

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 006**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006 E 06788533 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1919491**

54 Título: **Procedimiento para tratar o prevenir deterioro, lesión o daño tisular causado por insuficiencia cardiaca congestiva**

30 Prioridad:

26.07.2005 US 702269 P

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

09.07.2013

73 Titular/es:

**REGENERX BIOPHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
15245 Shady Grove Road, Suite 470
Rockville Maryland 20850, US**

72 Inventor/es:

CROCKFORD, DAVID

74 Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

ES 2 412 006 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

Procedimiento para tratar o prevenir deterioro, lesión o daño tisular causado por insuficiencia cardiaca congestiva

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

REFERENCIA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. n ° de serie 60/702,269, presentada el 26 de julio de 2005.

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere al campo del tratamiento o la prevención del deterioro, lesión o daño tisular causado por insuficiencia cardíaca congestiva

10 Descripción de antecedentes de la técnica

[0003] La enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) se manifiesta en un desequilibrio en la función de bombeo del corazón en la cual el corazón no puede mantener la circulación de la sangre de forma adecuada. La manifestación más grave de ICC, el edema pulmonar, se desarrolla cuando este desequilibrio provoca un aumento del fluido pulmonar secundario a pérdida desde capilares pulmonares hacia el intersticio y alvéolos del pulmón.

15 **[0004]** La ICC puede clasificarse en categorías como insuficiencia ventricular antérograda o retrógrada. La insuficiencia retrógrada es secundaria a una presión venosa sistémica elevada, mientras que la insuficiencia ventricular izquierda es secundaria a la reducción del caudal hacia adelante en la aorta y la circulación sistémica. Por otra parte, la insuficiencia cardiaca se puede subdividir en disfunción sistólica y diastólica. La disfunción sistólica se caracteriza por un ventrículo izquierdo dilatado con contractilidad deteriorada, mientras que la disfunción diastólica se produce en un ventrículo izquierdo normal o intacto con deterioro de la capacidad para relajarse y recibir, así como expulsar la sangre.

20 **[0005]** La clasificación funcional de la ICC de la New York Heart Association es una de las más útiles. La clase I describe un paciente con actividad física que no está limitado por los síntomas. La clase II se da cuando la actividad física ordinaria da como resultado fatiga, disnea u otros síntomas. La clase III se caracteriza por una marcada limitación de la actividad física normal. La clase IV está definida por síntomas en reposo o con cualquier actividad física.

25 **[0006]** La ICC se resume mejor como un desequilibrio en las fuerzas de Starling o un desequilibrio en el grado de estiramiento de la fibra de diástole final proporcional al trabajo mecánico sistólico empleado en una contracción subsiguiente. Este desequilibrio puede ser caracterizado como un fallo de funcionamiento entre los mecanismos que mantienen el intersticio y los alvéolos secos y las fuerzas opuestas que son responsables de la transferencia de fluido al intersticio.

30 **[0007]** El mantenimiento de la presión oncótica del plasma (generalmente de aproximadamente 25 mm de Hg) mayor que la presión capilar pulmonar (alrededor de 7 a 12 mm de Hg), el mantenimiento del tejido conjuntivo y las barreras celulares relativamente impermeables a las proteínas plasmáticas, y el mantenimiento de un sistema linfático extenso son los mecanismos que conservan el intersticio y los alvéolos secos.

35 **[0008]** Las fuerzas opuestas responsables de la transferencia de fluido al intersticio incluyen presión capilar pulmonar y la presión oncótica del plasma. En circunstancias normales, cuando se transfiere fluido al intersticio pulmonar con el aumento del flujo linfático, no se produce aumento alguno en el volumen intersticial. Cuando sin embargo se excede la capacidad de drenaje linfático, el líquido se acumula en los espacios intersticiales que rodean los bronquiolos y el sistema vascular pulmonar, originándose así ICC. Cuando el aumento de líquido y presión causa atravesamiento en el espacio intersticial alrededor de los alvéolos y la interrupción de las uniones de membranas alveolares, el fluido inunda los alvéolos que conduce a edema pulmonar.

40 **[0009]** En los EE.UU., más de 3 millones de personas tienen ICC, y más de 400.000 nuevos pacientes se presentan anualmente. La prevalencia de la CHF es del 1 al 2% de la población general.

45 **[0010]** Aproximadamente del 30 al 40% de los pacientes con ICC son hospitalizados cada año. La ICC es

el grupo de diagnóstico principal en pacientes mayores de 65 años hospitalizados. En 1971 se informó que la tasa de mortalidad a los 5 años posteriores al diagnóstico era el 60% en hombres y el 45% en mujeres. En 1991, los datos mostraron la tasa de mortalidad a los 5 años de ICC permanecía esencialmente sin cambios, con una mediana de supervivencia de 3,2 años para hombres y 5,4 años para mujeres. Esto puede ser secundario a un envejecimiento de la población en EE.UU., con disminución de la mortalidad por otras enfermedades.

[0011] La causa más común de muerte por ICC es la insuficiencia cardíaca progresiva, pero la muerte súbita puede representar hasta el 45% de todas las muertes. Después de los datos de auditoría sobre 4.606 pacientes hospitalizados por ICC entre 1992 a 1993, el total de mortalidad hospitalaria fue del 19%, con un 30% de las muertes producidas por causas no cardíacas.

