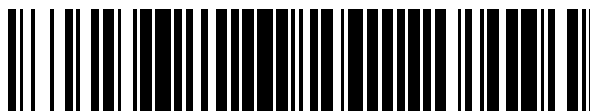


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 137**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/683** (2006.01)

**A61K 31/685** (2006.01)

**A61K 35/42** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 17/04** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06716088 .7**

96 Fecha de presentación: **23.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1855692**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Composiciones para tratar enfermedades cutáneas caracterizadas por la exudación de proteínas del suero**

30 Prioridad:  
**28.02.2005 KR 20050016567**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.03.2012**

73 Titular/es:  
**CHOI, SEONG-HYUN**  
**501-1404 JUGONG 5-CHA APT. SEOKSA-DONG**  
**CHUNCHEON-SI GANGWON-DO 200-761, KR y**  
**KT & G CORPORATION**

72 Inventor/es:  
**CHOI, Seong-hyun**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 377 137 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratar enfermedades cutáneas caracterizadas por la exudación de proteínas del suero.

**Campo técnico de la invención**

5 La invención presente se refiere a una composición para reducir la exudación de las proteínas del suero, y más concretamente a una composición para mejorar la dermatitis atópica, eczema atópico, prurito de la piel, eritema atópico o eritrodermia, y dermatitis de contacto, reduciendo la exudación de las proteínas del suero en piel y mucosa.

**Antecedentes de la invención**

10 Con-el propósito de la comprensión académica de las enfermedades atópicas y la mejora y tratamiento de sus síntomas, se han hecho muchos intentos por los investigadores para comprender los mecanismos inmunoreguladores en el cuerpo de un ser vivo o los mecanismos de señalización celular y los métodos que emplean los mecanismos junto con el desarrollo de la inmunología y citología. Por otro lado, ha habido algunos estudios de algunos investigadores para elucidar las causas de las enfermedades con los cambios ocasionados por el desarrollo de la civilización moderna, es decir, los cambios en la dieta o la exposición a contaminantes.

15 El hecho común encontrado en los estudios sobre enfermedades atópicas en estos diversos hallazgos es que las proteínas del suero exudan de la piel o mucosa de pacientes con enfermedades atópicas, independientemente del conocimiento de que las enfermedades atópicas podrían ser causadas por razones inmunológicas. Sin embargo, no ha habido ningún estudio para concluir claramente si las proteínas del suero exudan de la piel o la mucosa como resultado del desarrollo de las enfermedades atópicas o la exudación de las proteínas del suero en la piel o mucosa desencadena las enfermedades atópicas.

20 Se sabe que la exudación de las proteínas del suero en la piel o mucosa exteriores se observa principalmente usando la albúmina del suero como proteína marcadora. Se sabe que el nivel de exudación de la albúmina en las enfermedades de la piel está estrechamente correlacionado con la severidad de las enfermedades. La hipoalbuminemia en la sangre es inducida a medida que las proteínas del suero exudan mucho de la piel (Worm et al., 1981. Br. J. Dermatol. 104: 389-396; y Worm y Rossing, 1980. J. Invest. Dermatol. 75: 302-305). Pacientes que sufrían de asma alérgica y rinitis desarrollaron síntomas tales como lifangiectasia intestinal originada por la severa pérdida de albúmina a través de la pared interna del intestino (Esenberh, 1976. Ann. Allergy, 36: 342-350). En el caso de los niños, la pérdida de albúmina por enfermedades de la piel graves hace que se retarde su crecimiento (Abrahamov, 1986. Eur. J. Pediatr. 145: 223-226), y va también acompañada de oliguria y acrocianosis junto con la lifangiectasia (Capulong et al. 1996. Pediatr. Allergy Immunol. 7: 100-102). Se ha informado sobre que un nivel de exudación de la albúmina en la zona de la piel enferma está estrechamente relacionado con la severidad de las afecciones incluso en el caso del eczema atópico y dermatitis de contacto (David et al., 1990. Br. J. Dermatol. 122: 485-489; y Wijsbek et al., 1991. Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 10: 193-204).

35 Se ha informado que la exudación de proteínas séricas que incluyen la albúmina se ha encontrado incluso en los esputos de los pacientes que sufren de síntomas de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Schoonbrood et al. 1994. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150:1519-1527; y Anderson & Persson 1988. Agents Actions Suppl. 23: 239-260), y también se informó de que la exudación de albúmina se produce sin signos de eosinofilia en el caso de la tos crónica (Pizzichini et al., 1999. Can. Respir. J. 6:323-330).

40 La exudación de las proteínas del suero es inducida por productos químicos, incluyendo materiales tales como el salicilato de metilo, fenol, aceite de croton, benzalconio, etc.. (Patrick et al. 1985. Toxicol. Appl. Pharmacol. 81: 476-490); y tolueno, m-xileno, ciclohexano, etc. (Iyadomi et al., 1998. Ind. Health 36:40-51). El 2,4-dinitrofluorobenceno se utiliza en los modelos animales para realizar un estudio de irritación de la piel y también induce la exudación de las proteínas del suero (Nakamura et al., 2001. Toxicol. Pathol. 29:200-207). Se ha informado de que no todos los materiales de disolventes orgánicos inducen la exudación de las proteínas del suero, y de que los niveles de exudación también varían de acuerdo con la estructura de los productos químicos. La exudación de las proteínas del suero es fácilmente inducida por los productos químicos que tienen anillos aromáticos, pero es poco afectada por disolventes orgánicos como la acetona.

50 Teniendo en cuenta que las enfermedades atópicas son causadas por los hábitos dietéticos occidentalizados (Weiland et al., 1999. Lancet 353:2040-2041; von Mutis et al., 1998. Lancet 351:862-866; y Dunder et al., 2001. Allergy 56:425-428), los investigadores han prestado atención a los cambios en los componentes y el contenido de los lípidos ingeridos por el pueblo. Con el advenimiento de la década de 1970, algunos investigadores han encontrado que la falta de equilibrio en el metabolismo humano es causada por la ingestión excesiva de ácidos grasos insaturados y aceites trans que son los componentes principales de los aceites vegetales, lo cual se traduce en el aumento de enfermedades atópicas.

A diferencia de otros tejidos y órganos, en los pulmones de los mamíferos incluyendo los seres humanos hay diversos fosfolípidos con un contenido muy alto de ácidos grasos disaturados, y los tensioactivos presentes en la superficie del pulmón tienen, en particular, un alto contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Se sabe que este componente funciona como reductor de la tensión superficial en los pulmones. La reducción de la tensión superficial por el tensioactivo en la superficie del pulmón puede facilitar la respiración cuando el aire es inhalado en los pulmones, y previene que las paredes alveolares se unan entre sí o que su estructura se colapse cuando se exhala. El componente lípido del tensioactivo se compone de alrededor del 90% de fosfolípidos (alrededor del 70% de los fosfolípidos son fosfolípidos disaturados) y alrededor del 10% de grasa neutra (la mayoría de la grasa neutra es colesterol) (Reviews: Jon Goerke 1998. *Biochem. Biophys. Acta.* 1408:79-89; y Veldhuizen et al., 1998. *Biochim. Biophys. Acta.* 90-108). El documento de patente internacional WO 99/30722 revela el uso de fosfolípidos para reducir la inflamación y la viscosidad del moco en un paciente. En particular, se describe el uso de agentes mucolíticos en la dilución o reducción de la viscosidad del moco tenaz, una secreción viscosa de las membranas mucosas. Se dice que al reducir la viscosidad de las secreciones de moco y reducir la inflamación, dichos agentes aumentan la eficiencia del reflejo de tos y de la acción ciliar en la eliminación de las secreciones mucosas acumuladas en las vías respiratorias del pulmón.

