

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 879**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 17189829 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3287131**

54 Título: **Aplicaciones terapéuticas de ectoína**

30 Prioridad:

09.09.2011 DE 102011113059

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

25.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**UNFRIED, KLAUS;
SYDLIK, ULRICH y
KRUTMANN, JEAN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 795 879 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

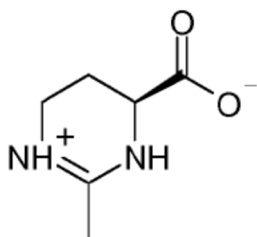
DESCRIPCIÓN

Aplicaciones terapéuticas de ectoína

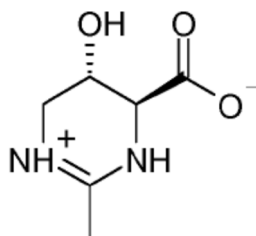
La invención se refiere a composiciones que contienen ectoína, hidroxiectoína o sales, ésteres y amidas correspondientes.

- 5 Los osmolitos o solutos compatibles de microorganismos extremófilos forman un grupo bien conocido de sustancias protectoras de bajo peso molecular. Los extremófilos son microorganismos muy inusuales porque crecen de manera óptima o con altas concentraciones de sal (hasta 200 g de NaCl/l) y a altas temperaturas (60 a 110 °C), lo que provocaría daños masivos a las estructuras celulares en los organismos mesófilos (normales). Por lo tanto, se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigación en los últimos años para identificar los componentes bioquímicos
- 10 que conducen a la notable estabilización de las estructuras celulares. Aunque muchas enzimas de microorganismos hipertermófilos son estables incluso a altas temperaturas, esto generalmente no se aplica a las estructuras celulares de los organismos termófilos e hipertermófilos. Las sustancias orgánicas de bajo peso molecular (solutos compatibles, osmolitos) en el entorno intracelular contribuyen a la estabilidad a alta temperatura de las estructuras celulares. Se han identificado varios nuevos osmolitos en microorganismos extremófilos por primera vez en los últimos años. En algunos casos, ya se ha demostrado la contribución de estos compuestos a la protección de las estructuras celulares, especialmente las enzimas, contra el calor y la sequía (K. Lippert, E. A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1992, 37, 61-65; P. Louis, H. G. Trüper, E. A. Galinski, Appl. Microbiol. Biotech. 1994, 41, 684-688; Ramos et al., Appl. Environm. Microbiol. 1997, 63, 4020-4025; Da Costa, Santos, Galinski, Adv. in Biochemical Engineering Biotechnology, 61, 117-153).
- 20 Para una serie de solutos compatibles, ha habido aplicaciones útiles en los campos médico, cosmético y biológico. Entre los solutos compatibles más importantes, se cuentan la ectoína (ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) y sus derivados. Así, por ejemplo, el documento EP 0 887 418 A2 describe el uso de ectoína e hidroxiectoína (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) para el tratamiento de enfermedades de la piel o como un aditivo eficaz para la crioprotección de principios activos biológicos y células. El documento DE 10 2006 056 766 A1 muestra el uso de ectoína para el tratamiento del síndrome de fuga vascular (VLS). Otros ejemplos son la estabilización de vacunas (documento DE 100 65 986 A1) o el uso dermatológico para el tratamiento de la neurodermatitis (documento DE 103 30 243 A1).
- 25

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



- 30 La hidroxiectoína también se ha descrito como ventajosa para diversos fines. La estructura de la hidroxiectoína natural ((4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico) se muestra a continuación:



- 35 El tratamiento de enfermedades pulmonares y enfermedades cardiovasculares basadas en la acción de las partículas suspendidas es el objeto de la patente europea EP 1 641 442 B1. En el presente documento, se describe la inhalación de preparaciones farmacéuticas que contienen ectoína o hidroxiectoína para combatir tales enfermedades. Las enfermedades que no se basan en la acción de las partículas suspendidas no son objeto de la patente.

Los granulocitos neutrófilos, o neutrófilos para abreviar, desempeñan un papel importante en muchos síntomas inflamatorios, particularmente en la lucha contra los patógenos virales y bacterianos. Los neutrófilos se producen en

grandes cantidades en la médula ósea. Los patógenos son destruidos por la liberación de especies reactivas de oxígeno y enzimas tales como mieloperoxidasa, elastasa o metaloproteinasas de matriz. Sin embargo, dado que estas reacciones están asociadas con efectos secundarios en el tejido involucrado, se debe llevar a cabo una regulación estricta para que la inflamación neutrofílica no vaya más allá de la lucha contra los patógenos propiamente dichos.

5 Una cascada de señales se activa en consecuencia, lo que conduce a la apoptosis de los granulocitos neutrófilos. Sin embargo, los mediadores inflamatorios provocan que la apoptosis se retrase y, de esta forma, extienden la vida útil de los neutrófilos. La acumulación de neutrófilos y monocitos en el sitio de la infección es uno de los principales componentes de una inflamación. El retraso permanente en la apoptosis puede conducir a síntomas de inflamación crónica. Ejemplos son la neumonía crónica o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

10 El enfoque en la lucha contra inflamaciones crónicas es, por lo tanto, la lucha contra la inflamación, que se debe a la acumulación de neutrófilos. El problema aquí es que los neutrófilos, a diferencia de otras células involucradas en la inflamación, solo responden de manera insatisfactoria a los corticosteroides. Por lo tanto, serían deseables los medicamentos que limitan los efectos antiapoptóticos de los mediadores de la inflamación, los corticosteroides y otras sustancias.

15 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que el tratamiento con ectoína o hidroxiectoína elimina al menos parcialmente el efecto antiapoptótico de los mediadores de la inflamación, los corticosteroides y otras sustancias y, de este modo, restaura la tasa de apoptosis natural de los granulocitos neutrófilos sin mostrar, sin embargo, solo un efecto proapoptótico. Por lo tanto, la invención se refiere a una composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos para suprimir señales antiapoptóticas en granulocitos neutrófilos y otras células

20 implicadas en la inflamación, tales como macrófagos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, linfocitos, células epitelioides y células dendríticas. La supresión de las señales antiapoptóticas suele estar relacionada con el tratamiento o la prevención de inflamaciones, en donde las inflamaciones crónicas desempeñan un papel especial aquí. La lucha contra inflamaciones que afectan las vías respiratorias y los pulmones es de particular importancia, en particular neumonía, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), SDRA, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis, sarcoidosis, alergias e hiperreactividad bronquial.