[0012] En la técnica sigue habiendo una necesidad de métodos de tratamiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro tisular, lesión o daño debido a la insuficiencia cardíaca congestiva.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0013] De acuerdo con un aspecto, un método de tratamiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro tisular, lesiones o daños, debidos a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, o para la restauración de tejido afectado negativamente por dicha enfermedad, en un sujeto, comprende administrar, a un sujeto con necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente peptídico incluyendo la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, una variante conservativa de la misma, o un agente estimulante que estimula la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT, o una variante conservativa de la misma, en dicho tejido, así como para inhibir dichos deterioro tisular, lesión o daño debido a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, o restaurar el tejido adversamente afectado por dicha enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0014] La insuficiencia cardíaca congestiva, también llamada insuficiencia cardíaca es un trastorno en el cual el corazón pierde su capacidad para bombear sangre de manera eficiente, y ya no puede mantenerse frente a las exigencias normales que se le plantean. Como consecuencia del estado dañado o debilitado del músculo cardíaco produce que los ventrículos se distiendan (dilatarse), la insuficiencia de bombeo no se mueve sangre de manera eficaz todo el sistema circulatorio. La sangre comienza a retroceder, aumentando la presión en los vasos sanguíneos y forzando líquido desde los vasos a los tejidos corporales. Este estado puede afectar el lado derecho, el lado izquierdo o ambos lados del corazón. Por lo general, la insuficiencia cardíaca comienza a fallar (insuficiencia cardíaca izquierda / insuficiencia cardíaca ventricular izquierda), la presión de retorno de la sangre fuerza al líquido a acumularse en los pulmones (edema pulmonar). Este exceso de líquido en los pulmones hace que sea más difícil para las vías respiratorias expandirse durante la inhalación. La respiración se vuelve más difícil y se produce falta de aire (disnea). Cuando el lado derecho del corazón comienza a fallar (insuficiencia cardíaca derecha), existe una presión de retorno de la sangre tratando de entrar en el corazón haciendo que se acumule líquido en los pies, los tobillos y las pantorrillas. A medida que se agrava la insuficiencia cardíaca, los muslos se hinchan y, finalmente, se acumula líquido en el abdomen (ascitis). El aumento de peso acompaña a la retención de líquidos. La tumefacción hinchada (edema periférico) es un signo de insuficiencia cardíaca derecha, sobre todo si el edema es edema con fovea. Esta acumulación de líquido en los pulmones, las piernas, los pies, los tobillos, el hígado y el abdomen es la parte congestiva de la insuficiencia cardíaca.

[0015] El desarrollo de la ICC es progresivo y es generalmente un estado crónico, a largo plazo, a pesar de que se podría desarrollar repentinamente después de un ataque cardíaco o de una enfermedad inflamatoria del músculo cardíaco, tales como cardiomiopatía dilatada o restrictiva o similares.

[0016] La cardiomiopatía dilatada (congestiva) es la forma más común y se produce debido al agrandamiento y distensión (dilatación cardíaca) de la cavidad del corazón, debilitando el corazón de manera que bombea anormalmente. También se pueden producir ritmos cardíacos anormales (arritmias) y trastornos de la conducción eléctrica del corazón. La causa de la enfermedad es desconocida en muchos casos, pero puede ser causada por un virus, enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y el exceso de consumo de alcohol. Además, la sangre circula más lentamente y de forma turbulenta a través de un corazón agrandado y arrítmico, que conduce a la formación de coágulos de sangre.

[0017] La miocardiopatía restrictiva es el tipo menos frecuente de miocardiopatía y se desarrolla cuando el músculo cardíaco dañado se reemplaza por tejido cicatricial fibroso y tejido graso. El lado derecho del corazón, incluyendo la aurícula puede engrosarse primero y más tarde dilatarse, es decir, se vuelven más delgadas. Ello puede conducir a la actividad eléctrica desordenada y, en algunos casos con la acción de bombeo del corazón. En la mayoría de los ventrículos se vuelven tan rígidos que les resulta difícil llenarse de sangre entre las

contracciones.

[0018] La ICC se vuelve más común con la edad avanzada. Los factores de riesgo incluyen obesidad, diabetes, uso de tabaco, abuso del alcohol, uso de cocaína.

Etiología

5 **[0019]** La causa más común de insuficiencia cardíaca congestiva es la enfermedad arterial coronaria (aterosclerosis), que debilita el corazón, dejando algunas zonas de miocardio crónicamente privadas de sangre rica en oxígeno y nutrientes. En consecuencia, estas áreas del corazón bombean menos vigorosamente. En muchos casos, el flujo de sangre al miocardio es suficiente para mantener vivo el músculo, pero no funcionando bien. En otros casos, se produce un ataque cardíaco cuando el flujo de
10 sangre se encuentra completamente bloqueado en una zona del músculo cardíaco. Regiones de miocardio muertas debilitan la capacidad global de bombeo del corazón.

[0020] Otra causa importante de la ICC es la hipertensión, que resulta en insuficiencia cardíaca ventricular izquierda. Si la presión arterial es alta, el corazón tiene que trabajar más de lo que debería para hacer circular la sangre por todo el cuerpo. Con el tiempo, el músculo del corazón volverse más grueso para
15 compensar el trabajo extra que debe realizar, pero sin ninguna o poca utilidad. En algunos casos, el corazón se agrandará. Eventualmente, el músculo cardíaco puede llegar a ser ya demasiado rígido o demasiado débil para bombear sangre eficazmente.

