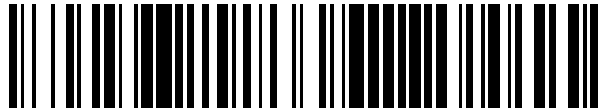


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 737**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07748080 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2037950**

54 Título: **Usos médicos adicionales de la proteína antisecretora**

30 Prioridad:

**27.04.2006 SE 0600933**  
**30.03.2007 US 920826 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.07.2014**

73 Titular/es:

**LANTMÄNNEN AS-FAKTOR AB (100.0%)**  
**BOX 30192**  
**10425 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

**HANSSON, HANS-ARNE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 472 737 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

Usos médicos adicionales de la proteína antisecretora

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al uso de proteínas antisecretoras, sus homólogos y/o fragmentos, que presenten una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de las mismas, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de una afección asociada a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en las membranas celulares, tal como se define en la reivindicación 10. La composición farmacéutica se usa en la presente memoria para monitorizar y/o afectar de forma beneficiosa a la estructura, a la distribución y a múltiples funciones de las balsas lipídicas, receptores y/o caveolas de las membranas. Los ejemplos de dichos efectos beneficiosos pueden contrarrestar la función anormal, tal como una hipo- o hiper-función, para restaurar y/o normalizar las balsas lipídicas, receptores y/o caveolas estructural y funcionalmente, para mejorar la supervivencia y/o el rescate en enfermedades, lesiones, procesos de reparación y otras disfunciones. Adicionalmente, también se describe el uso de dicha composición farmacéutica para monitorizar el transporte intracelular y la liberación de productos celulares, así como para normalizar la distribución de los constituyentes tisulares.

**Antecedentes de la invención**

20 Las balsas lipídicas son microdominios dinámicos y heterogéneos que forman regiones especializadas en las membranas celulares, y que están enriquecidos en colesterol y glicolípidos, de forma más evidente esfingolípidos tales como GMi (Ross y Pawlina, 2006; Pollard y Earnshaw, 2002). Una definición suya *in vitro* es la fracción insoluble que queda tras extraer con el detergente Triton X-100, usado diluido y en frío. Dicha fracción de membrana resistente al detergente es recuperada como una banda de baja densidad aislada mediante gradientes de flotación. La prevalencia de las balsas lipídicas se reduce mediante agotamiento o desorganización de colesterol en las membranas celulares. Las balsas lipídicas guardan una estrecha relación y están conectadas con el citoesqueleto, y están implicadas en la polarización celular. Constituyen microdominios especializados, prevalentes en membranas de células y tejidos en todas las edades, p.ej., en embriones, fetos, así como en individuos jóvenes, adultos y mayores.

30 Proteínas de importancia clave en la cohesión y la transducción de señal están enriquecidas en balsas lipídicas, tal como los receptores, las proteínas de unión celular, los transportadores iónicos y los complejos de canal iónico, que incluyen, p.ej., acuaporinas, así como receptores de quimioquina, receptores de neurotransmisores, receptores hormonales y receptores de factor de crecimiento. Estas proteínas y complejos proteínicos están interactuando con los sistemas de proteína G intracelular, que transfieren el mensaje recibido por, p.ej., los receptores al citoplasma y al núcleo de la célula (Dermine et al., 2001; Ross y Pawlina, 2006; Pollard y Earnshaw, 2002; Helms y Zurzolo, 2004; Chini y Parenti, 2004; Head et al., 2006; Mahmutefendic et al., 2007). Se ha demostrado que la distribución y las concentraciones del ion clave en la monitorización de la actividad celular,  $Ca^{2+}$ , están íntimamente relacionadas con las balsas lipídicas y las caveolas. Otras proteínas adicionales, como las conexinas, CD38, CD19, Thy-1 y CD59, están ancladas a las balsas lipídicas, normalmente a través de proteínas y receptores anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI), lo que les permite interactuar con las funciones celulares. Los esfingolípidos, como se ilustra por el gangliósido GMi, la diana de la toxina del cólera, están enriquecidos y caracterizan a las balsas lipídicas. Adicionalmente, los receptores de neurotransmisor y otros constituyentes de las sinapsis y los procesos neuronales, así como receptores de factor de crecimiento, se encuentran dentro del amplio rango de proteínas prevalentes en las balsas lipídicas, p.ej., en células altamente especializadas como las neuronas. Los canales y los transportadores de ion calcio, de importancia clave en la regulación de las funciones y las interacciones celulares, se encuentran confinados en un grado elevado a las balsas lipídicas (A Spät, 2007). Esto se puede ilustrar mediante la observación de que la disrupción de las balsas lipídicas dificulta o incluso previene la capacidad de la célula para propagarse viajando a través de ondas de  $Ca^{2+}$  en las células. Además, las ráfagas de ion calcio influyen significativamente en funciones clave de las células normales y de células alteradas patológicamente, p.ej. la división celular, la supervivencia celular y la muerte celular.

50 Además, se considera que las balsas lipídicas desempeñan un papel fundamental en el tráfico intracelular de proteínas, y la dinámica de receptor y lípidos. Los mensajes y las acciones de todas estas proteínas receptoras y transportadoras se transmiten al interior de las células a través de sistemas de proteínas G unidas, a través de sistemas enzimáticos o con la ayuda del citoesqueleto (Triantafilou y Triantafilou, 2004). Se sabe que el estado físico de las balsas lipídicas, p.ej., es conducente a concentrar y constreñir la movilidad de proteínas múltiples para facilitar el montaje dinámico de complejos de señalización competentes.

55 Lo que es más, se considera que las balsas lipídicas tienen la capacidad de regular la activación, la señalización y la disposición del citoesqueleto, lo que las hace críticamente importantes para los mecanismos que gobiernan la locomoción celular, que incluye la migración direccional, así como para mantener la forma y tamaño de las células y el transporte asociado. Además, el citoesqueleto es de importancia clave para el tráfico intracelular de los constituyentes celulares y como sensor de la carga dinámica y estática sobre las células.

Las balsas lipídicas son, por tanto, estructuras dinámicas, normalmente con un diámetro del orden de 5 – 50 nm, con un rango considerable de variación. Existen multitud de estrategias para demostrar la presencia de balsas lipídicas, p.ej., mediante demostración inmunohistoquímica e inmunoquímica de GMi que tiene una afinidad muy elevada por la toxina del cólera. Otro modo de demostrar su presencia y posición es aislar membranas celulares tras haber roto las células y después aislar una fracción resistente a detergente a una temperatura definida, tal como se describe en los libros de texto de biología celular disponibles habitualmente. La flotilina, la cavolina y la reggie pueden usarse para identificar inmunohistoquímicamente balsas lipídicas. De esas proteínas, la flotilina puede asociarse además a gotículas de lípidos. La microscopía de fuerza atómica y otras estrategias relacionadas se añaden a las técnicas que permiten la visualización de balsas lipídicas. La exposición de células a ciclodextrina y sus variantes, que provoca un agotamiento de colesterol en las membranas, constituye un modo alternativo de demostrar la prevalencia de las balsas lipídicas.

Las caveolas constituyen un tipo especializado de balsas lipídicas, que son estructuras dinámicas que se caracterizan por el enriquecimiento focal en membranas de colesterol y esfingolípidos, que transducen señales entre el entorno y el interior de las células, así como que conectan al citoesqueleto. Al contrario que otras balsas lipídicas, las caveolas son más grandes y normalmente aparecen como grietas o invaginaciones con forma de matraz en las membranas celulares y como vesículas (Kurzhalia y Parton, 1999). Su tamaño normalmente está en el orden de 0,1 µm, pero con variaciones considerables. Las caveolas son prevalentes, p.ej., en células musculares cardíacas y lisas, células endoteliales, macrófagos y adipocitos, es decir, virtualmente en todas las células de mamífero, aunque con una frecuencia altamente variable.

Se ha descrito que las balsas lipídicas y las caveolas albergan e influyen en el sistema de generación de NO (monóxido de nitrógeno). Además de las señales de transporte desde y hacia una célula, las caveolas están implicadas en el tráfico de fluidos y de varios compuestos desde y hacia una célula, la endocitosis y la regulación, el tráfico, el eflujo y el mantenimiento de ácidos grasos y colesterol en células y su entorno (Pohl et al., 2004; Rajendran et al., 2007). Los constituyentes de caveolas y las balsas lipídicas están implicadas adicionalmente en el procesamiento de proteína precursora amiloide β (βAPP) y amiloide β (Aβ), proteínas relacionadas preferentemente a enfermedades de Alzheimer pero también a otros trastornos neurodegenerativos y neurotrauma (Graham y Lantos, 2002).

Se sabe que las células tumorales presentan balsas lipídicas, así como caveolas. Por tanto, p.ej., es posible dificultar el crecimiento y la migración de células tumorales destruyendo, o desintegrando hasta un grado variable, estas estructuras (Márquez, D C et al., 2006; Freeman et al., 2007).

La importancia de las balsas lipídicas y las caveolas ha sido elucidada adicionalmente con animales modificados genéticamente. Ratonos bloqueados deficientes en caveolina desarrollan cardiomiopatía dilatada e hipertensión pulmonar (Mathew et al., 2004). Además, las balsas lipídicas y las caveolas están relacionadas con los sistemas transportadores estimulados por insulina, tal como los sistemas de transporte de hormona esteroide.

Se concluye que las balsas lipídicas y las caveolas, que constituyen estructuras altamente dinámicas, relacionadas íntimamente pero en algunos casos también divergentes, son prevalentes en células de mamífero y ejercen una multitud de funciones importantes. Las estrategias disponibles actualmente permiten la ruptura o el agotamiento de balsas lipídicas y caveolas, pero no existe ningún modo conocido para restaurar y/o normalizar la estructura, distribución, frecuencia y/o función de balsas lipídicas y de proteínas de señalización y de transferencia de masa, organizadas en la balsa lipídica.

