de la fosforilación en serina 9/21, se regula la actividad de GSK-3 también al nivel de su localización subcelular. La GSK-3 puede almacenarse para separación de sus sustratos en vesículas endolisosómicas, para disminuir la actividad cinasa. Los exámenes inmunohistoquímicos de la solicitante muestran una localización endolisosómica disminuida de GSK-3 como reacción a 1,8-cineol 100 μM , lo que destaca su inhibición disminuida después del tratamiento con 1,8-cineol (Figura 4B). La GSK-3 está implicada en la regulación de numerosas rutas de señalización biosintéticas y numerosas cinasas son capaces de regular la actividad de GSK-3 mediante fosforilación en sus sitios de fosforilación activadores o inhibidores. La cinasa Akt (también conocida como PKB), se identificó como oncogén con actividad serina/treonina cinasa y se mostró que ésta representa *in vivo* un regulador negativo de la actividad de GSK3-beta. Akt puede activarse mediante fosforilación en serina 473 mediante PDK1, en la que se supone que la PHLPP funciona como inhibidor de su fosforilación. En un primer enfoque, la solicitante ha analizado el nivel de expresión y el nivel de fosforilación de serina 473 de Akt en la reacción con 1,8-cineol 100 μM . El nivel de fosforilación de Akt en serina 473 no influía sustancialmente en todos los extractos de proteína analizados basados en pólipos nasales cuando se medía también el nivel de expresión individual (Figura 5).

Discusión

En los pólipos nasales, se trata de un trastorno proliferativo benigno de la mucosa nasal y de los cornetes nasales medios. La terapia estándar actual recomendada según las directrices internacionales y europeas se basa en corticosteroides tópicos. La respuesta de los pólipos nasales a los esteroides no es satisfactoria sin embargo a menudo, aun cuando estos se apliquen como terapia a largo plazo con ciclos intermedios de glucocorticoides sistémicos, de modo que a menudo son necesarias no obstante medidas quirúrgicas.

Los datos más recientes de la solicitante muestran en pólipos nasales, en comparación con los cornetes nasales inferiores de pacientes con RSCcPN, una tasa de fosforilación significativamente mayor de GSK-3-alfa/beta. Además, la solicitante ha observado una expresión simultánea de pGSK-3-alfa/beta en todas las células de la capa epitelial en pólipos con engrosamientos del epitelio.

En GSK-3, se trata de una enzima polivalente, que está implicada en una pluralidad de cascadas de señalización celular. La GSK-3 está conectada posteriormente con numerosas rutas de señalización principales que comprenden la ruta de señalización de fosfatidilinositol 3'-cinasa, la ruta de señalización de Wnt, la señalización de Hedgehog y la ruta de señalización de Notch.

Numerosos estímulos conducen a una inactivación de GSK-3, comprendiendo factores de crecimiento como EGF (factor de crecimiento epidérmico), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), IGF (factor de crecimiento similar a insulina) e insulina.

Las interacciones de GSK-3 con NF- κ B, mTOR, TGF-beta y p38 son conocidas. La GSK-3 fosforila una variedad de sustratos, p. ej. glicógeno sintasa y otras enzimas metabólicas, β -catenina, los factores de transcripción CBP (proteína de unión a CREB), c-Myc y c-Jun y los factores de iniciación de la traducción eIF2 y eIF2B.

En exámenes anteriores, la solicitante ha observado una activación de GSK-3 en mucosa nasal inflamada en general

y otra distinta activación de GSK-3 en pólipos nasales.

En el marco de este trabajo, la solicitante ha mostrado ahora por primera vez que el 1,8-cineol funciona como inhibidor fuerte de la actividad de Wnt/beta-catenina y al respecto conduce a un fuerte descenso de la progresión celular.

5 La degradación disminuida de beta-catenina se correlaciona con una inhibición disminuida de GSK3-beta, en la que las proteínas mencionadas responsables de este mecanismo no están aclaradas (véase la Figura 6 como modelo).

En resumen, puede comprobarse que los resultados de la solicitante muestran un nuevo enfoque de terapia o efecto útil para la actividad de 1,8-cineol y conducen a nuevas aplicaciones de tratamiento de este principio activo natural o de base natural.

Descripción de las Figuras

10 Figura 1

Tinción con hematoxilina-eosina (HE) de pólipos nasales y mucosa nasal sana

Este método de tinción tiñe las estructuras basófilas en azul lila y las estructuras eosinófilas en rosa claro, mientras que las estructuras hidrófobas, como las membranas del aparato de Golgi, permanecen sin teñir o transparentes.

Figura 2

15 Reducción dependiente de la dosis de la progresión celular mediante 1,8-cineol

Para determinar si el tratamiento con 1,8-cineol conduce a una inhibición de la viabilidad celular de pólipos nasales, se utilizó la prueba de MTT. Pudo observarse una proliferación fuertemente decreciente de células de pólipos nasales como reacción a una incubación con 1,8-cineol 100 µM después de 144 horas (Figura 2A, con dos sujetos de prueba distintos I y II). Sorprendentemente, las células epiteliales cultivadas de la mucosa nasal no se influyeron por el tratamiento con 1,8-cineol, lo que sugiere un mecanismo de acción específico dependiente del contexto del 1,8-cineol (Figura 2B).

20 Figura 3

Expresión de beta-catenina activa en respuesta al cineol

Para analizar el efecto de un tratamiento de 24 horas con 1,8-cineol 100 µM sobre el nivel de expresión de proteína de beta-catenina activa en tres muestras de tejido distintas de pólipos nasales (A, B, C), se llevaron a cabo análisis de transferencia Western en proteínas totales. Se utilizó GAPDH como control de carga.

25 Figura 4

(A) Expresión de beta-catenina activa y P-GSK-3 (serina 9/21) como reacción al cineol

Para analizar el efecto de un tratamiento de 24 horas con 1,8-cineol 100 µM sobre el nivel de expresión de proteína de beta-catenina activa, fosfo-GSK-3 (serina 9/21) y fosfo-GSK-3 (tirosina 279/216) en cuatro muestras distintas de pólipos nasales (D, E, F, G), se usaron análisis de transferencia Western en proteína totales. Se usó GAPDH como control de carga.

30 (B)/(C) Localización subcelular de P-GSK-3 (serina 9/21) como reacción al cineol

Para analizar la localización endolisosómica disminuida de fosfo-GSK-3 (serina 9/21) como reacción a 1,8-cineol 100 µM, en comparación con medio de control, se llevaron a cabo exámenes inmunohistoquímicos. Los núcleos celulares de tiñeron con DAPI.

35 Figura 5

Expresión de Akt y P-Akt (serina 473) como reacción al 1,8-cineol

Se utilizaron análisis de transferencia Western en proteínas totales para mostrar el efecto de 1,8-cineol 100 µM sobre el nivel de expresión de Akt y P-Akt (treonina 308) en cuatro muestras de tejido distintas de pólipos nasales (H, I, J, K). Se usó GAPDH como control de carga.

40 Figura 6

Modelo de inhibición de Wnt/beta-catenina como reacción al 1,8-cineol

En el marco de este trabajo, la solicitante ha mostrado por primera vez que el 1,8-cineol funciona como inhibidor de la actividad de Wnt/beta-catenina y provoca un fuerte descenso de la progresión celular de pólipos nasales. Los datos de la solicitante muestran que el 1,8-cineol influye en la fosforilación inhibidora y localización endolisosómica de GSK3-

45

beta, en que se trata del regulador básico de la actividad de beta-catenina.

3. Pruebas de aplicación clínica referentes al uso de 1,8-cineol en pacientes con *Polyposis nasi et sinuum*

En el marco de una aplicación clínica, 22 pacientes después de una operación de senos paranasales recibieron, además de una medicación estándar, 1,8-cineol (Soledum forte®), 1 cápsula 3 veces, durante un periodo de 3 meses. Se evaluaron las imágenes de TC preoperatorias según la puntuación de Lund-Mackay. Se pidió a los pacientes valorar sus molestias mediante un formulario (SNOT20 – versión adaptada al alemán). 21 de 22 pacientes terminaron la terapia como estaba previsto. Un paciente informó de efectos secundarios gastrointestinales e interrumpió el tratamiento con 1,8-cineol. El examen de seguimiento después de 6 meses mostró únicamente en un paciente una poliposis recidiva mínima incipiente. En una primera evaluación orientadora, se observó una clara mejora de la puntuación de SNOT-20 en comparación con los resultados preoperatorios. Por tanto, se observó una buena respuesta al tratamiento medicamentoso adicional con 1,8-cineol con un perfil de efectos secundarios tolerable.

El 1,8-cineol es por tanto un complemento valioso del tratamiento posterior medicamentoso después de cirugía de senos nasales.

Las pruebas de aplicación clínica hasta ahora esperanzadoras de los nuevos efectos útiles y posibilidades de terapia de 1,8-cineol encontrados por la solicitante continúan, y todos los pacientes tratados con 1,8-cineol hasta ahora se examinan regularmente respecto a la aparición de posibles recidivas.

Además, deben examinarse ahora los efectos útiles del 1,8-cineol también en la constitución adenoide, y a este respecto existe también la evaluación de la posible disponibilidad del 1,8-cineol en forma de un pulverizador nasal.

4. Otros estudios: Enfoques clínicos y de biología molecular para el empleo terapéutico de cineol, particularmente 1,8-cineol, en pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*)

1. Antecedentes

Polyposis nasi et sinuum son engrosamientos edematosos crónicamente inflamados de la mucosa de células etmoides, fosa esfenoidal y fosa maxilar en las fosas nasales. Pueden conducir a incapacidad de la respiración nasal, pérdida de olfato y otras afecciones de los senos paranasales. Las afecciones poco marcadas pueden tratarse mediante la toma de glucocorticoides (pulverizadores nasales que contienen cortisona, comprimidos de cortisona, etc.). En su mayoría, es sin embargo efectiva una terapia quirúrgica para tratar la incapacidad de respiración nasal y la pérdida de olfato. Las operaciones se llevan a cabo de forma mínimamente invasiva por vía endonasal (a través de las fosas nasales) y con anestesia general y consiguen tasas de curación de aproximadamente un 50 % y una mejora de las molestias en el 90 % de los casos. *Polyposis nasi et sinuum* y las afecciones poliposas crónicas de los senos paranasales tienden a recidivas. A menudo, son necesarias varias operaciones con la evolución de la enfermedad. Las operaciones de senos paranasales mínimamente invasivas se cuentan entre las intervenciones exigentes en el campo de la otorrinolaringología y están ligadas muchas veces a una estancia hospitalaria de varios días para los pacientes afectados y con un tratamiento posterior intensivo.