Uno de los resultados científicos que debería considerarse adicionalmente además de los hechos descritos anteriormente es la vía para la síntesis de los lípidos de los tensioactivos en los pulmones. Un aspecto es que la mayor parte del colesterol presente en el pulmón humano proviene de la sangre. El colesterol sintetizado en el pulmón representa sólo alrededor del 1%, y el resto de colesterol debe suministrarse de la sangre (Hass y Longmore, 1979. *Biochim. Biophys. Acta* 573:166-174). Se sabe que los fosfolípidos que constituyen la mayoría de los tensioactivos pulmonares son sintetizados en y secretados por las células epiteliales del tipo II, pero la mayoría de los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos se suministra de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) en la sangre (Rama et al., 1997. *J. Clin. Invest.* 99: 2020-2029).

La SP-A (proteína tensioactiva A) es una de las principales proteínas presentes en los tensioactivos del pulmón que ha sido estudiada durante los últimos 30 años. La proteína SP-A es sintetizada en y secretada por células epiteliales del tipo II presentes en los alvéolos y también se encuentra en la superficie del intestino delgado, trompa de Eustaquio del oído, lágrimas, etc.. Su peso molecular es de aproximadamente 700 kDa (medido por un ensayo de filtración de gel), y sus 18 unidades idénticas, cada una con un peso molecular de 32 kDa, se unen para formar una proteína madura que tiene funciones peculiares. Se ha sabido que la proteína tiene varias funciones biológicas, pero que pueden clasificarse principalmente en dos grupos. El primero es una función inmunológica en la que SP-A protege los pulmones por medio de la unión a bacterias o virus, así como a ácaros del polvo doméstico, polvo de antenas, etc. que entran en los pulmones al inhalar. La segunda función es la de participar en el mantenimiento de la homeostasis de los tensioactivos en el pulmón (Tino y Wright 1998. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408: 241-263; Haagsman, *Biochim. Biophys. Acta.* 1408: 264-277; Crouch & Wright, 2001. *Annu. Rev. Physiol.* 63:521-524; y Haagsman y Diemel, 2001 *Compar. Biochem. Physiol.* 129: 191-108).

### **Divulgación de la invención**

En consecuencia, la invención presente está diseñada para resolver los problemas de la técnica previa, y por lo tanto es un objeto de la invención presente proporcionar una composición para tratar y/o aliviar las enfermedades pertinentes a la exudación de las proteínas del suero.

A fin de lograr el objeto anterior, la invención presente proporciona una composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades pertinentes a la exudación de proteínas del suero seleccionadas del grupo que consiste en la dermatitis atópica, eczema atópico, prurito de piel, eritema atópico. o eritrodermia y dermatitis de contacto que comprende como componentes eficaces fosfolípidos disaturados, iones de calcio y un ácido orgánico que contiene un grupo carboxilo o grupos carboxilos.

Los fosfolípidos disaturados de la invención presente preferentemente se extraen de animales, más preferiblemente de vacas y cerdos y lo más preferentemente de sus lavados de los alvéolos bronquiales o sus homogenatos de tejido pulmonar.

Además, los fosfolípidos disaturados de la invención presente son preferentemente dipalmitoilfosfatidilcolina y/o dipalmitoilfosfatidilinositol.

El ácido orgánico que incluye grupo(s) carboxilo(s) preferentemente incluye, pero no está limitado a, un ácido orgánico que pueda ser metabolizado, por ejemplo ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico o ácido cítrico. Además, la composición de la invención presente puede además incluir aditivos, por ejemplo el glicerol, si es necesario. En la composición de la invención presente, los fosfolípidos disaturados están preferentemente presentes en una concentración de 1 a 700 mg/ml. El intervalo de concentración mencionado es el más preferido ya que los fosfolípidos disaturados exhiben un efecto terapéutico o de relajación malo en una concentración de 1 mg/ml o

menor y a una concentración igual o superior a 700 mg/ml son difíciles de utilizar ya que la gran viscosidad de la suspensión imposibilita su homogeneización.

Además, la solicitud presente describe una composición para el tratamiento de enfermedades de la piel, que contiene la composición de la invención presente. Asimismo, la solicitud presente describe una composición cosmética que contiene la composición de la invención presente.

Las enfermedades relacionadas con la exudación de proteínas del suero de la invención presente, se seleccionan del grupo consistente en la dermatitis atópica, eczema atópico, prurito de la piel, eritema atópico o eritrodermia, y dermatitis de contacto.

En lo sucesivo, la invención presente se describirá en detalle.

En la invención presente, sobre la base de que las enfermedades atópicas tienen un síntoma común que es que las proteínas del suero exudan de la piel o mucosas debido a que la función de la barrera endotelial epitelial es reducida por el consumo excesivo de ácidos grasos insaturados y aceites trans, se empleó un novedoso modelo animal. Se constató que cuando se introduce por vía intratraqueal aceite extraído de vegetales emulsificado en solución salina en el pulmón de la rata, el animal muestra exudación de las proteínas del suero en el pulmón. También se encontró que el síntoma de la exudación de las proteínas del suero puede ser reducido o suprimido por la administración por vía intratraqueal de los biocomponentes estables- una composición inventada aquí - que son completamente metabolizados *in vivo*. Y también se encontró que la composición, que contenga los fosfolípidos disaturados aislados del pulmón del animal, una cierta concentración de iones de calcio y un ácido orgánico que contenga (a) grupo(s) carboxilo(s), actúa con éxito en el área de la piel afectada de los pacientes con las enfermedades atópicas.

En la invención presente, se ha encontrado que se forma una capa única sedimentaria que contiene una combinación ideal de los fosfolípidos disaturados cuando la proteína SP-A se agrega en la presencia de cationes divalentes y luego se mezcla con lavados de alvéolos bronquiales u homogenatos pulmonares de animales sanos. La presente invención incluye un método que incluye los pasos de eliminar las proteínas tensioactivas (especialmente, las proteínas solubles en disolventes orgánicos SP-B y SP-C) y péptidos hidrófobos que pueden inducir una respuesta inmune en seres humanos, colesterol y fosfolípidos insaturados de la capa sedimentaria y luego obtener una combinación ideal de las fracciones de fosfolípidos disaturados existentes en el pulmón del animal sano. Sobre la base de las conclusiones que la proteína SP-A exhibe una fuerte interacción-hidrófoba no específica en ausencia de cationes divalentes, se requiere una cierta concentración de iones de calcio cuando se aplica una composición que contenga la fracción de fosfolípidos disaturados a la piel o mucosa del paciente con una enfermedad atópica para suprimir o reducir la exudación de las proteínas del suero, así como son también añadidos ácidos orgánicos que tengan (a) grupo(s) carboxilo(s) que puedan ser metabolizados en las células, por ejemplo citrato o ácido cítrico a la composición para evitar que los fosfolípidos disaturados se agreguen debido a una cierta concentración de iones de calcio.

#### Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de las realizaciones preferidas de la invención presente se describirán en más detalle en la siguiente descripción detallada, tomada con los dibujos acompañantes. En los dibujos:

La Fig. 1 es un diagrama que muestra que los lípidos totales obtenidos del pulmón del animal se visualizan mediante CCF.