La proteína antisecretora es una proteína de 41 kDa que fue descrita originalmente para proporcionar protección contra enfermedades diarreicas e inflamación intestinal (para una revisión, véase Lange y Lönnroth, 2001). La proteína antisecretora se ha secuenciado y su ADNc ha sido clonado. La actividad equivalente parece ser ejercida principalmente por un péptido localizado entre las posiciones 35 y 50 de la secuencia de la proteína antisecretora. Investigaciones inmunohistoquímicas e inmunohistoquímicas han revelado que la proteína antisecretora está presente y también puede ser sintetizada por la mayoría de los tejidos y órganos de un organismo. Se han caracterizado péptidos sintéticos, que comprenden la secuencia antidiarreica (WO 97/08202; WO 05/030246). Previamente se ha descrito que los factores antisecretorios normalizan el transporte de fluidos patológico y/o las reacciones inflamatorias, tal como en el intestino y el *plexus choroideus plexus* del sistema nervioso central tras exposición a la toxina del cólera (WO 97/08202). Por tanto, se sugirió el uso de factores antisecretorios naturales en comida y piensos como útil para el tratamiento de edema, diarrea, deshidratación e inflamación en WO 97/08202. El documento WO 98/21978 describe el uso de productos que tienen actividad enzimática para la producción de un alimento que induce la formación de proteínas antisecretoras. El documento WO 00/038535 describe además los productos alimenticios enriquecidos en proteínas antisecretoras como tales.

También se ha demostrado que la proteína antisecretora y sus fragmentos mejoran la reparación de tejido nervioso, y la proliferación, apoptosis, diferenciación y/o migración de células madre y células progenitoras, y de células derivadas de las mismas, en el tratamiento de afecciones asociadas a la pérdida y/o ganancia de células (WO 05/030246).

Los factores antiseoretos (AF), especialmente proteínas y péptidos, tal como se describen en detalle en el documento WO 97/08202, son efectivos para eliminar afecciones y enfermedades hipersecretoras en el intestino, tales como la diarrea. Otros ejemplos relacionados con los efectos de los AF en relación a las afecciones hipersecretoras son, p.ej., las enfermedades inflamatorias del intestino, el edema cerebral, el glaucoma, la presión intracraneal elevada, Morbus Menière y la mastitis. Los AF también han sido considerados para el tratamiento del glaucoma (WO 97/08202).

Recientemente se ha reconocido que la estructura, prevalencia, distribución y función de las balsas lipídicas, que han sido alteradas debido a una función celular anormal, una carga excesiva o anormal, infección, o por un compuesto tóxico o un fármaco pueden monitorizarse e incluso normalizarse con la ayuda de determinadas proteínas específicas y compuestos relacionados.

De forma realmente sorprendente, los inventores han sido capaces ahora de probar que la proteína Factor Antisecretor (AF) y los péptidos derivados de la misma, p.ej. AF-16 y AF-8, pueden afectar a la estructura, la prevalencia, la distribución y/o la función de las balsas lipídicas, los receptores y/o las caveolas, que han sido alteradas debido a una función celular anormal, una carga excesiva o anormal, infección, o por un compuesto tóxico y/o un fármaco en células, tejidos y/u órganos, de un modo tal que por primera vez es posible monitorizar, controlar y/o incluso normalizar las funciones confinadas en o relacionadas con las balsas lipídicas y las caveolas.

### **Resumen de la presente invención**

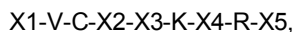
La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o un fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en membranas celulares, tal como anormal, insuficiente, hipo- y/o hiperfunción, como se reivindica en la reivindicación 10.

La invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o un fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de varias afecciones asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas, donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en disfunción vascular, disfunción cardiovascular, disfunción pulmonar, hiperplasia y/o hipertrofia de células y tejidos, disfunción cardiovascular, cardiomiopatía e hipertensión pulmonar, formación reactiva de tejido excesivo y diabetes mellitus, tal como diabetes de tipo I y/o II.

Además, también se describe el uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de varias afecciones asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas, donde dicha composición farmacéutica afectará de forma beneficiosa, p.ej., la transferencia de constituyentes a través de las barreras celulares, reparación de tejidos y órganos, formación reactiva de tejido excesivo y/o reparación y regeneración de cobertura celular epitelial.

También se describe el uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad funcional equivalente, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de varias afecciones asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas, siendo seleccionadas del grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos y neurotrauma.

En una realización preferida, dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia según la siguiente fórmula:



donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R ó K, X3 es S ó L, X4 es T ó A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43,51, 43-80 ó 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.

Adicionalmente, cuando una afección médica asociada a la disfunción en balsas lipídicas, los receptores y/o caveolas, es tratada y/o prevenida, tal como se ha mencionado anteriormente, se administra a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un derivado, homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma.

También se describen varias dosis y rutas de administración adecuadas para el propósito pretendido del tratamiento, así como la edad, género, condición, etc., del paciente.

Además, dicha composición farmacéutica puede, por supuesto, comprender dos o más proteínas antisecretoras, así como comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se formula en la presente memoria para administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica y puede, p.ej.

5 formularse para administración como un spray, aerosol e inhalador o mediante un nebulizador. Cuando se formula para administración sistémica a la sangre, dicha composición se formula preferiblemente a una dosis de aplicación de 0,1 µg a 10 mg por kg de peso corporal y día, tal como una dosis de aplicación de 0,1 µg a 1 mg por kg de peso corporal y día, tal como a 1-50 µg por kg de peso corporal y día. Dicha administración se puede llevar a cabo en una única dosis o en múltiples aplicaciones diarias.

10 En general, la presente invención se refiere al uso de una proteína antisecretora, un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de varias afecciones asociadas a la disfunción de las balsas lipídicas y/o caveolas. En una realización preferida, dicha composición puede emplearse para monitorizar y normalizar la estructura, la distribución y la función de caveolas y las balsas lipídicas, es decir, de microdominios especializados, p.ej. para restaurarlas estructural y funcionalmente, para mejorar la supervivencia y el rescate de enfermedades, lesiones y otras malfunciones. Adicionalmente, la invención permite la monitorización del transporte intracelular y la liberación de productos celulares, así como normalizar la distribución de constituyentes tisulares en varias enfermedades. Además, dicha composición también puede usarse para permitir el tratamiento de los efectos ejercidos por sustancias tóxicas y para monitorizar sus efectos a largo plazo. En una realización preferida, dicha afección se selecciona del grupo que consiste en trauma, intoxicación, infección, malformación, degeneración y otras malfunciones o enfermedades de células, tejidos y órganos en un organismo mamífero.

20 Sin pretender limitar el alcance de la presente invención a una teoría específica, se postula que la composición para uso según la presente invención que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, podría ejercer sus efectos a través de su influencia beneficiosa en la normalización de la estructura, la distribución y/o la función de caveolas y/o balsas lipídicas en las membranas celulares.

#### **Leyendas de las figuras**

25 Figura 1: muestra una diferencia en el potencial sobre la membrana celular en células con un defecto de receptor GABA. Se añade histamina o AF-16 y el efecto de estos compuestos se mide sobre el potencial de la membrana celular medido en I/Io.

#### **Definiciones y abreviaturas**

##### **Abreviaturas**

30 PS: presión sanguínea; CSF: fluido cerebroespinal; SNC: sistema nervioso central, es decir, el cerebro y la espina dorsal; IFP: presión de fluido intersticial; HP: hipertensión pulmonar; PBS: salino tamponado con fosfato; AF: factor antisecretor, AF-16: un péptido compuesto por los aminoácidos VCHSKTRSNPENNVGL; octa péptido IVCHSKTR; septa péptido VCHSKTR; hexa péptido CHSKTR; penta péptido HSKTR.

##### **Definiciones**

35 Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos ligados unos a otros mediante enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se denominan polipéptidos. Típicamente, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácido y por tanto presentan pesos moleculares en el rango de entre aproximadamente 6.000 y aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se denominan péptidos u oligopéptidos. Los términos "proteína" y "péptido" se pueden usar de forma intercambiable en el presente contexto.

40 Una "composición farmacéutica", en el presente contexto, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente activa de una proteína antisecretora, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente activo, tal como un portador o vehículo. Dicha composición farmacéutica se formula para la ruta apropiada de administración, que puede variar dependiendo de la condición del paciente, así como de otros factores, tal como la edad o la elección preferida. Una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora sirve como sistema de administración de fármaco. La composición farmacéutica, al ser administrada, presenta la sustancia activa al organismo de un humano o un animal. Dicha composición farmacéutica puede estar en la forma de, p.ej., comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, geles, disoluciones, etc., pero no se limita a ellos.

45 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de una proteína antisecretora, que puede ser cualquier sal derivada, basada en la denominada serie de Hofmeister. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente activas comprenden trifluoroacetato, acetato y cloruro de lisina, pero no la invención no se limita a ellas.

50 El término "antisecretor" se refiere en el presente contexto a la inhibir o disminuir la secreción, especialmente secreciones intestinales. Por tanto, el término "proteína antisecretora" se refiere a una proteína capaz de inhibir o disminuir la secreción en un organismo.

Un “alimento médico”, en el presente contexto, se refiere a un alimento que ha sido preparado con una composición con una proteína antisecretora. Dicho alimento puede ser cualquier alimento adecuado, en forma fluida o sólida, tal como un líquido o un polvo, o cualquier sustancia alimentaria adecuada. Los ejemplos de dicha materia se pueden encontrar en el documento WO 0038535. Dicho constituyente puede también inducir la captación, la formación y la liberación de una proteína antisecretora.

En el presente contexto, una “proteína antisecretora”, o un homólogo o fragmento de la misma, puede usarse de forma intercambiable con el término “factores antisecretores” o “proteínas de factor antisecretor” tal como se define en la patente WO 97/08202, y se refiere a una proteína antisecretora o un péptido o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que tenga actividad antisecretora y/o una actividad funcional equivalente y/o una actividad análoga. Por lo tanto, debe entenderse que un “factor antisecretor”, una “proteína de factor antisecretor”, un “péptido antisecretor”, un “fragmento antisecretor” o una “proteína antisecretora” en el presente contexto también se pueden referir a un homólogo o fragmento del mismo. Estos términos pueden usarse todos de forma intercambiable en el contexto de la presente invención. Además, en el presente contexto, el término “factor antisecretor” puede abreviarse “AF”. La proteína antisecretora en el presente contexto también se refiere a una proteína con propiedades antisecretoras como las definidas previamente en WO 97/08202 y WO 00/38535. Los factores antisecretores también han sido descritos, p.ej., en WO 05/030246. También se pretende que el término factor antisecretor sea yema de huevo enriquecida en factores antisecretores como los descritos en SE 900028-2 y WO 00/38535 como se describe más adelante.

Un “nebulizador”, en el presente contexto, se refiere a un dispositivo médico que suministra una medicación líquida en forma de una neblina a las vías respiratorias. Los compresores de “nebulizador” hacen pasar aire a través de un tubo hacia una copa de medicina rellena con medicina líquida. La fuerza del aire rompe al líquido en diminutas partículas de neblina que pueden ser inhaladas profundamente por las vías respiratorias.

