



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 257**

51 Int. Cl.:

A61K 31/403 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

A61K 31/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04027492 .0**

96 Fecha de presentación : **27.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1529529**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54 Título: **Uso de al menos un efector del metabolismo del glutatión, junto con ácido α -lipoico, para el tratamiento inmunomodulador, potenciador de las defensas y/o antiinflamatorio.**

30 Prioridad: **28.05.2001 DE 101 25 882**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2009

73 Titular/es: **Esparma GmbH**
Seepark 7
39116 Magdeburg, DE
Imtm GmbH

72 Inventor/es: **Täger, Michael;**
Ansorge, Siegfried;
Koegst, Dieter y
Fries, Gerhard

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Uso de al menos un efector del metabolismo del glutatión, junto con ácido α -lipoico, para el tratamiento inmuno-modulador, potenciador de las defensas y/o antiinflamatorio.

La invención se refiere al uso de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol para el tratamiento de trastornos del estado de tiol celular y de las enfermedades acompañantes a éstos.

La regulación fina del estado de tiol-disulfuro representa una de las condiciones básicas más importantes para los rendimientos biológicos metabólicos. El elemento central de regulación dentro de este sistema es el tripéptido glutatión, que dentro de las células alcanza concentraciones relativamente altas (hasta 10 mM) en forma reducida. Además del glutatión, las proteínas que portan grupos tiol, enlazadas en forma intracelular y, en particular, enlazadas en la membrana celular, son otras unidades estructurales importantes del estado de tiol-disulfuro de cada célula.

El metabolismo de la escisión de disulfuro y la formación de grupos tiol, regulado por diversas clases de enzimas es indispensable en su integridad para cada función celular normal, por la multiplicidad de sus funciones biológicas, entre otras, en procesos celulares de crecimiento y diferenciación, incluyendo la muerte celular programada, así como en mecanismos de protección celular y desintoxicación. Los trastornos de este sistema y alteraciones de la concentración de los tioles conducen a trastornos graves de las funciones celulares, que sólo en casos aislados permanecen limitados en forma local, pero normalmente afectan al organismo entero.

En un gran número de exámenes pudo comprobarse la participación de un estado de tiol-disulfuro perturbado en enfermedades agudas y crónicas.

Así, por ejemplo, en determinadas células nerviosas, en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, se comprobaron alteraciones notables del metabolismo del tiol (Brain Res. Rev. 1997; 25:335-358). Existen indicaciones claras de que como consecuencia de este trastorno del metabolismo sucumben en forma múltiple las células nerviosas decisivamente responsables de los síntomas de la enfermedad, en áreas funcionalmente afectadas del cerebro, los ganglios basales (Ann. Neurol. 1994; 36:348-355).

También se hallaron niveles reducidos de glutatión o un contenido intracelular reducido de glutatión, dentro del marco de las enfermedades vasculares y los estados a consecuencia de éstas -arteriosclerosis e infarto de miocardio- en las células endoteliales que revisten la pared interna de los vasos (Med. Sci. Res. 1998; 26:105-106).

Las enfermedades pulmonares que están acompañadas por una transformación del tejido pulmonar, regularmente están relacionadas con una deficiencia de glutatión en el tejido. En tal fibrosis pulmonar, el grado de gravedad transcurre en forma paralela con la pérdida de tiol (Clin. Chim. Acta 1997; 265:113-119). Las enfermedades pulmonares inflamatorias graves, examinadas en el ejemplo del síndrome de disnea aguda del adulto, están acompañadas por una disregulación del metabolismo del tiol en las células inflamadas participantes (granulocitos) (Chest 1996; 109:163-166).

Las células defensoras competentes para la inmunidad del sistema bronquial (macrófagos alveolares) de fumadores y pacientes con enfermedades obstructivas crónicas de las vías respiratorias, según exámenes propios, muestran un grave déficit celular de tiol. El grado del trastorno del estado celular del tiol es directamente proporcional a las limitaciones de la función pulmonar (Free Radic. Biol. Med. 2000; 29:1160-1165).

Mediante exámenes exhaustivos para determinar el significado del metabolismo del glutatión en enfermedades virales, se comprobaron tanto un pronóstico más desfavorable de células con deficiencia de tiol, basado en una defensa celular dañada, como también una función antiviral del glutatión, que inhibe la multiplicación viral (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:1967-1972).

Exámenes propios demostraron que, en particular, en las condiciones de una función renal limitada en alto grado, que hace necesaria una terapia de sustitución renal en forma de una hemodiálisis o diálisis peritoneal, el metabolismo celular de tiol-disulfuro está gravemente trastornado. Este trastorno, entre otras cosas, tiene como consecuencia una alta pérdida de funciones celulares normales, como la capacidad de fagocitar de los macrófagos peritoneales o la capacidad de ser activados de los linfocitos.

El sistema inmunitario celular del ser humano, constituido por las células blancas sanguíneas granulocitos, linfocitos y monocitos, representa un sistema que reacciona en forma especialmente susceptible frente a un trastorno en el metabolismo del tiol.

Alteraciones mínimas, en particular, pérdidas de glutatión celular, pueden desencadenar un programa en forma de cascada para la autodestrucción de la célula, la muerte celular programada (apoptosis) (FASEB J 1998; 12:479-486). El metabolismo tiol-disulfuro actúa aquí como un elemento de mando central de un sistema inmunitario intacto, sin el cual el organismo no sería capaz de vivir.

Además, en los últimos años, se hallaron en forma múltiple indicaciones de un metabolismo dañado del tiol en enfermedades renales crónicas (Ren. Fail. 1998; 20:117-124), anemias (Br. J. Haematol. 1995; 91:811-819), neonatos

inmaduros (Pediatr. Pulmonol. 1995; 20:160-166), pérdida de la audición, condicionada por ruido (Brain Res. 1998; 784:82-90), enfermedades intestinales inflamatorias (Gut 1998; 42:485-492), así como en particular, en diabetes mellitus (Metabolism: Clinical and Experimental 1998; 47 (8):993-997).

5 Por estudios dentro del marco de la diabetes mellitus y trastornos metabólicos asociados a ésta, pudo comprobarse tanto un desplazamiento del estado redox en perjuicio del glutatión reducido, como una disminución absoluta de la existencia total de glutatión (Free Radic. Biol. Med. 1998; 24:699-704). En la compilación de los trabajos realizados hasta ahora para determinar la influencia del trastorno del estado de tiol-disulfuro, se parte de la base de que no sólo se presenta una deficiencia acompañante de SH, como consecuencia de la enfermedad primaria, diabetes del tipo 1
10 ó del tipo 2, sino que más bien una desregulación del metabolismo del tiol es al menos un factor desencadenante de la enfermedad. Se dio un ejemplo convincente, entre otros, comprobando la destrucción de las células pancreáticas β , inducida por radicales (Diabet. Med. 2000; 17:171-180).