La inhibición de la apoptosis de los granulocitos neutrófilos en las reacciones inflamatorias examinadas se atribuye a la activación mediada por membrana de las vías de señalización acopladas a la membrana a través de PI3-K (fosfatidilinositol-3-quinasa). Estos conducen a una activación de la proteína quinasa B (AKT) y, finalmente, a un aumento en el nivel de Mcl-1, una proteína de acción antiapoptótica. Se cree que la ectoína reduce la activación de

30 AKT.

La respuesta inflamatoria de neutrófilos se investigó en ratas que fueron alimentadas con nanopartículas de carbono por vía intratraqueal. Esto sucedió tanto con como sin ectoína. Luego, las ratas se examinaron en diferentes momentos, pudiendo observar una reducción significativa en el número de neutrófilos en el grupo de ectoína en comparación con el grupo de placebo después de dos días. La eficacia después de dos días es consistente con la

35 reducción observada en la liberación de cinc-1, una quimioquina que desempeña un papel importante en el caso de las inflamaciones. Inicialmente, la liberación de cinc-1 tiene lugar principalmente a través de células epiteliales y macrófagos, mientras que más tarde la liberación está dominada por los neutrófilos, que finalmente están presentes en grandes cantidades. La reducción en la liberación de cinc-1 después de dos días con la administración de ectoína muestra que, en este punto, el número de neutrófilos ha disminuido.

40 También se pudo demostrar que la administración de ectoína en dos dosis 1 y 2 días después de desencadenar la reacción inflamatoria tiene prácticamente el mismo efecto que la administración de ectoína cuando se desencadena la reacción inflamatoria. Por lo tanto, la ectoína no solo puede usarse en forma preventiva, sino también para tratar una inflamación existente. Incluso con la administración repetida de ectoína después del desencadenamiento múltiple de una reacción inflamatoria, se pudo observar una reducción en el número de neutrófilos, así como una disminución

45 en el nivel de cinc-1, lo que subraya la aplicabilidad en el tratamiento de inflamaciones crónicas.

También se han realizado estudios pertinentes en granulocitos neutrófilos humanos aislados. Se pudo demostrar que la reducción en la tasa de apoptosis por factores proinflamatorios como las nanopartículas de carbono (CNP), LTB₄ o GM-CSF puede compensarse al menos parcialmente en función de la concentración por administración de ectoína. La administración de ectoína sola a los neutrófilos sin tratamiento previo con factores proinflamatorios no condujo a

50 un aumento en la tasa de apoptosis. Esto muestra que la ectoína generalmente no tiene un efecto proapoptótico, sino que más bien suprime los mecanismos antiapoptóticos que tienen lugar en caso de una inflamación.

La eficacia anti-antiapoptótica se ha demostrado en experimentos in vivo e in vitro, en los que se desencadenó una reacción inflamatoria usando nanopartículas de carbono, pero no se limita a ello, sino que, más bien, la presente invención se refiere explícitamente a tales inflamaciones, que no se deben a la acción de las partículas en suspensión.

55 Si bien el documento EP 1 641 442 B1 todavía asumía que la ectoína solo combate los efectos nocivos de los polvos suspendidos directamente, ahora se ha demostrado que el tratamiento de inflamaciones con ectoína comienza con la restauración de la tasa de apoptosis natural de los neutrófilos.

Además, se ha demostrado que una combinación de ectoína/hidroxiectoína o derivados correspondientes con corticosteroides es particularmente ventajosa, en particular con glucocorticoides como dexametasona, budesonida,

betametasona, triamcinolona, fluocortolona, metilprednisolona, deflazacort, prednisolona, prednisona, cloprednol, cortisona, hidrocortisona, fluocortina, clocortolona, clobetasona, alclometasona, flumetasona, fluoprednidenol, fluorandrenolona, prednicarbat, mometasona, metilprednisolona, fluticasona, halometasona, fluocinolona, diflorasán, desoximetasona, fluocinonida, fludrocortisona, deflazacort, rimexolona, cloprednol, amcinonida, halcinonida, difluocortolona, clobetasol o sales, ésteres, amidas, solvatos o hidratos de estos compuestos.

Aunque se sabe que los corticosteroides son agentes eficaces contra inflamaciones, desempeñan un papel de doble filo en la lucha contra la inflamación neutrófila porque reducen la apoptosis neutrófila natural. Al combinar un corticosteroide con ectoína/hidroxiectoína, el efecto antiinflamatorio beneficioso del esteroide se combina con la restauración de la tasa de apoptosis natural y, por lo tanto, la reducción del efecto antiapoptótico indeseable del corticosteroide por ectoína/hidroxiectoína. Ejemplos son combinaciones de ectoína o derivados correspondientes con dexametasona y/o budesonida. Las combinaciones ventajosas alternativas son ectoína/hidroxiectoína con GM-CSF, leucotrienos como LTB₄, teofilina (1,3-dimetil-xantina), antagonistas de leucotrienos, inhibidores de fosfodiesterasa (inhibidores de PDE, en particular inhibidores de PDE4), antagonistas de receptores muscarínicos, anticolinérgicos como bromuro de ipratropio o bromuro de tiotropio u otros fármacos en los cuales la tasa natural de apoptosis neutrófila se reduce de modo indeseable.

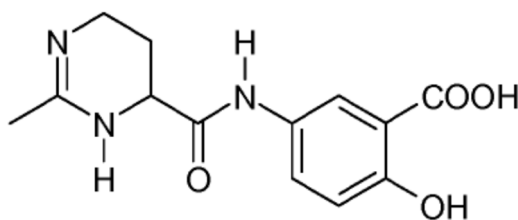
El tratamiento de enfermedades pulmonares, en particular neumonía, asma bronquial, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), SDRA, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, silicosis, sarcoidosis, alergias e hiperreactividad bronquial tiene particular importancia cuando se combinan corticosteroides con ectoína/hidroxiectoína. En este caso, tiene sentido prever la composición como una composición inhalable. La composición puede ser líquida como una solución o sólida, en donde la composición puede atomizarse e inhalarse convenientemente como un aerosol si es necesario usando un dispositivo de inhalación.

La administración de corticosteroides y ectoína/hidroxiectoína no siempre tiene que realizarse con la misma composición, pero es importante que se administren de manera simultánea o inmediata para que las sustancias activas funcionen juntas en la forma descrita con anterioridad. Por consiguiente, la invención también se refiere a una preparación combinada que comprende al menos dos composiciones individuales, a saber, una composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos y una composición adicional que contiene un corticosteroide. El producto combinado, por lo tanto, representa un kit de partes que consta de dos composiciones que recién desarrollan su eficacia completa cuando están juntas. En el caso del corticosteroide, se puede tratar en particular de uno de los glucocorticoides mencionados con anterioridad.

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

Al hacer reaccionar el grupo carboxilo de ectoína/hidroxiectoína con alcoholes o aminas, se pueden obtener los ésteres o amidas correspondientes, que también se pueden usar según la invención. En el caso de una amida, el átomo de nitrógeno puede presentar, a su vez, grupos alquilo saturados o insaturados, de cadena lineal o ramificada. En el caso de la hidroxiectoína, el grupo hidroxilo también puede convertirse en un éster correspondiente con un ácido carboxílico.

Ha demostrado ser ventajoso, entre otros, el uso de la amida de ectoína del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. La fórmula estructural se reproduce a continuación:



Así, se trata de la amida del ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. Con preferencia, se trata de la correspondiente amida de la L-ectoína: amida de ácido (S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico. El compuesto se probó y mostró una eficacia comparable con la propia ectoína (véase la Fig. 7). También es posible usar la amida correspondiente de hidroxiectoína (ácido 5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico), preferiblemente de L-hidroxiectoína (ácido (4S,5S)-5-hidroxi-2-metil-1,4,5,6-tetrahidropirimidin-4-carboxílico), es decir, la amida de hidroxiectoína del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico. La amida respectiva también puede estar en forma iónica o zwitteriónica. Por lo tanto, la invención también se refiere a los compuestos o sales, ésteres o amidas mencionados de estos compuestos y composiciones que contienen estos compuestos o sales, ésteres o amidas. Las composiciones pueden usarse como medicamentos, en particular para suprimir señales antiapoptóticas en granulocitos neutrófilos, macrófagos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, mastocitos, linfocitos, células epitelioides, células dendríticas u otras células implicadas en inflamaciones.