El término “aerosol” en el presente contexto se refiere a una suspensión gaseosa de partículas finas sólidas o líquidas.

### **Descripción detallada de la invención**

Existe una necesidad de nuevos fármacos dirigidos al tratamiento farmacológico de afecciones médicas asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas, ya que actualmente no se dispone de una terapia adecuada. Las proteínas antisecretoras tienen efectos beneficiosos, como queda ejemplificado en el texto siguiente.

Se describe la monitorización y regulación de la estructura y la función de balsas lipídicas y las caveolas de estructura relacionada, prevalentes en las membranas celulares. Las balsas lipídicas se definen como microdominios de membrana, enriquecidos en colesterol y en los que los que están confinadas proteínas importantes, por ejemplo esfingolípidos tales como transporte de GMI de iones, unión, crecimiento y señalización celular, y la unión del citoesqueleto. Las caveolas son estructuras de tipo vesicular o con forma de matraz, abundantes en células, p.ej., de los sistemas cardiopulmonar y vascular, que incluyen células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales, fibroblastos y miocitos cardiacos (Chan y Ye, 2007; Petersen et al., 2007), formados por una o más agrupaciones de constituyentes de balsa lipídica. Otras proteínas asociadas, tanto solas como en combinaciones, son flotilina, caveolina y reggie; y existen varias variantes de cada una.

Las caveolas son prevalentes, p.ej., en células cardiacas y de músculo liso, células endoteliales, macrófagos y adipocitos, son un tipo especializado de balsas lipídicas, que son estructuras dinámicas que se caracterizan por el enriquecimiento focal en membranas de colesterol y esfingolípidos, transducir señales entre el entorno y el interior de las células, así como conectar al citoesqueleto. Al contrario que otras balsas lipídicas, las caveolas son más grandes y normalmente con apariencia de grietas en forma de matraz o invaginaciones de las membranas celulares y como vesículas. Su tamaño habitualmente está en el orden de 0,1  $\mu\text{m}$ , pero con variaciones considerables. Además, las proteínas ligadas a glicofosfatidilinositol y sus variantes constituyen proteínas ancla unidas a dichas infraestructuras y que interactúan con ellas. También se ha revelado que enzimas que median en funciones vasculares están localizadas en las estructuras mencionadas. Estos constituyentes dinámicos de membrana están ligados al interior de una célula vía sistemas de proteína G y sistemas enzimáticos, así como vía el citoesqueleto, permitiendo con ello que estas estructuras influyan y regulen las funciones celulares. Por tanto, las balsas lipídicas y las caveolas se han revelado como fundamentales para la estructura y la función de las células. No existe ninguna estrategia conocida que permita monitorizar la estabilización de dichas estructuras de membrana que incluyen proteínas de señalización y de transferencia de masa.

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de una afección asociada a la disfunción de balsas lipídicas y caveolas en membranas celulares como se define en la reivindicación 10. La invención también se refiere al tratamiento y/o la prevención de varias afecciones asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y caveolas, tal como hiperplasia y/o hipertrofia de células y tejidos, función cardiovascular.

Además, para tratar y/o normalizar disfunciones de balsas lipídicas y caveolas, como se ha mencionado anteriormente, se puede administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica y/o un alimento médico que comprende una proteína antisecretora o un homólogo o fragmento de las mismas, que tienen una actividad equivalente, o una sal farmacéuticamente activa de las mismas.

- 5 También se describen varias dosis y rutas de administración adecuadas para el propósito de tratamiento, así como la edad, género, afección, etc., del paciente.

El tratamiento según la invención probablemente es más útil para pacientes en riesgo de desarrollo o de padecer disfunción de balsas lipídicas y caveolas, o de la captación o liberación de sustancias patogénicas. Adicionalmente, dicho tratamiento también es beneficioso en otras afecciones que se caracteriza por una renovación anormal de  
10 células y constituyentes de matriz extracelular.

La prueba obtenida actualmente de que las proteínas y péptidos antisecretores probablemente ejercen efectos sobre las balsas lipídicas de membranas celulares es realmente sorprendente para el especialista en la técnica. Existe un gran número de dominios con un tamaño medio de mucho menos que un  $\mu\text{m}$ , denominados balsas lipídicas, que se caracterizan por concentraciones elevadas de colesterol y esfingomielina. Las balsas lipídicas contienen una  
15 variedad de proteínas de membrana integrales y periféricas implicadas en la transferencia de materia y la señalización celular. Dichas plataformas de señalización flotan en la membrana y están equipadas con elementos necesarios para funciones apropiadas como receptores, factores de acoplamiento, enzimas y compuestos efectores, y sustratos, siendo con ello capaces de recibir y transportar iones, moléculas y señales específicos. Estos dominios interactúan además con, p.ej., el citoesqueleto y adicionalmente influyen en la composición y la renovación sobre  
20 el fluido intersticial, así como su presión. Además, las balsas lipídicas están relacionadas con la renovación de caveolas y con la internalización de, p.ej., virus. Existe un agrupamiento en las membranas celulares de receptores de factor de crecimiento, receptores de señal inflamatoria, canales iónicos y transportadores de receptores de factor de crecimiento, receptores de señal inflamatoria, canales iónicos y transportadores a las balsas lipídicas, que sufren cambios dinámicos relacionados con la función prevalente en cada momento.

- 25 El uso de proteínas y péptidos antisecretores (AF) no se limita a los tejidos, órganos y estructuras anatómicas descritas en los ejemplos, sino que incluye síntomas y enfermedades adicionales tan bien caracterizados como la disfunción, la función anormal, la hipo- o hiper-función de balsas lipídicas y/o caveolas.

Las proteínas, péptidos y homólogos antisecretores tienen capacidad para monitorizar e incluso normalizar las funciones de las balsas lipídicas y de proteínas implicadas en la transferencia de materia y la señalización. El muy  
30 amplio rango de regímenes de dosis efectivas utilizado indica que los riesgos de efectos secundarios y complicaciones inesperadas son mínimos. Por tanto, la estrategia usada para monitorizar y controlar estructuras y funciones relacionadas con las balsas lipídicas y las caveolas permiten el tratamiento de cargas excesivas sobre las células y los tejidos, así como el tratamiento de un paciente con un amplio rango de dosis que se adecuen a la respuesta individual y a la gravedad de la enfermedad y/o incomodidad.

- 35 La composición farmacéutica para uso según la presente invención puede, en un contexto, administrarse mediante aplicación tópica, local *in situ*, oral, en la nariz, subcutánea y/o sistémica vía vasos sanguíneos o vía tracto respiratorio.

El factor antisecretor es una clase de proteínas que se da de forma natural en el cuerpo. La proteína de factor antisecretor humano es una proteína de 41 kDa, que comprende 382 aminoácidos cuando se aísla de la glándula  
40 pituitaria. El sitio activo con respecto al efecto beneficioso sobre la normalización de balsas lipídicas y/o la monitorización de caveolas según la presente invención puede localizarse dentro de la proteína en una región próxima al extremo N-terminal de la proteína, localizado en los aminoácidos 1-163 de la SEQ ID NO 6, o en un fragmento de dicha región.

Los presentes inventores han demostrado que el factor antisecretor es hasta cierto punto homólogo con respecto a la proteína S5a, también denominada Rpn 10, que constituye una subunidad de un constituyente que prevalece en  
45 todas las células, el proteosoma 26 S, más específicamente en el tapón 19 S/PA 700. En la presente invención, las proteínas antisecretoras se definen como una clase de proteínas homólogas que tienen las mismas propiedades funcionales. Los proteosomas presentan una multitud de funciones relacionadas con la degradación de las proteínas en exceso, así como con proteínas no deseadas, desnaturalizadas, mal plegadas o en definitiva anormales.  
50 Adicionalmente, el factor antisecretor/S5a/Rpn10 está implicado en la distribución y el transporte de constituyentes celulares, más evidentemente de proteínas.

Los homólogos y fragmentos de proteínas y/o péptidos antisecretores según la presente invención tienen todos la actividad biológica análoga de ser capaces de ser usados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de disfunciones en las balsas lipídicas y/o las caveolas, así como en un método para tratar  
55 afecciones asociadas a disfunciones de las balsas lipídicas y/o las caveolas. Los homólogos y fragmentos, en el presente contexto, comprenden al menos 4 aminoácidos de una proteína antisecretora que existe de forma natural, que puede modificarse adicionalmente cambiando uno o más aminoácidos a fin de optimizar la actividad biológica del factor antisecretor en el tratamiento y/o la prevención de afecciones relacionadas con la presente invención.

Un fragmento de una proteína antisecretora generalmente comprenderá la secuencia de péptidos/aminoácidos o un fragmento de los mismos en una preparación en la que más del 90%, p.ej. 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de la proteína de la preparación es una proteína, péptido y/o fragmento de la misma, de la invención.

5 Además, cualquier secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 70%, tal como idéntica en al menos un 72%, 75%, 55%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%, con respecto a la secuencia de aminoácidos de una proteína, péptido, homólogo y/o fragmento antisecretor según la invención, también se considera que entra dentro del alcance de la presente invención. En el presente contexto, los términos homólogo e identidad se usan de manera intercambiable, es decir, una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad con respecto a otra secuencia de aminoácidos tiene el mismo grado de homología con respecto a una secuencia de aminoácidos especificada.

10 Por proteínas, homólogos, péptidos y/o fragmentos de la misma que tengan una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, se pretende indicar que la secuencia de aminoácidos, p.ej., del péptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 95% con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta un 5% de los aminoácidos de la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos por otros aminoácidos, o un número de aminoácidos de hasta el 5% del total de aminoácidos de la secuencia de referencia pueden ser insertados en la secuencia de referencia. Dichas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino terminal o carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier sitio entre dichas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

15 En la presente invención, para determinar la identidad lo más adecuado es un programa de algoritmo local. Los programas de algoritmo local (tal como Smith Waterman) comparan una subsecuencia de una secuencia con una subsecuencia de una segunda secuencia, y encuentran la combinación de subsecuencias y el alineamiento de dichas subsecuencias, que da lugar a la mayor puntuación de similitud global. Si se permite, los huecos internos se penalizan. Los algoritmos locales funcionan bien para comparar dos proteínas multidominio, que tienen en común un único dominio, o solo un sitio de unión.