Además, se sabe que la enfermedad es acompañada por un gran número de trastornos inmunológicos. Principalmente, se pudieron comprobar un desequilibrio de las citocinas reguladoras de la inmunidad, acompañado por
15 trastornos de la función de los linfocitos, así como de los macrófagos, con el resultado de una propensión aumentada de los pacientes a las infecciones (Horm. Metab. Res. 1998; 30: 526-530).

Por tanto, la corrección de un metabolismo trastornado del tiol adquiere una importancia fundamental como terapia básica en el tratamiento de un gran número de enfermedades de diversos orígenes, pero, en particular, en las condiciones de la diabetes mellitus.

El ácido α -lipoico hasta ahora se usa con un éxito relativo como sustancia neuroprotectora para el tratamiento de parestias de origen neurotóxico, dentro del marco de la polineuropatía diabética (Diabetologica 1995; 38:1425-1433, Diabetes Res. Clin. Pract. 1995; 29:19-26, Diab. Care 1999; 22:1296-1301, Drug Metab. Rev. 1997; 29:1025-1054, DE 4343592 C2). Además, de los documentos DE 4447599 C2 y EP 0530446 B1 se conoce el uso de ácido α -lipoico en otros trastornos neuronales, incluyendo zumbido de oídos y sordera súbita.

Aquí el mecanismo de acción citoprotectora, además de la influencia en la modificación proteica dependiente del
30 azúcar (glucosilación de proteínas), así como de una reducción de la generación neurotóxica de cuerpos cetónicos, al fin y al cabo consiste en la función antioxidante del ácido α -lipoico y sus metabolitos (Free Radic. Biol. Med. 1995; 19:227-250).

Esta función citoprotectora fue examinada, en particular, en el aspecto del impedimento de la transformación oxidativa de ácidos grasos no saturados esenciales. Tal inhibición de la peroxidación lipídica, además del uso del
35 ácido α -lipoico como neuroprotector, representa la base para una aplicación como medicamento hepatoprotector en diversas intoxicaciones y enfermedades hepáticas (Biochemistry 1998; 37:1357-1364).

Además, pudo demostrarse que el ácido α -lipoico inhibe la multiplicación del VIH en diferentes etapas de desarrollo y de esta manera podría contrarrestarse un progreso de la enfermedad del SIDA, aunque los resultados de estos
40 ensayos de laboratorio pudieron transferirse sólo en forma limitada a estudios clínicos (FEBS-Lett 1996, 394:9-13). Algo similar vale para la comprobación de una función antiinflamatoria de la sustancia para las células insulares del páncreas, que producen insulina (Agents Actions 1993; 38:60-65).

En el documento EP 0812590 A2, así como en el documento EP 0427247 B1 se da a conocer el uso del ácido α -lipoico como citoprotector, analgésico y también como medicamento para enfermedades inflamatorias.

Las propiedades antioxidantes del ácido α -lipoico, además de en la capacidad de formar quelatos con iones metálicos, así como de eliminar directamente radicales, se basan en su función como fuerte reductor. Para llevar a cabo esta
50 reacción en forma intracelular, el ácido α -lipoico mismo debe encontrarse en forma reducida, como ácido dihidrolipoico. La transformación del ácido α -lipoico (como disulfuro) en la forma de ditiol del ácido dihidrolipoico, mediante la reducción, a su vez consume equivalentes reductores, siendo catalizado este proceso por, entre otros, la enzima glutathionreductasa (Gen. Pharmacol. 1997; 29:315-331). Esto evidentemente representa la causa del efecto hasta ahora insatisfactorio de la sustancia, en cuanto a la restitución del tiol. El ambroxol, es decir, el clorhidrato de trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)-ciclohexano se usa en diversas formas farmacéuticas en enfermedades pulmonares y bronquiales, como medicamento mucolítico (documentos WO 9633704, GB 2239242, WO 0105378). Además, del documento DE 3530761 se conoce su uso en la hiperuricemia. El efecto del ambroxol como mucolítico consiste tanto en un estímulo de la producción de tensioactivo de las células bronquiales, como en particular, en la capacidad de eliminar radicales libres (Respir. Med. 1998; 92:609-23). Esta actividad antioxidante de la sustancia basada en esto, fue
60 comprobada principalmente en células pulmonares (Pharmacol. 1999; 59:135-141), pero también dentro del marco de mecanismos inflamatorios (Inflamm. Res. 1999; 48:86-93). Además, se sabe que por la adición de ambroxol en altas dosis, *in vitro* se influyen directamente enzimas reguladoras del metabolismo del glutatión, y también se inhiben procesos peroxidantes (Arch. Vet. Pol. 1992; 32:57-66).

Los inhibidores de la enzima transformadora de angiotensina (Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, inhibidores de ACE) se usan con gran éxito en el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades cardiovasculares. La causa del efecto reductor de la tensión arterial aquí usado, consiste en la inhibición de la transformación de angiotensina I en angiotensina II. Además, también se han descrito inhibidores de ACE como efectores del metabolismo del

glutación. Además de exámenes de efectos de este tipo en enfermedades cardiocirculatorias y vasculares (J. Cardio-
 vasc. Pharmacol. 2000; 36:503-509), se examinaron principios generales de regulación (Clin. Nephrol. 1997; 47:243-
 247). Aquí deben distinguirse los efectos de inhibidores de ACE que portan grupos SH como, por ejemplo, capto-
 pril (1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina), de los de inhibidores de ACE exentos de grupos SH como, por
 ejemplo, enalapril {1-(N-[(S)-1-etoxicarbonil-3-fenilpropil]-L-alanil)-L-prolina}. Los primeros reaccionan directa-
 mente como capturadores de radicales en forma antioxidante, mientras que los inhibidores de ACE exentos de grupos
 SH no son capaces de esto en forma primaria. Es común a ambos grupos la influencia sobre el ciclo redox del glutatión,
 mediante la regulación de la glutathionreductasa y la glutathionperoxidasa, así como además, de la superoxidodismutasa
 (Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 2000; 278:572-577).

El documento EP 0 182 590 A2 describe el uso de ácido R- α -lipoico y sus sales farmacéuticamente utilizables
 para la citoprotección así como un procedimiento de preparación de un medicamento.

En "Antioxidantien zur Therapie von Lungenerkrankungen" por R. Buhl y col., Medizinische Monatsschrift für
 Pharmazeuten 1996, Vol. 19 n°. 10 p. 287-294, se dan a conocer las circulaciones de regulación pulmonar, el ciclo
 redox del glutatión, la protección antioxidativa del pulmón como también posibilidades de terapia en relación con el
 uso del uso de antioxidantes en las enfermedades pulmonares.

El documento WO 99/32150 describe una composición farmacéutica de inhibidores ACE e inhibidores de metalo-
 proteinasa de la matriz como también posibilidades de tratamiento para retardar, como también revertir, enfermedades
 en mamíferos, como, entre otras, fibrosis, dilatación ventricular e insuficiencia cardíaca.

En la publicación "Effects of Captopril on Interleukin-6, Leukotriene B₄, y Oxidative Stress Markers in Serum and
 Inflammatory Exudate of Arthritic Rats: Evidence of Antiinflammatory Activity" por A.M.Agha y col., se describe el
 efecto del inhibidor ACE captopril sobre distintos parámetros en suero y en el exudado inflamatorio de ratas artríticas.