En el sentido estricto, se entiende por rinitis la alteración inflamatoria de la mucosa nasal y por sinusitis las alteraciones similares de la mucosa de los senos paranasales. En el centro de las molestias, se encuentran dolores, rinorrea y la incapacidad de respiración nasal. La epidemiología, patogénesis causal y formal de la rinosinusitis están suficientemente aclaradas solo en pocos casos. Puede realizarse una clasificación de las rinitis y/o sinusitis según el historial clínico (frecuencia y duración de las molestias), según los puntos de vista inmunológico y morfológico o experimentalmente según su etiología o asociación con afecciones sistémicas.

En la mayoría de entidades de rinitis, se comprobó una transición fluida de rinitis a sinusitis. La mucosa de la nariz y los senos paranasales se diferencia menos en estructura y función cualitativamente que sobre todo cuantitativamente, se superponen directamente en la zona de los orificios de los senos paranasales. En coincidencia con esta imagen, incluso un resfriado vírico banal conduce en un número predominante de casos (hasta un 87 %) a una coparticipación de los senos paranasales demostrable en un tomograma informatizado. Se diferencian por el historial clínico y diagnóstico de 3 a 5 tipos de rinosinusitis.

En la rinosinusitis crónica, la hinchazón de la mucosa con desplazamiento de las vías de drenaje de senos paranasales representa solo uno de los factores patogénéticos, en otra parte de los casos colaboran otros factores a menudo ampliamente desconocidos todavía como, p. ej., para la formación de pólipos nasales como hiperplasias de mucosa grises vidriosas acuosas benignas. Por esta razón, se realiza en la bibliografía una separación entre rinosinusitis poliposa y no poliposa. La presente solicitud se centra en la sinusitis poliposa crónica, a ser posible con manifestación de una *Polyposis nasi et sinuum*.

Terapia conservadora:

Glucocorticoide local en *Polyposis nasi et sinuum*

Particularmente la reacción inflamatoria asociada con eosinófilos en pólipos nasales se inhibe efectivamente por

glucocorticoides. A este respecto, se llega clínicamente a una clara reducción de los síntomas. En los últimos años, las observaciones clínicas se apoyaban crecientemente en parámetros objetivos (rinomanometría, rinometría, flujo inspiratorio nasal máximo PNIF, tomografía de resonancia magnética). También la tasa de recidiva o el punto temporal de la recidiva después de la operación mejoraban o se retardaban significativamente en algunos estudios, sin embargo, los exámenes no superan el periodo de un año. Es por tanto recomendable el empleo de corticosteroides tópicos durante varios meses en pólipos nasales no tratados, así como el inicio de un esquema de terapia antes de un saneamiento quirúrgico, así como para profilaxis de recidiva después de una terapia quirúrgica (6 meses a 1 año).

Terapia quirúrgica

Indicaciones para intervenciones de senos paranasales

La intervención operatoria en rinosinusitis recidivante y crónica con o sin *Polyposis nasi et sinuum* está pues indicada cuando la terapia conservadora no conlleva una mejora o mejora duradera de las molestias.

Sumario:

No hay en la bibliografía hasta ahora ningún examen que examine la influencia del cineol o sustancias similares en la terapia de sinusitis poliposa crónica (con o sin *Polyposis nasi et sinuum*). Hasta ahora, se examina y estandariza aquí solo el empleo de glucocorticoides orales y/ tópicos. El objetivo es examinar en qué medida pueden demostrarse resultados similares en el tratamiento de sinusitis poliposa crónica (con o sin *Polyposis nasi et sinuum*). Como ya se ha representado anteriormente, la solicitante ha procedido por dos lados, a saber, por un lado el lado clínico así como por otro lado el lado de biología molecular.

2. Preliminares para el proyecto de investigación

Características de citoblastos de *Polyposis nasi et sinuum*

Los pólipos nasales muestran, en comparación con mucosa nasal sana, una morfología fuertemente discrepante que se ilustra en la Figura 1 mediante una tinción con hematoxilina-eosina (HE) de cortes congelados de ambos tejidos (Figura 1). Este método de tinción tiñe las estructuras basófilas en azul púrpura y las estructuras eosinófilas en rosa, mientras que las estructuras hidrófobas como las membranas del aparato de Golgi permanecen transparentes. La Figura 1 muestra por tanto la morfología diferente de mucosa nasal sana y *Polyposis nasi et sinuum*.

Para examinar el perfil de expresión de distintos marcadores de citoblastos en *Polyposis nasi et sinuum*, se usó una matriz de proteínas que posibilita el análisis paralelo de un amplio espectro de proteínas de citoblastos distintas. Se valoró el nivel de expresión de 10 marcadores de citoblastos distintos, que de este modo pudieron identificarse en *Polyposis nasi et sinuum*. Pertenecen a estas proteínas, entre otras, los activadores de la transcripción SOX2, Nanog, SOX17, Pdx1 y Otx2, que desempeñan un papel importante en la regulación de procesos de diferenciación celular. Además, podían identificarse las proteínas proteína tumoral 63 (TP63), alfa-fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana beta (HCG) y E-cadherina, representando dichas proteínas clave distintos procesos celulares como diferenciación, proliferación y adhesión en citoblastos pluripotentes humanos.

Citoblastos que expresan Oct-4 A en *Polyposis nasi et sinuum*

Entre los marcadores de citoblastos identificados, se encuentra también el activador de la transcripción Oct-4 en *Polyposis nasi et sinuum*. Se supone que Oct-4 es el regulador básico de la pluripotencia embrionaria y la capacidad de autorrenovación.

Se ha mostrado que existen 2 isoformas distintas de Oct-4, a saber, Oct-4 A y Oct-4 B, que se diferencian tanto en el tamaño de proteína como en la función.

Se supone que únicamente la isoforma Oct-4 A mayor regula las propiedades de citoblastos, mientras que la función de Oct-4 B está en gran medida sin resolver.

Por tanto, la solicitante ha usado anticuerpos específicos de Oct-4 A para analizar inmunohistoquímicamente la existencia de células que expresan Oct-4 A en *Polyposis nasi et sinuum*.

Los datos muestran claramente la presencia de células que expresan Oct-4 A en *Polyposis nasi et sinuum* y los exámenes de citometría de flujo continuos muestran de media aproximadamente un 1,7 % de células que expresan Oct-4 A en *Polyposis nasi et sinuum*, que son negativas de los marcadores de linaje analizados CD3, CD16, CD19, CD20 y CD56.

Los exámenes inmunohistoquímicos y de citometría de flujo muestran de media aproximadamente un 1,7 % de células que expresan Oct-4 A en *Polyposis nasi et sinuum*, que son negativas de los marcadores de linaje analizados CD3, CD16, CD19, CD20 y CD56.

Influencia inhibitoria del cineol sobre la progresión de *Polyposis nasi et sinuum*

Se llevaron a cabo los primeros ensayos preliminares de la influencia del cineol sobre la progresión de *Polyposis nasi et sinuum*. Para ello, se prepararon en primer lugar suspensiones de células individuales y se incubaron éstas en cultivo celular durante un periodo de 288 horas con medio estándar y con cineol 1 mM. Los resultados muestran la caída masiva de vitalidad celular después de 96 a 144 horas por cineol. Esto demuestra la influencia inhibitoria del cineol 1 mM sobre la progresión de *Polyposis nasi et sinuum*.

Estos ensayos se llevaron a cabo hasta ahora con pólipos de 5 pacientes distintos y mostraron cada vez resultados sorprendentemente coincidentes, de forma que la solicitante consideró los análisis continuos de los mecanismos moleculares subyacentes de la efectividad del cineol, particularmente también de las características de citoblastos y por tanto las tasas de recidiva de *Polyposis nasi et sinuum*, extremadamente esperanzadores y relevantes en terapia.

3. Finalidad

Debe caracterizarse la influencia del cineol sobre el mecanismo molecular y las cascadas de transducción de señal en la progresión de *Polyposis nasi et sinuum*, particularmente también con respecto a las características de citoblastos que comprenden esta afección.

(I) Parte experimental

Influencia del cineol sobre la vitalidad y proliferación celular

Se llevaron a cabo exámenes continuos para análisis de la influencia del cineol sobre la vitalidad y proliferación de distintas líneas celulares permanentes. Para ello, se usaron por un lado dos líneas celulares HNSCC y además una línea celular de fibroblastos. Estas se cultivaron durante un periodo de 250 horas con distintas concentraciones de cineol (1 mM a 10 mM) y se examinó la vitalidad de las células respectivamente mediante un ensayo de MTT. Se encontró tanto una influencia inhibitoria del cineol sobre la progresión y vitalidad de HNSCC como una influencia inhibitoria del cineol sobre la progresión y vitalidad de fibroblastos.

A este respecto, se mostró una imagen similar a los exámenes precedentes de influencia del cineol sobre la vitalidad de suspensiones de células individuales de *Polyposis nasi et sinuum*, en la que sin embargo las líneas celulares permanentes pueden influirse significativamente en su proliferación solo en puntos temporales poco posteriores y a concentraciones de cineol poco mayores. Esta diferencia se basa muy probablemente también en el hecho de que se trataba en las muestras de *Polyposis nasi et sinuum* de material primario y que las células se sometieron a mayor estrés por las etapas de ensayo necesarias, además de las características específicas celulares.

Sin embargo, estas diferencias subrayan claramente la eficacia inhibitoria de la proliferación masiva observada del cineol a partir de una concentración de 1 mM a 2 mM y una acción claramente citotóxica a 10 mM en todas las especies celulares examinadas.

Para establecer una clara conexión de las repercusiones observadas del cineol con la posible inducción de apoptosis, una necrosis o bien un bloqueo del ciclo celular, se examinan las distintas células actualmente mediante citometría de flujo en presencia y ausencia de distintas concentraciones de cineol.

Esto sucede mediante tinciones con anexina V y yoduro de propidio (PI) y puede valorarse cuantitativamente a continuación en FACS (citometría de flujo), como se ve claramente en los primeros ensayos preliminares.

Con el análisis de anexina V-GFP/PI-FACS, pueden detectarse cuantitativamente las poblaciones individuales. Las células vitales son negativas de anexina V-GFP/PI, las células apoptóticas presenta tinción con anexina V. Las células que han pasado ya a necrosis secundaria son positivas de anexina V-GFP/PI.

Durante la apoptosis, se enriquece en fosfatidilserina (PS) la membrana celular externa, que se encuentra normalmente solo en la capa interna de la membrana plasmática. La PS es una señal de reconocimiento fagocítico que agrupa células fagocíticas como macrófagos para la eliminación de las células apoptóticas. El denominado tinte de muerte yoduro de propidio (PI) es impermeable para la membrana y puede teñir el ADN solo en células con una membrana dañada. Por ello, se usa el PI también para la diferencia entre viva/muerta.