20 Los métodos para determinar identidad y similitud están codificados en programas disponibles públicamente. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, aunque sin limitación, el paquete de programa GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX se encuentra disponible al público en la NCBI y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F., et al, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de análisis de secuencia tiene una matriz de puntuación por defecto y penalizaciones de hueco por defecto. En general, sería de esperar que un biólogo molecular usara los parámetros establecidos por defecto por el programa de software usado.

25 Las proteínas antisecretoras o un péptido o un homólogo y/o fragmento de los mismos que tiene una actividad equivalente tal como se define en la presente memoria, puede comprender 4 aminoácidos o más, tal como 5-16 aminoácidos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 aminoácidos o más. En otras realizaciones preferidas, el factor antisecretor consta de 42, 43, 45, 46, 51, 80, 128, 129 ó 163 aminoácidos. En las realizaciones preferidas, el factor antisecretor consta de 5, 6, 7, 8 ó 16 aminoácidos.

30 En otra realización preferida, las proteínas antisecretoras o un péptido o un homólogo, o fragmento de los mismos, que tiene una actividad equivalente, para uso según la presente invención consta de una secuencia de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5$$

35 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R ó K, X3 es S ó L, X4 es T ó A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 ó 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.

40 El factor antisecretor para uso según la presente invención puede ser producido *in vivo* o *in vitro*, p.ej. de forma recombinante, sintéticamente y/o ser sintetizado químicamente, y/o ser aislado de una fuente natural de factores antisecretores, tal como glándulas pituitarias de cerdo o huevos de aves. Tras la producción, los factores antisecretores pueden ser procesados adicionalmente, tal como mediante ruptura química o enzimática para generar fragmentos antisecretores activos o mediante modificación de aminoácidos. Actualmente no es posible obtener factor antisecretor en forma pura mediante purificación. Sin embargo, es posible producir una proteína antisecretora biológicamente activa de forma recombinante o sintética, tal como se ha descrito previamente en el documento WO 97/08202 y en el documento WO 05/030246. WO 97/08202 también describe la producción de fragmentos biológicamente activos de dicha proteína de 7-80 aminoácidos.



El factor antisecretor para uso según la invención puede comprender adicionalmente un grupo N-terminal y/o C-terminal protector. Un ejemplo de grupo protector N-terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C-terminal incluye amida.

5 En una realización preferida de la presente invención, el factor antisecretor se selecciona entre las SEQ ID NO 1-6, es decir, VCHSKTRSNPENNVGL (SEQ ID NO 1, en este contexto también denominado AF-16), IVCHSKTR (SEQ ID NO 2), VCHSKTR (SEQ ID NO 3), CHSKTR (SEQ ID NO 4), HSKTR (SEQ ID NO 5), o la secuencia de aminoácidos de una proteína antisecretora según la SEQ ID NO 6, usando las abreviaturas comunes de una letra para los aminoácidos. Las SEQ ID NO 1, 2 y 3 se han descrito previamente, p.ej., en WO 05/030246. Como se especifica en el listado de secuencias anexo, algunos de los aminoácidos de las secuencias mencionadas antes  
10 pueden ser reemplazados por otros aminoácidos. En lo que sigue en el presente párrafo, la posición de un aminoácido particular en una secuencia de aminoácidos particular se calcula desde la izquierda, denotando el aminoácido más N-terminal como la posición 1 de dicha secuencia particular. Cualquier sustitución(es) de aminoácido(s) como se especifica más adelante puede(n) llevarse a cabo de forma independiente respecto a cualquier otra sustitución(es) de aminoácido(s) de dicha secuencia. En la SEQ ID NO 1, la C de la posición 2 puede ser reemplazada por S, la H de la posición 3 puede ser reemplazada por R ó K, la S de la posición 4 puede ser reemplazada por L, y/o la T de la posición 6 puede ser reemplazada por A. En la SEQ ID NO 2, la C de la posición 3 puede ser reemplazada por S, la H de la posición 4 puede ser reemplazada por R ó K, la S de la posición 5 puede ser reemplazada por L, y/o la T de la posición 7 puede ser reemplazada por A. En la SEQ ID NO 3, la C de la posición 2 puede ser reemplazada por S, la H de la posición 3 puede ser reemplazada por R ó K, la S de la posición 4 puede ser reemplazada por L, y/o la T de la posición 6 puede ser reemplazada por A. En la SEQ ID NO 4, la C de la posición 1 puede ser reemplazada por S, la H de la posición 2 puede ser reemplazada por R ó K, la S de la posición 3 puede ser reemplazada por L, y/o la T de la posición 5 puede ser reemplazada por A. En la SEQ ID NO 5, la H de la posición 1 puede ser reemplazada por R ó K, la S de la posición 2 puede ser reemplazada por L y/o la T de la posición 4 puede ser reemplazada por A.

25 La presente invención también abarca la combinación de dos o más de cualquiera de los fragmentos según las SEQ ID NO 1-6.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica para uso según la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección del excipiente farmacéuticamente aceptable y de su concentración óptima para uso según la presente invención puede ser determinada fácilmente por el especialista mediante experimentación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para uso según la presente invención incluyen disolventes, agentes tamponantes, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes y estabilizantes, agentes de emulsión, agentes de suspensión y/o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional, p.ej., según "Remington: The science and practice of pharmacy", 21ª edición, ISBN 0-7817-4673-6 ó "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2ª edición, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es sustancialmente inofensiva para el individuo al cual se debe administrar la composición. Dicho excipiente normalmente cumple los requisitos exigidos por las autoridades sanitarias nacionales. Las farmacopeas oficiales, tal como la "British Pharmacopoeia", la "United States of America Pharmacopoeia" y la "The European Pharmacopoeia" fijan estándares para los excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 A continuación se presenta una revisión de composiciones relevantes para uso opcional en una composición farmacéutica según la invención. La revisión está basada en la ruta particular de administración. Sin embargo, cabe destacar que los casos en los que el excipiente farmacéuticamente aceptable se pueda emplear en diferentes formas de dosis o composiciones, la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable particular no se limita a una forma de dosis particular o a una función particular del excipiente. Debe señalarse que la invención no está limitada al uso de las composiciones mencionadas a continuación.

Composiciones parenterales:

Para aplicación sistémica, las composiciones para uso según la invención pueden contener vehículos y excipientes convencionales farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que incluyen micro esferas y liposomas.

50 Las composiciones para uso según la invención pueden incluir todo tipo de composiciones sólidas, semi-sólidas y fluidas.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes tamponantes, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes y estabilizantes, agentes de emulsión, agentes de suspensión y/o diluyentes. Los ejemplos de los diferentes agentes se muestran a continuación.

Ejemplo de varios agentes:

55 Los ejemplos de disolventes incluyen, aunque sin limitación, agua, alcoholes, sangre, plasma, fluido espinal, fluido ascítico y fluido linfático.

Los ejemplos de agentes tamponantes incluyen, aunque sin limitación, ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido hidrógeno fosfórico, bicarbonatos, fosfatos, dietilamida, etc.

Los ejemplos de agentes quelantes incluyen, aunque sin limitación, EDTA y ácido cítrico.

5 Los ejemplos de antioxidantes incluyen, aunque sin limitación, hidroxilanisol butilado (BHA), ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, cisteína, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de diluyentes y agentes de desintegración incluyen, aunque sin limitación, lactosa, sacarosa, emdex, fosfatos de calcio, carbonato cálcico, sulfato cálcico, manitol, almidones y celulosa microcristalina.

10 Los ejemplos de agentes de unión incluyen, aunque sin limitación, sacarosa, sorbitol, goma arábiga, alginato sódico, gelatina, quitosán, almidones, celulosa, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

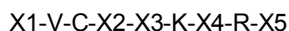
La composición farmacéutica para uso según la invención, en un contexto, puede administrarse localmente o vía infusión periférica intravenosa o vía inyección intramuscular o subcutánea en el paciente, o vía rutas bucal, pulmonar, nasal, cutánea u oral. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica a través de una cánula insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral del paciente.

15 En una realización, la composición farmacéutica para uso según la presente invención se formula para administración intraocular, local, intranasal, oral, subcutánea y/o sistémica. En una realización preferida, la composición para uso según la invención se administra mediante aplicación como una suspensión o, incluso más preferiblemente, un polvo para inhalación con un espray, aerosol, inhalador o nebulizador nasalmente y/o para el tracto respiratorio.

20 La administración de un polvo que comprende factores antiseoretos presenta ventajas adicionales en términos de estabilidad y posología. Una composición farmacéutica para uso según la invención también puede aplicarse tópicamente, administrarse intraocularmente, intranasalmente, oralmente, subcutáneamente y/o sistémicamente vía vaso sanguíneo. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa, intramuscular, local, oral o nasal. Típicamente, cuando se usa para aplicación tópica en el ojo, la concentración aplicada en la composición de la invención está entre 1 µg y 1 mg por aplicación, preferiblemente 50 – 250 µg, tanto como una dosis individual al día o repetida varias veces al día (múltiples dosis), pero no se limita a ello.

30 Administrada sistémicamente a la sangre, la dosis se encuentra en el rango de 0,1 µg a 10 mg por kg de peso corporal, tal como una dosis de aplicación de 0,1 µg a 1 mg por kg de peso corporal, preferiblemente 1 – 500 µg/kg de peso corporal, de nuevo preferiblemente 1 – 50 µg/kg de peso corporal, como una dosis individual o repetida varias veces al día. Cuando se usa yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos según la presente invención, esta formulación se administra preferiblemente de forma oral.

35 Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de una proteína antisecretora o un homólogo y/o fragmento de la misma, que tiene actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica y/o un alimento médico para el tratamiento y/o la prevención de disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas, tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia según la siguiente fórmula



40 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R ó K, X3 es S ó L, X4 es T ó A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 ó 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente. En otra realización, la invención se refiere al uso de una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la invención se refiere al uso de una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 2. En otra realización adicional, la invención se refiere al uso de una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 3. En otra realización adicional, la invención se refiere al uso de una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 4. En otra realización adicional, la invención pertenece al uso de una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 5.

50 Además, en otra realización adicional, la invención pertenece al uso de una proteína antisecretora que es una proteína con una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO 6, o un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 38-42 de SEQ ID NO 6.

55 En otra realización adicional, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica como se ha descrito en la presente memoria, que comprende dos o más proteínas antisecretoras seleccionadas entre las proteínas descritas en las SEQ ID NO 1-6, y la SEQ ID NO 6 o un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO 6, o una secuencia como la descrita por las fórmulas generales descritas en la presente memoria. Dichas secuencias son preferidas igualmente para ser usadas en la presente invención.

