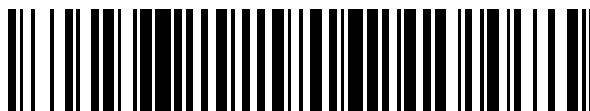


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 173**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 3/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 05766584 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1768691**

54 Título: **Composiciones que contienen aecurina y procedimientos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**21.06.2004 US 872795**

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

**09.09.2013**

73 Titular/es:

**QUINCY BIOSCIENCE, LLC (100.0%)  
455 SCIENCE DRIVE SUITE 120  
MADISON WI 53711, US**

72 Inventor/es:

**UNDERWOOD, MARK Y.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 422 173 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 que contienen aecurina y procedimientos de uso de las mismas

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere, en general, a composiciones útiles para el mantenimiento de la homeostasis del calcio. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen aecurina útiles en la prevención y/o el alivio de enfermedades o síntomas asociados con un desequilibrio de calcio, tales como un daño isquémico a las neuronas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 El calcio es el quinto elemento más abundante en el organismo humano y está presente principalmente en los huesos. Más del 99 % del calcio del organismo se almacena en el esqueleto, que intercambia constantemente sus existencias con el 1 % restante disuelto en los fluidos corporales y en los tejidos blandos, tales como la sangre. El control de este intercambio está dirigido en gran medida por el sistema endocrino que detecta la concentración de calcio ionizado en el plasma y dirige el intercambio de calcio para mantener este equilibrio crítico. Solamente una pequeña fracción del 1 % de calcio de los fluidos intersticiales y los tejidos blandos está ionizado y es soluble; el

15 resto se encuentra unido a proteínas, en particular a proteínas de unión a calcio (PUCa). Se sabe que estas PUCa actúan en el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Debido a que el organismo requiere concentraciones específicas de iones calcio con el fin de llevar a cabo procesos fisiológicos necesarios, el mantenimiento de la homeostasis de calcio tiene, por lo tanto, una importancia crítica en la salud corporal. La comunidad médica entiende que las concentraciones apropiadas de calcio iónico en plasma y fluidos corporales son críticas en la realización de

20 funciones corporales, incluidas, pero sin limitación, la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, la permeabilidad de membranas, la división celular, la secreción hormonal y la mineralización ósea. Una alteración de la homeostasis del calcio, es decir, un desequilibrio de calcio, está asociada a muchas enfermedades, síndromes y afecciones, incluidas, pero sin limitación, cáncer, cardiopatías y enfermedades neurodegenerativas.

25 En el pasado, los antagonistas de los canales de calcio, que bloquean el flujo de calcio entre el interior de la célula y el líquido intersticial, se han prescrito ampliamente como agentes farmacéuticos útiles en la prevención de trastornos relacionados con el calcio, incluidos hipertensión, angina, asma, migrañas y deterioro neuronal. Por ejemplo, se ha observado que la nimidopina mejora la sintomatología clínica y las funciones cognitivas en demencia mediante el alivio de un desequilibrio de calcio causante de deterioro neuronal. No obstante, muchos de estos antagonistas de los canales de calcio tienen efectos secundarios no deseados que incluyen, pero sin limitación, malestar general,

30 retención de líquidos, acidez, ritmo cardíaco errático, mareos, malestar estomacal y, en casos raros, desmayos, fiebre y sangrado excesivo.

Por lo tanto, existe la necesidad de productos terapéuticos nuevos y alternativos que alivien o prevengan el desequilibrio de calcio. En particular, se desean composiciones farmacéuticas o nutracéuticas que tengan efectos secundarios reducidos en comparación con agentes anteriores y, si se descubrieran, satisfarían una necesidad

35 antigua en las comunidades médica y de la salud nutricional.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona aecurina para su uso como medicamento. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que son ventajosas en el alivio y/o la prevención de síntomas o trastornos asociados con el desequilibrio de calcio. Dichas composiciones incluyen aecurina en combinación con vehículos

40 aceptables para su administración a un sujeto por una diversidad de vías. En consecuencia, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de aecurina en combinación con un vehículo aceptable.