En la Fig. 1, el indicador \* representa la fracción de fosfolípidos disaturados.

La Fig. 2 es un diagrama cromatográfico que muestra los resultados del patrón de elución de proteínas del eluyente de cada cromatografía de columna después de que la exudación de las proteínas del suero fuera inducida en el pulmón de la rata y luego suprimida por la composición. En la Fig. 2, el diagrama 1 muestra el perfil de proteínas pulmonares de una rata en la que la exudación de las proteínas del suero fue inducida por administración de aceite de maíz emulsionado en solución salina al pulmón de la rata, el diagrama 2 muestra el perfil de proteínas pulmonares después de que la composición fuera administrada a una rata en la que la exudación de las proteínas del suero fue inducida previamente, y el diagrama 3 muestra el perfil de proteínas pulmonares de una rata control. "A" indica el pico de las proteínas que contengan una SP-A (aproximadamente 700 kDa de peso molecular) y "B" indica el pico de las proteínas que contengan albúmina del suero (aproximadamente 70 kDa). Se evaluó el nivel de la supresión o reducción de la exudación de las proteínas del suero comparando los tamaños de los dos picos, A y B.

La Fig. 3 es una fotografía que muestra los resultados después de que la composición se aplicara en las enfermedades atópicas de la piel (de 2 a 4 semanas). La parte al lado izquierdo de la fotografía muestra la condición de la piel antes de la aplicación de la composición. La parte derecha de la fotografía muestra los resultados después

de la aplicación de la composición. La aplicación de la composición se llevó a cabo durante un período de 2 a 4 semanas, la parte superior de la foto muestra a un paciente que sufre de eczema atópico, la segunda fotografía en la parte superior muestra a un paciente que padece dermatitis atópica incluyendo úlcera de la piel, la tercera foto en la parte superior muestra a un paciente que sufre eritema atópico y la parte inferior de la fotografía muestra a un paciente que padece dermatitis atópica.

La Fig. 4 es una fotografía que muestra el resultado antes y después de que se aplicara la composición. Este resultado muestra fotografías tomadas antes de la aplicación de la composición en una enfermedad de la piel atópica desarrollada en la espalda de una niña de 6 años de edad (izquierda) y después de la aplicación de la composición en la enfermedad atópica de la piel durante 4 semanas (derecha).

La Fig. 5 es una fotografía que muestra el resultado antes y después de que la composición se aplicara. Estos resultados muestran fotografías tomadas antes de la aplicación de la composición a una piel con dermatitis atópica, incluyendo úlcera de la piel, desarrollada en la región poplíteica de la rodilla de una niña de 6 años de edad (izquierda) y después de la aplicación de la composición a la piel con dermatitis atópica durante 5 semanas (derecha).

La Fig. 6 es una fotografía que muestra el resultado antes y después de que la composición se aplicara. Estos resultados muestran fotografías tomadas antes de la aplicación de la composición a la piel con una enfermedad atópica común desarrollada en la región poplíteica de la rodilla de una mujer de 16 años de edad (izquierda) y después de la aplicación de la composición a la piel con enfermedad atópica durante 3 semanas (derecha).

La Fig. 7 es una fotografía que muestra el resultado antes y después de que la composición se aplicara a piel con una enfermedad atópica en estado incipiente desarrollada en la cara de una niña de 10 meses de edad (izquierda) y después de la aplicación de la composición a la piel con enfermedad atópica durante 3 semanas (derecha).

### Mejor forma de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la invención presente se describirá más detalladamente en relación a las realizaciones preferidas. Sin embargo, debe entenderse que la descripción propuesta aquí es sólo un ejemplo preferible para el propósito de ilustración solo, y no pretende limitar el alcance de la invención.

#### 25 Ejemplo 1: Extracción de la fracción de fosfolípidos disaturados del lavado alveolar bronquial de cerdo

##### (1) Método para obtener el lavado bronquial alveolar

Se obtuvo el lavado bronquial alveolar pulmonar tomando el pulmón de un cerdo sano y administrando una solución osmótica salina, que contenía cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 5 mM, al pulmón. El lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente administrando alrededor de 0,6 l de una solución a uno de los pulmones mediante una bomba de presión, seguido de la recolección del lavado que emanaba desde el pulmón. El lavado se llevó a cabo con 15 l de la solución salina por pulmón. El lavado alveolar bronquial recogido fue transferido inmediatamente a un baño de agua helada y enfriado.

##### (2) Método para obtener un precipitado del tensioactivo del lavado alveolar bronquial mediante un fenómeno de agregación

Puesto que el lavado alveolar bronquial incluyendo el calcio iónico (5 mM) se mantuvo en un baño de agua helada durante 1 hora, a continuación, la proteína SP-A comenzó a agregarse con los lípidos en el tensioactivo. Esta solución fue centrifugada en una centrifugadora (componente-R, Hanil, República de Corea) con una función de giro de aceleración baja. La solución se centrifugó a 4° C durante 35 minutos bajo una fuerza centrífuga de 4.500 g. El precipitado formó tres capas distintivas después de la centrifugación. Una pequeña cantidad de la capa inferior contenía células y proteínas insolubles y/o desnaturalizadas, y la mayor cantidad de la capa intermedia y una pequeña cantidad de la capa superior contenían tanto los lípidos del tensioactivo como las proteínas del tensioactivo que son necesarios en esta invención. Las capas intermedias y superiores del precipitado fueron recogidas juntas y se procedió a la extracción con un disolvente orgánico para obtener una fracción de fosfolípidos disaturados.

##### (3) Extracción con el disolvente orgánico principal

Se añadió el doble de su volumen de agua destilada a la mezcla de las proteínas tensioactivas y los lípidos tensioactivos preparada en el paso anterior y la mezcla luego fue suspendida. Se añadió un disolvente mixto (relación volumétrica de 2:1) de cloroformo y metanol a la muestra en el mismo volumen y se agitó a 30° C durante 30 minutos. La muestra se centrifugó durante 15 minutos bajo una fuerza centrífuga de 1.000 g, y luego se recogió la capa de disolvente orgánico para el procedimiento de aislamiento posterior.

##### 50 (4) Extracción de la fracción de fosfolípidos disaturados usando cromatografía de columna de sílice

Se evaporó el disolvente de la muestra obtenida por la extracción con el disolvente orgánico principal mediante un rotavapor al vacío (Eyela, Japón) y, a continuación, la muestra fue disuelta de nuevo en cloroformo. La muestra fue cargada en una columna que tenía una relación diámetro altura de 1:5, llena de sílice (Merck, 230-400 de malla). La columna de sílice fue lavada previamente con cloroformo puro antes de la aplicación de la muestra en la columna.

5 Para deshacerse del colesterol y las proteínas tensioactivas solubles en el disolvente orgánico, especialmente en acetona y a fin de obtener la fracción de fosfolípidos disaturados, los sistemas de disolventes fueron empleados en el siguiente orden. Después de la aplicación de la muestra en cloroformo: cloroformo puro - acetona pura - cloroformo puro - un disolvente mixto de cloroformo: metanol (9:1 relación volumétrica) - un disolvente mixto de cloroformo: metanol (relación volumétrica de 4:1) y, un disolvente mixto de cloroformo:metanol:agua (8:6:1 relación volumétrica) como disolvente final. Las proteínas tensioactivas solubles en disolventes orgánicos y péptidos hidrófobos eluyeron en las primeras etapas de la labor de columna cuando se lavó la columna con los disolventes acetona pura y cloroformo puro, y se eluyó una fracción de fosfolípidos disaturados, que es necesaria para la invención presente, con el último sistema de disolventes. Cada uno de los componentes de fosfolípido de las fracciones fue identificado mediante 2D-CCF (cromatografía bidimensional en película fina) utilizando los estándares de lípidos (comercialmente disponibles de Sigma) (Fig. 1). Los componentes principales de los fosfolípidos disaturados extraídos fueron dipalmitoilfosfatidilcolina y dipalmitoilfosfatidilinositol.