[0021] Otras causas estructurales o funcionales de la insuficiencia cardíaca son la enfermedad valvular cardíaca (incompetente o estenótica), enfermedad cardíaca congénita, distrofinopatías, miocardiopatía
20 dilatada idiopática (músculo cardíaco con enfermedad/daño/debilidad de origen desconocido), arritmias graves prolongadas, y enfermedades pulmonares (por ejemplo, La hipertensión arterial pulmonar).

ICC Clasificación

[0022] Insuficiencia cardíaca sistólica: La acción de bombeo del ventrículo izquierdo se reduce o se debilita haciendo que pierda su capacidad de contraerse vigorosamente. Una medición clínica común de la función
25 ventricular izquierda es la fracción de eyección. Los pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica tienen una fracción de eyección de menos del 50% (por lo general alrededor de 40% o menos). Una fracción de eyección normal es mayor que 50%.

[0023] Insuficiencia cardíaca diastólica: El ventrículo izquierdo parece contraerse normalmente, pero ha perdido su capacidad para relajarse o de llenar por completo (es decir, es rígido, o menos flexible, cuando se
30 está relajando y llenándose de sangre). Esto impide el llenado con sangre del corazón y produce retroceso dentro de los pulmones. La insuficiencia cardíaca diastólica es más común en personas mayores de 75. En la insuficiencia cardíaca diastólica la fracción de eyección es normal.

[0024] Sin fundarse en una teoría, péptidos específica, péptidos secuestrantes de actina tales como timosina beta 4 (Tβ4 o TB4) y otros agentes que incluyen péptidos secuestrantes de actina o fragmentos
35 de péptidos conteniendo la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o variantes conservadoras de las mismas, promueven la reversión o prevención del deterioro del tejido, lesión o daño debidos a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva.

[0025] La timosina beta 4 fue identificada inicialmente como una proteína que se aumenta durante la migración y diferenciación celular endotelial in vitro. La timosina beta 4 fue originalmente aislada del timo y es un aminoácido 43, 4,9 kDa de polipéptidos obicuos identificados en una variedad de tejidos. Varias
40 funciones se han atribuido a esta proteína incluyendo un papel en la diferenciación de células endoteliales y la migración, diferenciación de células T, secuestro de actina, la vascularización y la curación de heridas.

[0026] De acuerdo con una forma de realización, la invención es un procedimiento de tratamiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro tisular, lesiones o daños debidos a la enfermedad de
45 insuficiencia cardíaca congestiva, o para restaurar tejido afectado adversamente afectado por dicha enfermedad, en un sujeto, que comprende administrar un sujeto con necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que incluye un agente peptídico, que puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o una variante conservativa de la misma que tiene actividad inhibidora de la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, preferiblemente timosina β4, e/o isoformas de Tβ4, análogas o derivadas, incluyendo KLKKTET, LKKTETQ, Tβ4 oxidada, variantes
50 N-terminal de Tβ4, variantes de C-terminal de Tβ4 y similares.

[0027] En realizaciones preferidas, el deterioro tisular, lesiones o daños comprenden al menos uno de los siguientes: un aumento del tamaño o masa del corazón, aumento del tamaño o masa del tejido cardíaco, el

engrosamiento del músculo cardíaco, o el edema pulmonar.

5 **[0028]** Las composiciones que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen agentes peptídicos tales como timosina $\beta 4$ ($T\beta 4$), e/o isoformas de $T\beta 4$, análogas o derivadas, incluyendo $T\beta 4$ oxidada, variantes N-terminales de $T\beta 4$, variantes de C-terminales de $T\beta 4$ y antagonistas de $T\beta 4$, polipéptidos o fragmentos de péptido que comprende o que consisten esencialmente en la secuencia de aminoácido LKKTET o LKKTNT, o variantes conservativas de la misma, que tienen actividad inhibitoria de la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva. La solicitud Internacional N° PCT/US99/17282, incorporada aquí por referencia, describe isoformas de $T\beta 4$ que pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención, así como la secuencia de aminoácidos LKKTET y variantes conservativas de la misma, que puede ser utilizado con la presente invención. Solicitud Internacional N° de Serie PCT/GB99/00833 (WO 99/49883), incorporada aquí por referencia, describe timosina $\beta 4$ oxidada que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Aunque la presente invención se describe principalmente en lo sucesivo en relación a $T\beta 4$ e isoformas de $T\beta 4$, debe entenderse que la siguiente descripción pretende ser igualmente aplicable a la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, péptidos y fragmentos que comprenden o que consisten esencialmente en LKKTET o LKKTNT, variantes conservativas de las mismas que tiene actividad inhibitoria de la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, e/o isoformas de $T\beta 4$, análogas o derivadas, incluyendo $T\beta 4$ oxidada, variantes N-terminal de $T\beta 4$, variantes de C-terminal de $T\beta 4$ y similares.