En una realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho excipiente puede ser cualquier excipiente preferible elegido por ser apropiado para el propósito específico. En la presente memoria se describen ejemplos de excipientes.

5 En otra realización de la invención, dicha composición farmacéutica se formula para administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica. La ruta elegida para la administración variará dependiendo de la afección del paciente a tratar y de la edad y el género del paciente, etc.

10 En otra realización, la composición farmacéutica se formula para la administración como un spray, un aerosol o mediante un nebulizador o un inhalador. En otra realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica y/o un alimento médico que se formula para administración sistémica a la sangre con una dosis de aplicación de 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-500 µg por kg de peso corporal y día, de nuevo preferiblemente 1-50 µg por aplicación y kg de peso corporal y día. En otra realización, dicha dosis de aplicación es 1-1000 µg por kg de peso corporal y día, tal como 1-100 µg por kg de peso corporal y día. La cantidad de la composición farmacéutica que se distribuye al paciente que lo necesite variará, por supuesto, dependiendo del paciente tratado, y será decidida por el especialista, tal como un prácticamente de medicina, para cada ocasión. Dicha administración puede llevarse a cabo como una dosis individual o como aplicaciones múltiples al día.

20 Durante los últimos años, se ha hecho cada vez más evidente que las balsas lipídicas, las caveolas y las caveolinas están implicadas en varios estados de enfermedad humana, tal como, aunque sin limitación, distrofia muscular (p.ej., distrofia muscular de faja de miembro), desequilibrio del colesterol celular (p.ej., Niemann-Pick tipo C) y/o disfunción en la generación del péptido amiloide procedente de la proteína de precursor de amiloide (APP) (p.ej., enfermedad de Alzheimer). La presente invención por tanto proporciona en una realización el uso de una composición farmacéutica como la descrita en la presente memoria para uso en la prevención y/o el tratamiento de distrofia muscular y/o desequilibrio de colesterol celular.

25 Las balsas lipídicas representan un tipo de dominio celular donde lípidos de química específica pueden asociarse dinámicamente entre ellos, para formar plataformas importantes para la clasificación de proteínas de membrana y la construcción de complejos de transferencia de materia y señalización.

30 Se sabe que varios receptores celulares residen en balsas lipídicas y/o caveolas de la membrana celular, p.ej. se ha demostrado que las balsas son importantes en la regulación de GPCRs en todas las etapas de su ciclo vital, es decir, en el mecanismo exocítico, en la membrana plasmática y en el mecanismo endocítico. Se ha descubierto que las balsas lipídicas y/o las caveolas están implicadas en la regulación de la estabilidad de receptor, regulando la señalización y el tráfico de cualquier GPCR particular. Se puede monitorizar adicionalmente la rápida renovación de los receptores, canal iónico y proteínas de canal de agua y otros transductores de señal. Consecuentemente, en una realización, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica según la presente invención para regular la estabilidad de receptor, regulando la señalización y/o el tráfico de uno o más receptores localizados en la membrana celular.

35 Muchos receptores tienen una vida media de no más de 3-5 horas. En consecuencia, una producción constante de nuevas proteínas receptoras requiere que las proteínas receptoras producidas sean guiadas de forma segura y correcta y se fijen en las localizaciones apropiadas de la membrana celular. La presente invención describe un uso potencial de una composición farmacéutica según la presente invención para mejorar y/o facilitar dicho posicionamiento del receptor en la membrana celular.

40 Y lo que es más, descubrimientos recientes indican que los receptores de hormona esteroide clásicos residen en las balsas lipídicas y/o las caveolas de la membrana celular, y por tanto pueden actuar en el interior, y con la ayuda, de dichas estructuras. Los ejemplos de dichos receptores, aunque sin limitación, son tirosina quinasas receptoras, es decir mecanismos de señalización de EGFR y receptor de andrógeno, Akt1, IL-6, STAT3, receptores de estrógeno (ER). Por tanto, la presente invención también proporciona el uso de una composición farmacéutica según la presente invención o el tratamiento y/o la prevención de afecciones asociadas a disfunciones de receptores de hormona esteroide.

45 Se cree que la resistencia a insulina, definida como la disminución de la capacidad de las células o tejidos para responder a niveles fisiológicos de insulina, es el defecto primario en la patofisiología de la diabetes de tipo II. Se sabe que el TNFα desempeña un papel fundamental en dicha resistencia, como probablemente hacen otras citoquinas y linfoquinas. Actualmente, parece evidente que las acciones únicas de la hormona están íntimamente conectadas con la compartimentalización de la molécula de señalización en balsas lipídicas de la membrana celular. Por tanto, se ha demostrado que una función apropiada de las balsas lipídicas es crítica para una compartimentalización apropiada de la señalización de insulina, p.ej., en adipocitos. Una alteración de la organización y/o la función de balsa lipídica conduce a su vez a la inhibición y/o la alteración de la señalización metabólica de la insulina, probablemente debido al menos de forma parcial a una expresión aberrante de glicosfingolípidos. En una realización actualmente preferida, por tanto, la expresión se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antsecretora, homólogo y/o fragmento de la misma que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para normalizar la señalización

metabólica de la insulina. Por consiguiente, la invención, en dicha realización, también se refiere al tratamiento y/o la prevención de la diabetes mellitus, p.ej. diabetes de tipo II.

Las balsas lipídicas y las caveolas actúan como centros organizados para la transducción de señales. Tanto el receptor de insulina como el TC10 residen en balsas lipídicas. La dirección errónea de TC10 hacia un dominio que no sea una balsa lipídica impide su activación por insulina y bloquea la acción de la insulina. Numerosos estudios han demostrado que las balsas lipídicas actúan como centros organizadores para la señalización de la insulina en el adipocito. El receptor de insulina activado cataliza específicamente la fosforilación de tirosina de determinadas proteínas de las balsas lipídicas, que incluyen caveolina y Cbl. Los componentes de la señalización de insulina están localizados constitutivamente en balsas lipídicas, que incluyen algún receptor de insulina, o todos, flotilina y TC10.

La insulina estimula el transporte de glucosa en células grasas y musculares a través de un proceso de reciclado de vesícula regulado en el que el transportador de glucosa facultativo Glut4 es traslocalizado desde sitios intracelulares hasta la membrana plasmática. En células no estimuladas, el Glut4 sufre endocitosis en el interior de endosomas y posteriormente se clasifica en vesículas de almacenamiento especializadas que se dirigen a la membrana plasmática tras la desactivación del receptor de insulina. A continuación las vesículas se alojan y fusionan en sitios específicos de la membrana, dando como resultado la exposición extracelular del transportador. La cascada de señalización desde el receptor de insulina implica la fosforilación de tirosina de una serie de sustratos intracelulares y la desactivación del mecanismo de PI3-quinasa y la activación de una proteína G, que a su vez se une a numerosos efectores, que incluyen la proteína exocítica Exo70.

Y lo que es más, el complejo exocítico, que comprende Exo70, Sec6 y Sec8, está implicado en la compartimentalización de vesículas que contienen Glut4 en dominios de balsas lipídicas de la membrana celular, p.ej. en adipocitos. Partes del complejo exocítico son reclutadas por proteínas G tras activación mediante insulina y son esenciales para la captación de glucosa estimulada por insulina en células. Además, últimamente se ha demostrado que su especificidad por balsas lipídicas es un requisito para la captación de glucosa y el acoplamiento de Glut4 en la membrana plasmática. Curiosamente, este complejo también requiere una proteína de dominio PDZ, que se une al complejo tras su traslocalización en la balsa lipídica. La estructuración exocítica en las balsas lipídicas prepara sitios diana para vesículas de Glut4, que se asocian transitoriamente con dichos micro dominios tras la estimulación de células con insulina.

Como se ha demostrado en la sección experimental de esta aplicación, los inventores han sido capaces ahora de demostrar que los factores antiseoretos ejercen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de síntomas en diabetes mellitus inducida químicamente. Más detalladamente, se investigó la diabetes mellitus inducida experimentalmente provocada mediante tratamiento con estreptozocina en relación a si era afectada de forma beneficiosa por el tratamiento con AF-16. Por lo tanto, en una realización actualmente preferida, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o un homólogo y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para tratar y/o prevenir afecciones médicas en un paciente que estén asociadas a diabetes mellitus y/o complicaciones relacionadas con la diabetes, seleccionada entre diabetes I y II.

En una realización preferida adicional de la presente invención, la composición farmacéutica para uso según la invención se emplea para normalizar la formación y/o la función de balsas lipídicas en células musculares, células endoteliales, células grasas y/o células sanguíneas rojas, para tratar y/o prevenir la disfunción de Glut4 y/o la estructuración exocítica en dichas células. Por consiguiente, dicha composición farmacéutica se usa en la presente memoria para tratar y/o prevenir la diabetes mellitus y/o complicaciones relacionadas con la diabetes, seleccionadas entre diabetes I y II.

Las caveolas son estructuras dinámicas que pueden brotar de la membrana plasmática, formando vehículos citoplásmicos implicados en la captación mediada por receptores de disoluciones al interior de la célula, así como en la transcitosis a través de la célula. Aunque las caveolas aparecen en muchos tipos de células, son especialmente abundantes en los adipocitos, donde pueden agruparse en estructuras anulares (rosetas de caveolas) a menudo asociadas a filamentos de actina. Están implicadas en la captación de ácidos grasos, así como en el transporte de ácidos grasos y/o la unión de ácidos grasos en las células. Además, está bien caracterizado que las caveolas y la caveolina-1 están implicadas en el transporte de colesterol hacia la superficie celular y están reguladas por los niveles de colesterol en las células. Por tanto, la presente invención, en una realización adicional, también se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o un derivado, homólogo y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el tratamiento y/o la prevención de afecciones médicas en un paciente que estén asociadas a disfunciones en la captación de ácidos grasos, el transporte de ácidos grasos, la unión de ácidos grasos y/o los niveles de colesterol.

Las disfunciones de caveolas están asociadas a varias enfermedades humanas. P.ej., las células nulas en caveolina-1 (CAV1) muestra un aumento de proliferación, y la pérdida de CAV acelera la génesis tumoral. En algunos cánceres de mama, la CAV1 está regulada a la baja y se han detectado una serie de mutaciones esporádicas en la CAV1 en muestras de cánceres de mama humanos, que se correlacionan específicamente con el estatus positivo-alfa-receptor-estrógeno. La CAV3, la isoforma de caveolina específica de músculos, también está

fuertemente ligada a la enfermedad. Muchas mutaciones de la CAV3 están asociadas a una serie de trastornos musculares humanos.