Por ello, el objetivo de la presente invención era proporcionar medicamentos novedosos que contuvieran sustancias
 reactivas frente a tiol, para el tratamiento inmunomodulador, potenciador de las defensas y antiinflamatorio.

Conforme a la invención, aquí se usa ambroxol en combinación con ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos.

Sorprendentemente, pudo demostrarse que por la administración de la combinación que se usa conforme a la in-
 vención, de ácido α -lipoico y ambroxol, se produjo una normalización del estado del tiol de células inmunitarias,
 primeramente disminuido. El efecto estabilizante del tiol de la combinación, no sólo superaba regularmente el logrado
 con el uso de ácido α -lipoico o de ambroxol, en forma de sustancia única, más bien también pudieron comprobarse
 efectos superaditivos. La restitución del estado del tiol comprendía tanto tioles intracelulares como grupos SH enlaza-
 dos en la membrana y por tanto es la expresión de una regulación biológica compleja. Este fenómeno se basa en que
 el ambroxol, por un lado, elimina radicales libres que se forman en forma intermedia y, por el otro lado, aumenta la
 disponibilidad de equivalentes reductores para la transformación del ácido α -lipoico desde la forma de disulfuro en la
 forma reducida y con ello mejora el efecto inductor de síntesis del ácido α -lipoico sobre el estado de tiol-disulfuro.

Además, se hizo evidente que un efecto de aumento del tiol mediante la combinación de ambroxol y ácido α -
 lipoico sólo se presentaba en células inmunitarias con deficiencia previa de tiol. Células inmunitarias sanas, que no
 presentaban ninguna alteración del estado de tiol-disulfuro, no reaccionaban con otro incremento de la concentración
 de SH.

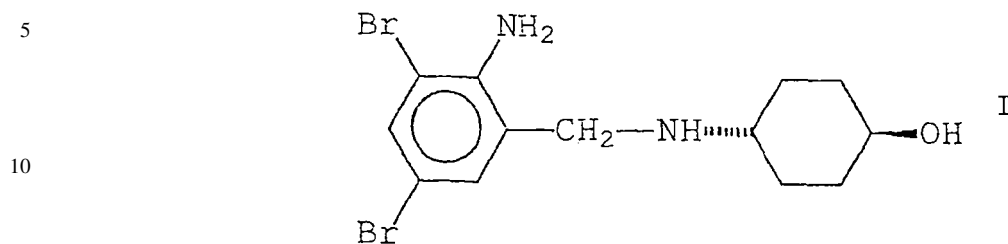
La restitución del estado del tiol en las células inmunitarias fue acompañada por una normalización de los paráme-
 tros funcionales. Esto, en particular, afectó los efectos inmunomoduladores en cuanto a la capacidad de los linfocitos
 T, de ser activados.

Además, pudo demostrarse que las combinaciones que pueden usarse conforme a la invención estabilizaron el
 estado de tiol-disulfuro de otras células inmunitarias, como los macrófagos peritoneales, de pacientes que necesi-
 tan diálisis. Los macrófagos peritoneales de líquidos de diálisis peritoneal con alto contenido de glucosa, antes del
 tratamiento con ácido α -lipoico/ambroxol o, en su caso, ácido α -lipoico/inhibidores de ACE, además de un estado
 deficiente del tiol, presentaban una pérdida casi completa de su función fagocitaria, así como un grave trastorno de la
 diferenciación y de la síntesis de citocinas, que se han descrito como causantes de las altas tasas de infección en estos
 pacientes. Estas pérdidas de funcionalidad pudieron suprimirse mediante la adición de las combinaciones nombradas
 conforme a la invención.

Este medicamento es especialmente apropiado para el tratamiento de cuadros patológicos en los que se presenta
 un trastorno del estado de tiol-disulfuro de las células inmunitarias. Aquí el tratamiento puede realizarse en forma
 simultánea, en formulaciones separadas o temporalmente espaciado.

Las preparaciones de combinaciones que pueden usarse conforme a la invención, pueden administrarse en las
 formas farmacéuticas usuales o como instilación, tanto en forma profiláctica como terapéutica. La dosis eficaz aquí
 debe administrarse dependiendo del caso. Preferentemente, en la administración al paciente en medicina humana, se
 encuentra entre 30 y 1200 mg/día, muy preferentemente, entre 200 y 600 mg/día.

De acuerdo con la invención, como efector del metabolismo del glutatión se usa ambroxol, de fórmula general I,



15 su sal y/o su profármaco. La dosis de ambroxol para la administración en medicina humana, preferentemente se encuentra entre 7,5 y 90 mg/día, muy preferentemente, entre 60 y 75 mg/día.

Los medicamentos pueden administrarse por vía oral o parenteral.

20 Adicionalmente, el medicamento puede contener aditivos usuales. A éstos pertenecen, por ejemplo, disolventes acuosos, estabilizantes, agentes suspensores, dispersantes y humectantes.

25 El medicamento puede prepararse en cualquier formulación. Por ejemplo, a éstas pertenecen soluciones, granulos, polvos, emulsiones, comprimidos y/o comprimidos revestidos por película.

Conforme a la invención, se usa ambroxol junto con ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos para la preparación de un medicamento para el tratamiento inmunomodulador, potenciador de las defensas y/o antiinflamatorio.

30 Igualmente, puede usarse ambroxol junto con ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos para la preparación de un medicamento para el tratamiento inmunomodulador, potenciador de las defensas y/o antiinflamatorio.

Aquí los componentes de la preparación combinada pueden encontrarse en una única formulación o en formulaciones separadas.

35 El uso de la combinación de ácido α -lipoico y efectores del metabolismo del glutatión, como también el uso de acuerdo con la invención de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol se describe en más detalle mediante los siguientes ejemplos y figuras.

40 Ejemplo 1

Influencia sobre el estado celular del tiol de células inmunitarias periféricas del ser humano

45 Se aislaron células inmunitarias periféricas de sangre periférica de donantes sanos ($n = 9$), mediante centrifugación de gradiente de densidades. La fracción principal de la población total resultante de células mononucleares, regularmente la representan linfocitos, con una proporción relativa dependiente del donante, de aproximadamente 90%. El 10% de células mononucleares lo representan los monocitos.

50 Las células mononucleares obtenidas se recibieron en medios de cultivo celular especiales y se incubaron en una estufa incubadora gasificada, a 37°C, una humedad relativa del aire del 98%, y un contenido relativo del 5% de CO₂ en el aire. Se activó el metabolismo de las células inmunitarias primariamente en reposo, mediante estimulación mitogénica (0,5 μ g/ml de fitohemaglutinina). Para examinar la influencia de las combinaciones usadas conforme a la invención sobre el estado del tiol en células inmunitarias con deficiencia de tiol, se empobrecieron artificialmente dichas células en cuanto al contenido de tiol. Esto se efectuó mediante el cultivo en medios con deficiencia de tiol (RPMI 1603), mediante procedimientos ensayados. Cultivos comparativos mediante el uso de medios enteros (RPMI 1640) servían para definir el mejor valor normal posible en las condiciones del cultivo.