20 **[0029]** En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro tisular tejido, lesiones o daños debidos a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, o para restaurar tejido afectado adversamente por dicha enfermedad, en un sujeto, poniendo en contacto con el tejido cardiaco, una cantidad eficaz de una composición que contiene un agente peptídico tal como se describe en este documento. La puesta en contacto puede realizarse directa o sistémicamente. Ejemplos de administración directa incluyen, por ejemplo, puesta en contacto con el tejido, mediante la aplicación directa o por inhalación, con una solución, loción, ungüento, gel, crema, pasta, pulverización, suspensión, dispersión, hidrogel, pomada, espuma o aceite que comprende un agente peptídico como se describe en este documento. La administración sistémica incluye, por ejemplo, la intravenosa, la intraperitoneal, inyecciones intramusculares, de una composición que contiene un agente peptídico tal como se describe en este documento, en un vehículo farmacológicamente aceptable, tal como agua de inyectar.

35 **[0030]** Agentes de péptido para utilizar en la invención, tal como se describe en este documento, se pueden administrar en cualquier cantidad eficaz. Por ejemplo, un agente peptídico tal como se describe en este documento se puede administrar en dosis dentro del rango de alrededor de 0,0001 a 1.000.000 de microgramos, más preferiblemente en cantidades dentro del rango de alrededor de 0,1 a 5.000 microgramos, y más preferiblemente dentro del rango de aproximadamente 1 a 30 microgramos.

[0031] Una composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar diariamente, cada dos días, cada dos semanas, cada dos meses, etc., en una sola aplicación o en múltiples aplicaciones por día de administración, tales como 2, 3, 4 aplicaciones o más veces por día de administración.

40 **[0032]** Se han identificado muchas isoformas de $T\beta 4$ con aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 75%, o aproximadamente el 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos de $T\beta 4$ conocida. Tales isoformas incluyen, por ejemplo, $T\beta 4^{ala}$, $T\beta 9$, $T\beta 10$, $T\beta 11$, $T\beta 12$, $T\beta 13$, $T\beta 14$ y $T\beta 15$. Similarmente a $T\beta 4$, las isoformas $T\beta 10$ y $T\beta 15$ se han mostrado secuestrantes de actina. $T\beta 4$, $T\beta 10$ y $T\beta 15$, así como estas otras isoformas comparten una secuencia de aminoácidos, LKKTET o LKKTNT, que parece estar implicada en la mediación de secuestro de actina o unión. Aunque no se desea ligarse teoría particular alguna, la actividad de los agentes de péptidos como se describe en este documento puede ser debido, al menos en parte, a la actividad de modulación de actina o anti-inflamatoria de tales agentes. La $T\beta 4$ modula la polimerización de actina (por ejemplo, las timosinas- β parecen despolimerizar actina-F secuestrando actina-G libre). La capacidad de la $T\beta 4$ para modular la polimerización de la actina puede ser debido a su capacidad para enlazarse o secuestrar actina mediante la secuencia LKKTET o LKKTNT. Por lo tanto, como con la $T\beta 4$, otras proteínas que son anti-inflamatorias y/o se unen o secuestran actina, o modulan la polimerización de actina, incluyendo isoformas de $T\beta 4$ que tienen la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, es probable que sean eficaces, por sí solas o combinadas la $T\beta 4$, como se establece en este documento.

[0033] Agentes de péptido tal como se describe en este documento, tales como la $T\beta 4$ e isoformas de $T\beta 4$, disminuyen la actividad inflamatoria de quimioquinas, citoquinas y de las capas.

55 **[0034]** Por lo tanto, se contempla específicamente que las isoformas de $T\beta 4$ conocidas, tales como $T\beta 4^{ala}$, $T\beta 9$, $T\beta 10$, $T\beta 11$, $T\beta 12$, $T\beta 13$, $T\beta 14$ y $T\beta 15$, así como las isoformas de $T\beta 4$ aún no identificadas, serán útiles en los procedimientos de la invención. Como tales las isoformas de $T\beta 4$ son útiles en los procedimientos de la

invención, incluyendo los procedimientos practicados en un sujeto. Por consiguiente, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden T β 4, así como isoformas de T β 4 T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 y T β 15, y un vehículo farmacológicamente aceptable.

5 **[0035]** Además, otros agentes o proteínas con actividad anti inflamatoria capacidad de enlace y/o
 10 secuentrante de actina, o de que pueden movilizar actina o modular la polimerización de actina, como se ha
 demostrado en un ensayo apropiado sobre secuestrante, enlace, movilización o polimerización, o identificada
 por la presencia de una secuencia de aminoácidos que media en el enlace de actina, tal como por ejemplo.
 LKKTET o LKKTNT, pueden ser empleados igualmente en los métodos de la invención. Tales proteínas
 pueden incluir gelsolina, proteína de enlace a vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, DNasel, villina,
 15 fragmin, severin, proteína capping, β -actinina y acumentina, por ejemplo. Como tales procedimientos incluyen
 los practicados en un sujeto, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden
 gelsolina, proteína de enlace de vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, DnaseI, villina, fragmin,
 severin, proteína capping, β -actinina y acumentina como se describe aquí. Por lo tanto, la invención incluye la
 utilización de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT y variantes
 conservativas de las mismas.

20 **[0036]** Como aquí se utiliza, el término "variante conservativa" o variaciones gramaticales de la misma
 significa la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos
 de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, vallina,
 leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina
 por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares.