(5) Proceso después del tratamiento de la fracción extraída de fosfolípidos disaturados

La muestra final extraída de la columna se pasó a través de un papel de filtro de 3 capas de Whatman Filterpaper No.1, y después el disolvente fue eliminado usando un rotavapor de evaporación al vacío. Se añadió etanol puro a la muestra libre de disolvente y luego se filtró mediante un filtro de PVDF (fluoruro de polivinilideno, tamaño de poro de 0,22 µm, Millipore). Se evaporó nuevamente el etanol usando un evaporador. Se lavó la muestra con etanol 2 veces. Se eliminó una cantidad muy pequeña del etanol restante mediante la liofilización. Se almacenó una forma en polvo de los fosfolípidos disaturados a -70°C en un recipiente de almacenaje hermético al aire lleno de gas nitrógeno.

Ejemplo 2: Extracción de la fracción de fosfolípidos disaturados del lavado alveolar bronquial de ganado vacuno

25 Se repitió el método de los pasos 1 a 5 descrito en el ejemplo 1 para obtener la fracción de fosfolípidos disaturados del lavado alveolar bronquial de ganado vacuno, excepto que se utilizó el ganado vacuno en lugar del cerdo.

Ejemplo 3: Método para obtener la fracción de fosfolípidos disaturado de un homogenato de tejido pulmonar de cerdo sano

(1) Homogenización primaria del tejido pulmonar del animal

30 Se cortaron 150 g del tejido pulmonar extraído de un cerdo sano en un tamaño de aproximadamente 2 cm x 2cm. Se añadieron 700 ml de una solución salina osmótica refrigerada que contenía iones positivos divalentes (cloruro de calcio) 3 mM a las piezas de pulmón cortadas, y luego se homogenizó con un homogenizador de cuchilla de metal. La homogenización se llevó a cabo 6 veces a una baja velocidad de rotación durante 20 segundos cada vez. Durante la homogenización, el homogenizador fue a menudo refrigerado mediante un baño de agua helada para impedir que la temperatura se incrementara. Los tejidos del pulmón se redujeron a un tamaño de judía sin ser completamente homogenizados en esta etapa inicial.

(2) Método para eliminar el suero de un homogenato primario sin pérdida de los lípidos tensioactivos

40 El homogenato principal preparado de esta manera se guardó durante 1 hora en un baño de agua helada para permitir que el suero exudara fácilmente del tejido homogenizado que tenía una gran área superficial y simultáneamente para permitir que los componentes tensioactivos se agregaran en presencia de iones divalentes (iones de calcio, 3 mM). El homogenato se dejó estar durante 1 hora y luego se centrifugó a 4° C durante 40 minutos bajo una fuerza centrífuga de 4.500 g mediante una centrifugadora que tenía una función de giro de baja aceleración. Una solución que contenía suero y no contenía precipitado y material flotante (el tejido pulmonar de tamaño de grano pequeño que no está completamente homogenizado flota ya que incluye aire en él) fue eliminado después de la centrifugación.

(3) Homogeneización secundaria del tejido pulmonar y precipitación de los lípidos de los tensioactivos

50 Se añadieron 500 ml de una solución de cloruro de sodio 75 mM (la mitad de la concentración de una solución salina) que contenía 5 mM de iones positivos divalentes (iones de calcio) al homogenato de tejido pulmonar primario libre de suero y luego el tejido fue minuciosamente homogenizado con un homogenizador de cuchilla de metal. En este procedimiento, fue empleado una solución hipotónica para obtener fácilmente estructuras multilamelares que funcionan como reservorio de los lípidos de los tensioactivos existentes dentro de las células epidérmicas de tipo II en los alvéolos. La homogeneización se llevó a cabo de 6 a 8 veces a una alta velocidad de rotación de 40 segundos cada una y el homogenizador fue a menudo refrigerado mediante un baño de agua helada para impedir que la temperatura se incrementara durante el procedimiento de homogenización. La muestra homogenizada

secundariamente se mantuvo a 4° C durante 1 hora para evitar que las proteínas de coagulación de la sangre se coagularan y al mismo tiempo, para permitir que la proteína SP-A se agregara con los lípidos tensioactivos en presencia de los iones de calcio. La muestra se centrifugó a 4° C durante 40 minutos usando una fuerza de centrifugación de 4.500 g mediante una centrifugadora que tenía una función de giro de baja aceleración. La muestra formó dos capas distintivas que eran claramente diferentes en colores y texturas después de la centrifugación. Un sobrenadante de la capa precipitada fue separado y sujeto a un procedimiento de extracción con un disolvente orgánico para fraccionar los fosfolípidos disaturados. Una cierta cantidad de los lípidos tensioactivos integrados en la capa inferior de los tubos de centrifuga pudo ser extraída cuando la solución salina que contenía iones de calcio 5 mM se añadió a la capa inferior y se suspendió de nuevo y luego centrifugó de la misma manera como se describió anteriormente. La capa superior reformada del precipitado se recolectó y combinó con la muestra preparada previamente y luego se sometió al procedimiento de extracción con disolventes orgánicos.

#### (4) Método para obtener la fracción de fosfolípidos disaturados

El método de los pasos (3) a (5) descrito en el ejemplo 1 se repitió para obtener una fracción de fosfolípidos disaturados a partir del homogenato del tejido pulmonar.

#### 15 Ejemplo 4: Método para obtener una fracción de fosfolípidos disaturados a partir de un homogenato de tejido pulmonar de ganado vacuno sano

El método descrito en el ejemplo 3 se repitió para obtener la fracción de fosfolípidos disaturados a partir de un lavado bronquial alveolar del ganado, excepto que se utilizó ganado vacuno en lugar de un cerdo.

#### Ejemplo experimental 1: Experimento animal

#### 20 1-1. Inducción de la exudación de las proteínas del suero en el pulmón del animal

Aceite de maíz (comercialmente disponible de Sigma Co.) y una solución salina fueron esterilizados, respectivamente, utilizando una autoclave. Se mezclaron 500  $\mu$ l (microlitros) del aceite de maíz y 1500  $\mu$ l de la solución salina y después se agitaron con un vórtex muy vigorosamente para dar una suspensión homogénea. La suspensión fue administrada por vía intratraqueal a los pulmones de ratas Sprague-Dawley adultas para inducir la exudación de las proteínas del suero en el pulmón. Para estudiar el efecto placebo, sólo la solución salina estéril fue administrada a las ratas de control por vía intratraqueal. Dos semanas después de la aplicación, los grupos de ratas fueron anestesiados mediante un anestésico ketamina (Yuhan Co Ltd., República de Corea) y luego sacrificados inmediatamente mediante eutanasia con gas de dióxido de carbono. Los pulmones se sacaron inmediatamente después de que el animal experimental fuera sacrificado, y el pulmón se lavó con un total de 50 ml de una solución salina (que contenía cloruro de calcio 3 mM) para recoger un lavado bronquial alveolar de cada animal.