60 Se efectuó la determinación del contenido intercelular de tiol a nivel de la célula individual, usando diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA) en citofluorimetría de paso de flujo.

65 El CMFDA primariamente no fluorogénico es recibido en forma pasiva por la célula. Se produce un enlace con grupos tiol citoplasmáticos, a través del resto clorometilo. Después del desprendimiento de los restos acetato por esterasas celulares inespecíficas, este complejo ahora impermeable por la membrana celular, a una longitud de onda de excitación $\lambda_{ex} = 490$ nm, se vuelve fluorogénico, con una longitud de onda de emisión $\lambda_{em} = 520$ nm. La intensidad media de fluorescencia de la muestra (10000 células) es directamente proporcional a la concentración de los grupos tiol intracelulares.

ES 2 322 257 T3

La expresión de grupos tiol unidos a la membrana también se determinó mediante citofluorimetría de paso de flujo. Aquí se usó clorometiltetrametilrodamina (CMTMR) como conjugado de tiol, en las condiciones de un potencial de membrana bloqueado, así como de una capacidad de difusión inhibida de las células. La intensidad de fluorescencia de las moléculas de fluorocromo enlazadas en la membrana celular también es proporcional a la cantidad de grupos tiol en la superficie celular.

En la figura 1 está representado el efecto de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 1a), así como de ácido α -lipoico y enalapril (figura 1b) sobre la expresión intracelular del tiol en linfocitos. La siguiente tabla muestra los resultados de la combinación de ácido α -lipoico y captopril. Los datos están representados como relación de la intensidad de fluorescencia celular respecto a partículas de calibración (perlas), analizadas paralelamente. La concentración de principio activo de la respectiva combinación es idéntica a las concentraciones de los componentes individuales.

Expresión intracelular de tiol [mfi(intensidad media de fluorescencia) con relación a las perlas]

Duración del cultivo [d]	Control	Ácido α -lipoico [50 μ M]	Captopril [10 μ M]	Ácido α -lipoico + captopril
0	2,88 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,20	2,88 $\pm$ 0,20
1	2,31 $\pm$ 0,20	2,81 $\pm$ 0,23	2,80 $\pm$ 0,21	2,89 $\pm$ 0,31
2	1,98 $\pm$ 0,16	2,76 $\pm$ 0,50	2,76 $\pm$ 0,22	2,92 $\pm$ 0,32
3	1,63 $\pm$ 0,15	2,63 $\pm$ 0,60	2,49 $\pm$ 0,26	2,88 $\pm$ 0,41
4	1,30 $\pm$ 0,16	2,41 $\pm$ 0,40	2,21 $\pm$ 0,36	2,91 $\pm$ 0,39
6	1,10 $\pm$ 0,13	2,23 $\pm$ 0,50	1,83 $\pm$ 0,33	2,93 $\pm$ 0,35
8	0,95 $\pm$ 0,10	2,02 $\pm$ 0,30	1,02 $\pm$ 0,39	2,93 $\pm$ 0,41
10	0,81 $\pm$ 0,10	1,89 $\pm$ 0,30	0,91 $\pm$ 0,46	2,90 $\pm$ 0,45
12	0,69 $\pm$ 0,10	1,86 $\pm$ 0,68	0,76 $\pm$ 0,49	2,88 $\pm$ 0,49
14	0,65 $\pm$ 0,08	1,83 $\pm$ 0,60	0,75 $\pm$ 0,56	2,86 $\pm$ 0,47

Se cultivaron células inmunitarias periféricas durante un período de 4 días, en condiciones normales (control 1640) o, en su caso, en condiciones de deficiencia de tiol (1603), para la inducción de una reducción del 10 al 20% de tiol. Como se muestra en 1a, la adición de ambroxol en combinación con ácido α -lipoico, comenzando después de 48 horas de tratamiento, da por resultado una compensación completa de la deficiencia intracelular de tiol. Usando la combinación de ácido α -lipoico y el inhibidor de ACE exento de grupos SH, enalapril, así como con el inhibidor de ACE portador de grupos SH, captopril, estos efectos estuvieron acentuados cuantitativamente aún más, así como en la cinética del tiempo fueron detectables ya después de 24 horas. Ni mediante el ácido α -lipoico solo ni mediante el uso individual de los efectores fue posible una compensación completa de la deficiencia del tiol.

Los resultados obtenidos con este planteamiento experimental de la influencia de las combinaciones nombradas conforme a la invención de ácido α -lipoico y ambroxol sobre la expresión de tioles que se encuentran en la membrana están representados en la figura 2 para la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 2a), así como para la combinación de ácido α -lipoico y enalapril (figura 2b); la siguiente tabla reproduce los resultados de la combinación de ácido α -lipoico y captopril.

Expresión del tiol en la membrana [mfi con relación a las perlas]				
Duración del cultivo [d]	Control	Ácido α -lipoico [50 μ M]	Captopril [10 μ M]	Ácido α -lipoico + captopril
0	2,57 $\pm$ 0,45	2,37 $\pm$ 0,45	2,37 $\pm$ 0,45	2,37 $\pm$ 0,39
1	2,79 $\pm$ 0,50	2,65 $\pm$ 0,39	2,63 $\pm$ 0,39	2,38 $\pm$ 0,38
2	2,35 $\pm$ 0,45	2,43 $\pm$ 0,52	2,54 $\pm$ 0,41	2,42 $\pm$ 0,41
3	1,98 $\pm$ 0,43	2,31 $\pm$ 0,36	2,52 $\pm$ 0,38	2,49 $\pm$ 0,46
4	1,63 $\pm$ 0,43	2,26 $\pm$ 0,20	2,50 $\pm$ 0,41	2,39 $\pm$ 0,52
6	1,10 $\pm$ 0,46	2,19 $\pm$ 0,13	2,46 $\pm$ 0,50	2,40 $\pm$ 0,50
8	0,98 $\pm$ 0,31	1,93 $\pm$ 0,20	2,01 $\pm$ 0,39	2,40 $\pm$ 0,53
10	0,96 $\pm$ 0,32	1,63 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,29	2,36 $\pm$ 0,52
12	0,95 $\pm$ 0,33	1,32 $\pm$ 0,21	1,02 $\pm$ 0,51	2,36 $\pm$ 0,49
14	0,98 $\pm$ 0,33	1,34 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,46	2,36 $\pm$ 0,55

Por el tratamiento con la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol, nuevamente comenzando después de 48 horas, se produjo un mejoramiento significativo de la expresión del tiol en la membrana. Aquí llamaba especialmente la atención que la administración de las sustancias individuales en ningún momento manifestaba una influencia significativa. La adición de la combinación de ácido α -lipoico y los respectivos inhibidores de ACE dio por resultado un efecto superaditivo tanto con enalapril como con captopril.