En general, los principios activos de acuerdo con la invención también pueden procesarse, si es apropiado, con otros principios activos usando auxiliares y aditivos farmacológicamente aceptables para dar preferiblemente medicamentos inhalables. En el caso de preparaciones líquidas inhalables, tales aditivos son principalmente agua, posiblemente con la adición de disolventes, estabilizadores, conservantes, emulsionantes, antioxidantes, rellenos o solubilizantes adicionales. Los antiasmáticos, los broncolíticos, las sustancias antiinflamatorias no esteroideas (AINE) o los expectorantes son concebibles como principios activos adicionales. Como conservantes se tienen en cuenta: cloruro de benzalconio, clorobutanol, tiomersal, metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico y sus sales, edetato sódico, alcohol feniletílico, acetato clorhidrato de clorhexidina, digluconato clorhidrato de clorhexidina, cloruro, bromuro de cetilpiridinio, clorocresol, acetato de fenilmercurio, nitrato de fenilmercurio, borato de fenilmercurio, fenoxietanol.

- 5 Las formulaciones de la invención también pueden incluir sistemas de tampón adecuados u otros adyuvantes para la regulación del pH, para ajustar y mantener un pH del orden de 4 a 8, preferiblemente de 5 a 7,5. Los sistemas de tampón adecuados son citrato, fosfato, trometamol, glicina, borato, acetato. Estos sistemas de tampón se pueden producir a partir de sustancias como ácido cítrico, fosfato monosódico, fosfato disódico, glicina, ácido bórico, tetraborato de sodio, ácido acético o acetato de sodio.
- 10 La concentración de la ectoína/hidroxiectoína o el derivado correspondiente referido a la composición es típicamente del 0,001 al 50% en peso, preferiblemente del 0,05 al 20% en peso, en particular del 0,1 al 10% en peso.

En el caso de la administración en forma sólida, por ejemplo, usando inhaladores de polvo, es conveniente usar solo vehículos no irritantes fácilmente absorbibles como la lactosa micronizada.

Prueba 1

- 20 Las nanopartículas de carbono (CNP, 14 nm, Printex 90, Degussa, Fráncfort, Alemania) se suspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante tratamiento con ultrasonido. También se preparó una solución de ectoína de 0,1 y 1 mM en PBS. Las ratas Fisher 344 hembras fueron tratadas intratraquealmente con 0,4 ml de la suspensión de partículas CNP. Después de 1 y 2 días, tuvo lugar el tratamiento con 0,4 ml de las soluciones de ectoína o PBS. Al tercer día, las ratas se sacrificaron y los pulmones se enjuagaron con 4 x 5 ml de PBS. Las células de cada animal se suspendieron en 1 ml de PBS y se centrifugaron. Los gránulos se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 300 µl de solución hipotónica (citrato de sodio al 0,1%, Triton X 100 al 0,1%) que contenía 50 µg/ml de yoduro de propidio (PI). Luego se llevó a cabo la medición de fluorescencia para determinar la tasa de apoptosis.

Se obtuvo el resultado que se muestra en la Figura 1 (C: control sin tratamiento con CNP; *: diferencia significativa del grupo control sin tratamiento con CNP; †: diferencia significativa de los animales tratados solo con CNP y PBS).

Prueba 2

- 30 El efecto de la ectoína sobre la apoptosis se examinó utilizando neutrófilos humanos. Los neutrófilos de 3 donantes jóvenes sanos masculinos y 2 femeninos se aislaron y se trataron con las cantidades indicadas de ectoína (mM). El tratamiento fue con ectoína sola (barras abiertas) o con 33 µg/ml de CNP (barras negras). No se administró ectoína en el grupo de control (C). El resultado se muestra en la Figura 2.

- 35 Las células apoptóticas se cuantificaron de la siguiente manera: los neutrófilos se suspendieron en 300 µl de solución hipotónica que contenía yoduro de propidio (PI). La fluorescencia de PI se midió por citometría de flujo (citómetro FACScan, BD Biosciences). Los resultados se presentan como un porcentaje de ADN hipodiploide (sub-G1), correspondiente al ADN fragmentado que es característico de las células apoptóticas.

- 40 La reducción en la tasa de apoptosis causada por el CNP fue prácticamente abolida por la administración de cantidades significativas de ectoína.

(*: diferencia significativa con el grupo de control sin tratamiento con CNP; †: diferencia significativa con los neutrófilos tratados solo con CNP y PBS).

Prueba 3

- 45 El efecto de la ectoína sobre la apoptosis se examinó utilizando neutrófilos humanos. Se aislaron neutrófilos de 3 donantes jóvenes sanos masculinos y 2 femeninos y se pretrataron durante 2 h con PBS (barras oscuras) o con 1 mM de ectoína (barras claras). Luego se llevó a cabo el tratamiento con 33 µg/ml de nanopartículas de carbono (ufCB: negro de carbón ultrafino), 300 nM de LTB₄, 20 ng/ml de GM-CSF o 1 mM de dexametasona o no se llevó a cabo ningún tratamiento con factores proinflamatorios. El resultado se muestra en la Figura 3 (†: diferencia significativa para el grupo de control; *: diferencia significativa para neutrófilos tratados solo con factores proinflamatorios y PBS, cuantificación de las células apoptóticas análoga al experimento 2).

Prueba 4

El efecto de la ectoína sobre la apoptosis se demostró en forma análoga al experimento 3 en pacientes con EPOC y, en consecuencia, pacientes de edad no con EPOC. Los granulocitos neutrófilos se pretrataron durante 2 h con 1 mM de ectoína o PBS, seguido de tratamiento durante 16 h con 33 µg/ml de CNP, 300 nM de LTB₄, 20 ng/ml de GM-CSF

o PBS. Se pudo determinar una apoptosis básica más alta, sin embargo, los estimulantes inflamatorios redujeron la apoptosis y un tratamiento adicional con ectoína restableció significativamente la tasa de apoptosis. El resultado se muestra en la Figura 4 (barras oscuras: pretratamiento con ectoína; barras claras: pretratamiento con PBS; *: diferencia significativa con el grupo de control sin CNP o mediadores de inflamación; §: diferencia significativa con el tratamiento sin ectoína; cuantificación de las células apoptóticas análogo al experimento 2).

Prueba 5-7

Para las pruebas 5 a 7, se obtuvieron granulocitos neutrófilos a partir de muestras de sangre. Los grupos 1 y 2 estaban compuestos por personas de un estudio de pacientes en curso. Pacientes masculinos (edad: 40 a 80 años) con curso estable de EPOC (GOLD III/IV) y pacientes sanos de control en el mismo grupo etario.