Influencia del cineol sobre la actividad de migración celular

Aparte de la vitalidad y progresión celular, así como la influencia sobre la apoptosis y el ciclo celular, la solicitante ha examinado también la influencia del cineol sobre el comportamiento de migración celular. A causa de la sensibilidad de las muestras primarias de *Polyposis nasi et sinuum* y la reproducibilidad requerida de las disposiciones de ensayo, la solicitante ha cultivado en sus análisis de migración líneas celulares permanentes de tumores de cabeza y cuello malignos con distintas concentraciones de cineol y ha examinado su actividad de migración.

Los ensayos se llevaron a cabo mediante el sistema X-Celligence y muestran únicamente una ligera influencia del cineol sobre la actividad de migración celular a una concentración de 2 mM.

Influencia del cineol sobre el factor de transcripción NF-kB

Se ha mostrado que una inhalación de cineol en el “modelo de conejillo de Indias” conduce a una clara reducción de las citocinas proinflamatorias, en la que sin embargo los mecanismos moleculares subyacentes siguen estando por resolver.

5 Ya que también se postula en la *Polyposis nasi et sinuum* que los parámetros de inflamación tienen una influencia decisiva en la progresión de esta afección, la solicitante examinó la influencia del cineol sobre la actividad del factor de transcripción factor nuclear kappa B (NF-kB) y sobre la actividad de un amplio espectro de distintas fosfocinasas, para identificar así los puntos de ataque molecular del cineol en distintas rutas de biosíntesis de las células respecto al “micromedio” de *Polyposis nasi et sinuum*.

10 El factor de transcripción NF-kB se descubrió en 1986 en el laboratorio de David Baltimore como un regulador de la expresión del gen de la cadena ligera kappa (kL) de inmunoglobulina en linfocitos B de murido. Desde entonces, se sabe que este factor de transcripción aparece ubicuamente y funciona como coordinador básico de un amplio espectro de distintas funciones celulares. Muchas indican que el factor de transcripción NF-kB desempeña también una función clave en la generación tumoral debida a inflamaciones crónicas. Las funciones de NF-kB son sin embargo muy diversas y también específicas de célula. Así, la inhibición de NF-KB puede provocar tanto apoptosis como generación tumoral espontánea. Todas estas rutas de transducción de señal complejas requieren una regulación bien coordinada, de forma que las desregulaciones de factores de transcripción como NF-KB están implicadas relevantemente en distintos aspectos celulares de la oncogénesis. En muchas células, el NF-kB activa la expresión de una pluralidad de citocinas inflamatorias, como IL-1 e IL-6, de quimiocinas como IL-8, moléculas de superficie inmunorreguladoras o moléculas de adhesión molecular.

20 Los exámenes de la influencia del cineol sobre la actividad del factor de transcripción NF-kB en *Polyposis nasi et sinuum* muestran claramente que el cineol no tiene influencia inhibitoria, sino que más bien actúa activando ligeramente. En los resultados de medida, se usó TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa) como estímulo establecido de actividad de NF-kB y por tanto como control positivo interno.

Perfil de fosfocinasas en *Polyposis nasi et sinuum*

25 Se llevó a cabo el nivel de fosforilación, y por tanto la activación de un amplio espectro de distintas fosfocinasas de rutas de biosíntesis muy distintas, mediante una “matriz de fosfocinasa-proteína”. Esta matriz determina el nivel de expresión de 44 fosfocinasas fosforiladas y permite por tanto conclusiones sobre la regulación de distintas cascadas de transducción de señal.

30 El principio de esta matriz de proteínas se basa en el análisis simultáneo de distintas proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa. Sobre esta membrana de nitrocelulosa se colocan anticuerpos primarios (“anticuerpos de captura”) contra las proteínas para examinar y anticuerpos de control respectivamente como determinaciones por duplicado. Después de incubación con los lisados celulares obtenidos de tejidos de *Polyposis nasi et sinuum*, se eliminaron las proteínas no unidas mediante etapas de lavado correspondientes. A continuación, se realizó la incubación con un anticuerpo secundario biotinilado específico, con posterior incubación con un Ab anti-biotina (fosfatasa alcalina), con lo que las proteínas unidas específicamente a la membrana se hicieron visibles y por tanto cuantificables.

35 Estos exámenes se llevaron a cabo respectivamente con tejidos de *Polyposis nasi et sinuum* en comparación directa con mucosa “sana” de los mismos pacientes. Los cocientes conseguidos, la diferencia pues entre sano y enfermo de los resultados de cuantificación llevados a cabo, se representan en la Tabla 1.

Tabla 1: Perfil de actividad fosfocinasas

| | PM de | PM de | DE de | DE de | Cociente de |
|------------------|---------|---------|--------|---------|----------------|
| | pólipos | cornete | pólipo | cornete | pólipo/cornete |
| Fyn; Y420 | 3,73 | 2,42 | 0,86 | 0,71 | 1,54 |
| Lyn; Y397 | 3,53 | 2,10 | 0,77 | 0,83 | 1,68 |
| c-jun; S63 | 6,61 | 4,51 | 1,38 | 0,40 | 1,47 |
| Pyk2; Y402 | 4,43 | 2,82 | 1,33 | 0,28 | 1,57 |
| STAT1; Y701 | 5,17 | 6,62 | 1,39 | 3,70 | 0,78 |
| STAT2; Y689 | 10,50 | 7,66 | 1,67 | 1,43 | 1,37 |
| STAT3; Y705 | 3,73 | 1,80 | 1,00 | 0,85 | 2,08 |
| STAT4; Y693 | 5,23 | 6,46 | 1,01 | 2,76 | 0,81 |
| STAT5a/b; Y699 | 5,59 | 5,50 | 1,44 | 2,29 | 1,02 |
| STAT5a; Y699 | 3,43 | 2,90 | 0,80 | 0,60 | 1,18 |
| STAT5b; Y699 | 14,61 | 7,60 | 7,19 | 4,42 | 1,92 |
| STAT6; Y641 | 7,76 | 6,09 | 2,30 | 2,21 | 1,28 |
| TOR; S2448 | 4,38 | 3,14 | 1,44 | 1,87 | 1,40 |
| CREB; S133 | 2,88 | 1,29 | 3,55 | 0,91 | 2,24 |
| GSK-3α/β; S21/S9 | 11,19 | 3,01 | 5,85 | 1,46 | 3,72 |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| β-catenina | 2,88 | 2,24 | 1,32 | 0,95 | 1,29 |
| MEK1/2 | 5,01 | 2,80 | 1,29 | 1,04 | 1,79 |
| MSK1/2; S376/S360 | 4,75 | 3,61 | 0,88 | 1,11 | 1,31 |
| ERK1/2; T202/Y204, T185/Y187 | 38,59 | 16,50 | 46,47 | 23,69 | 2,34 |
| p27; T198 | 1,29 | 3,25 | 1,35 | 4,51 | 0,40 |
| p27; T157 | 1,63 | 2,15 | 1,06 | 0,77 | 0,76 |
| p38α | 2,38 | 1,93 | 1,58 | 1,17 | 1,23 |
| p53; S46 | 5,71 | 5,51 | 0,91 | 1,32 | 1,04 |
| p53; S392 | 1,44 | 2,00 | 1,14 | 0,98 | 0,72 |
| p53; S15 | 9,28 | 6,97 | 1,80 | 2,49 | 1,33 |
| Paxilina; Y118 | 4,47 | 2,99 | 1,15 | 0,63 | 1,50 |
| eNOS; S1177 | 6,59 | 3,00 | 4,50 | 2,75 | 2,20 |

En 5 pacientes con sinusitis poliposa crónica se examinaron muestras de tejido de pólipos y del cornete nasal inferior, que sirvieron como control interno, mediante la matriz de proteínas.

5 En las muestras de tejido de pólipos nasales examinadas se reconocían claramente cambios en comparación con la mucosa sana. Así, por ejemplo, el nivel de fosforilación de la proteína STAT3; Y705 en todas las muestras estaba significativamente elevado. Lo mismo es válido para STAT5b, Y699 y GSK-3-alfa (véase la Tabla 1).

Los exámenes forman el fundamento de análisis continuos para la identificación de las rutas de biosíntesis responsables de la proliferación en *Polyposis nasi et sinuum*.

10 Así, la STAT3 desempeña un papel básico en la ruta de JAK-STAT. La activación se realiza, p. ej., mediante la unión de IL-6 al receptor de JAK, dando así como resultado la fosforilación de STAT. Estas dimerizan y migran a los núcleos celulares, donde activan la transcripción de distintos genes diana en el marco de la proliferación celular.

La solicitante centra sus exámenes en la caracterización funcional de estas proteínas con respecto a la progresión de *Polyposis nasi et sinuum* y la efectividad del cineol.

15 La naturaleza proliferativa crónica de la *Polyposis nasi et sinuum* y la alta tasa de recidiva también después de saneamiento operatorio Perfil de expresión de ARNm de un amplio espectro de marcadores de citoblastos potenciales en *Polyposis nasi et sinuum*

de los senos paranasales deja reconocer claramente semejanzas con el crecimiento de afecciones tumorales. Hasta ahora, está sin resolver de qué conjunto celular se agrupan las células de tejido de pólipos nasales, qué proceso de transducción de señal desempeña un papel para el crecimiento de los pólipos y por qué razón los pólipos nasales no degeneran.

20 Posiblemente, los citoblastos forman un conjunto celular que contribuye a una proliferación crónica de los pólipos nasales, en estudios más recientes podría mostrarse pues que los citoblastos no solo desempeñan un papel esencial en la generación y diferenciación de organismos complejos y en procesos de renovación celular, sino también en la generación y progresión de afecciones proliferativas. Posiblemente, los citoblastos podrían desempeñar también un papel en la patofisiología de *Polyposis nasi et sinuum*.

25 Para la identificación y caracterización continua y de genoma completo de poblaciones de citoblastos potenciales en *Polyposis nasi et sinuum*, se examinó la expresión de marcadores de citoblastos de suspensiones de células individuales mediante análisis de PCR de tiempo real.

30 Además, se analizaron comparativamente en exámenes adicionales tejidos de *Polyposis nasi et sinuum*, así como tejidos de cornete nasal inferior mediante micromatrices (configuraciones de genoma completo y especial) y se examinaron las diferencias en los patrones de expresión.

35 Se elaboraron perfiles de expresión de ARNm de marcadores de citoblastos potenciales en *Polyposis nasi et sinuum*. La valoración de estos exámenes no está todavía concluida, ya que se recopilan otros datos de muestras de tejido de *Polyposis nasi et sinuum* adicionales y actualmente se investigan mediante micromatrices. Hasta ahora, sin embargo, se muestra que el perfil de expresión de los distintos pacientes presenta características muy propias y, a pesar de estas divergencias individuales, destacan algunos cambios de perfil significativos entre *Polyposis nasi et sinuum* y mucosa sana, como los factores de transcripción Nanog y FOXC2 o el marcador de migración CXCR4.