#### 1-2. Prueba de un efecto sobre la supresión o reducción de la exudación de proteínas del suero del componente de la composición aplicada

La exudación de las proteínas del suero fue inducida en animales con el mismo método descrito anteriormente, y después las composiciones que contenían la fracción de fosfolípidos disaturados preparada en los ejemplos 1 a 4 fueron administradas por vía intratraqueal 1 semana después del procedimiento de inducción de la exudación de proteínas del suero. El lavado para extracción del pulmón y los alveolos bronquiales de los animales experimentales se llevó a cabo una semana después de que las composiciones fueran administradas por vía intratraqueal.

La composición aplicada a las ratas para suprimir o reducir la exudación de las proteínas del suero en el pulmón fue una concentración de 30 mg/ml de fosfolípidos disaturados, 1,5 mM cloruro de calcio, 7,5 mM citrato (sal de citrato trisódico) y 125 mM cloruro de sodio, y el pH de la solución se ajustó a 6,0. La solución fue vigorosamente agitada

para formar una suspensión homogénea antes de ser administrada a los animales.

#### 1-3 Análisis de la inducción y supresión de la exudación de las proteínas del suero en los animales de prueba

##### (1) Preparación de las muestras de cada animal experimental

Los lavados de los alvéolos bronquiales obtenidos de cada grupo animal experimental se centrifugaron a 4° C durante 30 minutos bajo una fuerza centrífuga de 4.500 g mediante una centrifugadora que tenía una función de giro de baja aceleración. Sólo una capa de tensioactivo, agregado en presencia de iones divalentes (ión calcio) con SP-A, fue recogida del precipitado. Aproximadamente se añadió 3 veces el volumen de una solución salina (que incluía cloruro de calcio 3 mM) al precipitado recogido y el precipitado fue suspendido de nuevo. La suspensión se centrifugó bajo la misma fuerza centrífuga para formar un pellet. El procedimiento de lavado descrito anteriormente se repitió dos veces para limpiar el pellet utilizando la misma solución. Una suspensión del precipitado final fue dividida en tubos de centrifuga miniatura de 1ml, y el volumen del precipitado fue ajustado a 200  $\mu$ l.

5 Se añadió 1ml de Tris tamponado salino 10 mM (pH 7,4, Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM) que contenía EDTA 10mM (ácido etilendiaminoteteraacético) a 200  $\mu$ l del precipitado de tensioactivo descrito anteriormente, y el precipitado fue luego suspendido en la solución. Un detergente iónico de zwitterion CHAPS (Amresco, EEUU) fue agregado a la solución gota a gota con agitación suave hasta que la suspensión fue solubilizada por CHAPS. Para solubilizar la muestra, se empleó una concentración de un 10% (p/v, aproximadamente 162 mM) de la solución madre de CHAPS y la concentración final de CHAPS en la muestra fue de alrededor de 65 mM.

(2) Análisis

10 Se tomaron muestras de 1 ml de cada muestra (2 ml) preparada según el procedimiento descrito anteriormente y se aplicaron a una columna de cromatografía empaquetada con resina de Sephacry S-400 HR (1,5 cm x 20 cm, Amersham Bioscience) para analizar el patrón de elución de las proteínas. La cromatografía de exclusión de tamaño se llevó a cabo usando GradiFrac (Pharmacia). En este momento, la solución tampón usada en la cromatografía como tampón de elución fue una solución tampón de Tris 10 mM (pH 7,4) que incluía EDTA 5 mM, CHAPS 1mM y NaCl 140 mM. Se determinó el nivel de exudación de las proteínas del suero y el nivel de supresión de las proteínas, respectivamente, comparando el tamaño (cantidad) del pico que contenía SP-A alrededor de un peso molecular de 700 kDa con el tamaño del pico que contenía albúmina alrededor de un peso molecular de 70kDa a partir de un gráfico de absorción UV de las proteínas eluidas de la columna (véase la Fig. 2).

1-4. Resultados de los experimentos animales

20 Se calcularon a partir del gráfico de los patrones de elución de las proteínas de las muestras obtenidas del grupo de las ratas probadas en las que la exudación de las proteínas del suero fue inducida, las muestras de las ratas en las que la exudación de las proteínas del suero fue suprimida por la administración de la composición, las muestras obtenidas de las ratas a las que se les administró únicamente una solución salina y las muestras obtenidas de las ratas control no tratadas, las proporciones de los tamaños de pico de proteína alrededor de un peso molecular de 700 kDa y los tamaños de pico de proteína alrededor de un peso molecular de 70 kDa respectivamente. Las proporciones de los dos tamaños de pico (cantidad) obtenidos de los grupos de ratas se enumeran en la siguiente tabla 1.

[Tabla 1]

	Relación del pico de proteína alrededor de 700 kDa/pico de proteína alrededor de 70 kDa
Grupo inducido de exudación de proteínas del suero	0,8
	1,1
	1,4
Composición administrada del ejemplo 1 o 2	2,0
	2,3
Composición administrada del ejemplo 3 o 4	1,9
	1,9
	2,1
	2,3
Grupo control administrado solamente con solución salina	4,4
	5,7
Grupo control (ratas no tratadas)	4,2
	4,3
	4,8



De los resultados obtenidos mostrados en la tabla 1, se descubrió que las composiciones que contenían la fracción de fosfolípidos disaturados como componente principal, extraída del lavado alveolar de los bronquios y del homogenato pulmonar del animal sano, redujeron la exudación de proteínas del suero en las ratas probadas. El tamaño del pico de las proteínas que contenían albúmina como proteína principal se redujo en aproximadamente un 50% cuando la composición fue administrada por vía intratraqueal sólo una vez, en comparación con los resultados de las ratas inducidas para la exudación de proteínas del suero. Dicha cantidad reducida mostrada en la tabla 1 representa el valor calculado simplemente del criterio establecido en la cromatografía de exclusión por tamaño. Sin embargo, la cantidad de reducción real de los exudados es considerablemente mayor que el valor calculado que se muestra en la tabla 1. La razón es que generalmente se obtiene un promedio de 2-3 ml de precipitado (volumen/cabeza) cuando se obtienen las muestras de lavado alveolar bronquial de ratas normales, pero la cantidad de precipitado obtenido de las ratas inducida para la exudación de las proteínas del suero fue de 3 a 5 veces mayor que el de las ratas normales aunque la cantidad del precipitado puede variar ampliamente dependiendo de los sujetos. Sin embargo, las cantidades de los precipitados de las ratas en las que la exudación de proteínas del suero fue suprimida por la composición de la presente invención fueron casi lo mismo o más que, a lo sumo 2 veces, las de los precipitados obtenidos de las ratas de control. Es decir, se demostró que la composición de la invención presente redujo significativamente la cantidad total de los precipitados cuando fueron comparados con los obtenidos de las ratas inducidas para la exudación de las proteínas del suero Sin embargo, estos valores no se muestran aquí cuantitativamente ya que las cantidades de los precipitados obtenidos de las ratas probadas pueden variar enormemente con los factores experimentales tales como la temperatura del experimento, la conformidad de los tejidos pulmonares, la destreza del examinador, etc.. Por lo tanto, las reducciones de las proteínas del suero que se muestran en la figura 2 y tabla 1 no muestran la cantidad total de las proteínas. Sólo muestran las relaciones entre los tamaños de pico que contiene SP-A y los tamaños del pico que contiene albúminas del suero como la proteína principal de la fracción. Como las cantidades totales de las proteínas del suero reducidas por la composición de la invención presente (véase B de la Fig. 2(2)) se miden, se podría encontrar que los niveles reducidos son muy significativos en su efecto.