Ejemplo 2

Influencia en el estado celular de activación de linfocitos T periféricos del ser humano

En la preparación de cultivo descrito en el ejemplo 1 se estimularon linfocitos T humanos con 1,0 μ g/ml de fitohe-maglutinina. Dentro de una duración de cultivo de 72 horas se determinaron cuantitativamente marcadores específicos de la activación celular mediante citofluorimetría por determinación mediante anticuerpos monoclonales. Se examinó la influencia de las combinaciones usadas sobre los marcadores de activación CD69 (antígeno de activación temprana), CD25 (antígeno de activación intermedia) y CD71 (antígeno de activación tardía) de linfocitos T. En la figura 3 está representado el efecto de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 3a), así como de la combinación de ácido α -lipoico y enalapril (figura 3b) sobre el índice de activación de linfocitos T. En comparación con linfocitos T normales (índice de activación = 1,0), en las células con deficiencia de tiol se puede detectar una notable reducción de la capacidad de ser activadas, que demuestra el trastorno funcional celular. Después de la adición de ácido α -lipoico se presenta el efecto conocido de un leve mejoramiento de la capacidad de las células de ser activadas, que, sin embargo, de ninguna manera compensa la desviación significativa del grupo control normal. El ambroxol no presenta ninguna influencia sobre alguno de los tres marcadores de activación; el inhibidor de ACE enalapril es de igual valor al ácido α -lipoico sólo en el caso de una efectivización del antígeno CD25. En cambio, se pudo comprobar un aumento del índice de activación de las células T al intervalo normal, tanto con el uso combinado de ácido α -lipoico con ambroxol, como con el uso combinado de ácido α -lipoico con enalapril. Este efecto se observó con marcadores de activación temprana, intermedia y tardía. Por tanto, puede concluirse que la normalización del estado del tiol celular por el uso combinado del ácido α -lipoico y los respectivos efectores del metabolismo del glutatión, está acompañada por una restitución de la funcionalidad celular.

Ejemplo 3

Influencia sobre el estado del tiol celular de macrófagos peritoneales, dentro del marco de la terapia de sustitución renal

Se aislaron macrófagos peritoneales del líquido effluente de la diálisis peritoneal en pacientes de alta insuficiencia renal, se recibieron en un medio de cultivo celular y se incubaron en una estufa incubadora gasificada, a 37°C, una humedad relativa del aire del 98% y un contenido relativo de CO₂ del aire del 7,5%. Para examinar la influencia de las combinaciones usadas sobre el estado del tiol de los macrófagos peritoneales se trataron respectivamente una fracción con ácido α -lipoico, con el efector del metabolismo del glutatión, ambroxol, o con el inhibidor de ACE, enalapril, o con la combinación de ácido α -lipoico/ambroxol o ácido α -lipoico-enalapril, mientras que respectivamente otra fracción fue usada como control no tratado.

La determinación del estado del tiol celular se efectuó mediante el procedimiento de medición descrito en 1.

En la figura 4 se representa el efecto de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 4a), así como de ácido α -lipoico y enalapril (figura 4b) durante el período de 14 días ($n = 12$).

Añadiendo las monosustancias, nuevamente sólo pudo observarse un aumento de la expresión celular del tiol usando ácido α -lipoico, mientras que el ambroxol y los inhibidores de ACE no mostraban efecto alguno. En cambio, añadiendo la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol, comenzando después de 72 horas, pudo comprobarse un notable aumento de la expresión del tiol celular, que después de 4 días de tratamiento alcanzó un efecto superaditivo, así como después de 8 días alcanzó un máximo que superaba en el triple los datos iniciales y del control (figura 4a). La combinación de ácido α -lipoico y un inhibidor de ACE (figura 4b) dio un resultado similar, pero nuevamente en un tiempo notablemente menor. Aquí el máximo del efecto superaditivo ya se alcanzó a las 48-72 horas de duración del tratamiento.

En la figura 5 se representa el efecto de la combinación de ácido α -lipoico y enalapril (figura 5b) sobre la expresión del tiol dentro de la membrana de macrófagos peritoneales en el orden de ensayos descrito anteriormente. La expresión de tioles en la membrana fue determinada mediante la intensidad media de fluorescencia (mfi) de la muestra (3000 células por medición), después del acoplamiento con un derivado fluorocrómico de clorometilo.

En comparación con los resultados de la expresión intracelular de tiol, aquí puede constatar un efecto muy notable después de la administración de ácido α -lipoico solo, que sin embargo, después de 4 días de tratamiento se suprime nuevamente. Contrariamente a esto, la administración combinada de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 5a) o de ácido α -lipoico y un inhibidor de ACE (figura 5b) genera un aumento superaditivo de la expresión del tiol en forma primaria dentro de la membrana, que es más notable, así como estable a lo largo del período de observación.

Ejemplo 4

Influencia en la capacidad de fagocitar de macrófagos peritoneales

Para posibilitar una caracterización de los macrófagos peritoneales, en cuanto a sus funciones originales, se eligió la capacidad de fagocitar como magnitud para la medición.

Se aislaron macrófagos peritoneales en forma análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 3 y se cultivaron *ex vivo*. Se efectuó la determinación del rendimiento de fagocitosis mediante un ensayo citofluorimétrico a nivel de la célula individual. Se cultivaron los macrófagos juntamente con bacterias adicionadas de opsonina y marcadas con fluorocromo. La cantidad de bacterias recibidas en un período de tiempo definido fue determinada cuantitativamente mediante la intensidad de fluorescencia en los macrófagos y sirvió como medida de su capacidad de fagocitar.

La influencia de las combinaciones usadas sobre la capacidad de los macrófagos peritoneales de fagocitar, después de un de tratamiento de 6 días de duración, está representada en la siguiente tabla.

	Tasa de fagocitosis [mfi/10000 células]
Control	371 $\pm$ 39
Ácido α -lipoico [50 μ M]	687 $\pm$ 59
Ambroxol [10 μ M]	501 $\pm$ 52
Ácido α -lipoico + ambroxol	1398 $\pm$ 286
	($p < 0,05$)
Enalapril [5 μ M]	567 $\pm$ 59
Ácido α -lipoico + enalapril	1698 $\pm$ 241
	($p < 0,05$)
Captopril [10 μ M]	653 $\pm$ 43
Ácido α -lipoico + captopril	1589 $\pm$ 176
	($p < 0,05$)

Después de la incubación con ácido α -lipoico, ambroxol o, en su caso, enalapril, la tasa de fagocitosis estuvo aumentada por el factor 1,85 (ácido α -lipoico), 1,35 (ambroxol) o, en su caso, 1,53 (enalapril), en comparación con el control no tratado. En cambio, con el uso de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol se pudo lograr un aumento de la tasa de fagocitosis por un factor 3,7, con el uso de la combinación de ácido α -lipoico y un inhibidor de ACE, se pudo lograr un aumento en un factor de 4,6 (enalapril) o, en su caso, 4,3 (captopril).