En otra realización, la invención también proporciona procedimientos para tratar un síntoma o trastornos asociados con el desequilibrio de calcio mediante la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento una

45 cantidad terapéuticamente eficaz de aecurina.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes tras el estudio de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

**BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 representa una micrografía de fluorescencia que representa la absorción de aecurina por las neuronas del hipocampo.

50

Las figura 2 muestra videomicrografías que ilustran que la aecuroina es neuroprotectora cuando se administra antes de una isquemia.

La figura 3 ilustra un gráfico de barras del número medio de neuronas que contienen azul de tripano (muertas) después de una isquemia.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### I. EN GENERAL

5 Debe indicarse que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, los términos y expresiones "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse de forma intercambiable en el presente documento. También debe indicarse que las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pueden usarse de forma intercambiable.

10 A menos de que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen los mismos significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención algunos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos, ahora se describirán los procedimientos y materiales preferentes.

### II. LA INVENCION

15 La aecurina es una fotoproteína aislada originariamente de medusas luminiscentes y de otros organismos marinos. El complejo de aecurina comprende una proteína de apoaecurina de 22.000 dalton, oxígeno molecular y el luminóforo coelenterazina. Cuando se unen tres iones de  $Ca^{2+}$  a este complejo, la coelenterazina se oxida dando coeleteramida, con una liberación concomitante de dióxido de carbono y luz azul. La aecurina no la exportan ni la segregan las células, ni está compartimentalizada o secuestrada dentro de las células. En consecuencia, se han usado mediciones de aecurina para detectar los cambios de  $Ca^{2+}$  que tienen lugar en periodos relativamente largos. 20 En diversos sistemas experimentales, la luminiscencia de aecurina era detectable muchas horas a días después de la carga celular. Además, se sabe que la aecurina tampoco altera las funciones celulares o el desarrollo embrionario.

25 Debido a su luminiscencia dependiente de  $Ca^{2+}$ , el complejo de aecurina se ha usado ampliamente como indicador del  $Ca^{2+}$  intracelular. La aecurina de *Aequorea victoria* se ha usado específicamente para: (1) analizar la respuesta de secreción de células cromafines suprarrenales individuales a agonistas colinérgicos nicotínicos; (2) aclarar el papel de la liberación de  $Ca^{2+}$  en el daño al músculo cardiaco; (3) demostrar la liberación masiva de  $Ca^{2+}$  durante la fertilización; (4) estudiar la regulación de la expresión de la bomba de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico en mioblastos de pollo en desarrollo y (5) calibrar micropipetas con volúmenes de inyección tan reducidos como 3 picolitros.

30 La purificación convencional de aecurina de la medusa *Aequorea victoria* requiere procedimientos de extracción laboriosos y, algunas veces, proporciona preparaciones que son sustancialmente heterogéneas o que son tóxicas para que los organismos en estudio. Dos toneladas de medusas proporcionan típicamente ~125 mg de la fotoproteína purificada. Por el contrario, la aecurina recombinante se produce preferentemente mediante la purificación de apoaecurina procedente de *Escherichia coli* manipulada genéticamente, seguida por la 35 reconstitución del complejo de aecurina *in vitro* con coelenterazina pura. Este procedimiento de preparación proporciona un complejo de aecurina puro, no tóxico, totalmente cargado, que es adecuado para su uso en la presente invención. Está disponible una preparación comercial ejemplar de aecurina útil en la presente invención de Molecular Probes, Inc., con la denominación comercial AQUALITE. La aecurina de la presente invención se ha descrito, por lo tanto, y puede obtenerse comercialmente mediante esquemas de purificación y/o síntesis conocidos 40 por los expertos en la técnica.

45 La función de la aecurina se distingue mediante varias características: la aecurina no es tóxica y no interfiere con la estequiometría celular interna. (Miller y col., *Methods Cell Biol.* 40:305-338 (1994)); la proteína no es tóxica cuando se introduce en células extrañas (Bliks, *J. Environ Health Persp* 83:75-8 1 (1990)). Se sabe que cada molécula de aecurina se une a hasta tres iones calcio (Inouye y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:3154-3158 (1985)).