De los resultados indicados anteriormente, se constató que la composición más ideal de fosfolípidos disaturados para suprimir o reducir la exudación de proteínas del suero fue la que se aisló del lavado alveolar bronquial de animales sanos. Sin embargo, la fracción de fosfolípidos disaturados obtenida del homogenato de tejido pulmonar desangrado también exhibió casi el mismo nivel de supresión de la exudación de las proteínas del suero en los resultados.

Ejemplo experimental 2: prueba de voluntarios con enfermedad de piel atópica

2-1. Aplicación de la composición utilizada en la piel

(1) Composición

La fracción de fosfolípidos disaturados obtenida del método de homogenización de pulmón de cerdo que explota un fenómeno de agregación de los tensioactivos por iones positivos divalentes (iones de calcio) y filtrada a través de un filtro de PVDF (fluoruro de polivinilideno, tamaño de poro 0,2  $\mu\text{m}$ , Millipore), un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{l}$  fue utilizado en la prueba.

La fracción fue liofilizada. Una cierta concentración de los fosfolípidos disaturados secos fue emulsionada en solución isoosmótica salina y luego autoclavada. Una solución madre de cloruro de calcio, una solución madre de citrato (sal de citrato trisódico) y glicerol fueron también autoclavadas, respectivamente. Cada componente esterilizado (solución) fue mezclado en condiciones asépticas hasta una concentración de 15 mg/ml de fosfolípidos disaturados, 1.5 mM de iones de calcio, 7,5 mM de citrato (sal de citrato trisódico) y glicerol al 10% (relación volumen/volumen) a pH 6,0. Se añadió glicerol al 10% de la concentración total para dar viscosidad (o adherencia) a la solución de manera que los fosfolípidos disaturados pudieran extenderse fácilmente sobre la piel con fuerza mecánica durante las aplicaciones en la piel. Los componentes fueron mezclados vigorosamente con agitación con vórtex para formar una suspensión homogénea y después ser usada de aquí en adelante

(2) Aplicación

Se llevó a cabo la aplicación sobre la piel mediante el vertido de una gota (aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ ) de la solución (descrita anteriormente) en cada 2 cm X 2 cm de la zona de piel enferma y después frotando la solución muy suavemente hasta que fue absorbida completamente por la piel. Se recomendó que la solución se aplicara por lo menos 2 veces al día. También se recomendó que no se usaran cosméticos o jabones con fuerte olor, que pueden contener productos químicos que tengan un anillo(s) aromático durante el período de aplicación de la composición.

2-2-1. Resultados del experimento en voluntarios primarios (observación a simple vista)

Los ensayos en voluntarios se llevaron a cabo en 15 sitios de la piel de 8 voluntarios (de 5 a 40 años de edad, promedio de edad 33 años, 4 hombres y 4 mujeres) que sufrían de enfermedad de piel atópica. La aplicación de la

composición de la piel se llevó a cabo durante un período de 2 a 4 semanas período que fue determinado por la severidad y la mejora de las condiciones de la piel. Se constató que, durante el período de la aplicación, los síntomas de las enfermedades de la piel atópica se mejoraron en todos los voluntarios de la prueba hasta la medida de que fue difícil distinguir los límites del área de la piel enferma anterior.

- 5 Se observó que costras en la piel, formadas de los exudados de la piel cuando se secan debido a las enfermedades de la piel atópica, no se forman nuevamente en la superficie de la piel aproximadamente 3 días después de la aplicación de la composición. En el caso de los voluntarios con eritema atópico, los síntomas desaparecieron de forma que el borde de la zona afectada por la enfermedad de la piel atópica no podía ser distinguido 1 semana después de la aplicación de la composición. Se confirmó que las heridas estaban completamente recuperadas 3,5
- 10 semanas (aproximadamente 25 días) después de la aplicación de la composición en el caso de los pacientes con complicaciones de gangrena de la piel (úlceras de la piel) (véase la Fig. 3).

#### 2-2-2. Resultados del experimento sobre voluntarios secundarios (observación a simple vista)

Otra prueba con voluntarios se llevó a cabo con 27 voluntarios (0,8 a 42 años de edad, promedio de la edad de 23,4 años, 13 hombres y 14 mujeres) que sufrían enfermedades de piel atópica.

- 15 La aplicación de la composición sobre la piel se llevó a cabo durante un período de 2 a 5 semanas. Los síntomas de las enfermedades de piel atópica mejoraron en 25 voluntarios excepto 5 voluntarios en la medida en que fue difícil distinguir los límites de la zona de la piel originalmente enferma. Dos pacientes que tenían complicaciones de la enfermedad de piel atópica y síntomas de acné severo en la cara y la espalda, respectivamente, no mostraron una mejora significativa de la condición. Tres voluntarios que tenían una cornificación muy severa de la piel como
- 20 consecuencia del padecimiento de una enfermedad muy larga de piel atópica mostraron una leve mejora de la condición de la piel durante el período de la aplicación. Tres de 25 voluntarios cuyos síntomas mejoraron claramente tuvieron que ser tratados con un ungüento antibacteriano durante la aplicación de la composición porque se observó una infección de la piel y los pacientes no pudieron superar la infección por sí mismos. Las fotografías que muestran los resultados de la mejora de la condición de la piel se muestran en las figuras 4 a 7.

#### 25 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Como se describió anteriormente, la composición que contiene los fosfolípidos disaturados, la invención presente, tiene un efecto significativo en el tratamiento o alivio de los síntomas de enfermedades atópicas, etc. causados por la exudación de las proteínas del suero en la piel y mucosas.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para uso en el tratamiento y alivio de las enfermedades de la piel que muestran exudación de las proteínas del suero seleccionadas del grupo que consiste en dermatitis atópica, eczema atópico, prurito de la piel, eritema atópico o eritroderma, y dermatitis de contacto, que comprende como componentes eficaces fosfolípidos disaturados, iones de calcio y un ácido orgánico que contiene un grupo carboxilo o grupos carboxilo.
2. La composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades según la reivindicación 1, en donde los fosfolípidos disaturado se extraen de animales.
3. La composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades según la reivindicación 1, en donde los fosfolípidos disaturados se extraen de ganado vacuno y porcino.
- 10 4. La composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades según la reivindicación 2 o 3, en donde los fosfolípidos disaturados se extraen del lavado de los alvéolos bronquiales o del homogenato de tejido pulmonar.
- 15 5. La composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en donde los fosfolípidos disaturados tienen la dipalmitoilfosfatidilcolina y/o dipalmitoilfosfatidilinositol como componentes principales.
6. La composición para uso en el tratamiento o alivio de las enfermedades según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende glicerol.
7. La composición para uso en el tratamiento y alivio de las enfermedades según la reivindicación 1, en donde los fosfolípidos disaturados están presentes en una concentración de 1 a 700 mg/ml.