En otra realización, igualmente preferida, la composición farmacéutica para uso según la invención se emplea para normalizar el desarrollo y/o la función de caveolas para contrarrestar y/o estabilizar una presión sanguínea elevada en un paciente que lo necesite. Tal como se demuestra en la sección experimental, el tratamiento de mamíferos con una composición farmacéutica según la presente invención puede reducir complicaciones debido a una hipertensión del sistema circulatorio pequeño y grande del cuerpo del mamífero. Por lo tanto, la presente invención se puede emplear para tratar y/o prevenir ataques cardíacos, tensión sanguínea elevada, enfermedades pulmonares, formación de plaquetas y/o lesiones traumáticas en el sistema vascular, tal como del corazón y los pulmones, así como disfunción y desregulación hormonal.

Se usa una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o un derivado, homólogo y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para el tratamiento y/o la prevención de la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en un mamífero que lo necesite. En una realización, dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia según la siguiente fórmula X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 en la que X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R ó K, X3 es S ó L, X4 es T ó A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 ó 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente. En otra realización, donde dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización adicional, la presente invención se refiere a un método, donde dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 2. En otra realización adicional, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 3. Además, la invención se refiere a una proteína antisecretora que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 4. En otra realización adicional, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 5. En otra realización adicional, dicha proteína antisecretora es una proteína con una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO 6, o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 38-42 de la SEQ ID NO 6. En una realización, dicha composición farmacéutica comprende dos o más proteínas antisecretoras seleccionadas de las proteínas de SEQ ID NO: 1-6, y la SEQ ID NO 6 o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que comprenda los aminoácidos 38-42 de la SEQ ID NO 6, o una secuencia como la descrita por la fórmula general presentada en la presente memoria. En una realización, dicha composición farmacéutica se formula para administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica. En otra realización adicional, dicha composición farmacéutica y/o alimento médico se formula para administración como un spray, aerosol, o mediante un nebulizador o un inhalador. También se contempla en una realización de la presente invención una composición farmacéutica que se formule para administración sistémica en sangre con una dosis de aplicación de 0,1 µg a 10 mg por kg de peso corporal y día, tal como de 0,1 µg a 1 mg por kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-500 µg por kg de peso corporal y día, de nuevo preferiblemente 1-50 µg por kg de peso corporal y día. Dicha administración se lleva a cabo como una dosis individual o como múltiples aplicaciones al día. Para el tratamiento y/o la prevención de la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en un mamífero que lo necesite, se administra una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o un homólogo, y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad funcional equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma.

En el tratamiento y/o prevención de la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en un mamífero que lo necesite, se administra una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o un homólogo, y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma.

Además, cabe destacar que la administración de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica a un mamífero que lo necesite y/o el segundo uso médico de una composición farmacéutica que comprenda una proteína antisecretora o un derivado, homólogo y/o fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, según la presente invención, está dirigida a todas las afecciones descritas en la presente memoria asociadas a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas.

## **Sección experimental**

### **Ejemplo 1**

Se trataron experimentalmente ratas adolescentes y adultas, con un peso corporal de 150 – 300 g y de cualquier sexo, para inducir hipertensión pulmonar y alteraciones reactivas en los pulmones. La hipertensión pulmonar (HP) se define como tener una tensión en exceso sobre la tensión arterial pulmonar normal, ~20 mm Hg, normalmente en el rango de 30 – 40 mm Hg. Es una enfermedad progresiva con una elevada morbilidad y mortalidad en humanos y en animales. Los modelos experimentales permiten la investigación de los mecanismos desencadenadores. Un tratamiento único de ratas con monocrotalina es una estrategia establecida para la inducción de HP (Cf. Mathew et al., 2004). Este alcaloide vegetal es activado en el hígado por metabolitos pirrólicos, con una vida media de solo unos pocos segundos y, por tanto, afecta principalmente al endotelio arterial pulmonar, provocando un daño celular endotelial y una pérdida vascular pulmonar. Esto viene seguido a los pocos días de una estimulación prominente de

síntesis e hipertrofia de ADN celular endotelial arterial pulmonar. Se cree que dichas células endoteliales secretan factores de promoción del crecimiento y la movilidad, lo que contribuye a la migración y a cambios reactivos de células de músculo liso adyacentes. En dos semanas, el ventrículo derecho del corazón se vuelve hipertrófico debido a la elevada carga que resulta de los cambios inducidos por la crotalina en el sistema vascular pulmonar.

5 Grupos de ratas Sprague-Dawley recibieron una única inyección intraperitoneal de crotalina (60 mg/kg de peso corporal; Sigma). A uno de cada dos animales se le implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica Alzet (tipo 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1 $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). De este modo, la bomba estaba administrando ~ 20  $\mu$ g de AF-16 por hora durante al menos 10 días. En un experimento, las ratas con bomba Alzet 2001 recibieron en el implante además una única inyección intramuscular de 2 mg de AF-16. Para comparar, una de cada dos ratas recibió en la inyección de crotalina el implante de bombas Alzet 2001 rellenas de vehículo, PBS con 15 % de etanol. Los grupos adicionales de ratas de igual peso recibieron solamente implantes de bombas rellenas con AF-16 ó con el vehículo, pero sin crotalina.

15 Las ratas fueron anestesiadas 18 días después y se determinó sus pesos corporales. Las tratadas con crotalina estaban delgadas y pequeñas para su edad, eran menos activas y presentaban un pelo áspero, y tenían un menor peso, en comparación con los controles normales no tratados. Las tratadas con crotalina y que habían recibido infusiones de AF con la ayuda de las minibombas parecían saludables y presentaban casi el mismo peso y apariencia que los controles. Se determinó la tensión del ventrículo derecho del corazón con la ayuda de un sistema transductor de fibra óptica miniaturizado (sensor Samba System 3200 & Samba Preclin 420; Samba Sensors AB, V. Frölunda, Suecia), insertado a través de la vena yugular derecha. La tensión sanguínea arterial pulmonar media fue de aproximadamente 20 mm de Hg en las ratas tratadas con el vehículo o que habían sido tratadas con AF-16. Por el contrario, las ratas tratadas con crotalina (inyección ip única; 60 mg/kg de peso corporal; crotalina disuelta en PBS) y el vehículo administrado por una bomba Alzet presentaron durante 18 días una tensión arterial pulmonar excesiva de 30 mm de Hg y una hipertrofia del ventrículo derecho, según se determinó comparando su peso neto con el del ventrículo derecho y con el peso de las estructuras correspondientes de ratas normales no tratadas. El tratamiento con AF-16 de las ratas tratadas con crotalina volvió la tensión sanguínea ventricular derecha y la tensión sanguínea arterial pulmonar a lo normal y no se produjo una hipertrofia significativa del ventrículo derecho, en comparación con el de ratas normales no tratadas. Estos resultados fueron reproducibles, ya que se alcanzaron consistentemente al repetirlos. Se sabe que los compuestos derivados de crotalina provocan la disrupción, p.ej., de la proteína caveolina, dando como resultado la desorganización de las caveolas y las balsas lipídicas, cuyos efectos producen alteraciones en la señalización celular endotelial en este modelo de HP (Mathew R., et al., 2004).

30 Concluimos que el tratamiento con AF-16 evitó la reconstitución del sistema vascular pulmonar y por tanto el desarrollo de anomalías pulmonares y la hipertrofia del lado derecho del corazón documentada tras tratamiento con crotalina. De este modo, mediante tratamiento con AF-16 se redujo el daño inducido a las balsas lipídicas y las caveolas en el endotelio y en las células de músculo liso vasculares y los subsiguientes cambios reactivos, y ninguno dio como resultado las anomalías vasculares esperadas, ni la hipertrofia ventricular del lado derecho del corazón.

#### Ejemplo 2

40 En un segundo experimento se investigó si la administración de AF-16, en una dosis que anteriormente se ha demostrado que evita el desarrollo de hipertensión pulmonar, afectaba al proceso de curación de las arterias lesionadas.

45 En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 10 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 1 mg de AF-16 justo después de la implantación. Después, se afeitó la piel de la ingle derecha, se cortó y se aisló la femoral derecha y la arteria ilíaca común. Se posición un fórceps de Pean alrededor de la arteria y se cerró tres veces, durante 15 segundos cada vez, y después se retiró. Se tuvo un gran cuidado de no perforar el vaso o cualquier estructura circundante. Se comprobó la patencia de las arterias femoral e ilíaca y de las venas para asegurar una circulación sanguínea adecuada. A continuación se adaptó y suturó los márgenes de la herida. En paralelo, se pinzó la arteria femoral derecha y la arteria ilíaca de ratas adicionales, pero se la infundió el vehículo, PBS con un 15 % de etanol, en lugar de la sustancia activa.