50 La presente invención se refiere a la administración de composiciones que contienen aecurina a un sujeto con el fin de corregir o mantener el equilibrio de calcio en dicho sujeto. Se entiende que el mantenimiento de las concentraciones de calcio iónico en plasma y líquidos corporales es crítica para una amplia diversidad de funciones corporales, incluidas, pero sin limitación, excitabilidad neuronal, contracción muscular, permeabilidad de membranas, división celular, secreción hormonal y mineralización ósea. Se entiende que la alteración de la homeostasis de calcio, es decir, un desequilibrio de calcio, causa y/o se correlaciona con muchas enfermedades, síndromes y afecciones. El estudio de las PUCa ha llevado a su reconocimiento como factores protectores que actúan en el mantenimiento de los niveles de calcio iónico apropiados.

55 En determinadas realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden la administración de aecurina como único ingrediente activo para el tratamiento del desequilibrio de calcio, para retrasar la progresión del desequilibrio de calcio, para prevenir la aparición de desequilibrio de calcio y para prevenir y/o tratar la recurrencia del desequilibrio de calcio. En otras realizaciones, la invención proporciona procedimientos que comprenden administrar aecurina en combinación con uno o más agentes adicionales que tienen valor terapéutico

conocido.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que trata" incluye el tratamiento preventivo y también el tratamiento de remisión del trastorno. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "que reducen", "que alivian", "que suprimen" y "que inhiben" tienen su significado comúnmente entendido de disminuir o reducir. Tal como se usa en el presente documento, el término "progresión" significa aumentar el alcance o gravedad, avanzar, crecer o empeorar. Tal como se usa en el presente documento, el término "recurrencia" significa el retorno de una enfermedad después de una remisión.

Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar" se refiere a poner en contacto un paciente, tejido, órgano o célula con aecourina. Tal como se usa en el presente documento, la administración puede realizarse *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, o *in vivo*, es decir, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, seres humanos. En realizaciones preferentes, la presente invención abarca administrar las moléculas útiles de la presente invención a un paciente o sujeto. Un "paciente" o "sujeto", usados de forma equivalente en el presente documento, se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, que: (1) tiene un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio que puede remediarse o tratarse mediante la administración de aecourina; o (2) es susceptible a un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio que puede prevenirse mediante la administración de aecourina.

Tal como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente eficaces de aecourina junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y coadyuvantes adecuados, colectivamente "vehículos farmacéuticamente aceptables" Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente activo suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica deseada sin excesivos efectos secundarios tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica. La "cantidad eficaz" especifica variará, obviamente, en función de factores tales como la afección particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de animal que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) y las formulaciones específicas usadas y la estructura de los compuestos o sus derivados. En este caso, una cantidad será considerada terapéuticamente eficaz si tiene uno o varias de las consecuencias siguientes: (a) la prevención de un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio y (b) la reversión o estabilización de un trastorno relacionado con el desequilibrio de calcio. Las cantidades eficaces óptimas puede determinarlas fácilmente un experto en la técnica usando experimentos rutinarios.

Las composiciones farmacéuticas son líquidas o formulaciones liofilizadas o secadas de otro modo e incluyen diluyentes de diversos contenidos de tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la adsorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerina, polietilenglicerina), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias sustancias voluminizadoras o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, marmitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína, acomplejamiento con iones metálicos o incorporación del material a o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc, o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas milamelares o multimelares, eritrocitos fantasmas o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o mantenida incluyen formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

La invención también abarca procedimientos de administración de composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones incorporan recubrimientos protectores de formas particuladas, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluidas la vía parenteral, pulmonar, nasal y oral. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracanceral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal o intratumoral.

Además, tal como se usa en el presente documento, los "vehículos farmacéuticamente aceptables" son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfatos 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,9 %. Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidas soluciones salinas y medios tamponados.

Los vehículos para administración parenteral incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites fijos y de Ringer con lactato. Los vehículos para la administración intravenosa incluyen reabastecedores de fluidos y de nutrientes y reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes aglutinantes, gases inertes y similares.

Las composiciones de liberación controlada o mantenida que pueden administrarse según la invención incluyen formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). La invención también comprende composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado a ligandos de receptores específicos de tejido.