Después de concluir la valoración de la micromatriz continua actual, se verifican los resultados así obtenidos de niveles de proteínas y se examina entonces la influencia por distintas concentraciones de cineol.

Exámenes de la ruta de señalización de Wnt/FZD

40 La ruta de señalización de Wnt-Frizzled desempeña un papel importante para procesos regulatorios del desarrollo

embrionario, de conservación de órganos autorregenerativos del depósito de citoblastos y la activación de la proliferación de citoblastos.

Los fundamentos de la ruta de señalización de Wnt se investigaron a finales de los 1980 o principios de los 1990, cuando pudo mostrarse que los productos génicos de *Drosophila wingless* (wg) e Int1 de ratón (más tarde renombrado Wnt1) pertenecen a una gran familia conservada evolutivamente de moléculas de señalización extracelulares.

Las proteínas Wnt son ligandos de glicoproteína de la familia de receptores transmembrana Frizzled (FZD), de las que son conocidas hasta ahora 19 en el hombre. Dependiendo del contexto de receptor, del tipo celular y del estadio de diferenciación de las células, los ligandos de Wnt podrían iniciar al menos tres cascadas de señalización intracelular distintas, que desembocan en la regulación de la transcripción de distintos genes. Se diferencian entre sí la ruta "canónica", de "Wnt/polaridad celular plana" y "Wnt-Ca²⁺". En la cascada de señalización "canónica", la interacción de ligandos de Wnt (por lo general Wnt3a) con los receptores FZD con cooperación con la "proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad" (LRP) conduce a la inhibición de la glicógeno sintasa cinasa 3-beta (GSK-3-beta), y por consiguiente se llega a la estabilización y acumulación de beta-catenina en el citoplasma, su translocación a los núcleos celulares y la transcripción de genes dependientes de TCF4/LEF. Si no se presenta una interacción Wnt3a/FZD, se fosforila así la beta-catenina mediante el complejo axina/GSK3-beta/APC y por consiguiente se degrada después de ubiquitinación mediada por el proteasoma. En la ruta de señalización de Wnt/Ca²⁺ "no canónica" dependiente de beta-catenina, se llega después de la interacción de ligandos de Wnt (típicamente Wnt5a) con receptores FZD (típicamente FZD2/FZDS5) por fosfolipasa C a una corriente de entrada de Ca²⁺ y la activación de factores dependientes de Ca²⁺, como proteinasa C (PKC) y cinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKII). De ello puede darse como resultado una actividad de transcripción por los factores de transcripción NF-kappaB, NFAT y la familia AP1.

La ruta de señalización de Wnt/FZD puede inhibirse mediante dos clases de antagonistas extracelulares, que impiden ambos la interacción entre ligando y receptor: la primera clase la forman las sFRP "proteína relacionada con Frizzled secretada", "factor inhibidor de Wnt 1" y Cerberus, que se unen a proteínas Wnt y por tanto impiden su unión a receptores de Wnt. La segunda clase de antagonistas de Wnt forman las proteínas "Dickkopf" (DKK), que pueden provocar el bloqueo del correceptor LRPS/LRP6.

La complejidad de las rutas de transducción de señal de Wnt/FZD requiere una buena regulación coordinada. Una desregulación o sobreexpresión de la señalización de Wnt puede conllevar un crecimiento no dirigido de distintas células. En el carcinoma de colon, se encuentran mutaciones de las proteínas APC y axina, implicadas en la ruta de señalización de Wnt. Además, se ha mostrado para numerosas entidades tumorales un "silenciamiento" epigenético del factor inhibidor de Wnt 1, que podría favorecer una desregulación de la ruta de señalización de Wnt/FZD.

Desde los primeros informes de una sobreexpresión mediada por Wnt5a de citocinas y citocinas proinflamatorias en fibroblastos en artritis reumatoide, pudo mostrarse el papel de la ruta de señalización de Wnt/FZD para la regulación de procesos inflamatorios en psoriasis, sepsis, asma y tuberculosis. Para células endoteliales, se describió que mediante la ruta de señalización de Wnt/Ca²⁺ independiente de beta-catenina puede inducirse la expresión de COX-2 y potenciarse la secreción de citocinas. En contraposición a la ruta de señalización de Wnt/Ca²⁺, la señalización de Wnt "canónica" dependiente de beta-catenina parece tomar un papel inmunomodulador o antiinflamatorio. Después de eso, los resultados conseguidos recientemente señalan claramente que en macrófagos podría mostrarse una expresión de TNF-alfa disminuida después de activación de la señalización de Wnt/beta-catenina mediante Wnt3a o un inhibidor de GSK-3-beta. En otros estudios, la inhibición de la expresión de beta-catenina en células dendríticas conducía a una potenciación de la respuesta inflamatoria, con lo que el papel de la beta-catenina como moderador de la respuesta inmunitaria podía demostrarse expresamente. La expresión de beta-catenina de células dendríticas intestinales parece ser además decisiva para el equilibrio del estado de activación de linfocitos T reguladores y linfocitos T efectoras.

Numerosos medicamentos tienen influencia sobre la expresión de Wnt. De forma interesante, los glucocorticoides potencian la expresión de antagonistas de Wnt y pueden por tanto reprimir la señalización de Wnt. Por tanto, existe una interacción inmediata entre los fármacos más importantes actualmente en RSCcPN, los glucocorticoides, con la ruta de señalización de Wnt.

Para el ácido acetilsalicílico (AAS), que desempeña un papel importante para el desarrollo de una RSCcP en pacientes con intolerancia a AAS mediante un mecanismo desconocido hasta ahora, podía mostrarse en un análisis de expresión génica de estirpes celulares de colon-Ca una regulación positiva de WIF-1 y por tanto una supresión de Wnt.

Las propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias de las rutas de señalización de Wnt "canónicas" (señalización de Wnt/beta-catenina) y "no canónicas" parecen tomar un papel importante para la modulación de procesos inflamatorios agudos y crónicos en la rinosinusitis crónica con poliposis (RSCcP). Una mejor comprensión de la ruta de señalización de Wnt/FZD en RSCcP puede contribuir a enfoques de terapia novedosos y por tanto a una reducción de la frecuencia de recidiva y la necesidad de intervenciones operatorias en RSCcP.

A continuación, se enumeran e ilustran los resultados actuales muy prometedores de señalización de Wnt/FZD en RSCsP.

Mediante análisis de micromatriz (Agilent Whole Human Genome Oligo), la solicitante ha conseguido datos de expresión génica integral de 5 parejas de pólipo/cornete nasal inferior de 5 pacientes con RSCcP.

Factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1)

5 En el análisis de los datos de micromatriz, llama la atención en todos los preparados una regulación negativa altamente significativa de al menos 100 veces del factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1), que puede confirmarse en RT-PCR (ensayo TaqMan) con una regulación negativa de 4 a 230 veces.

10 Para otros inhibidores de Wnt como DKK (Dickkopf) y SFRP (proteína relacionada con Frizzled secretada), se mostraba únicamente para SFRP 5 una regulación negativa significativa ($p < 0,01$). La inmunohistoquímica de WIF-1 mostraba en tejido de cornete nasal inmunopositividad en la zona del estroma subepitelial, mientras que el epitelio presentaba poca a ninguna inmunopositividad de WIF-1. En tejidos de poliposis, se mostraba solo una débil inmunopositividad.

Una regulación negativa de los inhibidores de Wnt puede tener como consecuencia una desregulación de la ruta de señalización de Wnt/FZD y podía contribuir por tanto a la inflamación y progresión en RSCsP.

15 En la inmunohistoquímica de fluorescencia contra WIF-1, se mostraba en tejido de cornete nasal inmunopositividad en la zona del estroma subepitelial, mientras que el epitelio presentaba poca a ninguna inmunopositividad de WIF-1. El tejido de poliposis mostraba solo áreas subepiteliales puntuales poco inmunopositivas.

Se elaboró un diagrama de KEGG de la ruta de señalización de Wnt/FZD en RSCsP. Se transfirieron los datos de micromatriz con el software "Onto-Tools" al diagrama de KEGG y se valoraron.

Proteínas Wnt

20 De la comparación de pólipos y cornetes nasales inferiores como fundamento del análisis de micromatriz surgió (después de "agrupamiento" de los resultados y corrección de errores mediante el modelo de errores de Rosetta; Rosetta Resolver Software) una regulación negativa significativa de varias proteínas Wnt.

25 Se agruparon los datos de micromatriz de 5 pólipos y 5 cornetes nasales y se compararon entre sí después de corrección de errores (software Rosetta). Se valoraron las diferencias de expresión de pólipo frente a cornete nasal. Se realizó una validación de los datos de micromatriz por RT-qPCR (ensayo TaqMan). Hasta Wnt7a se mostró una buena correlación de los datos de micromatriz con los datos de RT-qPCR.

Aparte de una regulación positiva significativa de Wnt3a responsable de la activación de la ruta de Wnt/beta-catenina, se mostró un nivel claramente elevado de ARNm de Wnt4 y Wnt7a, cuyos papeles hasta ahora se han caracterizado poco para la señalización de Wnt/FZD.

30 Pudo confirmarse en gran medida un nivel de expresión de ARNm de proteínas Wnt significativamente elevado o reducido ($p < 0,05$) entre pólipo y cornete nasal inferior mediante RT-qPCR (ensayo Taq-Man). La solicitante pudo detectar inmunohistoquímicamente hasta ahora Wnt3a y Wnt4.

La inmunohistoquímica de LSAB para Wnt3A y Wnt4 mostraba en tejidos de poliposis inmunopositividad tanto del epitelio como de fibroblastos e infiltrado inflamatorio.

35 La detección de proteína de Wnt5a no es exitosa todavía con los métodos usados hasta ahora por la solicitante (transferencia Western e inmunohistoquímica) y debe por tanto realizarse próximamente una inmunoprecipitación. Independientemente del preparado, es válido sin embargo que la detectabilidad de los niveles de proteína Wnt5a es en general técnicamente exigente.

Receptores de Frizzled (FZD)

40 De los análisis de micromatriz surgió una imagen heterogénea regulada positiva y negativamente de receptores de Frizzled (FZD), es decir, los resultados de micromatriz mostraban una imagen heterogénea de receptores de FZD regulados positiva y negativamente. Es llamativa la regulación positiva de > 3 veces de FZD2, un activador de la señalización de Wnt/ Ca^{2+} .