25 **[0037]** La T β 4 se ha localizado en numerosos tejidos y tipos de células y, por tanto, los agentes que estimulan
 la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT, tales como T β 4 u otro agente peptídico tal como se describe
 en este documento, puede ser añadido a, o comprender una composición para efectuar la producción de un
 agente péptido a partir un tejido y/o una célula. Tales agentes estimulantes pueden incluir miembros de la
 familia de factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento similar a la insulina (FCI-1), factor de
 crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento
 transformante beta (FCT- β) , factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb), timosina α 1 (Ta1) y factor
 de crecimiento endotelial vascular (FCEV). Más preferiblemente, el agente estimulante factor de crecimiento
 transformante beta (FCT- β) u otros miembros de la super familia de FCT- β .

30 **[0038]** De acuerdo con una forma de realización, los sujetos son tratados con un agente estimulante que
 estimula en dicho sujeto la producción de un agente peptídico tal como se define en este documento.

35 **[0039]** Además, otros agentes que ayudan a la reducción del deterioro tisular tejido, lesiones o daños debidos
 a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, o a restaurar el tejido afectado adversamente por dicha
 enfermedad se puede añadir a una composición junto con un agente peptídico tal como se describe en este
 documento. Por ejemplo, y no de manera limitativa, un agente peptídico tal como se describe en este
 documento solo o en combinación puede añadirse en combinación con uno cualquiera o más de los
 siguientes agentes: antibióticos, FCEV, FCK, FCF, FCDP, FCT β , IGF-1, FCI-2, IL-1, protimosina α y / o
 timosina α 1 en una cantidad eficaz.

40 **[0040]** La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad
 terapéuticamente eficaz, de un agente peptídico tal como se describe en este documento en un vehículo
 farmacológicamente aceptable. Tales vehículos incluyen los que se enumeran en este documento.

45 **[0041]** La dosificación real o reactiva, la formulación o composición que proporciona tratamiento pueden
 depender de muchos factores, incluyendo la talla y la salud de un sujeto. Sin embargo, las personas de
 experiencia ordinaria en la técnica pueden usar las enseñanzas que describen los procedimientos y
 técnicas para determinar las dosificaciones clínicas como se describe en el documento PCT/US99/17282,
 antes mencionado, y las referencias citadas en el mismo, para determinar la dosificación apropiada a usar.

50 **[0042]** Las formulaciones adecuadas pueden incluir un agente peptídico tal como se describe en este
 documento en una concentración comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 50% en peso,
 más preferiblemente comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 0.1% en peso, más
 preferiblemente de aproximadamente 0,05% en peso.

[0043] Los enfoques terapéuticos descritos en este documento implican diferentes vías de administración o
 aportación a un sujeto de un agente peptídico tal como se describe en este documento, incluidas las técnicas
 de administración convencionales (por ejemplo, pero no limitado a, administración directa, inyección local,
 inhalación, o administración sistémica). Los procedimientos y composiciones que utilizan o que contienen un

agente peptídico tal como se describe en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante mezcla con excipientes o vehículos no tóxicos farmacológicamente aceptables.

- 5 **[0044]** La invención incluye la utilización de anticuerpos que interactúan con, mejoran o inhiben, un agente peptídico tal como se describe en este documento. Se proporcionan anticuerpos consistentes esencialmente en anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene fragmentos de la proteína mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica como se describe en el documento PCT/US99/17282, antes mencionado. El término anticuerpo como se utiliza en esta invención, debe entenderse como que incluye anticuerpos monoclonales y policlonales.
- 10 **[0045]** En aún otra realización, la invención proporciona un procedimiento para tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de agente estimulante que modula la expresión génica. El término "modular" se refiere a la inhibición o supresión de la expresión cuando un agente peptídico tal como se describe en este documento se encuentra sobre expresado, y la inducción de la expresión cuando un agente peptídico tal como se describe en este documento está infra expresado. El término "cantidad eficaz" significa la cantidad de agente estimulante que es eficaz para modular la expresión génica de un agente peptídico tal como se describe en este documento, lo que resulta en la reducción de los síntomas de deterioro tisular, lesiones o daños debidos a la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, o la restauración de tejido adversamente afectado por dicha enfermedad. Un agente estimulante que modula la expresión de genes de un agente peptídico tal como se describe en este documento puede ser por ejemplo, un polinucleótido. El polinucleótido puede ser un antisentido, un agente triplex, o una ribozima. Por ejemplo, puede utilizarse un antisentido dirigido a la región del gen estructural o a la región promotora de un agente peptídico tal como se describe en este documento puede ser utilizado. El agente estimulante que modula la expresión de genes de un agente peptídico tal como se describe en este documento también pueden ser Ácidos Ribonucleicos interferente pequeño (ARNip).
- 20 **[0046]** En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para utilización de compuestos que modulan la actividad de un agente peptídico tal como se describe en este documento utilizando. Los compuestos que afectan a la actividad de un agente peptídico como se describe aquí (por ejemplo, antagonistas y agonistas) incluyen péptidos, péptidos miméticos, polipéptidos, compuestos químicos, minerales tales como cinc, y agentes biológicos.
- 30 **[0047]** Un procedimiento para evaluación de un agente estimulante tal como se define en este documento, comprende poner en contacto el tejido cardíaco que presenta la enfermedad de insuficiencia cardíaca congestiva, con un compuesto candidato, y la medición de la actividad de dicho tejido de un péptido LKKTET o LKKTNT, en el que un aumento de la actividad de dicho péptido en dicho tejido, en comparación con un nivel de actividad de dicho péptido en un tejido correspondiente que carece dicho compuesto candidato, indica que dicho compuesto es capaz de inducir dicho agente estimulante.
- 35

Ejemplo 1

[0048] Estudio de la timosina $\beta 4$ en ratón con infarto de miocardio (IM) Modelo de Insuficiencia cardíaca. Objetivo:

- 40 **[0049]** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la timosina $\beta 4$ en un ratón con IM inducido como modelo insuficiencia cardíaca.