Además, pudo comprobarse una correlación directa entre la tasa de fagocitosis y el contenido intracelular de tiol de los macrófagos peritoneales, en el caso de las combinaciones de ácido α -lipoico y ambroxol ($r = 0,79$; $p < 0,01$), ácido α -lipoico y captopril ($r = 0,86$; $p < 0,01$), así como de ácido α -lipoico y enalapril ($r = 0,82$; $p < 0,01$).

Ejemplo 5

Influencia sobre el grado de diferenciación y de activación, así como sobre la síntesis de citocinas de macrófagos peritoneales

Se aislaron macrófagos peritoneales de pacientes en terapia sustitutiva renal, mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 3, y se cultivaron en presencia de las combinaciones nombradas conforme a la invención, de ácido α -lipoico y efectores del metabolismo del glutatión. Después de 6 días de incubación, en forma citofluorimétrica se determinó el grado de diferenciación de los macrófagos peritoneales, mediante la expresión de los antígenos de superficie celular CD15 y CD11c, así como el grado de la activación celular, mediante la coexpresión de los antígenos de activación CD69 con células CD15-positivas, así como de antígenos CD71 con células CD11c-positivas.

Los resultados están compilados en la siguiente tabla.

	CD15	CD11c	CD15/69	CD11c/71
Control	1,0	1,0	1,0	1,0
Ácido α -lipoico [50 μ M]	1,18 $\pm$ 0,16	1,21 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,09
Ambroxol [10 μ M]	0,98 $\pm$ 0,13	1,01 $\pm$ 0,09	0,98 $\pm$ 0,11	0,96 $\pm$ 0,1
Ácido α -lipoico + ambroxol	1,29 $\pm$ 0,21	1,65 $\pm$ 0,21	1,49 $\pm$ 0,13	1,83 $\pm$ 0,14
Enalapril [5 μ M]	1,21 $\pm$ 0,22	1,23 $\pm$ 0,22	1,19 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,14
Ácido α -lipoico + enalapril	2,12 $\pm$ 0,16 ($p < 0,05$)	1,99 $\pm$ 0,15 ($p < 0,05$)	1,69 $\pm$ 0,2	1,58 $\pm$ 0,12
Captopril [10 μ M]	1,19 $\pm$ 0,14	1,26 $\pm$ 0,24	1,69 $\pm$ 0,21	1,52 $\pm$ 0,16
Ácido α -lipoico + captopril	2,25 $\pm$ 0,2 ($p < 0,05$)	2,63 $\pm$ 0,23 ($p < 0,05$)	1,74 $\pm$ 0,19	1,61 $\pm$ 0,18

Pudo demostrarse que la expresión de los marcadores de maduración CD15 y CD11c aumentó notablemente usando la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol, y usando la combinación de ácido α -lipoico e inhibidores de ACE aumentó significativamente. Además, pudo comprobarse un aumento notable de los antígenos de activación CD69 o, en su caso, CD71, en las respectivas poblaciones de células. La administración de las monosustancias no tuvo influencia o sólo tuvo una influencia marginal sobre el grado de diferenciación y de activación de macrófagos peritoneales.

Paralelamente a esto, en esta preparación experimental se obtuvieron los sobrenadantes de cultivos celulares y se determinaron las citocinas contenidas, sintetizadas por los macrófagos peritoneales y secretadas, interleucina-6 (IL-6), así como un antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra). El análisis se efectuó usando la técnica de enzoinmunoensayo, con sistemas de medición estandarizados.

En presencia de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol, así como de la combinación de ácido α -lipoico y los diferentes inhibidores de ACE, pudo comprobarse una reducción significativa de la síntesis de IL-6. Este efecto a su vez superaba notablemente la suma de las reducciones averiguadas, mediadas por las monosustancias. En estas condiciones fue inducida significativamente la síntesis de IL-1ra. También aquí pudo constatarse una influencia superaditiva de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol o, en su caso, inhibidores de ACE.

Ejemplo 6

Influencia sobre la estabilidad de la restitución del tiol en macrófagos peritoneales en el modelo de diálisis

Después de 6 días, se retiraron de este sistema de ensayo macrófagos peritoneales restituidos en cuanto al tiol, mediante las combinaciones usadas conforme a la invención, descritos en el ejemplo 3, y se cultivaron durante un período de 14 días en un modelo de diálisis. Para esto, los macrófagos peritoneales se adaptaron sobre matrices móviles revestidas por colágeno IV y se pusieron en contacto 3 veces por día, cada vez durante 60 minutos, con solución de diálisis tradicional, de alto contenido de glucosa. Este modelo servía para la inducción de un estrés combinado hiperglucémico/osmótico. En la figura 6 está representado el efecto de la combinación de ácido α -lipoico y ambroxol (figura 6a), así como de la combinación de ácido α -lipoico y enalapril (figura 6b) sobre la expresión intracelular de tiol de los macrófagos peritoneales, en la cinética del tiempo. Se determinó la expresión de tioles en la membrana mediante la intensidad media de fluorescencia (mfi) de la muestra (3000 células/medición), después del acoplamiento a un derivado fluorocromado de clorometilo. Mientras que en los controles no tratados, primeramente restituidos en cuanto al tiol, en este modelo de diálisis durante los primeros 4 días se pudo constatar un descenso casi lineal de la concentración del tiol intracelular, la adición combinada de ácido α -lipoico y ambroxol, así como de ácido α -lipoico y enalapril da por resultado un estado intracelular constante del tiol en el nivel de la restitución primaria. También aquí puede comprobarse un monoefecto, especialmente con el ácido α -lipoico, que sin embargo sólo es de poca duración, y después de aproximadamente 4 días, en el modelo de diálisis presenta sólo aproximadamente el 50% del efecto de las combinaciones.

Se observa un cuadro similar en la observación de las curvas de la expresión del tiol enlazado en la membrana, representadas en la figura 7. También aquí las cantidades obtenidas por la restitución primaria del tiol se mantienen constantes por el uso de las combinaciones del ácido α -lipoico y ambroxol (figura 7a) o con inhibidores de ACE (figura 7b), mientras que por adición de las monosustancias sólo se observaron efectos intermedios (ácido α -lipoico) o marginales (ambroxol, enalapril).

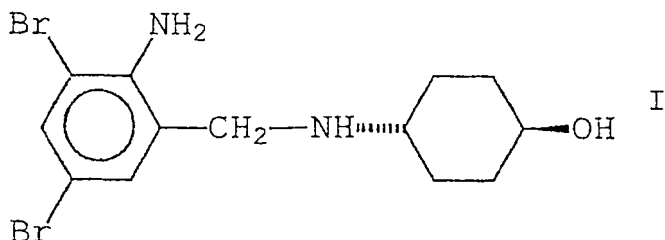
Los efectos del ácido α -lipoico y efectores del metabolismo celular del glutatión sobre la síntesis de citocinas de macrófagos peritoneales, después de una duración del tratamiento de 6 días ($n = 10$) están representados en la siguiente tabla.