45 El nivel de expresión de ARNm de FZD2 estaba regulado positivamente 3,53 veces (micromatriz) o 2,21 veces (RT-qPCR). Mediante FZD2, así como FZD5, puede activarse la ruta de señalización de Wnt/ Ca^{2+} , activándose entre otros procesos proinflamatorios mediante activación de macrófagos. La inmunohistoquímica de FZD2 mostraba una intensidad de fluorescencia marcada del epitelio de pólipos. En transferencia Western, pudo confirmarse la expresión potenciada de FZD2 en pólipo encontrada en micromatriz y RT-PCR en comparación con cornete nasal inferior.

50 Se realizó una comparación del nivel de ARNm de FZD2 de pólipo frente a cornete nasal mediante micromatriz (MA) y RT-qPCR (PCR).

La inmunohistoquímica de FZD2 mostraba una intensidad de fluorescencia marcada del epitelio de pólipos. En

transferencia Western, pudo confirmarse la expresión potenciada de FZD2 en pólipo encontrada en micromatriz y RT-PCR en comparación con cornete nasal inferior.

Señalización de Wnt/beta-catenina

5 En infiltrado inflamatorio de tejido de poliposis, puede detectarse inmunohistoquímicamente beta-catenina nuclear. Después de incubación de suspensiones de células individuales de poliposis en portaobjetos de cámara con el inhibidor de GSK-3-beta SB216763, se mostraba en la inmunohistoquímica anti-beta-catenina una acumulación de beta-catenina en citoplasma y una translocación de beta-catenina al núcleo celular.

10 Se llevó a cabo una inmunohistoquímica anti-beta-catenina activa en la suspensión de células individuales de poliposis incubada durante 24 h con el inhibidor de GSK-3 SB216763 (portaobjetos de cámara). Mediante la inhibición de la degradación de beta-catenina, se muestra un claro enriquecimiento de beta-catenina así como una translocación de beta-catenina al núcleo celular.

15 Para el examen funcional del papel de la señalización de Wnt/beta-catenina sobre la expresión de citocinas, se incubaron tejidos primarios de poliposis con los activadores de la ruta de señalización de Wnt/beta-catenina Wnt3a y SB216763. Coincidentemente con otros resultados, una respuesta inflamatoria disminuida en macrófagos después de incubación con Wnt3a o el inhibidor de GSK3-beta SB216763 mostraba en tejidos de poliposis una secreción disminuida de IL-6 e IL-8.

Sumario de los exámenes

Pueden resumirse los siguientes conocimientos de los exámenes:

- 20 • Influencia del cineol sobre la viabilidad y la progresión celular a especies celulares benignas y malignas: análisis de las características del ciclo celular y de los mecanismos de una posible regulación apoptótica.
- Influencia del cineol sobre la actividad de migración celular: análisis de micromatriz de genoma completo de patrones de expresión de ARNm de *Polyposis nasi et sinuum* bajo la influencia del cineol y una valoración posterior respecto a los parámetros relevantes de migración.
- 25 • Influencia del cineol sobre los perfiles de actividad de NF-kB y fosfocinasa: verificación de las fosfocinasas identificadas a nivel de proteína y posterior caracterización funcional.
- Influencia del cineol sobre el perfil de expresión de marcadores de citoblastos potenciales: verificación de los marcadores de citoblastos identificados a nivel de proteína y posterior caracterización funcional.

Otras aplicaciones clínicas

30 En resumen, puede ponerse a disposición pues en el marco de la presente invención por primera vez un concepto de terapia novedoso, al menos sustancialmente libre de efectos secundarios, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente también formas recidivantes, basado en un principio activo de base natural (cineol, particularmente 1,8-cineol), con el que pueden evitarse al menos en gran medida o bien atenuarse al menos las desventajas del estado de la técnica y con el que puede conseguirse una eficiencia comparable, preferiblemente incluso mejorada, en comparación con los conceptos de terapia del estado de la técnica.

35 Para otra verificación clínica del concepto según la invención, se estiman datos clínicos adicionales. Particularmente, el efecto terapéutico del cineol, particularmente 1,8-cineol, puede verificarse también en el marco de sinusitis poliposa crónica con *Polyposis nasi et sinuum* (estudio aleatorizado con doble anonimato y controlado por placebo). El objetivo del concepto de terapia según la invención es particularmente también una ausencia de recidiva constante o al menos un alargamiento del intervalo libre de recidiva, particularmente debido al efecto antiinflamatorio y de tipo corticosteroide del cineol, particularmente 1,8-cineol. También se llega a una evitación o al menos reducción de las terapias prolongadas conocidas con corticosteroides (glucocorticoides), particularmente también con *Asthma bronchiale* existente simultáneamente.

Criterios de inclusión

45 Pansinusitis poliposa crónica asegurada clínicamente (endoscópicamente/radiológicamente/por TC) con o sin *Polyposis nasi*, eventualmente también afección recidiva eventualmente basada en *Asthma bronchiale*

Última terapia sistemática de corticosteroides antes de 6 semanas

Sin terapia con cineol en las últimas 6 semanas

Sin cambio de terapia en las últimas 4 semanas antes del inicio de los estudios

50 Sin intolerancia frente a aceites etéricos

Sin afecciones respiratorias inflamatorias bacterianas en las últimas 4 semanas

- Seguimiento regular posible
- Sin embarazo o lactancia
- Sin afección cardiopulmonar grave concomitante
- Sin afección tumoral maligna
- 5 Sin otra afección prolongada crónica (diabetes incontrolada; artritis reumatoide)
- División de los pacientes en 3 grupos:
1. Grupo de control con administración de mometasona nasal convencional
 2. Administración de mometasona nasal + toma sistémica de cineol
 3. Administración de mometasona nasal + toma tópica de cineol
- 10 Exámenes:
1. preterapéutico
 2. preoperatorio (PE intraoperatorio)
 3. posoperatorio de 3 semanas
 4. posoperatorio de 6 semanas
 5. posoperatorio de 12 semanas
- 15 Exámenes clínicos de otorrinolaringología
- Endoscopia (0°, 30°, 70° de óptica)
- Prueba de alergia
- Rinomanometría
- 20 Olfatometría
- Tomograma informatizado de senos paranasales
- Eventualmente función pulmonar/pletismografía corporal
- PE en poliposis; eventualmente también cornete nasal medio y/o inferior a ser posible en todos los controles
- Toma de sangre
- 25 Formulario de calidad de vida correspondiente a los controles
- Seguimiento
- “Diario” del paciente
- Estudio de micromatriz de cineol
- Examen de la expresión génica en rinosinusitis crónica con poliposis (RSCcP) con terapia de 1,8-cineol
- 30 Criterios de inclusión:
- Rinosinusitis crónica con *Polyposis nasi et sinuum* (RSCcP)
- Criterios de exclusión:
- Terapia sistémica o tópica con glucocorticoides antes de menos de 6 semanas
- Intolerancia contra aceites etéricos o sorbitol
- 35 Infección bacteriana de las vías respiratorias superiores
- Terapia de antibióticos
- Enfermedad tumoral maligna

Asma bronquial

Úlcera de duodeno

Embarazo o lactancia

Alergia

5 Experimentos:

Extracción de tejido de *Polyposis nasi* en aprox. 10 pacientes antes de la toma de cineol y después de aprox. 1 semana de terapia de cineol (intraoperatorio)

Extracción de tejido de cornete nasal de aprox. 10 pacientes "sanos" (sin RSC, sin medicación adicional, sin alergia) durante septoplastia con turbinectomía

10 Comparación de la expresión génica de tejido de poliposis extraído preoperativa e intraoperativamente de modo intraindividual así como interindividual con tejido de cornete nasal "sano" mediante análisis de micromatriz

Confirmación del análisis de micromatriz por RT-qPCR, inmunohistoquímica y transferencia Western.

Datos del paciente necesarios:

Punto temporal de la última terapia de glucocorticoides

15 Edad

Género

Alergias/intolerancia a AAS

Medicamentos

Afecciones coexistentes

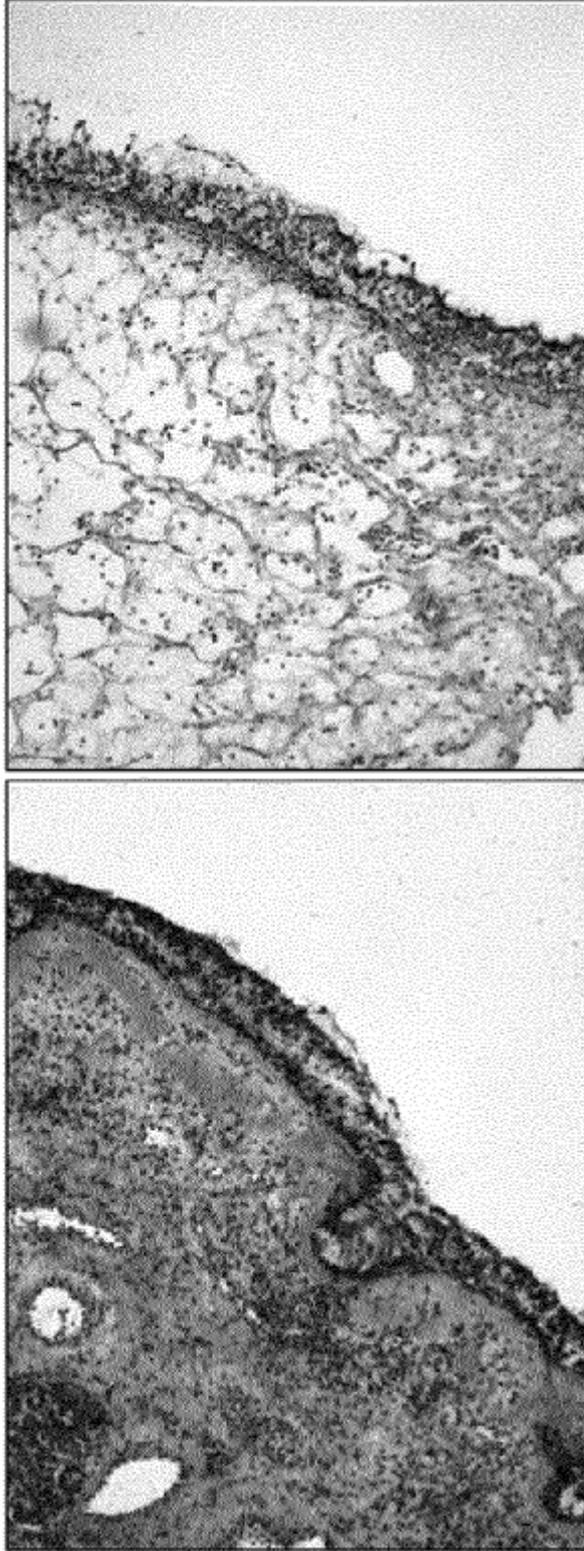
20

REIVINDICACIONES

1. Composición, particularmente composición farmacéutica, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en la que la composición contiene como principio activo, particularmente principio activo farmacéutico, cineol, preferiblemente 1,8-cineol.
- 5 2. Composición para uso según la reivindicación 1, en la que la composición se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*).
3. Composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la composición se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de formas de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) que están relacionadas con, preferiblemente inducidas por o favorecidas por, la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina.
- 10 4. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de estados posoperatorios.
5. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), particularmente formas recidivantes, después de la eliminación quirúrgica previa de pólipos nasales.
- 15 6. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se utiliza para la disminución del riesgo o probabilidad de formación de recidivas, particularmente en estados posoperatorios y/o estados después de la eliminación quirúrgica previa de pólipos nasales.
7. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se utiliza para la profilaxis de recidivas, particularmente en estados posoperatorios y/o estados después de la eliminación quirúrgica previa de pólipos nasales.
- 20 8. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición contiene el cineol como sustancia pura con una pureza de al menos 95 % en peso, referida al cineol, y libre de otros terpenos y en la que la composición contiene el cineol como principio activo único, particularmente como principio activo farmacéutico único.
- 25 9. Composición para uso según una de las reivindicaciones previas, en la que la composición contiene el cineol, referido a la composición, en cantidades relativas en el intervalo de 0,0001 a 80 % en peso, particularmente de 0,001 a 75 % en peso, preferiblemente de 0,005 a 70 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 60 % en peso, particularmente preferiblemente de 0,05 a 55 % en peso y muy preferiblemente de 0,1 a 50 % en peso.
- 30 10. Composición para uso según una de las reivindicaciones previas, en la que el cineol se administra con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 1 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 5 a 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 10 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 50 a 1.500 mg/día.
- 35 11. Composición para uso según una de las reivindicaciones previas, en la que el cineol se administra por vía sistémica con una dosis diaria en el intervalo de 10 a 5.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 50 a 3.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 100 a 2.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 150 a 2.000 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 200 a 1.500 mg/día o bien en la que el cineol se administra por vía tópica con una dosis diaria en el intervalo de 0,1 a 2.000 mg/día, particularmente en el intervalo de 0,5 a 1.500 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 1 a 1.000 mg/día, preferiblemente en el intervalo de 2 a 1.500 mg/día, particularmente preferiblemente en el intervalo de 5 a 1.000 mg/día.
- 40 12. Composición para uso según una de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se utiliza como terapia de combinación con corticosteroides, particularmente corticosteroides sistémicos o tópicos.
13. Medicamento para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en el que el medicamento contiene como principio activo, particularmente principio activo farmacéutico, cineol, preferiblemente 1,8-cineol.
- 45 14. Combinación de principios activos, particularmente en forma de un kit (kit de piezas) para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*), en la que la combinación de principios activos comprende como componentes determinados espacialmente separados, pero funcionalmente relacionados, y/o para comedicación o terapia de combinación:
 - (a) cineol, particularmente 1,8-cineol, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica para aplicación tópica o sistémica que contiene cineol por un lado, y
 - (b) al menos un corticosteroide, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica para aplicación tópica o sistémica que contiene el corticosteroide.
- 50

15. Cineol, particularmente 1,8-cineol, para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*) que están relacionados con y/o inducidos por y/o favorecidos por la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, preferiblemente formas recidivantes de pólipos nasales (*Polyposis nasi et sinuum*);

- 5 en el que el cineol se utiliza como regulador, preferiblemente inhibidor y/o supresor, de la ruta de señalización de Wnt, particularmente la ruta de transducción de señal de Wnt/beta-catenina, preferiblemente como regulador y/o reductor de la fosforilación de la proteína cinasa GSK-3 en el marco de la ruta de señalización de Wnt o para activación de la proteína cinasa GSK-3 y/o como desactivador de beta-catenina en el marco de la ruta de señalización de Wnt; y/o
- 10 en el que el cineol se utiliza como regulador, preferiblemente inhibidor y/o supresor de al menos un gen Wnt y/o proteína Wnt.



Polyposis nasi

Mucosa sana

Fig. 1

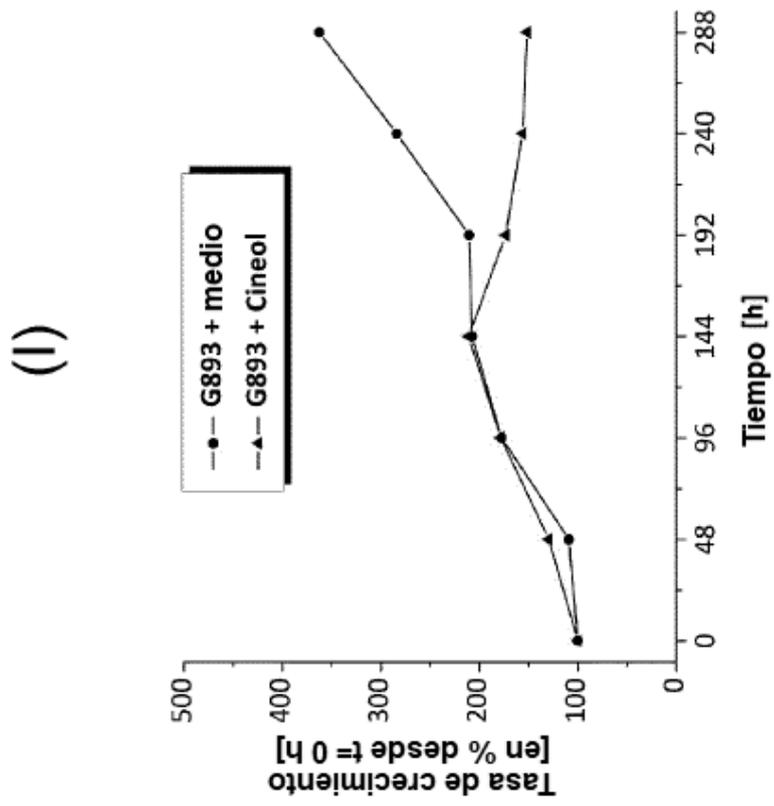
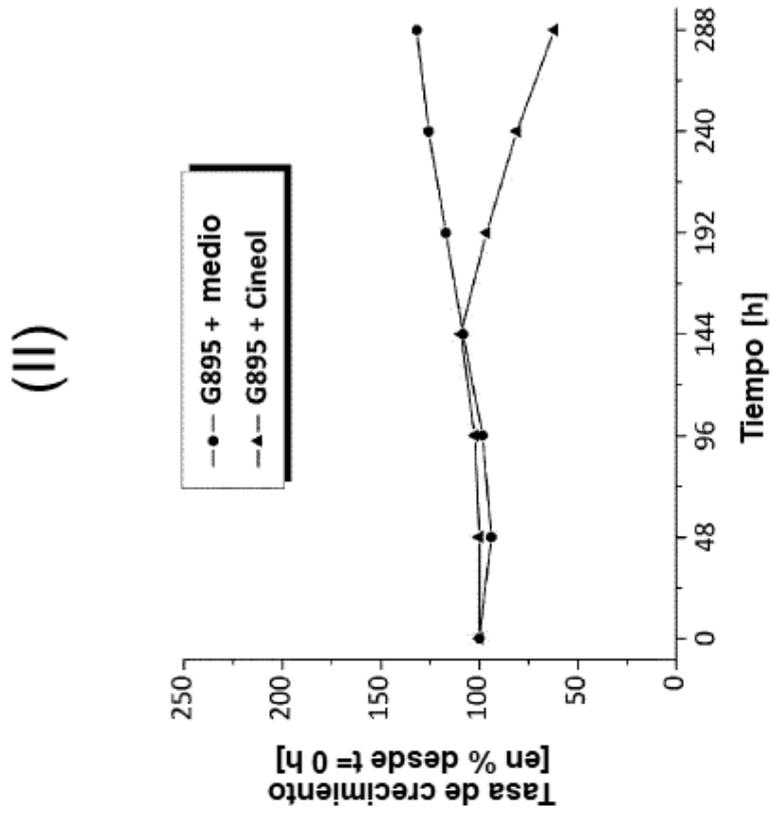