Modelos

- 45 **[0050]** Los procedimientos utilizados en este estudio son exactamente iguales a lo reportado en la revista Nature (432: 466 a 472, 2004). Brevemente, ratones C57 negros, con 14 semanas de edad, fueron utilizados en este estudio. Los ratones recibieron timosina $\beta 4$ (Bachem, Lote # FTHYB40501 B) (150 mg/ratón) inmediatamente después de un infarto de miocardio y después cada tres días durante 4 semanas por inyección i.p. Los parámetros de este estudio incluyen la morfología y la función cardíaca mediante ecocardiografía (eco), la medición de la función cardíaca invasiva mediante catéter Millar, tasa de supervivencia, y análisis histoquímico.
- 50 **[0051]** Un ataque cardíaco (infarto de miocardio) puede conducir rápidamente a un paro cardíaco (no hay latidos del corazón) o a daños permanentes en el ventrículo izquierdo. Si los daños son lo suficientemente severo, las regiones del corazón no pueden funcionar correctamente, lo que puede conducir a insuficiencia cardíaca. En la publicación de Nature de 2004 (citada anteriormente), se demostró que la TB4 fue capaz de mejorar la fracción de reducción y la fracción de eyección cuando al modelo de ratón se administra inmediatamente después de un ataque cardíaco. En este caso, el fármaco se administró con precisión y se demostró mejoras funcionales. Aunque las mejoras funcionales son críticas para la supervivencia de los
- 55

pacientes, no se presentaron datos sugiriendo que la TB4 sería capaz de atenuar o mejorar el resultado tras los daños significativos resultantes del ataque cardíaco inducido en el modelo animal. En consecuencia, no era obvio que la TB4 sería capaz de tratar una insuficiencia cardíaca resultante que seguiría en los animales supervivientes.

5 **[0052]** El presente estudio sugiere que la TB4 es eficaz en el tratamiento de mamíferos con insuficiencia cardíaca/ insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). En este caso la TB4 también se administró intensamente. Sin embargo, en la práctica, el fármaco se puede administrar aguda y/o crónica después de un infarto agudo de miocardio (IAM) o de forma crónica en los pacientes con insuficiencia cardíaca progresiva para detener el progreso y el empeoramiento de los síntomas de la CHF.

10 Mejoras hemodinámicas:

Reducciones de la presión ventricular:

15 **[0053]** El tratamiento con TB4 mostró una tendencia a la mejora (es decir, una reducción) de la presión sistólica ventricular izquierda (PSVI) después de daños / lesiones del músculo cardíaco. La hipertensión y/o el aumento de la presión sistólica ventricular es / son causa/s subyacente/s de ciertos tipos de insuficiencia cardíaca congestiva.

[0054] El tratamiento con TB4 redujo significativamente la presión diastólica final ventricular izquierda (PDFVI). La hipertensión y / o la elevación presión diastólica final ventricular es / son causa/s de cierto tipo de insuficiencia cardíaca congestiva.

Reducción del volumen ventricular

20 **[0055]** El tratamiento con TB4 atenuó significativamente el volumen sistólico ventricular izquierdo final, que es elevado en pacientes con ICC. Debido a que el volumen sistólico final es una medida de la adecuación de vaciado cardíaco relacionada con la función sistólica, se la asocia a pacientes de CHF con insuficiencia cardíaca sistólica.

25 **[0056]** El tratamiento con TB4 atenuó significativamente volumen diastólico final ventricular izquierdo. En el corazón enfermo, el caudal cardíaco cae si volumen diastólico final ventricular se eleva a niveles altos como es el caso en la insuficiencia cardíaca. Aumentos de volumen diastólico ventricular izquierdo se asocian a pacientes con ICC con insuficiencia cardíaca diastólica.

30 **[0057]** El tratamiento con TB4 mejoró significativamente la tasa de cambio (velocidad) del aumento de presión respecto del tiempo (dP/dt) en el ventrículo izquierdo, una medida sustitutiva de la contractilidad ventricular. Debido a que sólo hay un período finito de tiempo disponible para una expulsión, una reducida tasa de velocidad de aumento de presión (es decir, un tiempo más largo para la contracción) da como resultado que menos sangre sea expulsada por latido. Esto se evidencia en pacientes con ICC con insuficiencia cardíaca sistólica.

35 **[0058]** El tratamiento con TB4 mostró una tendencia a afectar (mejorar) la tasa de cambio (velocidad) en la relajación ventricular izquierda. Cuanto más negativa es la dP/dt más rápidamente es capaz de relajarse el corazón. Pacientes con ICC con insuficiencia cardíaca diastólica tienen corazones que son menos flexibles al relajarse y llenarse de sangre. Esto impide el llenado de sangre de los ventrículos y produce retroceso a los pulmones.