	IL-6 [ng/10 ⁶ células]	IL-1ra [ng/10 ⁶ células]
Control	53,1 $\pm$ 8,9	115,2 $\pm$ 23,4
Ácido α -lipoico [50 μ M]	46,9 $\pm$ 6,7	119,8 $\pm$ 19,5
Ambroxol [10 μ M]	51,8 $\pm$ 8,1	118,6 $\pm$ 21,3
Ácido α -lipoico + ambroxol	31,5 $\pm$ 9,2 ($p < 0,05$)	126,8 $\pm$ 15,3 ($p < 0,05$)
Enalapril [5 μ M]	41,7 $\pm$ 7,3	121,1 $\pm$ 16,9
Ácido α -lipoico + enalapril	22,3 $\pm$ 8,1 ($p < 0,05$)	139,8 $\pm$ 22,1 ($p < 0,05$)
Captopril [10 μ M]	42,9 $\pm$ 7,7	129,4 $\pm$ 25,1
Ácido α -lipoico + captopril	28,1 $\pm$ 6,1 ($p < 0,05$)	143,5 $\pm$ 18,7 ($p < 0,05$)

En total, estos ensayos ponen en evidencia que la administración de la combinación de ácido α -lipoico y los efectores del metabolismo del glutatión, ambroxol o, en su caso, inhibidores de ACE, estabilizan un estado del tiol primeramente dañado masivamente, en diferentes sistemas celulares. Además, por esta normalización se produce una restitución de funciones celulares centrales inmunorreguladoras, que no puede constatarse sin tal tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Uso de ambroxol con la fórmula general I,



sus sales y/o sus profármacos junto con ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento inmunomodulador, potenciador de las defensas y/o antiinflamatorio.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ambroxol y el ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos, se encuentran en una única formulación.

3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ambroxol y el ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos, se encuentran en formulaciones separadas.

4. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la dosis del ácido α -lipoico, sus sales y/o sus profármacos, para la administración al paciente en la medicina humana, se encuentra entre 30 y 1200 mg/día, preferentemente, entre 200 y 600 mg/día.

5. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la dosis de ambroxol, sus sales y/o sus profármacos, para la administración al paciente en la medicina humana, se encuentra entre 7,5 y 90 mg/día, preferentemente, entre 60 y 75 mg/día.

6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el medicamento se administra por vía oral o parenteral.

7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el medicamento contiene otros aditivos, seleccionados entre el grupo de disolventes acuosos, estabilizantes, agentes suspensores, dispersantes y humectantes.

8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el medicamento se presenta en forma de una solución, un granulado, un polvo, una emulsión, un comprimido y/o un comprimido revestido por película.

Fig. 1

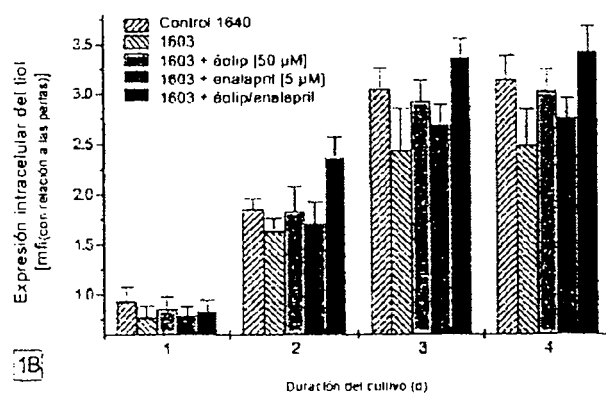
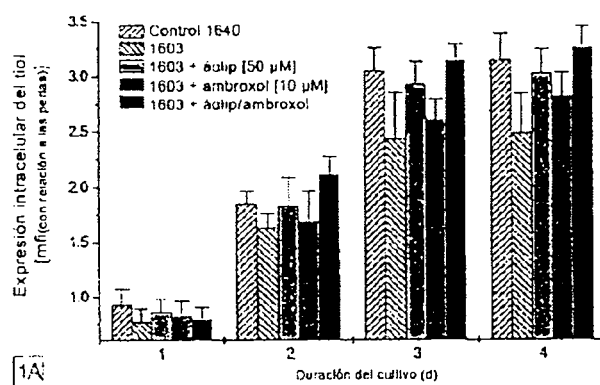


Fig. 2

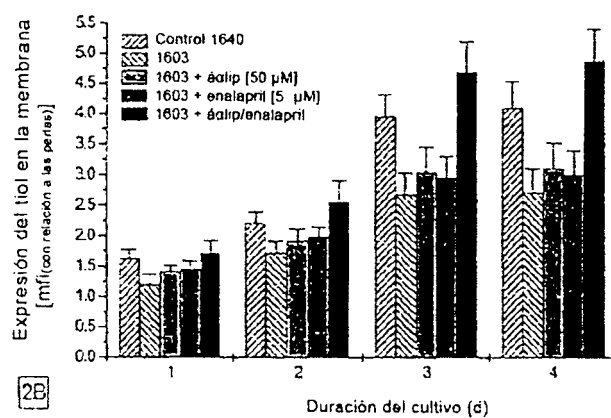
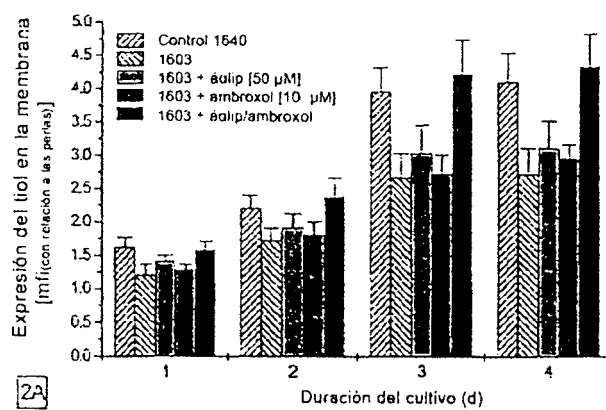


Fig. 3

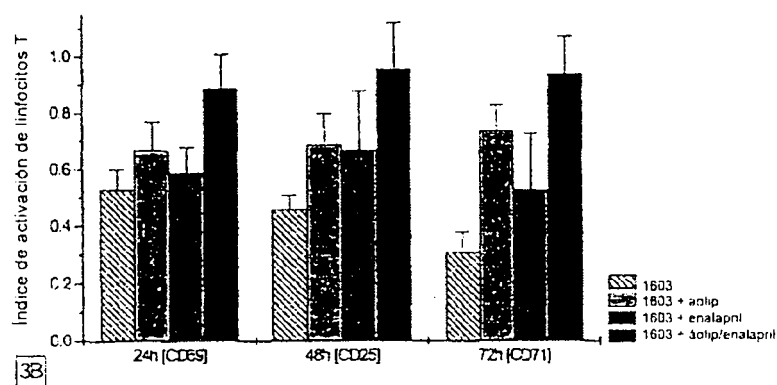
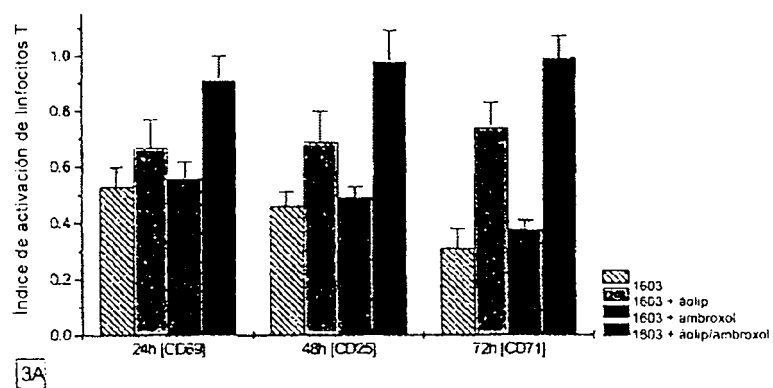