Además, se utilizaron jóvenes voluntarios varones en la clínica (grupo 3).

Prueba 5

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

El tratamiento con budesonida conduce a una disminución en la tasa de apoptosis de los neutrófilos. Se puede ver que el pretratamiento de las células con 1 mM de ectoína previene significativamente los efectos antiapoptóticos de la budesonida. El efecto ocurrió en todos los grupos, así como en el conjunto de los grupos. El efecto pudo mostrarse en granulocitos neutrófilos que no fueron tratados con sustancias proinflamatorias. Pero también cuando se combinaban sustancias de acción proinflamatoria (CNP, LTB₄, GM-CSF) con budesonida, la ectoína previno con éxito el efecto antiapoptótico.

Prueba 6

La influencia de la ectoína en combinación con budesonida sobre las señales antiapoptóticas se puede ver en la Figura 6. Las señales correspondientes a través de la proteína quinasa B (Akt) y Mcl-1 se llevaron a cabo en muestras seleccionadas de neutrófilos midiendo la fosforilación de Akt y el nivel de proteína Mcl-1, y como células sirvieron neutrófilos periféricos primarios humanos. Aislamiento de los neutrófilos por centrifugación Percoll®, cultivo de 2×10^6 neutrófilos en presencia de 33 µg/ml de CNP, 1 mM de budesonida, 1 mM de ectoína y combinaciones de ellos durante 6 h. Se realizaron aislamiento de proteínas, transferencia Western, luminiscencia en películas de rayos X sobre material de 3 pacientes con EPOC y 3 personas del control de edad correspondiente. El resultado muestra claramente el efecto antiapoptótico de la budesonida, que activa la vía de señalización de Akt y aumenta la cantidad de proteína antiapoptótica Mcl-1. La ectoína es capaz de contrarrestar este efecto, incluso en presencia de CNP.

Prueba 7

En la Figura 7, se muestra la influencia de varias otras sustancias de prueba sobre la tasa de apoptosis de los neutrófilos humanos. Las células sub-G₁ se midieron después de la tinción con yoduro de propidio (citometría de flujo FACS). Células: neutrófilos humanos primarios, periféricos. Aislamiento de los neutrófilos por centrifugación Percoll® y cultivo de 2×10^6 neutrófilos en presencia de 33 µg/ml de CNP, 1 mM de budesonida, 1 mM de ectoína, 1 mM de urea, 1 mM de amida de ectoína y combinaciones de ellos durante 16 h. Las células provienen de voluntarios jóvenes (grupo 3), n = 5, bud = budesonida. Se analizaron otras dos sustancias de prueba (urea y la amida de ectoína del ácido 2-hidroxi-5-aminobenzoico) por su capacidad para prevenir los efectos antiapoptóticos sobre los neutrófilos. Ninguna de las dos sustancias tuvo influencia en la tasa de apoptosis de fondo. La amida de ectoína pudo prevenir la reducción en la tasa de apoptosis causada por las nanopartículas de carbono (CNP) con o sin budesonida, pero la urea no.

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de enfermedades pulmonares, a excepción de aquellas que son atribuibles a la acción de polvos en suspensión y a excepción de alergias y asma, en donde la enfermedad pulmonar es hiperreactividad bronquial.
2. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la composición contiene al menos un corticosteroide.
3. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el corticosteroide es un glucocorticoide.
4. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el glucocorticoide es dexametasona, budesonida, betametasona, triamcinolona, fluocortolona, metilprednisolona, deflazacort, prednisolona, prednisona, cloprednol, cortisona, hidrocortisona, fluocortina, clocortolona, clobetasona, alclometasona, flumetasona, fluoprednidenol, fluorandrenolona, prednicarbat, mometasona, metilprednisolona, fluticasona, halometasona, flucinolona, diflorasán, desoximetasona, fluciclonida, fludrocortisona, deflazacort, rimexolona, cloprednol, amcinonida, halcinonida, difluocortolona, clobetasol o una sal, éster, amida, solvato o hidrato de uno de los compuestos antes mencionado.
5. Composición para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la composición es una composición inhalable.
6. Preparación combinada de composiciones para usar en un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades pulmonares, excepto alergias y asma, en donde la enfermedad pulmonar es hiperreactividad bronquial y las composiciones están destinadas a una administración rápida, que consiste en al menos
 - una primera composición que contiene ectoína, hidroxiectoína y/o una sal, éster o amida de estos compuestos y
 - una segunda composición que contiene un corticosteroide.