Fig. 2A

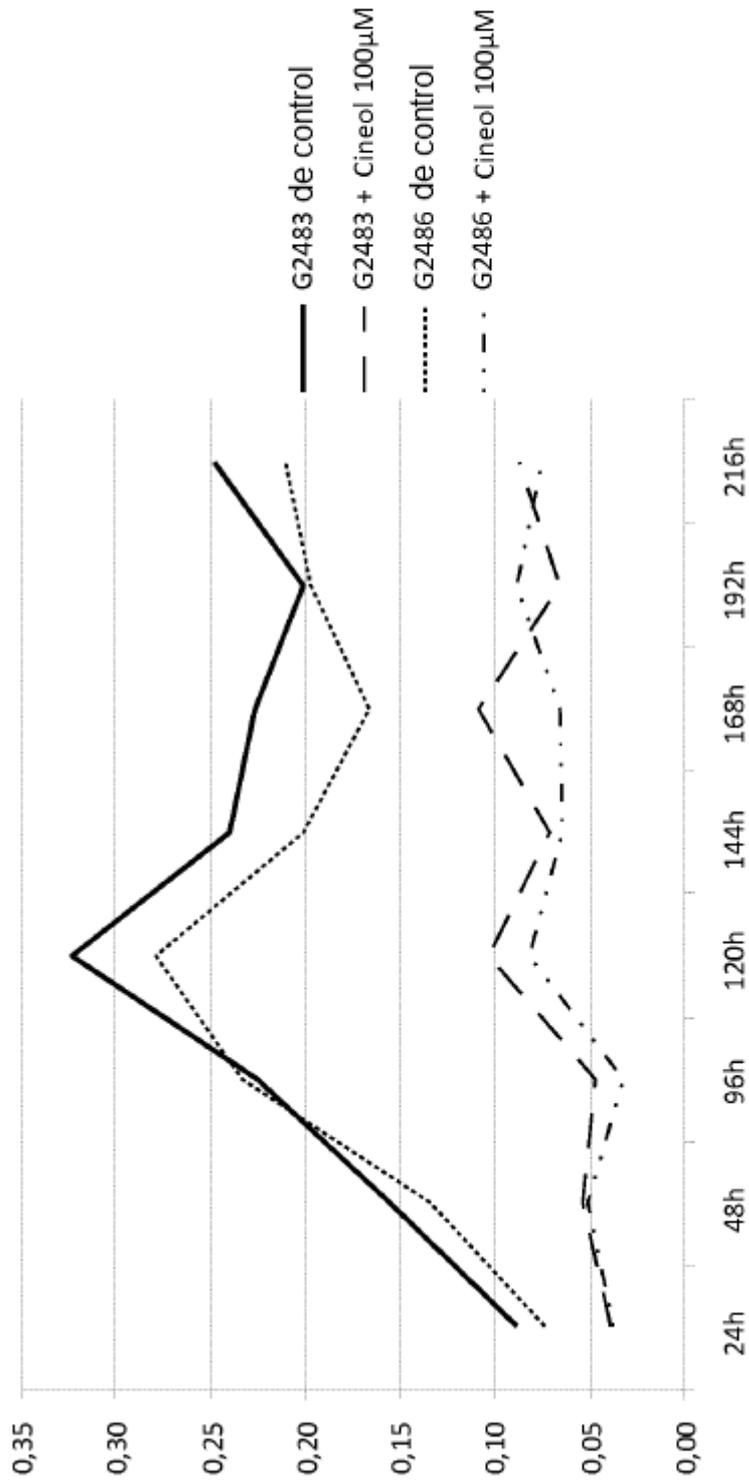


Fig. 2B

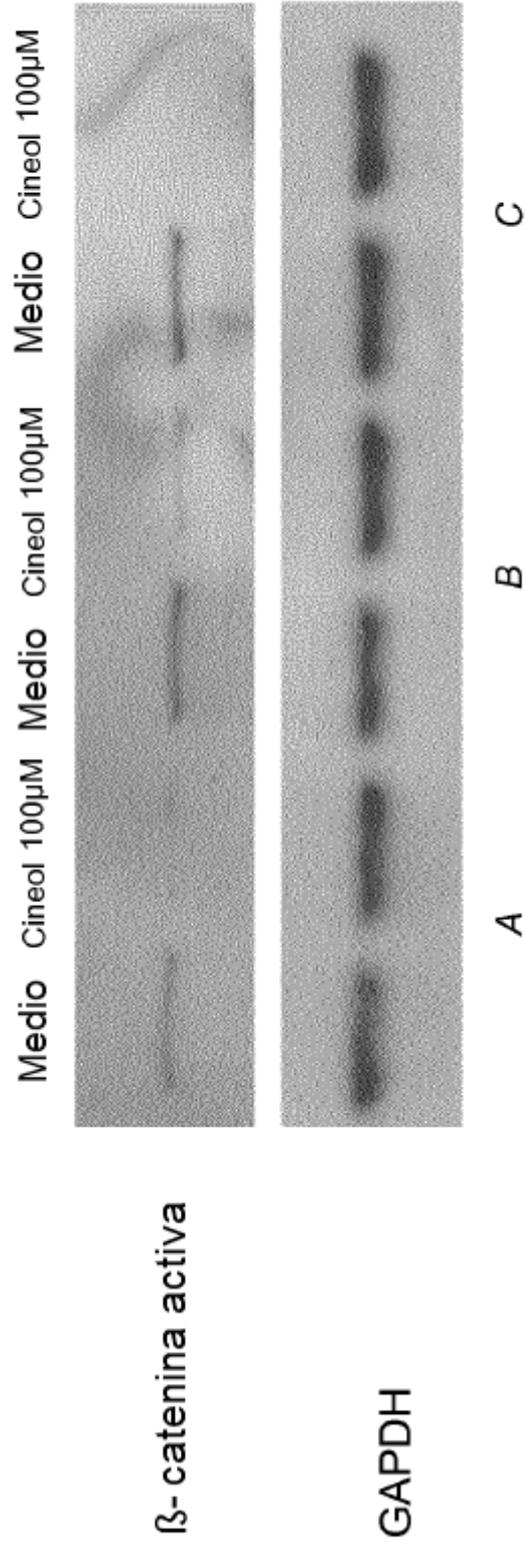


Fig. 3

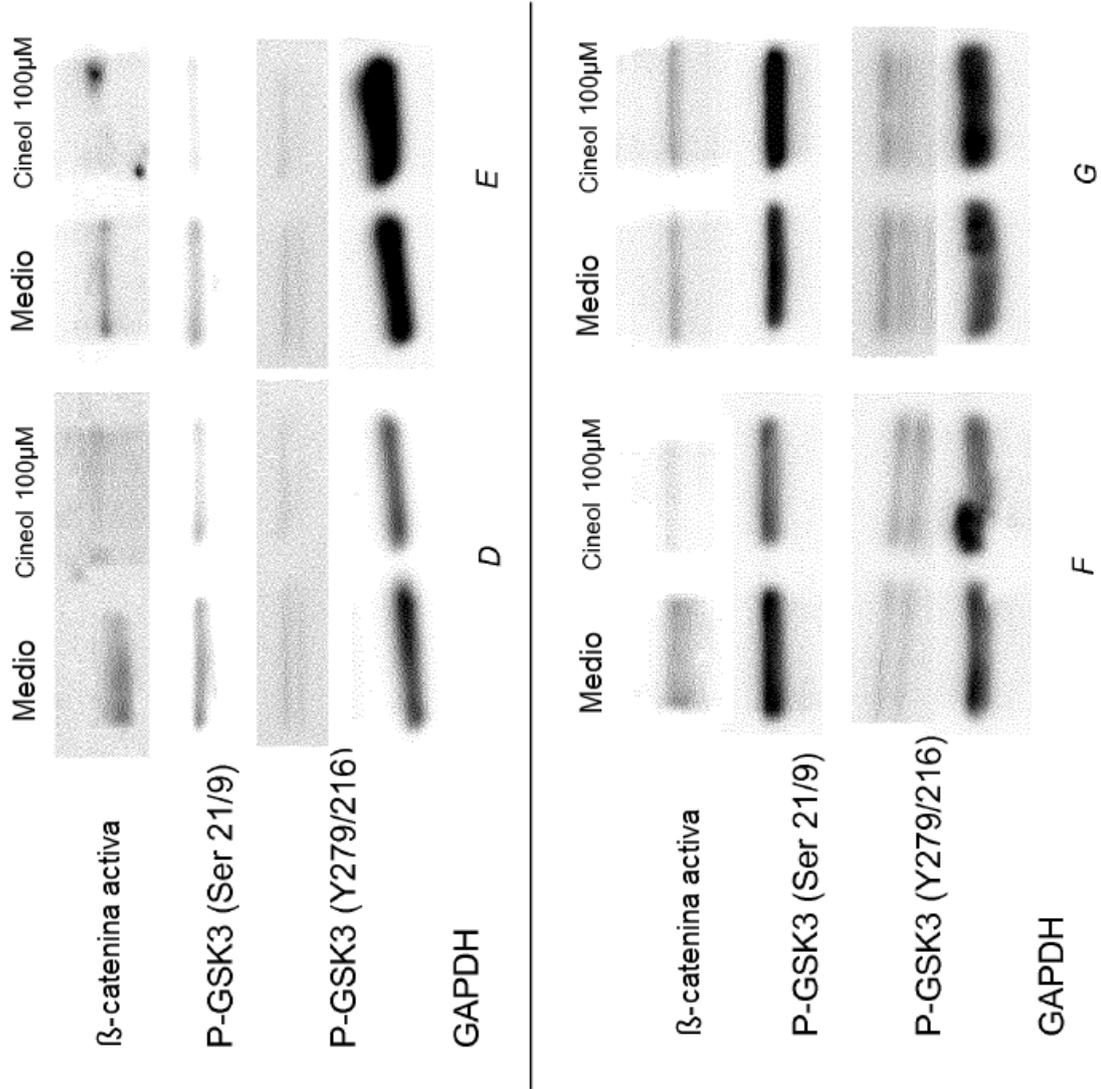


Fig. 4A

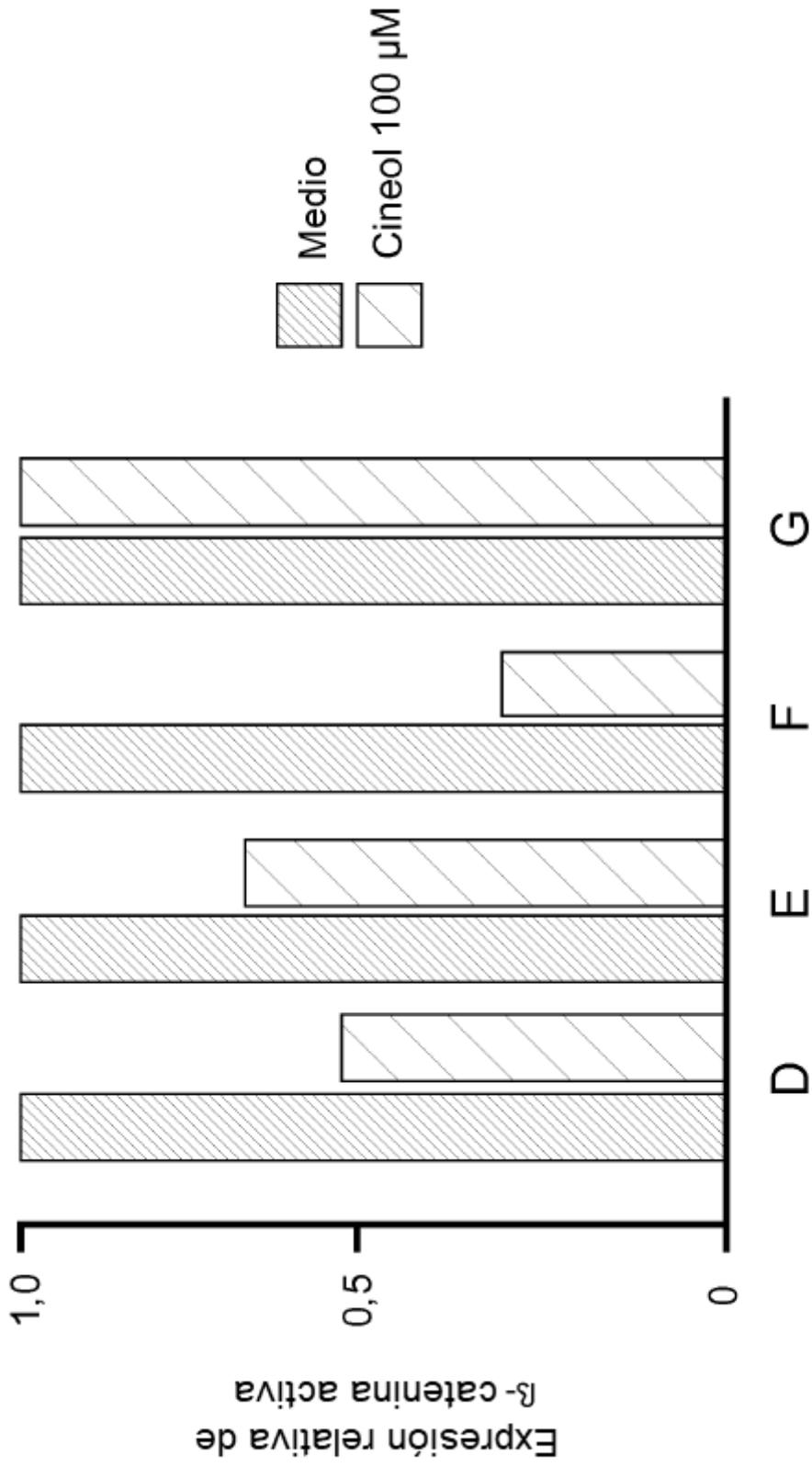
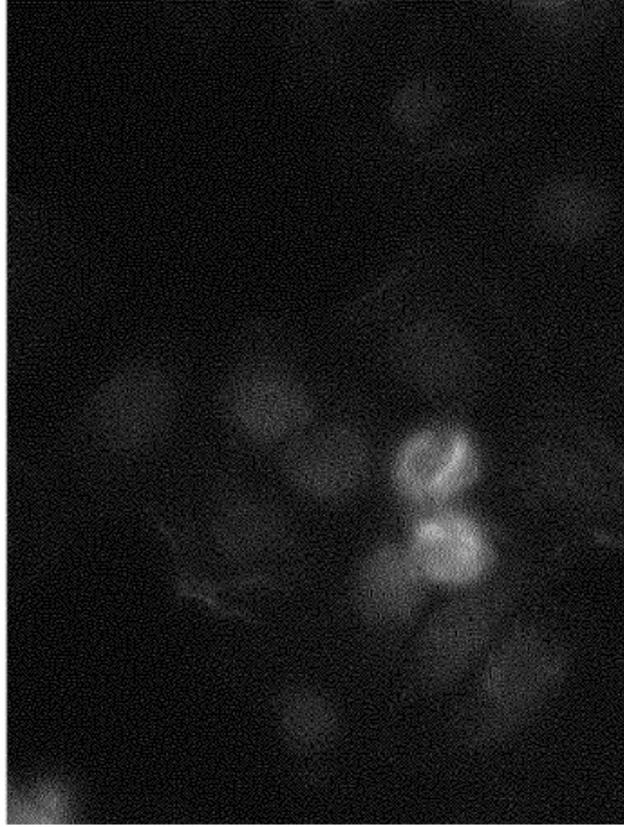