Peso órganos

40 **[0059]** El tratamiento con TB4 atenuó significativamente el edema pulmonar siguiente a daños / lesiones del músculo cardíaco. El edema pulmonar es una consecuencia grave que se presenta en pacientes con ICC, como resultado de la insuficiencia cardíaca izquierda.

[0060] El tratamiento con TB4 atenuó significativamente el engrosamiento del músculo del ventrículo izquierdo que afecta negativamente a la acción de bombeo del corazón.

45 **[0061]** En este estudio, fueron evaluados el peso de los órganos (corazón y pulmón) en grupos de animales tratados con TB4, tratados con vehículo y sin tratar (tratamiento placebo). Estos datos mostraron que la TB4 atenuó tanto engrosamiento del músculo cardíaco debido a estrés/lesión y edema pulmonar (acumulación de líquido en el pulmón debido a la insuficiencia cardíaca del lado izquierdo), lo que indica sólidamente que la TB4 puede ser eficaz en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Como la ICC (también llamada insuficiencia cardíaca) es casi siempre una enfermedad
50 crónica, de larga duración, el tratamiento crónico con TB4 puede retardar o detener la progresión de un

estado de empeoramiento.

Ejemplo 2

[0062] Se ha estudiado la utilización de timosina beta 4 durante el desarrollo de la cardiomiopatía distrófica. Utilizamos un modelo de ratón (Mdx) con déficit de distrofina acaecido de manera natural y seguimos la función cardíaca longitudinalmente con ecocardiografía no invasiva. La timosina beta 4 puede tener efectos beneficiosos sobre la ralentización de la progresión de la miocardiopatía a través de sus propiedades de estabilización de la membrana y anti-fibrosis. En miocardiopatías distróficas, los esfuerzos cortantes son mal tolerados debido a la falta de distrofina y sus conexiones a la matriz extracelular. Estos esfuerzos conducen a la rotura de las membranas de las células musculares que conducen a muerte celular y fibrosis. Se ha demostrado que la timosina beta 4 tiene propiedades estabilizadoras de membrana, probablemente relacionadas con efectos sobre la polimerización de actina. También seguimos los parámetros funcionales de la función de músculo esquelético, que también pueden beneficiarse de la administración de la timosina beta 4. Los datos preliminares se presentan en la tabla 1. La timosina beta 4 también tiene propiedades anti-fibróticas. El músculo cardíaco lesionado debido a esfuerzos de corte y afluencia de calcio puede beneficiarse de la modulación de la remodelación muscular de la timosina beta 4. Menos fibrosis mantiene la función cardíaca durante un periodo de tiempo mayor.

[0063] Parámetros de ensayo y diseño experimental:

[0064] Cuatro grupos de ratones fueron tratados con timosina beta 4. El grupo 1 eran ratones normales (BL10) que recibieron placebo (sin tratar). El grupo 2 eran ratones normales que fueron tratados con timosina beta 4. El grupo 3 eran ratones con déficit de distrofina (Mdx) tratados con placebo y el grupo 4 eran ratones Mdx tratados con timosina beta 4. Los ratones fueron tratados con 150 microgramos de timosina beta 4 en 300 microlitros de tampón administrado intraperitonealmente dos veces por semana y los ratones tratados con placebo se les dio 300 microlitros de tampón solo. Los ratones ejercitaron sobre una cinta de correr a una velocidad de 12 metros / minuto durante 30 minutos dos veces a la semana. Datos funcionales, conductuales y ecocardiográficos se obtuvieron al inicio del estudio y después de 2 meses, 4 meses y 6 meses de tratamiento.

[0065] Los datos funcionales fueron mediciones no invasivas de la función del músculo esquelético. Se evaluó la fuerza muscular de las extremidades anteriores y miembros posteriores utilizando un medidor de la fuerza de agarre. A los animales se les deja agarrarse a la plataforma medidora y luego se tiraron de ellos poco a poco hasta que pierden su agarre. Se registró la cuantía de la fuerza necesaria para liberar el agarre. Se tomaron múltiples mediciones para cada ratón en cada instante. El mismo protocolo se siguió para la fuerza muscular de los miembros posteriores. Otra evaluación funcional fue la prueba de Rotarod. Aquí, los ratones fueron colocados en una barra giratoria, manteniendo su equilibrio y posición cuando las barra gira con velocidad aumentando progresivamente (10 rpm durante 1 minuto y luego aumentada en 0,2 rpm durante los próximos tres minutos). Se midió el tiempo hasta que el ratón cae. Esta prueba también se repitió varias veces.

[0066] Los datos del comportamiento fueron recogidos a través del sistema de supervisión de actividad de animales VersaMax™. Los ratones fueron colocados en una caja de seguimiento y la actividad se cuantificó mediante diferentes sensores. Los datos incluyen actividad horizontal, actividad vertical y la distancia total recorrida, midiéndose muchos otros parámetros de actividad. Se realizaron múltiples mediciones durante un período de 3 días.

[0067] Evaluación ecocardiográfica se realizó con el sistema de alta frecuencia VisualSonics Vevo 660™. La estimación ecocardiográfica se llevo a cabo el sistema de alta frecuencia de VisualsSonics Vevo 660™. Se completaron estimaciones del tamaño de la cámara cardíaca, de la función ventricular y de las velocidades Doppler de entrada / salida bajo anestesia con isoflurano. El cardiólogo que realizó y midió los ecocardiogramas tuvo ocultos los grupos de estudio.