5

Otras realizaciones de las composiciones administradas según la invención incorporan formas particuladas, recubrimientos protectores, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluidas las vías parenteral, pulmonar, nasal, oftálmica y oral.

Se sabe que los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina muestran semividas sustancialmente más largas en sangre después de una inyección intravenosa que los compuestos correspondientes no modificados. Dichas modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, mejorar la estabilidad física y química del compuesto y reducir ampliamente la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como consecuencia, puede lograrse la actividad biológica deseada in vivo mediante la administración de dichos aductos de polímero-compuesto de forma menos frecuente o en dosis más reducidas que con el compuesto no modificado.

10

15

En otro procedimiento más según la invención, puede suministrarse una composición farmacéutica en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, puede usarse una bomba. En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos. En otra realización más, puede disponerse un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, la próstata, necesitando de este modo solo una fracción de la dosis sistémica.

20

La preparación farmacéutica puede comprender aecurina sola, o puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y puede estar en forma sólida o líquida, tal como comprimidos, polvos, cápsulas, pellas, soluciones, suspensiones, elixires, jarabes, bebidas, emulsiones, geles, cremas, formulaciones oftálmicas o supositorios, incluidos supositorios rectales y uretrales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales celulósicos y mezclas de los mismos. La preparación farmacéutica que contiene aecurina puede administrarse a un paciente mediante, por ejemplo, el implante subcutáneo de una pella. En otra realización, una pella proporciona la liberación controlada de aecurina durante un periodo de tiempo. La preparación también puede administrarse mediante inyección por vía intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida, la administración por vía oral de un líquido o preparación sólida o mediante aplicación tópica. La administración también puede realizarse mediante el uso de un supositorio de uso rectal o un supositorio de uso uretral.

25

30

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden administrar según la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos de disolución, mezclado, granulación o formación de comprimidos. Para la administración por vía oral, la aecurina o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes y se convierten mediante procedimientos habituales en formas adecuadas para la administración tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas. Los ejemplos de vehículos inertes adecuados son bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz, gelatina, con agentes disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o con lubricantes tales como ácido esteárico o estearato de magnesio.

35

40

Los ejemplos de vehículos o disolventes oleosos adecuados son aceites vegetales tales como aceite de girasol o aceite de hígado de pescado. Las preparaciones pueden realizarse como gránulos, tanto secos como húmedos. Para la administración por vía parenteral (inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular), los compuestos antiandrógenos o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos o similares se convierten en una solución, suspensión o expulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este fin, por ejemplo, solubilizantes u otras sustancias auxiliares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con y sin la adición de un tensioactivo y otros coadyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los aceites ilustrativos son los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, vehículos líquidos preferentes son agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicoles, en particular para soluciones inyectables.

45

50

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo es bien conocida en la técnica. Dichas composiciones pueden prepararse como aerosol suministrado al conducto nasofaríngeo o como productos inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; no obstante, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El ingrediente activo se mezcla frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución

55

60

salina, dextrosa, glicerina, etanol o similares o cualquier combinación de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades secundarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH que potencian la eficacia del ingrediente activo.

5 Un componente activo puede formularse en la composición como formas salinas farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos, que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también pueden estar derivadas de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y de base orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

10 Para la administración por vía tópica a superficies corporales usando, por ejemplo, cremas, geles, gotas y similares, la aecuorina o sus derivados fisiológicamente tolerados se preparan y se aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.

15 En otro procedimiento según la invención, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science, 249:1527-1533, 1990; Treat y col., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (ediciones), Liss, Nueva York, páginas 3 53-365 (1989)).

20 Para su uso en medicina, las sales de aecuorina pueden ser sales farmacéuticamente aceptables. No obstante, pueden ser útiles otras sales en la preparación de los compuestos según la invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen sales de adición de ácidos que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una solución de aecuorina con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico.