Fig. 4

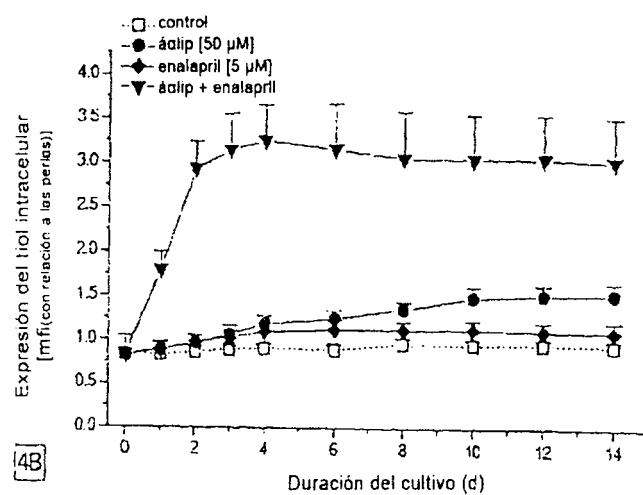
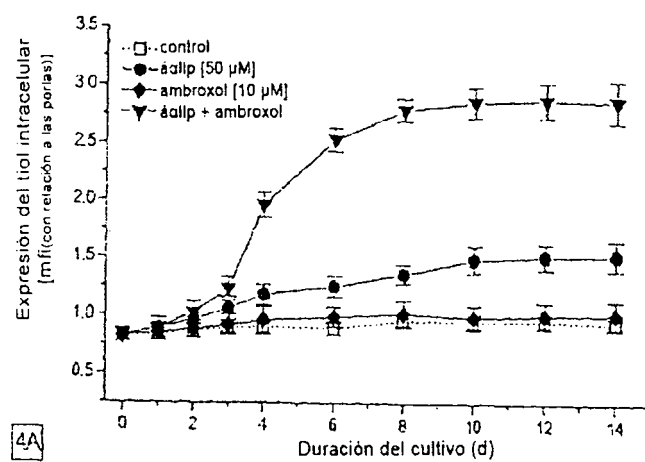


Fig. 5

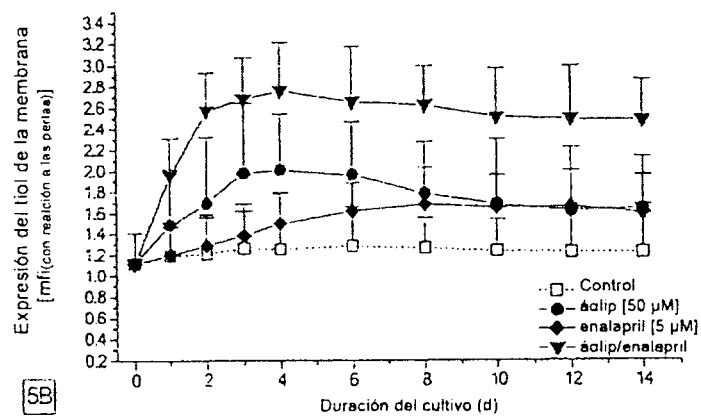
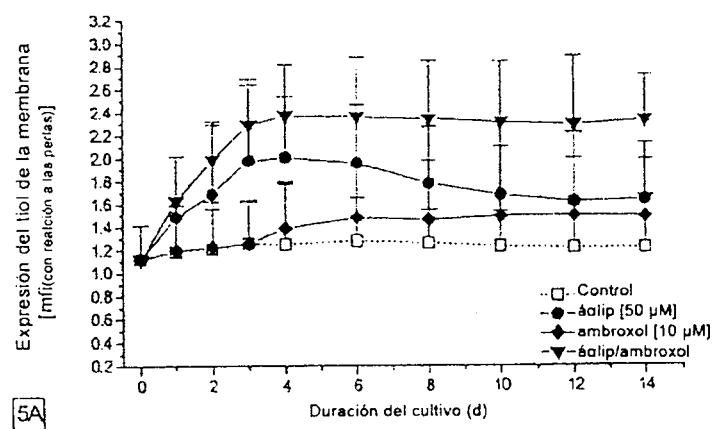


Fig. 6

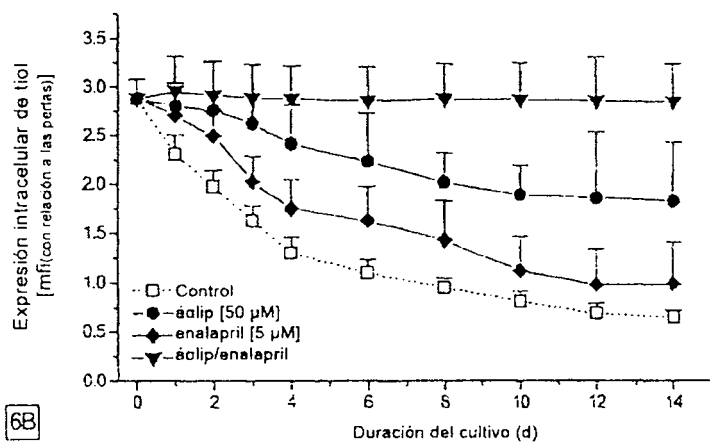
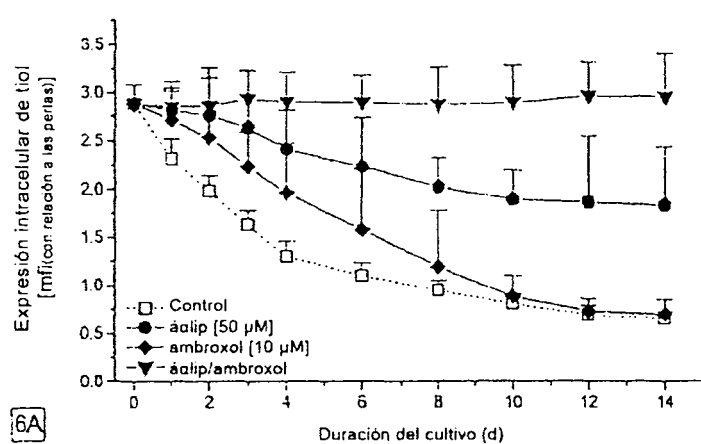


Fig. 7