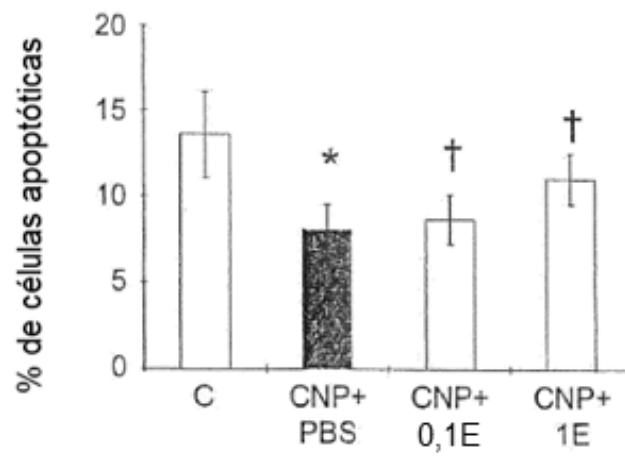


Fig. 1

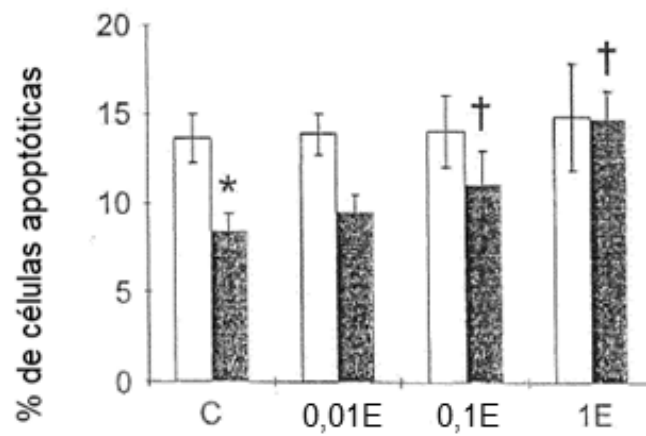


Fig. 2

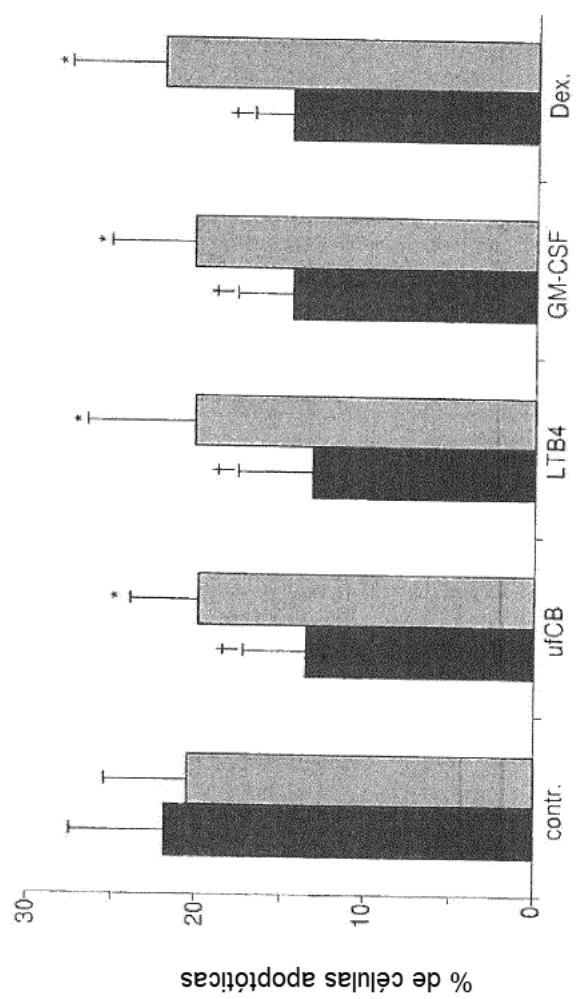