50 Tras 10 días, los animales fueron anestesiados una vez más, y se les infundió 1 mL/kg de peso corporal de una mezcla de azul de Evans al 2 % y albúmina al 3 % (albúmina de suero bovino; Sigma), disuelta en PBS. Tras 15 minutos, el animal fue fijado mediante perfusión transcardial con una disolución tamponada de formalina-salino tras un aclarado inicial con PBS con adición de heparina. Se aisló cuidadosamente las arterias ilíaca y femoral derecha e izquierda y se unieron en sus extremos, inmersas en una disolución de formalina en PBS. Tras 1 hora, los vasos fueron abiertos longitudinalmente con unas tijeras finas y fueron analizados en relación a la prevalencia de la tinción azul de la superficie luminal de la pared arterial. Las arterias no tocadas no mostraron tinción de su superficie luminal. Por el contrario, las arterias ilíacas y femorales derechas que habían sido traumatizadas y que habían sido tratadas con el vehículo presentaron una tinción azul intensa continua, distinta, de toda la pared del vaso lesionado,

con bordes claramente distintos. Las arterias ilíaca y femoral traumatizadas del tercer grupo de animales, tratados con AF-16 desde la lesión, presentaron manchas tipo punto de forma irregular, áreas discontinuas que habían sido teñidas de azul, separadas por áreas aparentemente no teñidas dentro de la zona de vasos dañados. Determinado visualmente, más de la mitad del área de la zona lesionada permaneció sin teñir en los animales tratados con AF-16. Eso significa que el AF-16 promovió la recuperación de la pared interior del vaso, inicialmente desnuda, haciendo que quedara recubierta de células. Además, se observaban menos coágulos visibles, en comparación con los vasos que habían sido lesionados en animales tratados con el vehículo. La microscopía óptica de las áreas lesionadas reveló que el número de leucocitos, plaquetas, macrófagos y células espuma sobre y dentro del tejido lesionado era menor tras el tratamiento con AF-16 en comparación con después del tratamiento con el vehículo. Además, había menos células mononucleares unidas a la superficie. Se reconocieron células de músculo liso invadiendo la capa adluminal, pero en menor extensión tras el tratamiento con AF-16 en comparación con después del vehículo. Las células endoteliales, los fibroblastos y las células de músculo liso se caracterizan en circunstancias normales por presentar abundancia de caveolas y vesículas sobre y dentro de su membrana plasmática. Estas estructuras superficiales se ven trastornadas tras el trauma mecánico al vaso sanguíneo y permanecen en una extensión considerable durante al menos 10 días, es decir, el periodo de tiempo investigado en los experimentos presentados. Sin embargo, en animales tratados con AF-16 hay una tendencia prominente a la normalización, en comparación con las condiciones prevalentes en los tratados con el vehículo. Se sabe que la transducción de señal para los tipos celulares mencionados anteriormente está mediada en gran medida por las balsas lipídicas y las caveolas. Por tanto, se concluye que el tratamiento con AF-16 reduce las alteraciones inflamatorias y reactivas en los vasos sanguíneos lesionados y normaliza en un grado considerable la estructura y la función de las células de dichas áreas. El AF-16 está ejerciendo sus efectos beneficiosos interfiriendo con las balsas lipídicas y las caveolas.

### **Ejemplo 3**

En un experimento se investigó si la administración de AF-16 afectaba al proceso de curación de la piel y el cartílago lesionados, usando lesiones de congelación-descongelación a una oreja de rata como sistema modelo.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235 µL; caudal de bombeo ~1 µL/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 1 mg de AF-16 justo después de la implantación. A continuación se aplicó una lesión de congelación-descongelación comprimiendo la oreja de un modo estandarizado con la ayuda de un fórceps de Pean, se enfrió con nitrógeno líquido. Para comparar, se trataron ratas adicionales del mismo modo en paralelo con el vehículo, PBS con un 15 % de etanol, solo y sin péptido. Adicionalmente, se usaron como referencia ratas normales, que no habían sido expuestas a ninguna lesión de congelación-descongelación, así como ratas no lesionadas que tenían bombas con AF-16 implantadas.

Las ratas tratadas durante 2 semanas con AF-16 después de la lesión por congelación mostraron menos edema e inflamación que las lesionadas pero tratadas con el vehículo. En cualquiera de los lados que rodean el cartílago elástico lesionado de la oreja se producía una formación de nuevo cartílago hialino. Las ratas tratadas con AF-16 tenían a las 2 semanas menos necrosis remanente en el cartílago elástico remanente, menos formación prominente de cartílago hialino cerrado, menos edema e infiltración de células inflamatorias. La cantidad de colágeno y la densidad de las células inflamatorias se redujo en los animales tratados con AF-16 en comparación con los que habían recibido el vehículo. El tratamiento de ratas no lesionadas con el vehículo o con AF-16 no alteró las estructuras de la oreja.

Se concluye que la evolución del proceso de curación respecto a la piel lesionada y el cartílago subyacente fue más beneficiosa y dio como resultado la formación de menos tejido cicatrizante si los animales eran tratados con AF-16. La lesión por congelación redujo de forma mucho más prominente el número de caveolas en las células que las áreas lesionadas de las orejas tratadas con vehículo en comparación con lo observado en las que habían recibido AF-16.

### **Ejemplo 4**

Se investigó con conejos adultos si la administración de AF-16 afecta al proceso de curación de piel y periostio lesionados.

Se aplicó un casco a conejos albinos de Nueva Zelanda adultos anestesiados (hembras, peso corporal 2,5 – 2,8 kg), hecho de fibra de vidrio reforzada con plástico, pegado al hueso del cráneo expuesto quirúrgicamente. Los conejos recibieron AF-16 o el vehículo inyectado intravenosamente en una vena marginal de la oreja. La dosis de AF-16 se fijó en hasta 5 mg por kg de peso corporal, dos veces al día. La herida de la piel calvarea y los sitios de inyección en la oreja fueron investigados macroscópicamente después de una semana. A continuación, se diseccionaron especímenes de ambas áreas y se prepararon mediante fijación, embebido, seccionamiento y tinción para examen en microscopio óptico. El tratamiento con AF-16 dio como resultado la prevalencia de menos edema en la piel en curación, que además estaba menos inflamada y carecía de tejido cicatrizante hipertrófico prominente, evidente en los correspondientes especímenes de animales tratados con vehículo. La microscopía óptica confirmó que los especímenes de animales tratados con AF-16 presentaban menos células inflamatorias y menos colágeno que los

tratados con vehículo. Adicionalmente, en especímenes de animales tratados con AF-16 los vasos sanguíneos parecían más maduros.

Se concluye que el AF-16 mejoró la curación de heridas cutáneas profundas, reduciendo la marcada inflamación y la prevalencia de edema y excesivo tejido cicatrizante. El tratamiento con AF, a su vez, pareció hacer la frecuencia reducida de caveolas más normal que lo observado entre los tratados con vehículo.

#### **Ejemplo 5**

Se ha investigado con ratas adultas si la administración de AF-16 influía en la curación de lesiones gástricas inducidas experimentalmente.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 2 mg de AF-16 justo después de la implantación de la bomba. A continuación, se afeitó el abdomen y se abrió quirúrgicamente la pared abdominal. Se identificó el estómago y se expusieron sus aspectos ventrales, teniendo extremo cuidado de no permitir que los órganos y estructuras adyacentes diferentes se secaran o fueran lesionados mecánicamente. Los aspectos ventrales de la parte glandular (distal) del estómago fueron expuestos entonces a ácido acético al 80%, contenido en un tubo de vidrio, durante 60 segundos. Después de eso, se retiró rápidamente el tubo de vidrio y la serosa expuesta fue enjuagada con un gran volumen de PBS. A continuación se cerró el abdomen con suturas. Paralelamente, otras ratas fueron tratadas del mismo modo pero con vehículo en la bomba, y recibieron el mismo volumen de vehículo inyectado. Tras una semana, las ratas volvieron a ser anestesiadas una vez más y se expuso el abdomen y se abrió quirúrgicamente. Se investigó la prevalencia de las adhesiones y de fluido ascítico, así como la curación de la úlcera gástrica. Había menos fluido en la cavidad abdominal en las ratas que habían sido tratadas con AF-16 en comparación con las que habían recibido el vehículo. La extensión de las adhesiones entre el omento mayor y el estómago, el intestino, el bazo y el hígado, así como en la lesión de la pared abdominal era menos prominente y reducida en frecuencia y tamaño en las ratas tratadas con AF-16. El microscopio óptico confirmó la impresión macroscópica de que la pared estomacal estaba menos edematosa. La cobertura epitelial de la superficie interna del estómago era más completa y extensiva, pareciendo mejor organizada tras el tratamiento con AF-16. Además, había menos infiltración de células inflamatorias en la pared gástrica tras el tratamiento con AF-16. Se concluye que el AF-16 mejoró la curación de las lesiones de la pared gástrica. Adicionalmente, la prevalencia de fluido ascítico se vio reducida, como la extensión y la gravedad de las adhesiones abdominales.

#### **Ejemplo 6**

En otro experimento se investigó si la administración de AF-16 afectaba a la biointegración de materiales extraños implantados en un organismo.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 10 ó 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 2 mg de AF-16 justo después de la implantación de la bomba. Los implantes consistieron en membranas delgadas (1 x 2 cm), suturas y espuma (0,2 x 0,5 x 1 cm; dirigido a aumento) preparadas todas en poliuretano urea degradable (Artelon®, obtenido como un obsequio de Artimplant, V. Frölunda, Suecia). En paralelo, ratas adicionales recibieron implantes de los mismos materiales en los mismos sitios justo detrás de la fascia muscular de su espalda. El procedimiento de implante se llevó a cabo lo más suavemente posible para evitar hemorragias y daños excesivos en los tejidos. Además, se implantaron esponjas de quitosán y membranas de quitosán (Medicarb AB, Bromma, Suecia) como se ha descrito anteriormente, en ratas tratadas con el AF-16 o con el vehículo.

Al ser examinadas a los 10 días, se observó que la biointegración de los implantes era superior en los animales que habían sido tratados con AF-16, tanto evaluado macroscópicamente como mediante microscopio óptico de secciones delgadas teñidas. Había menos células inflamatorias y macrófagos en los bordes de los implantes, y se reconocieron fibroblastos entrando en el implante de espuma, recuperado de animales tratados con AF-16. Adicionalmente, la curación de la herida cutánea en las ratas tratadas con AF-16 pareció más madura y con menos alteraciones reactivas, en comparación con las tratadas con el vehículo. Se sabe que la transducción de señal que da como resultado cambios reactivos de tejido implica la transferencia de señal a través de las balsas lipídicas y las caveolas de las células de tejido lesionado.

#### **Ejemplo 7**

Se llevaron a cabo experimentos para investigar si la administración de AF-16 afectaba a las reacciones isquémicas en un órgano interno de un organismo.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 2 mg



de AF-16 justo después de la implantación de la bomba. Se indujo isquemia unilateralmente en el riñón izquierdo obstruyendo el flujo sanguíneo a través de la arteria renal durante 40 minutos, y la posterior recirculación. Se extrajo quirúrgicamente el riñón derecho durante el periodo de pinzamiento. Después de ello, las heridas fueron cerradas y los animales recibieron fármacos analgésicos, pero ningún tratamiento adicional. En paralelo, ratas adicionales, que recibieron el vehículo pero no péptido, fueron expuestas a isquemia en el riñón izquierdo y se les extirpó el riñón derecho. Los animales fueron anestesiados una vez más tras 4 ó 7 días. El riñón se aisló, se inspeccionó, se midió y se pesó y después se fijó en disolución tamponada de formalina para continuar el procesado para microscopía óptica.

Los experimentos revelaron que las alteraciones isquémicas y reactivas del riñón fueron lo más prominente de los túbulos proximales. Se produjeron menos hemorragias y necrosis en las tratadas con AF-16.