25 Además, las composiciones que contienen aecuorina descritas en el presente documento pueden proporcionarse en forma de composiciones nutracéuticas en las que la aecuorina previene la aparición de, o reduce o estabiliza, diversos trastornos relacionados con el desequilibrio de calcio perjudiciales. El término "nutracéutico" o la expresión "composición nutracéutica", para los fines de la presente memoria descriptiva, se refiere a un artículo alimenticio o a una parte de un artículo alimenticio que ofrece beneficios de salud médicos, incluidos prevención y/o tratamiento de enfermedades. Una composición nutracéutica según la presente invención puede contener solo aecuorina según la presente invención como ingrediente activo o, alternativamente, puede comprenderla, además, en mezcla con suplementos dietéticos que incluyen vitaminas, coenzimas, minerales, hierbas, aminoácidos y similares que complementan la dieta aumentando la absorción total de esa sustancia.

30 Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para proporcionar beneficios nutracéuticos a un paciente que comprenden la etapa de administrar al paciente una composición nutracéutica que contiene aecuorina. Dichas composiciones incluyen generalmente un "vehículo nutracéuticamente aceptable" que, tal como se denomina en el presente documento, es cualquier vehículo adecuado para la administración por vía oral, incluidos los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente adecuados para la vía oral. En determinadas realizaciones, las composiciones nutracéuticas según la invención comprenden suplementos dietéticos que, definidos sobre una base funcional, incluyen agentes de refuerzo inmunitario, agentes antiinflamatorios, agentes antioxidantes, agentes antivíricos o mezclas de los mismos.

45 Los agentes de refuerzo inmunológico y/o antivíricos son útiles para acelerar la cicatrización de heridas y mejorar la función inmunitaria; e incluyen extractos de las equináceas, o hierbas del género *Echinacea*, extractos de hierbas de los géneros *Sambuca* y extractos de sello de oro. Las hierbas del género *Astragalus* también son refuerzos inmunológicos eficaces en sus formas natural o procesada. El astrágalo estimula el desarrollo en células madre en las células inmunológicamente activas del tejido medular o linfático. El cinc y sus sales bioactivas, tales como gluconato de cinc y acetato de cinc también actúan como refuerzos inmunológicos en el tratamiento del resfriado común.

50 Los antioxidantes incluyen el aminoácido natural que contiene azufre alicina, que actúa aumentando el nivel de enzimas antioxidantes en la sangre. Las hierbas o extractos de hierbas, tales como el ajo, que contiene alicina, también son antioxidantes eficaces. Las catequinas, y los extractos de hierbas tales como té verde que contienen catequinas, también son antioxidantes eficaces. Los extractos del género *Astragalus* también muestran actividad antioxidante. Los bioflavonoides, tal como la quercetina, la herperidina, la rutina y mezclas de los mismos, también son eficaces como antioxidantes. El principal papel beneficioso de los bioflavonoides puede ser la protección de la vitamina C de la oxidación en el organismo. Esto hace que haya más vitamina C, o ácido ascórbico, disponible para su uso por el organismo.

55 Los bioflavonoides tales como la quercetina también son agentes antiinflamatorios eficaces y pueden usarse como tales con las composiciones de la invención. Los suplementos de hierbas antiinflamatorios y los compuestos antiinflamatorios derivados de plantas y hierbas también pueden usarse como agentes antiinflamatorios en la

composición de la invención. Estos incluyen bromolaina, una enzima proteolítica encontrada en la piña; téis y extractos de ortiga; cúrcuma, extracto de cúrcuma o curcumina, un pigmento amarillo aislado de la cúrcuma.

Otro suplemento que puede usarse en la presente invención es jengibre, derivado de hierbas del género *Zingiber*. Este se ha observado que posee actividad cardiotónica debido a compuestos tales como gingerol y el compuesto relacionado shogaol, y también proporciona beneficios en el tratamiento de mareos y trastornos vestibulares. El jengibre también es eficaz en el tratamiento de náuseas y otros trastornos estomacales.

Los suplementos que ayudan en la reconstrucción de estructuras de tejido blando, en particular la reconstrucción de cartílagos, son útiles en composiciones para tratar el dolor de artritis y otros trastornos de articulaciones. La glucosamina, el sulfato de glucosamina, la condroitina y el sulfato de condroitina son particularmente útiles para este fin. La condroitina puede derivarse a partir de una diversidad de fuentes, tales como terciopelo de asta de alce. También se sabe que los complejos lipídicos marinos, complejos de ácidos grasos-omega 3 y aceites de pescado son útiles en el tratamiento de dolor asociado con artritis.