Fig. 3

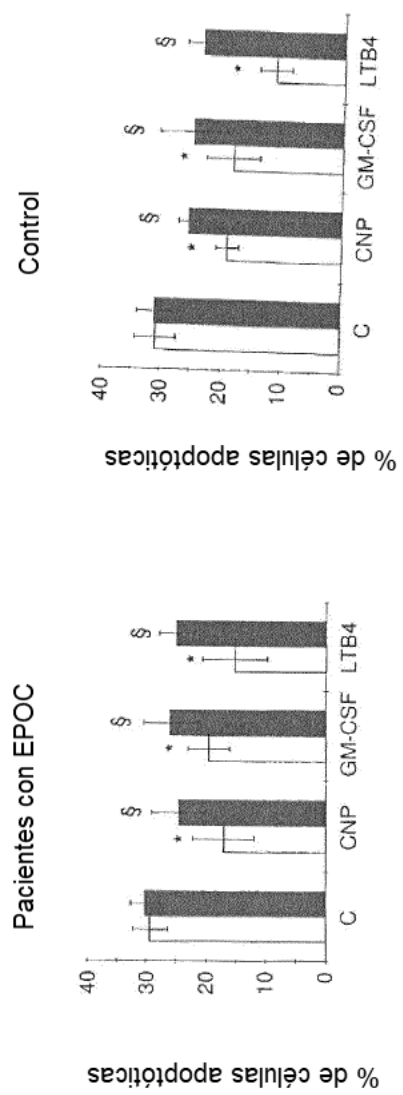


Fig. 4

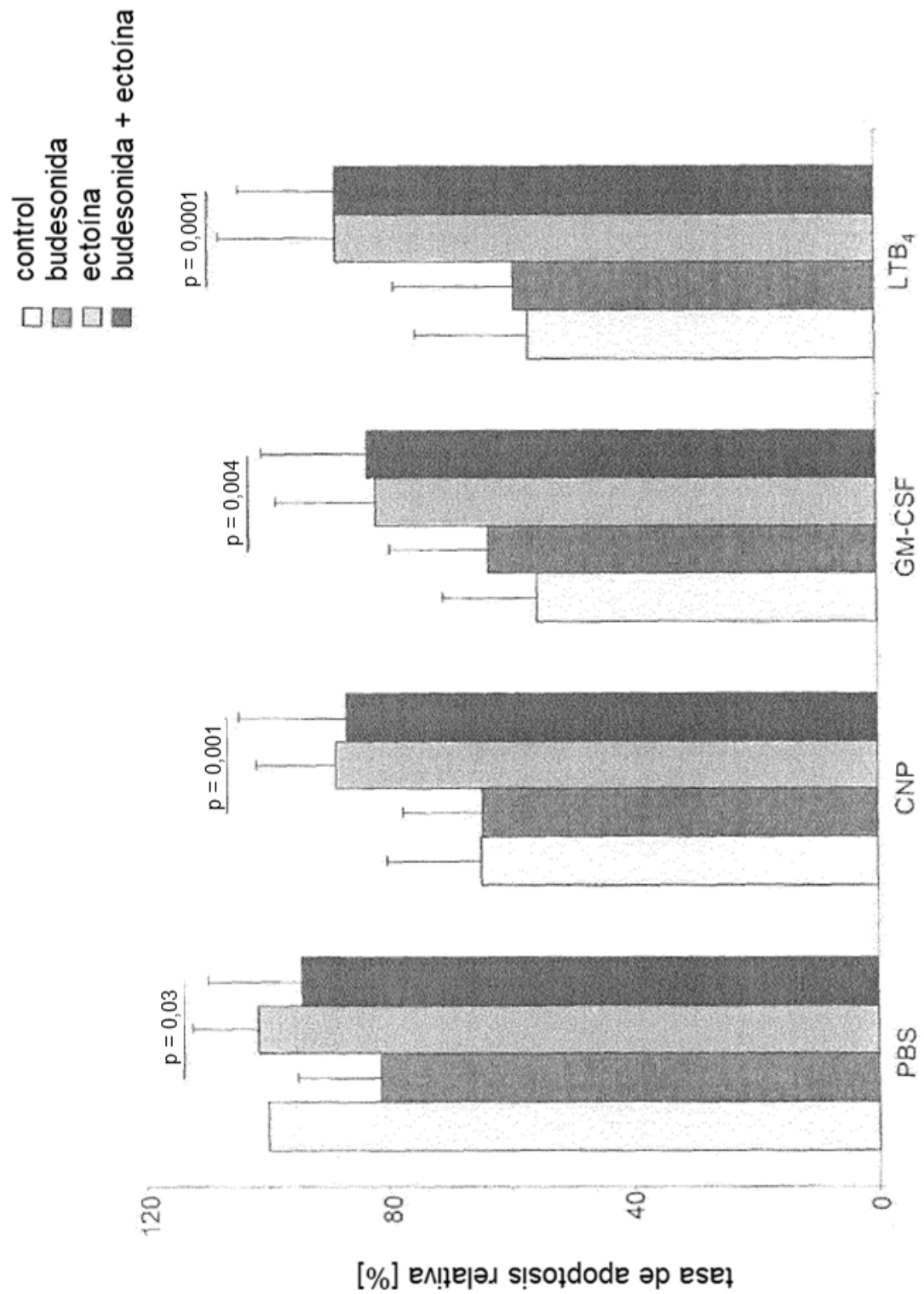


Fig. 5 A

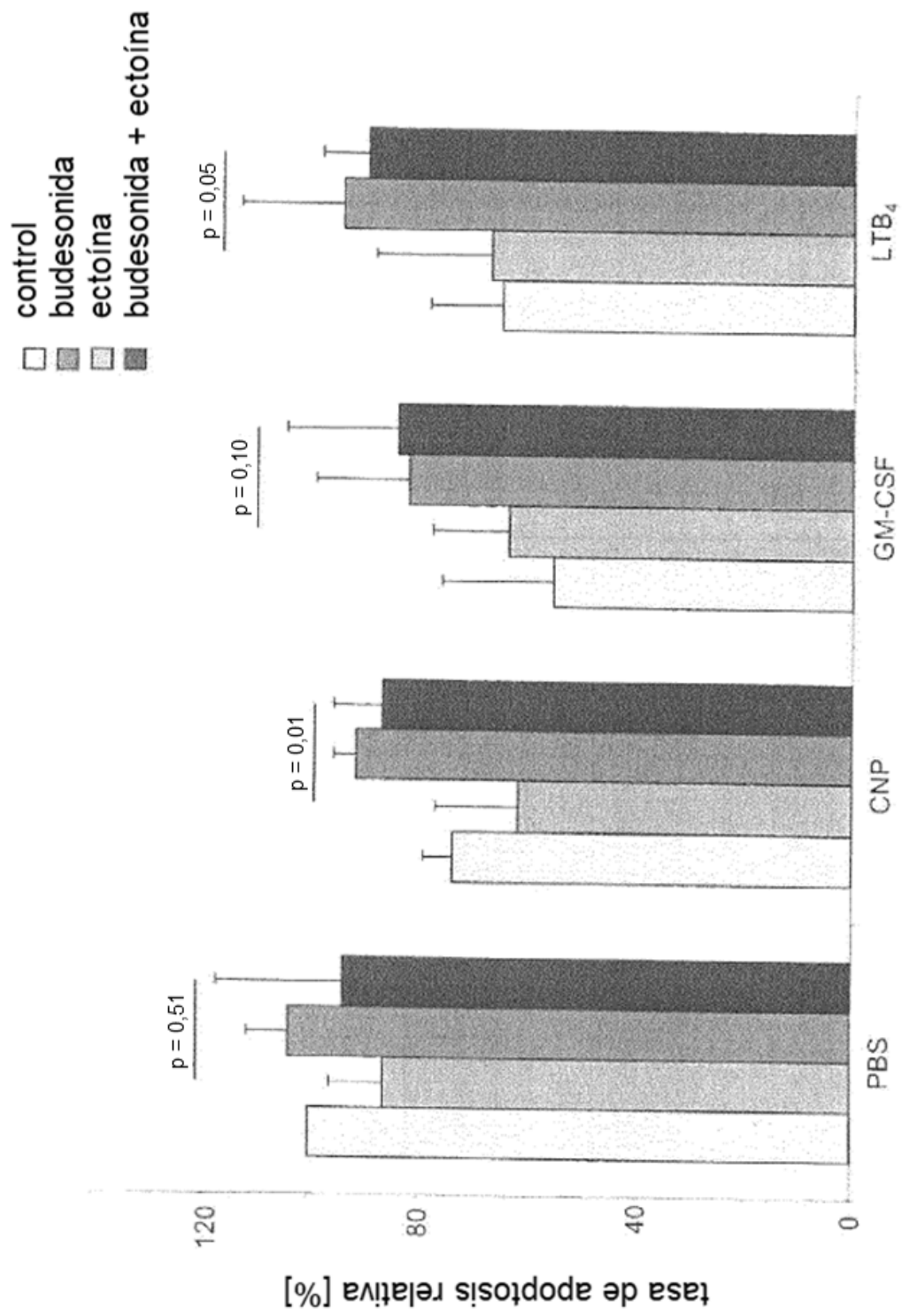