[0068] Tabla 1: Parámetros funcionales medidos en ratones normales (BL10) y ratones deficitarios en distrofina (Mdx) al inicio del estudio y después de dos meses de tratamiento con timosina beta 4.

TABLA 1

Grupo	BL10 sin tratar	BL10 sin tratar	BL10 tratado	BL10 tratado	Mdx sin tratar	Mdx sin tratar	Mdx tratado	Mdx tratado	
Tiempo	Inicio	2 meses	Inicio	2 meses	Inicio	2 meses	Inicio	2 meses	
5	Media máx fuerza ext. anteriores (KLGf/kg)	5.57	6.10	5.57	5.73	4.46	4.07	4.46	3.78
	Media máx fuerza ext. posteriores (KGF/kg)	7.35	9.01	7.35	9.18	6.29	7.54	6.29	7.29
10	Media actividad horizontal	1761	1302	1761	1287	1071	875	1071	961
	Media activ. Vertical	28	15.6	28	13.1	12	9.0	12	8.2
15	Media distancia total (cm)	375	252	375	239	209	162	209	167
	Media tiempo movi. (s)	41	28.4	41	27	25	19.2	25	18.9
	Rotorod	214	170	214	191	211	172	211	147

20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Composición para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca, o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto, comprendiendo dicha composición un agente peptídico que incluye una secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o una variante conservativa de la misma.
- 2.** Utilización de una composición que comprende un agente peptídico incluyendo la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o una variante conservativa de la misma, para preparar un medicamento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro de los tejidos cardíacos, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca, o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto.
- 10 **3.** Composición según la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o la utilización de la reivindicación 2, en la que dicho deterioro del tejido, lesión o daño comprende al menos uno de entre: aumento del tamaño o de la masa cardíaca, aumento del tamaño o de la masa de tejido cardíaco, el engrosamiento del músculo cardíaco, o un edema pulmonar.
- 15 **4.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicho agente peptídico es timosina beta 4 (T β 4).
- 20 **5.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicho agente peptídico comprende la secuencia de aminoácidos KLKKTET, la secuencia de aminoácidos LKKTETQ, una variante N-terminal de T β 4, una variante C-terminal de T β 4, o una isoforma de T β 4.
- 25 **6.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicho agente peptídico se encuentra destinado a administrarse a dicho sujeto en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 1 a 30 microgramos.
- 30 **7.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicho agente se encuentra destinado a administrarse directamente a dicho tejido o administrarse a dicho sujeto en forma intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, por inhalación transdérmica u oral.
- 35 **8.** Composición según la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o la utilización de la reivindicación 3 en la que dicha composición se encuentra destinada a una administración sistémica.
- 40 **9.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicha composición se encuentra destinada a administración directa.
- 45 **10.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido cardíaco afectado negativamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicha composición se encuentra en forma de solución, gel, crema, pasta, loción, pulverización, suspensión, dispersión, ungüento, hidrogel, pomada, espuma o aceite.
- 50 **11.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido afectado menos adversamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 3 en la que dicho agente peptídico es un péptido recombinante o sintético.

- 5 **12.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido afectado menos adversamente en dicho sujeto o utilización de la reivindicación 2, en la que dicho agente peptídico se encuentra destinado a administración aguda o crónica o una combinación de las mismas.
- 10 **13.** Composición de acuerdo con la reivindicación 1 para utilizar en un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir el deterioro del tejido cardíaco, lesiones o daños en un sujeto con insuficiencia cardíaca o para restaurar tejido afectado menos adversamente en dicho sujeto o la utilización de la reivindicación 2, en la que la administración de dicho agente peptídico tiene como resultado al menos uno de los siguientes:
- 15 reducción de la presión sistólica ventricular izquierda (PSVI) de un corazón; reducción en la presión ventricular izquierda diastólica final (PDFVI) de un corazón; atenuación del volumen sistólico ventricular final izquierdo de un corazón; atenuación del volumen ventricular diastólico final izquierdo de un corazón; aumento de la tasa de cambio (velocidad) del aumento de presión ventricular izquierda con el tiempo (dP/dt) de un corazón, aumento de la tasa de cambio (velocidad) de la disminución de presión ventricular izquierda con el tiempo (pDP/dt) de un corazón, atenuación de edema pulmonar siguiente a una lesión/daño del músculo cardíaco, o a una reducción de espesor muscular de un ventrículo izquierdo del corazón.
- 20 **14.** Procedimiento in vitro para evaluación de un agente estimulante que estimula la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT o una variante conservativa del mismo, que comprende poner en contacto un tejido cardíaco que presenta insuficiencia cardíaca, con un compuesto candidato, y medir la actividad en dicho tejido de un péptido LKKTET o LKKTNT, en el que un aumento de la actividad de dicho péptido en dicho tejido, en comparación con un nivel de actividad de dicho péptido en un tejido correspondiente exento de dicho compuesto candidato, indica que dicho compuesto es capaz de inducir dicho agente estimulante.
- 25 **15.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en el que dicho péptido LKKTET es timosina beta 4.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5 **Documentos de patente citado en la descripción**

- US 70226905 P [0001]
- GB 9900833 W [0028]
- US 9917282 W [0028] [0041] [0044]
- WO 9949883 A [0028]

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- *Nature*, 2004, vol. 432, 466-472 [0050]
- *Nature*, 2004 [0051]