Los suplementos útiles en el tratamiento de cefáleas migrañosas incluyen matricaria y *Gingko biloba*. El ingrediente activo principal de la matricaria es la sesquiterpeno lactona partenólida, que inhibe la secreción de prostaglandinas que, a su vez, causan dolor mediante su actividad vasoespástica en los vasos sanguíneos. La matricaria también muestra propiedades antiinflamatorias. El aceite de pescado, debido a sus acciones estabilizantes de plaquetas y antivasoespásticas, también puede ser útil en el tratamiento de cefáleas migrañosas. La hierba *Gingko biloba* también ayuda en el tratamiento de migrañas estabilizando arterias y mejorando la circulación sanguínea.

Aunque algunos de los suplementos enumerados anteriormente se han descrito por sus efectos farmacológicos, también pueden usarse otros suplementos en la presente invención y sus efectos están bien documentados en la literatura científica.

### III. EJEMPLOS

*Ejemplo 1. La aecurina es absorbida por neuronas del hipocampo.* En una serie de estudios preliminares, se inyectó bilateralmente aecurina directamente en el hipocampo de 3 ratas adultas diferentes. Las ratas se llevaron de nuevo a sus jaulas durante al menos 24 h, después de lo cual se anestesiaron y se retiraron sus cerebros, se seccionaron y se tiñeron para determinar la aecurina usando un anticuerpo antiaecurina monoclonal. El anticuerpo primario se visualizó después usando un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 594. La figura 1 muestra un ejemplo de neuronas de hipocampo marcadas con aecurina usando microscopía de fluorescencia convencional. El panel izquierdo es una fotomicrografía del hipocampo que muestra la localización de la punta de la cánula en la región CA1. Los rectángulos blancos indican la localización de las dos neuronas piramidales CA3 marcadas con aecurina mostradas en el panel derecho. Los datos ilustran que la infusión directa de aecurina en el hipocampo (panel izquierdo) tiene como consecuencia el marcado de neuronas piramidales en CA1 y CA3. La aecurina (al 6 % p/v) se disolvió en aCSF exento de calcio en presencia de DMSO al 3 %. La solución se inyectó lentamente (velocidad: ~ 1 µl/min) directamente al hipocampo usando una bomba de jeringa (volumen: ~ 1 µl por lado). Después de completar la inyección, la cánula de suministro se mantuvo en el sitio durante aproximadamente 1 min antes de su retirada. Un ejemplo de dos neuronas piramidales CA3 que contienen aecurina se muestra en el panel derecho (objetivo: 40X). Los datos demuestran claramente el suministro de aecurina directamente al cerebro y también que la aecurina se expande a través del hipocampo y después es absorbida por neuronas en CA1, CA3 y el giro dentado.

*Ejemplo 2. Efectos de aecurina sobre isquemia seguida de muerte celular.*

Se llevó a cabo un experimento para investigar el beneficio de la proteína de unión a calcio aecurina sobre la isquemia. La aecurina (al 4 %) se disolvió en líquido cerebroespinal exento de calcio con DMSO (dimetilsulfóxido) al 6 %. De dos a tres horas después, una rata se anestesió con isoflurano y se sacrificó por decapitación. Se prepararon cuatrocientas rodajas de cerebro de un micrómetro de espesor usando un Vibratome controlado por temperatura. Las rodajas se dispusieron inmediatamente en líquido cerebroespinal artificial oxigenado (95 % de O<sub>2</sub>/5 % de CO<sub>2</sub>) (aCSF) de la composición siguiente (en mM): NaCl 124, KCl 2,8, MgSO<sub>4</sub> 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, ascorbato de calcio 0,4, D-glucosa 10, pH 7,4, ~30 °C). Después de 1 hora de recuperación, las rodajas se sometieron a un episodio isquémico de 5 min. La isquemia se indujo reemplazando la glucosa por fructosa y reemplazando el oxígeno por nitrógeno. Después del reto isquémico de 5 min, las rodajas se llevaron de nuevo a aCSF oxigenado normal que contenía azul de tripano al 0,04 % y se incubaron en el azul de tripano-aCSF durante 30 min. El procedimiento de exclusión del azul de tripano (las células sanas excluyen azul de tripano, mientras que las células muertas o que se están muriendo absorben el azul de tripano y, por lo tanto, tienen una apariencia azul) se usa comúnmente para evaluar la muerte celular en cultivos celulares o rodajas de cerebro. Después de la incubación en azul de tripano, las secciones se retiraron y se dispusieron en medio de fijación durante la noche y después se incubaron durante 3 horas en sacarosa al 30 %. Las rodajas de 400 µm de espesor se seccionaron después a un espesor de ~ 40 µm usando un criostato, montado en rodajas recubiertas con gelatina y con cubreobjetos. Con referencia a la figura 2, es evidente que hay más neuronas teñidas de azul de tripano (muertas) en el control (panel superior) con respecto a las neuronas a las que se inyectó aecurina (panel inferior). La figura 3 muestra un gráfico de barras del número medio de neuronas que contienen azul de tripano (muertas) después de la isquemia. Este