Fig. 5 B

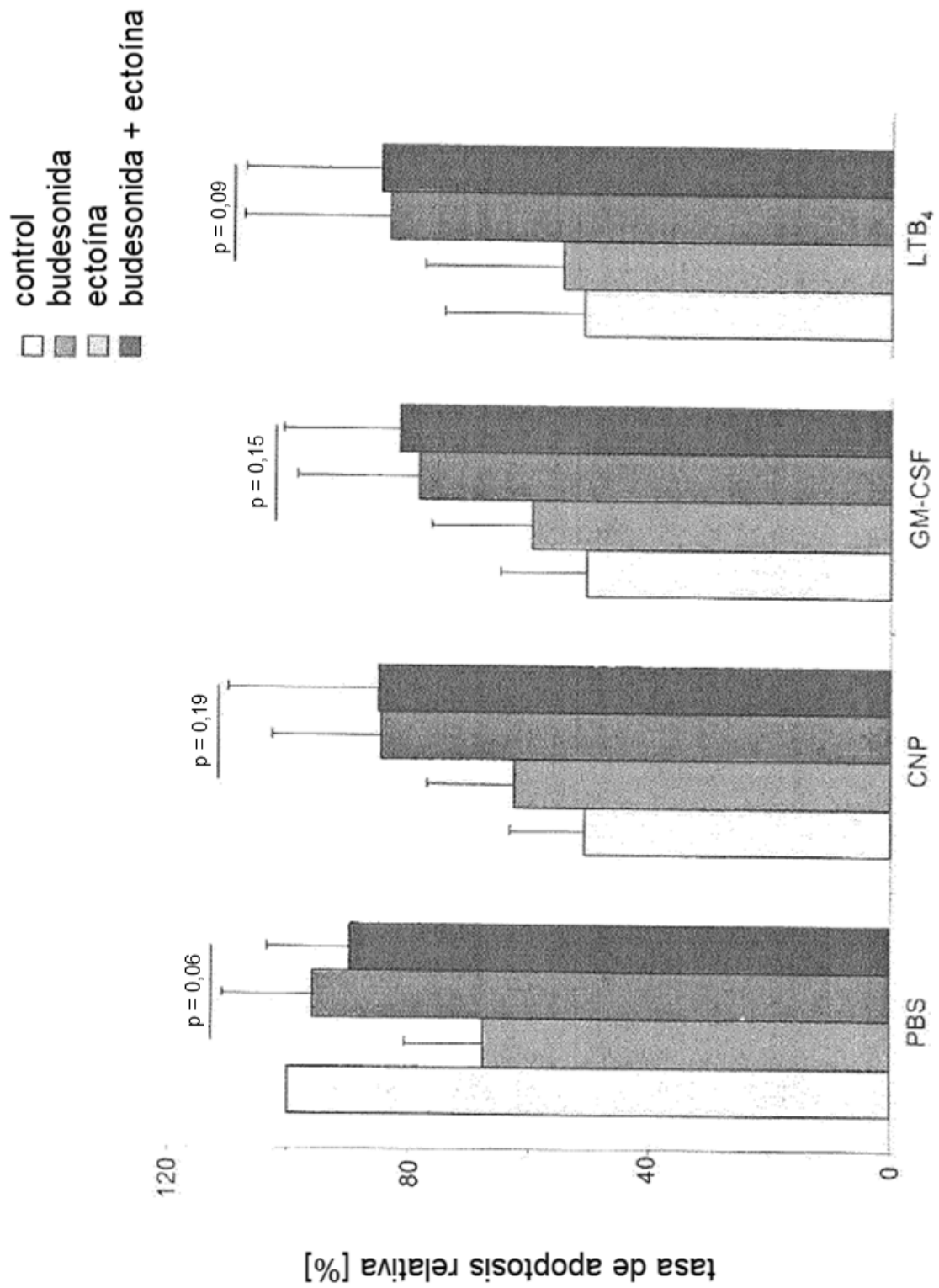


Fig. 5 C

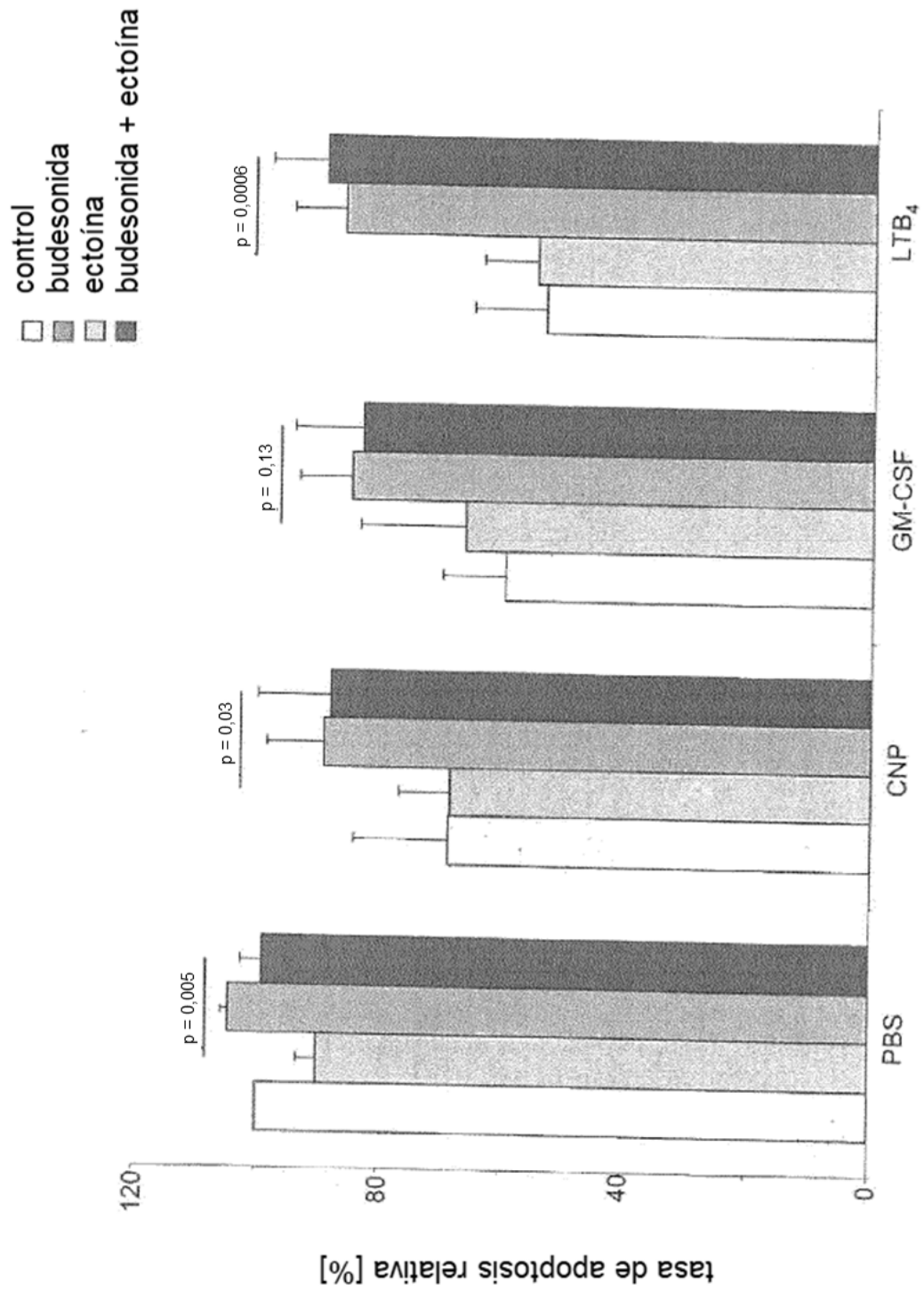


Fig. 5 D