20

FIG. 1

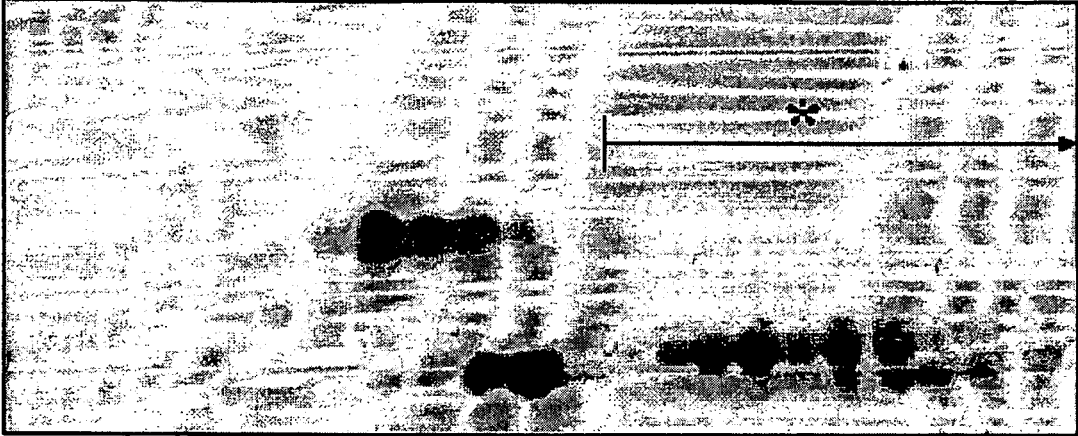


FIG. 2

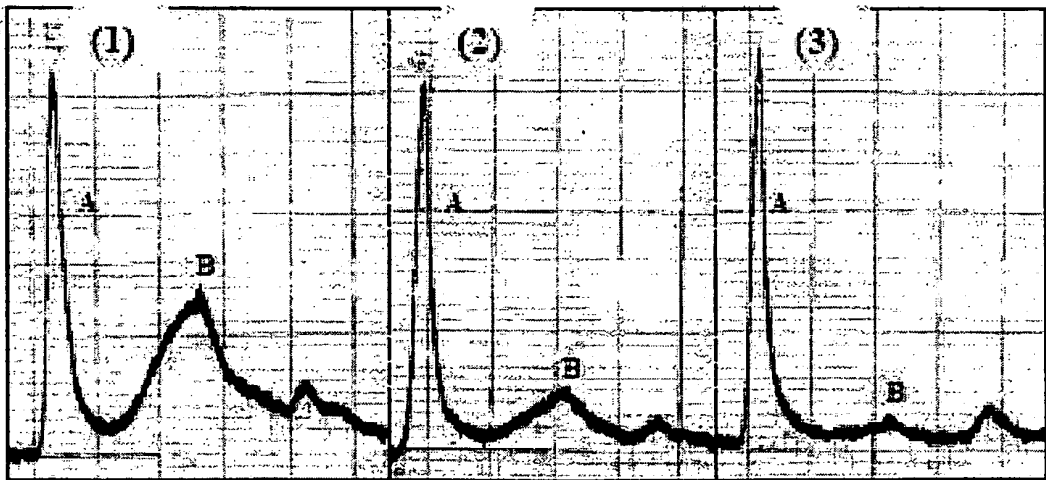


FIG. 3

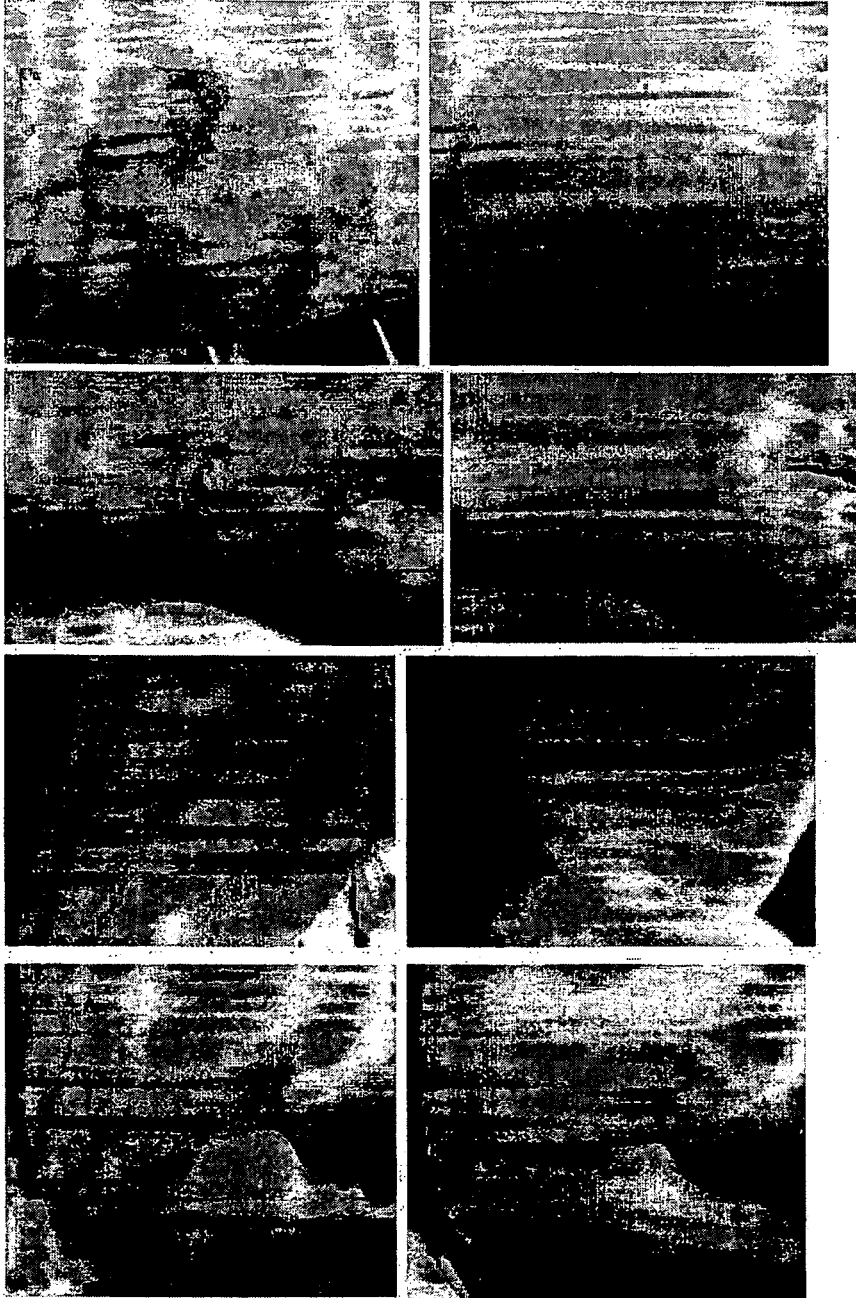
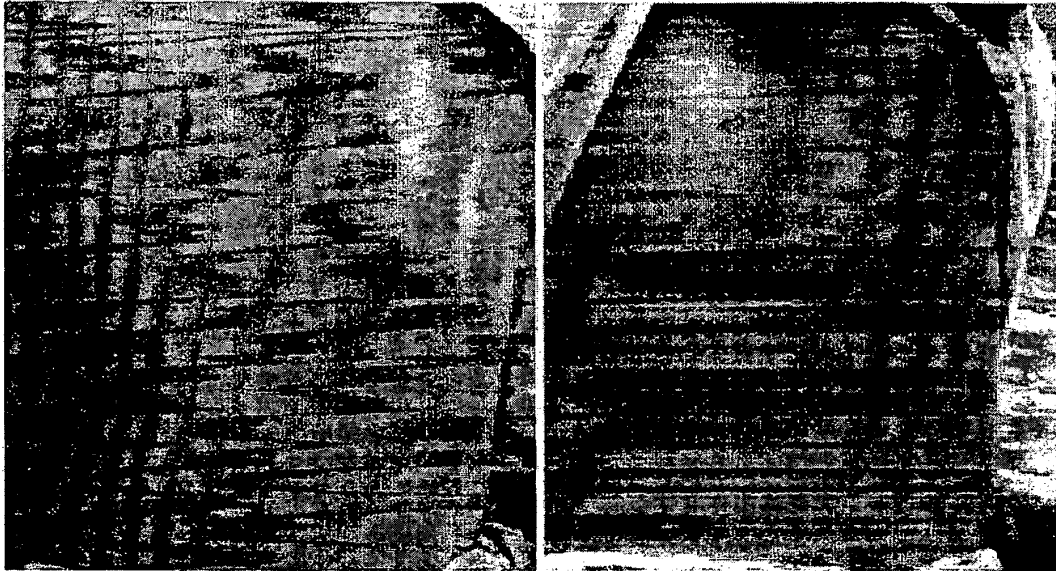