Fig. 4B

Cineol



Medio

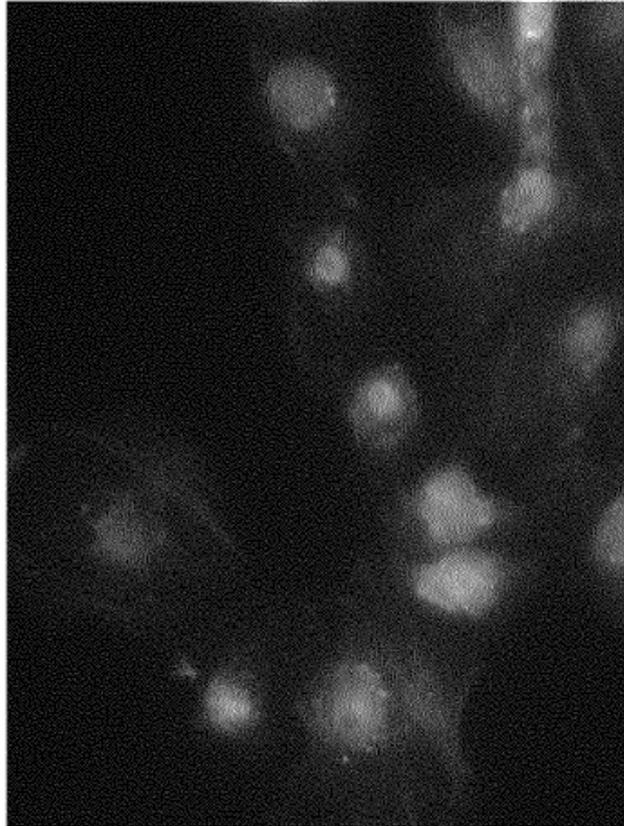


Fig. 4C

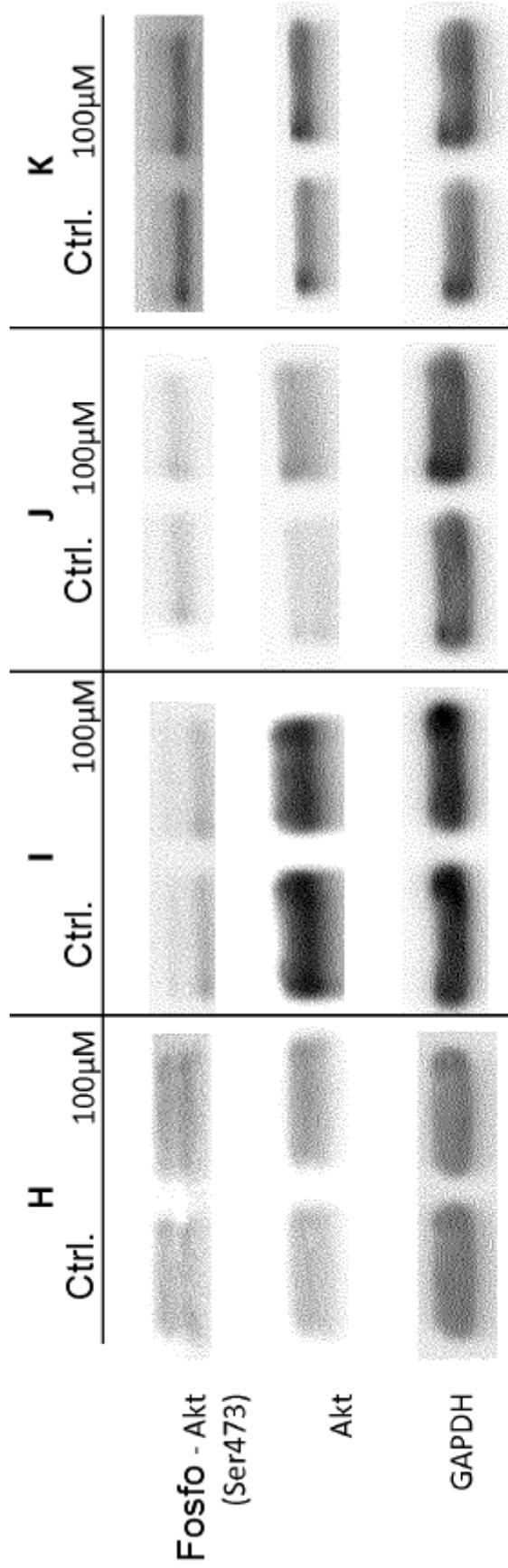


Fig. 5

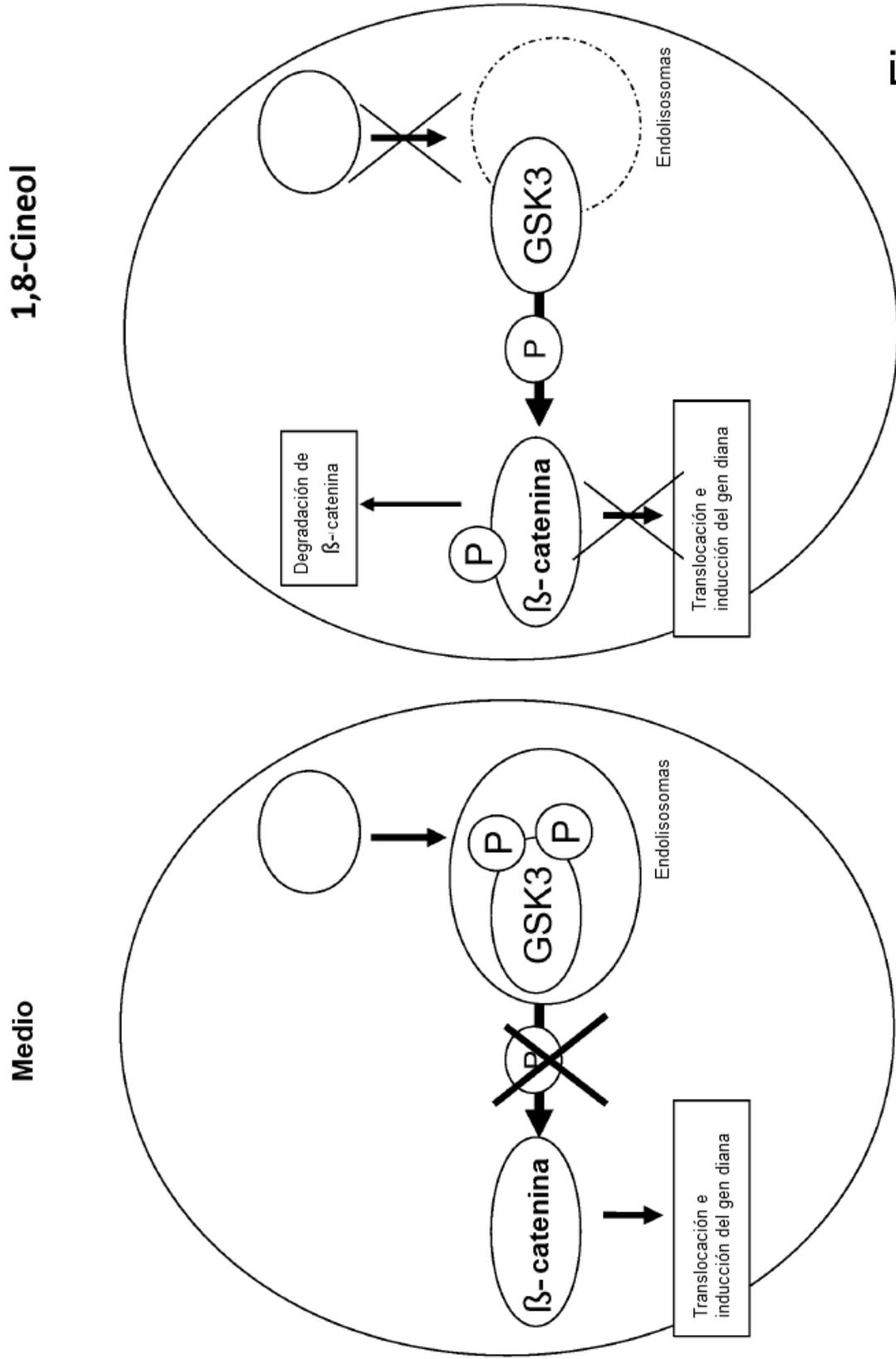


Fig. 6