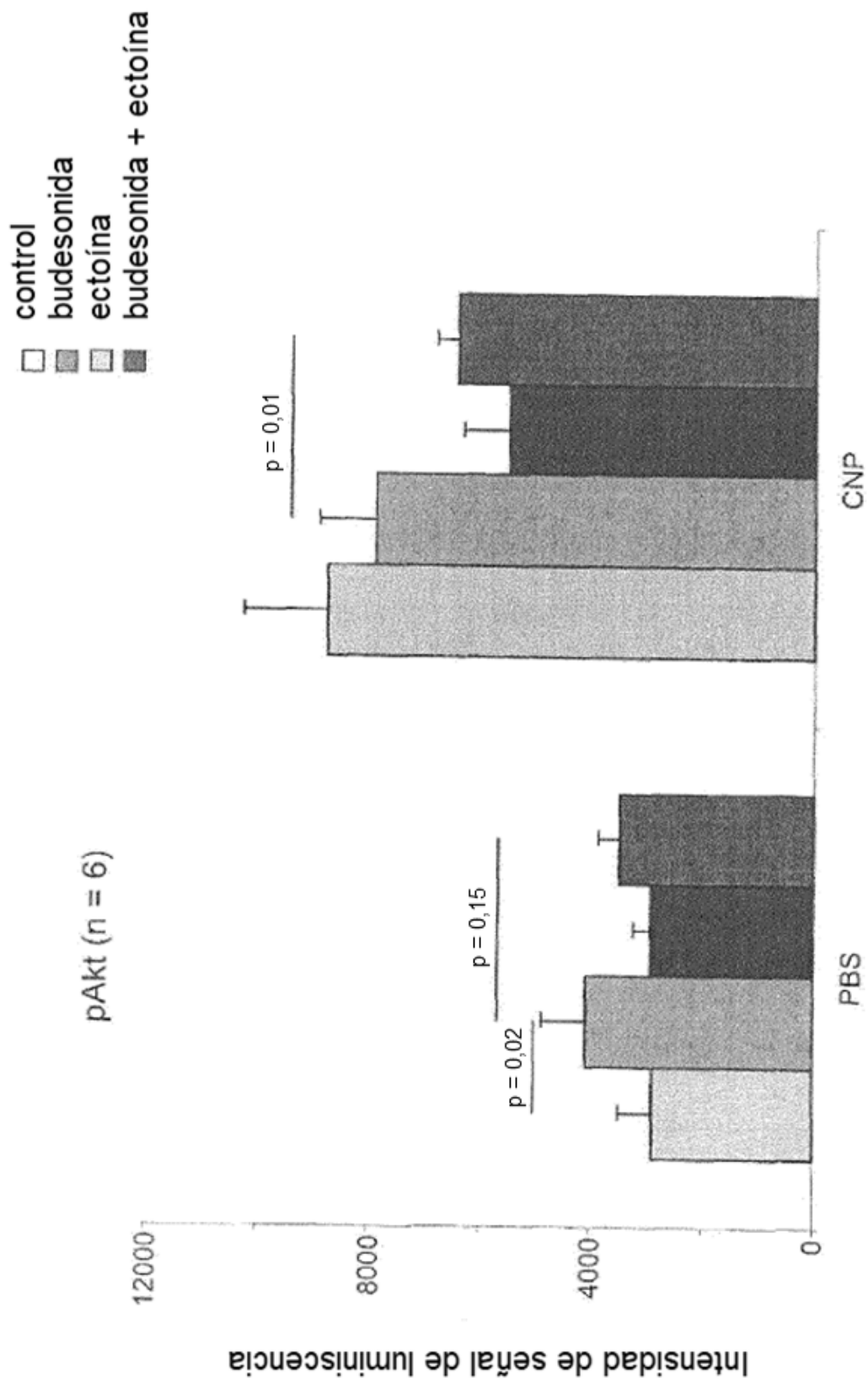


Fig. 6 A

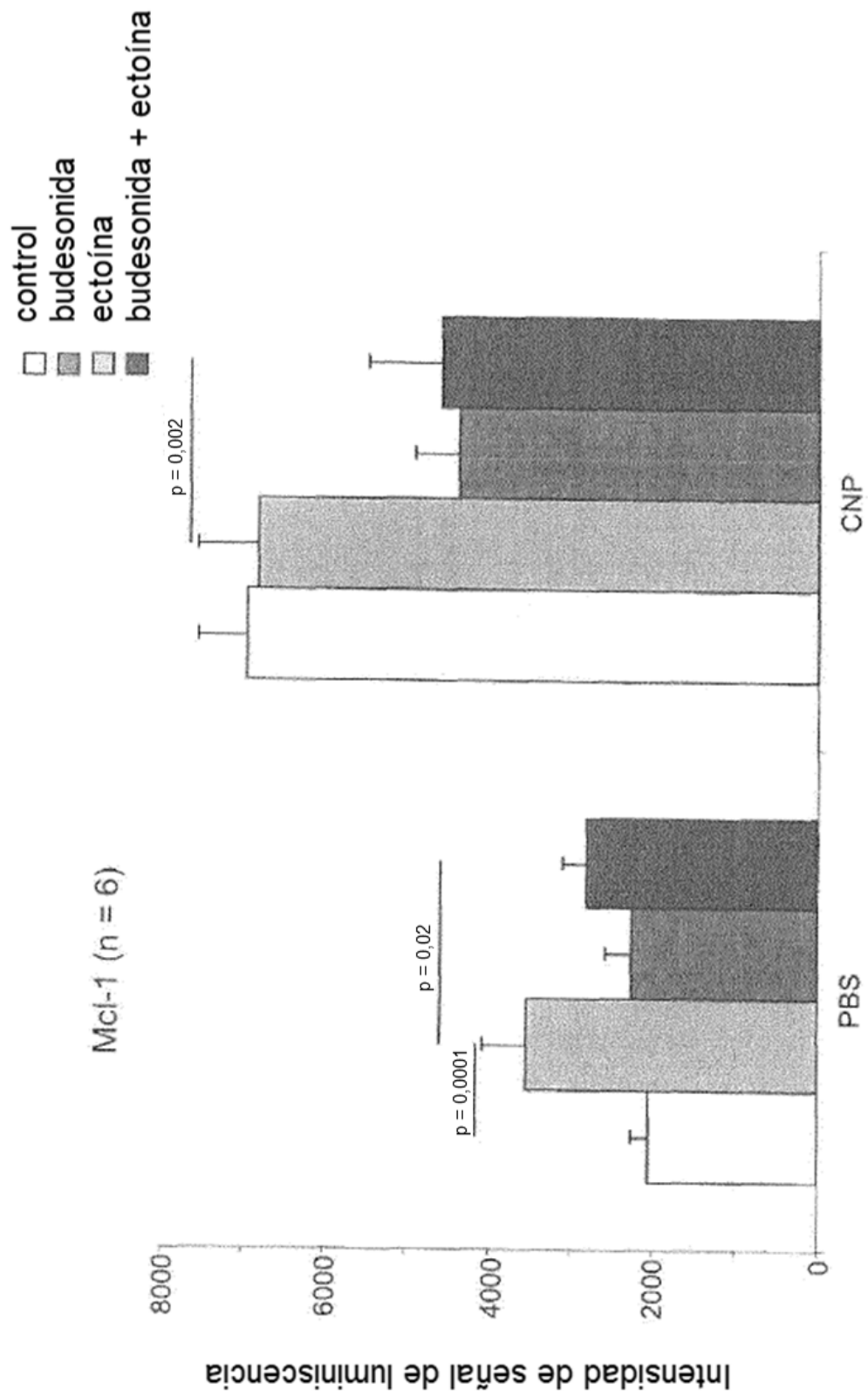


Fig. 6 B

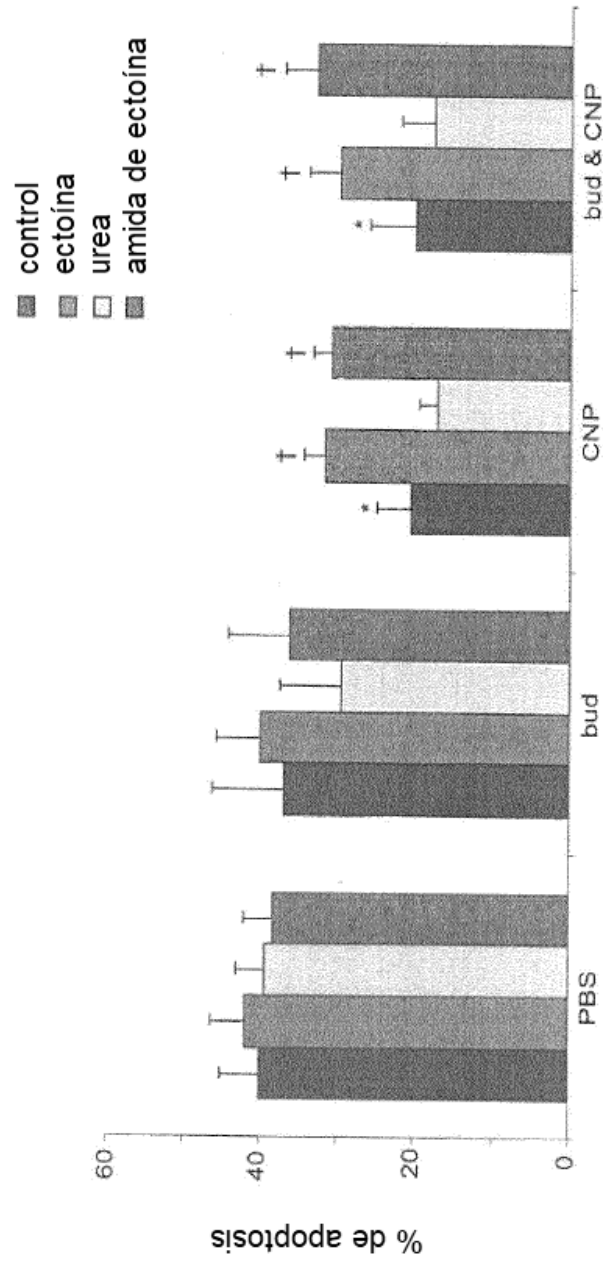


Fig. 7