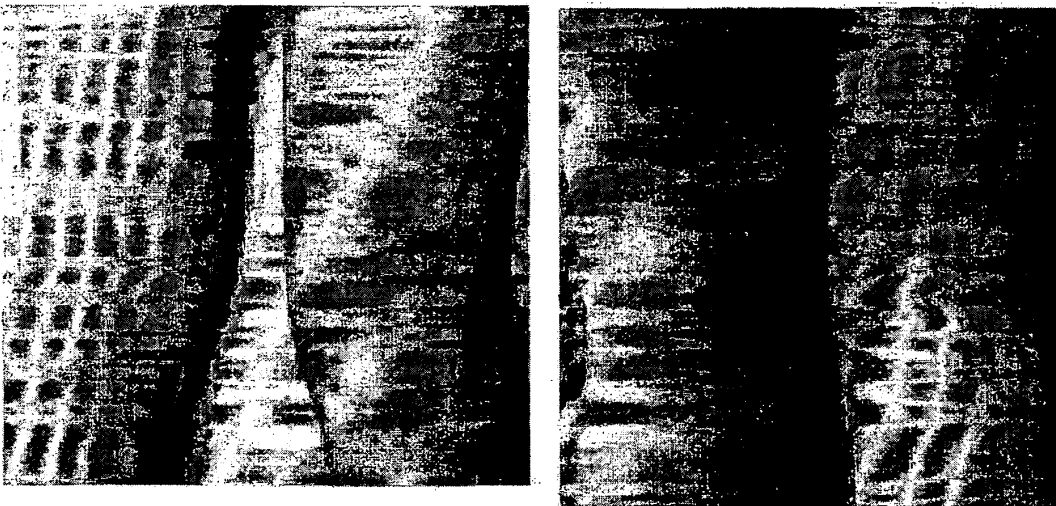
FIG. 4



(Hembra, 6 años de edad)

Antes de / después de 4 semanas

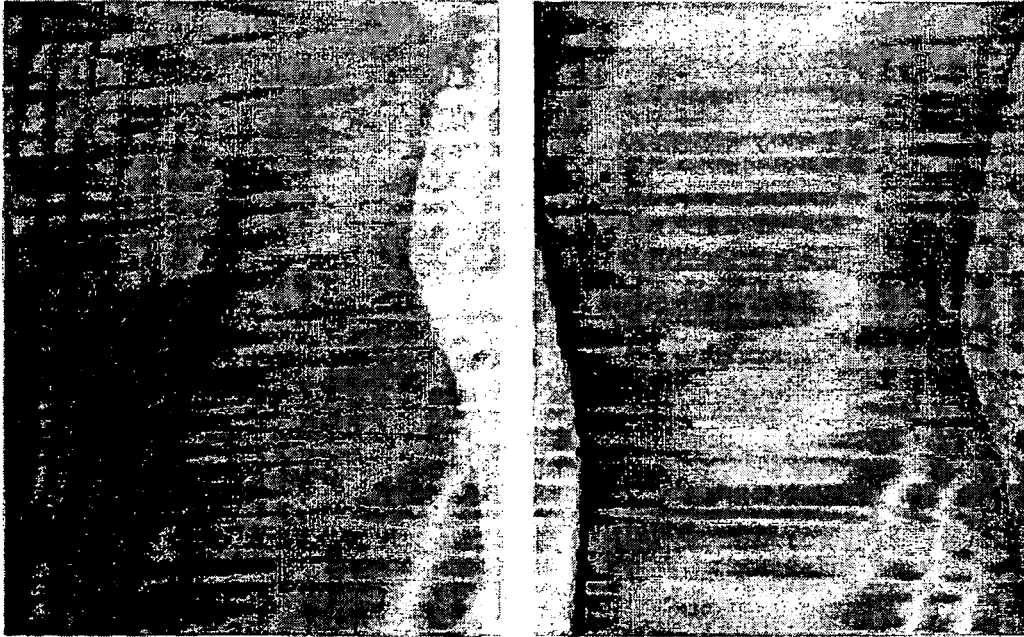
FIG. 5



(Hembra, 6 años de edad)

Antes de / después de 5 semanas

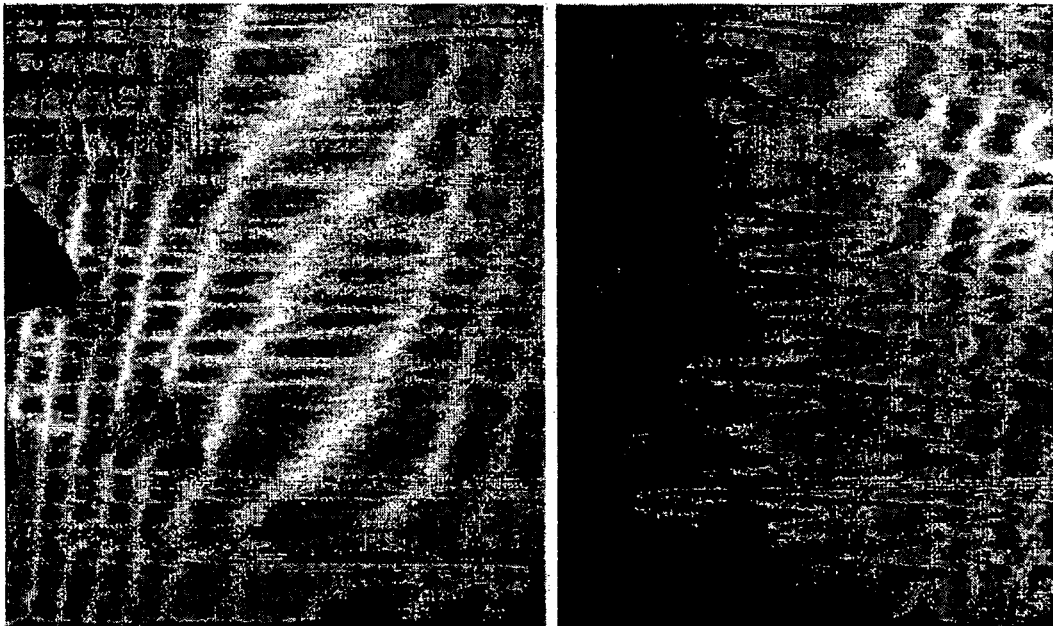
FIG. 6



(Hembra, 16 años de edad)

Antes de / después de 3 semanas

FIG. 7



(Hembra, 0,8 años de edad)

Antes de / después de 3 semanas