experimento demuestra que la inyección de aecurina directamente en el hipocampo confiere neuroprotección contra un ataque isquémico.



**REIVINDICACIONES**

1. Aecurina para su uso como medicamento.
2. Una composición que comprende una cantidad eficaz de aecurina en combinación con un vehículo aceptable para uso como medicamento.
- 5 3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de aecurina en combinación con un vehículo aceptable.

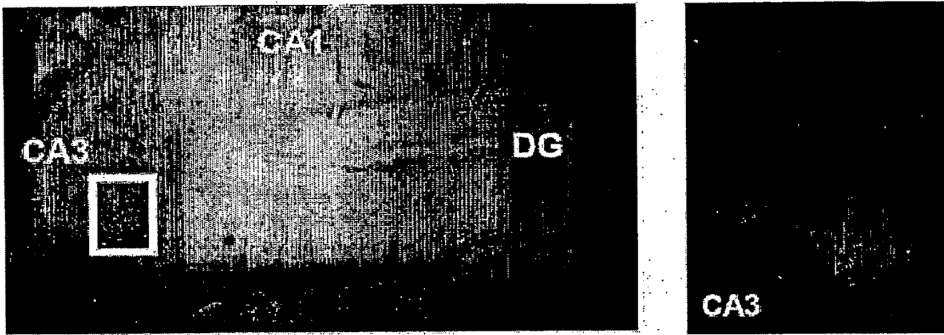


Fig. 1

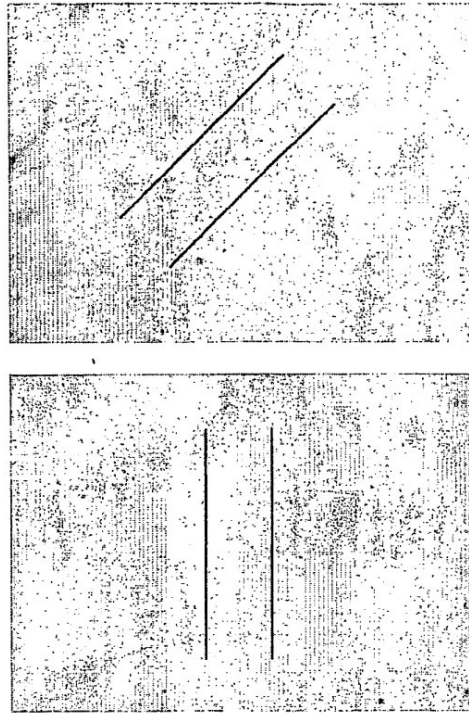


Fig. 2

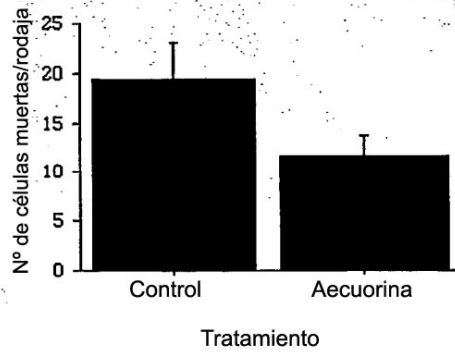


Fig. 3