#### **Ejemplo 8**

Los experimentos han sido llevados a cabo con tumores neoplásicos, investigados en relación a si su crecimiento se veía afectado por el tratamiento con AF-16.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Además se inyectó intramuscularmente 2 mg de AF-16 justo después de la implantación de la bomba. Una vez por semana se cambiaron las bombas por otras nuevas. Diferentes tumores, inducidos químicamente o trasplantados, fueron investigados con respecto a los efectos de la administración de AF-16, en comparación con el tratamiento con el vehículo.

Las ratas que recibieron un producto químico carcinogénico desarrollaron tumores mamarios más pequeños con una menor frecuencia tras el tratamiento con AF-16, en comparación con el tratamiento con vehículo. Los cambios reactivos e inflamatorios también fueron menos prominentes. También se han investigado tumores experimentales adicionales, alcanzándose efectos beneficiosos en las tratadas con AF-16, en comparación con el vehículo.

#### **Ejemplo 9**

Los experimentos se han llevado a cabo con ratas con diabetes mellitus inducida experimentalmente provocada por el tratamiento con estreptozocina, investigada con respecto al efecto del tratamiento con AF-16.

En ratas adultas anestesiadas se implantó subcutáneamente en la espalda una minibomba osmótica (tipo Alzet 2001; volumen de llenado ~235  $\mu$ L; caudal de bombeo ~1  $\mu$ L/h; preinicializada; disolución de relleno que contiene 20 mg/mL de AF-16 disuelto en PBS con adición de un 15 % de etanol). Para comparar, se trataron ratas adicionales con el vehículo, pero sin péptido. Se inyectó una única dosis de estreptozocina (Sigma) a las ratas, y se comprobó la aparición de glucosa en la orina con tiras comerciales y se observó la aparición de grandes volúmenes de orina.

El tratamiento con AF-16 redujo, según nuestros resultados preliminares, la pérdida de glucosa en orina y también redujo el volumen urinario. Los valores de glucosa en sangre resultaron menores tras el AF-16.

Por tanto, el AF-16 ejerce efectos beneficiosos sobre el desarrollo de síntomas en diabetes mellitus inducida químicamente.

#### **Ejemplo 10**

Los experimentos se llevan a cabo con AF, administrado a sujetos humanos que padecían diabetes mellitus, tipo II. El estudio es ciego para el médico y para los pacientes. Todos los pacientes padecían diabetes mellitus tipo II y fueron todos investigados a fondo para determinar la prevalencia de otras enfermedades diferentes a la diabetes mellitus en el Hospital Universitario de Lund, Suecia. El comité regional concede el permiso ético. A un grupo, de x sujetos, se le administra AF, mientras que x sujetos de un segundo grupo, para comparación, presentan la misma cantidad de sustancia de control administrada. Tras 12 semanas, se toman muestras de sangre y se analizan.

Un resultado a observar es que el nivel de HbA1c se ve reducido significativamente ( $p \geq 0,05$ ), en 0,2 unidades, para las que habían recibido AF en comparación con las que habían recibido la administración de disolución no activa. Esto significa que los niveles de glucosa en sangre de los sujetos que habían recibido AF permanecen en niveles más bajos y están mejor controlados en comparación con las condiciones para los grupo de comparación (placebo). Por tanto, se alcanzan efectos beneficiosos en relación a la evolución de la enfermedad de diabetes mellitus tipo II para los sujetos que habían recibido AF.

#### **Ejemplo 11**

Las alteraciones oscilatorias en las concentraciones de ion calcio constituyen una parte crítica de la maquinaria de señalización en muchos tipos de células, p.ej. neuronas y astrocitos, prevalentes en el cerebro, la espina dorsal y la retina. Además, se ha descrito que las células endocrinas, tal como las células  $\beta$  pancreáticas, tienen una secreción de insulina pulsada. También se ha demostrado que las células pancreáticas endocrinas presentan cambios iónicos

relacionados, p.ej., en la captación de glucosa. Se considera que una ligera alteración de las oscilaciones de células astrogliales de iones de calcio altera la regulación, p.ej., de glutamato extracelular, que *per se* podría conducir a una activación microglial local con la producción de citocinas proinflamatorias, hinchamiento de astrocitos y, debido a dicho hinchamiento, espacio extracelular reducido y finalmente daño cerebral. Durante estas condiciones, se produce un descenso de la liberación de glutamato y de la transmisión neuronal. Tentativamente, dicha reducción de la transmisión y dicha actividad alterada en el cerebro probablemente se correlaciona con la disfunción del sistema nervioso y las actividades y la actuación psiconeurológica patológica.

Se llevan a cabo experimentos para ilustrar las oscilaciones de ion calcio en células astrocíticos en tejido nervioso. Las oscilaciones son inducidas por un estimulante, p.ej., histamina y/o un transmisor monoaminérgico y se determina la posibilidad de monitorizar la actividad con proteínas específicas tal como AF. La concentración local de iones calcio se describe con la ayuda de compuestos de unión de calcio, cuya fluorescencia varía cuantitativa y cualitativamente con las concentraciones de iones calcio intracelular. Se utiliza la microscopía de fluorescencia y la microscopía de escaneo confocal de astrocitos y de neuronas, principalmente cultivados *in vitro*. Se usan otras estrategias electrofisiológicas adicionales. Se añaden a las células concentraciones especificadas de AF con el objetivo de determinar con ello los efectos sobre los sistemas de transporte de iones, localizados en las balsas lipídicas de las células.

Además, se analizan de forma similar diferentes tipos de células musculares y células de tejido conectivo para determinar la prevalencia, la frecuencia y la amplitud de las oscilaciones de ion calcio en su citoplasma antes, en el momento y después de la adición de AF y compuesto relacionados.

Como puede observarse en la Figura 1 representativa, la monitorización de oscilaciones de calcio en una célula, tejido y/u órgano permite la monitorización de dichas disfunciones de evento de señalización y ayuda en la normalización. Con ello se posibilitan tratamientos de disfunciones y enfermedades.

### **Ejemplo 12**

Las acuaporinas son una familia de proteínas, integradas en membranas, y expresadas en todas las células y organismos vivos. La función principal de las acuaporinas es controlar el flujo de agua hacia y desde las células, es decir, entre el citoplasma de las células y el entorno extracelular. Cada tipo de células, tejidos y órganos tiene su conjunto específico de acuaporinas con modelos de distribución característicos. Las acuaporinas funcionales se agrupan preferencialmente en las balsas lipídicas y las caveolas, mientras que las subunidades y los complejos de acuaporina disociados pueden ser demostrables fuera de estos constituyentes de membrana.

Los experimentos llevados a cabo con cerebros y espinas dorsales han revelado que la expresión y la distribución de acuaporinas, principalmente acuaporina 1 y acuaporina 4, se vieron alteradas cuando se exponían a isquemia o a distorsión y carga mecánica. Además, en las infecciones de cerebro y de espina dorsal, p.ej., encefalitis, los modelos de distribución e intensidad de estas dos acuaporinas se ven alteradas, tal como describen la inmunohistoquímica y la inmunoquímica. La interacción entre, p.ej., neuronas y células gliales de apoyo y estructuras vasculares resulta ser intrincada y compleja, pero importante.

Se llevan a cabo experimentos que mapean con más detalle los efectos de trauma, infecciones y otras condiciones patológicas. Los tratamientos con proteínas, péptidos, derivados y homólogos de AF se administran tópicamente y sistémicamente, administrados como una dosis individual o mediante múltiples aplicaciones, o crónicamente, es decir, durante el resto de la vida del sujeto tratado. Los efectos se caracterizan cuantitativa y cualitativamente y la importancia de los efectos sobre la estructura y las funciones de los diferentes tipos de acuaporinas en un organismo. Los experimentos indican que el AF tiene un gran impacto en la monitorización e incluso en la normalización de la prevalencia, la distribución y la actividad de acuaporinas y de complejos de canal iónico, que interactúan con las primeras. De este modo, se pueden desarrollar nuevos e importantes métodos de tratamiento en base a los resultados obtenidos.

45

**Referencias**

1. Chini & Parenti, 2004
2. Dermine et al., 2001
3. Freeman et al., 2007
- 5 4. Graham D I & Lantos P L. Greenfield's Neuropathology, 7<sup>a</sup> ed., Arnold, Londres, 2002.
5. Head et al., 2006
6. Helms & Zurzolo, 2004
7. Kurzchalia & Parton, 1999
- 10 8. Lange S & Lönnroth I. The antisecretory factor: synthesis, anatomical and celular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. Intern Rev. Cytology 210, 39-75, 2001.
9. Mahmutefendic et al., 2007
10. Márquez, D C et al., 2006
11. Mathew et al., 2004
12. Pollard, T D & Earnshaw, W C. Cell biology, Saunders, Filadelfia, 2002.
- 15 13. Petersen OH, Sutton R & Criddle DN. Failure of calcium microdomain generation and pathological consequences. Cell Calcium 40, 593-600, 2006
14. Pohl et al., 2004
15. Rajendran et al., 2007
16. Ross, M H & Pawlina, W. Histology, a text and atlas. Lippincott, Baltimore, 5<sup>a</sup> ed., 2006
- 20 17. Rutter GA, Tsuboi T & Ravier MA. Ca<sup>2+</sup> microdomains and the control of insulin secretion. Cell Calcium 40, 539-551, 2006
18. Spät, A. Calcium microdomains and the fine control of cell function – An introduction. Cell Calcium 40, 403-404, 2006.
19. Triantafilou & Triantafilou, 2004
- 25 20. WO 97/08202;
21. WO 05/030246
22. WO 98/21978
23. WO 00/038535

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una proteína antisecretora, un homólogo y/o un fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para uso en el tratamiento y/o la prevención de una afección asociada a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en membranas celulares, donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en disfunción vascular, disfunción cardiovascular, disfunción pulmonar, diabetes mellitus, complicaciones relacionadas con diabetes mellitus, hiperplasia y/o hipertrofia de células y/o tejido, cardiomiopatía, trastorno pulmonar y tumores y complicaciones de los mismos, o para uso terapéutico para facilitar una mejor biointegración de material extraño implantado en un mamífero.
- 10 **2.** Una proteína antisecretora para uso según la reivindicación 1, donde dicha disfunción se selecciona del grupo que consiste en función anormal, función insuficiente, hipofunción e hiperfunción.
- 3.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia según la siguiente fórmula
- X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5,
- 15 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R ó K, X3 es S ó L, X4 es T ó A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 ó 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.
- 4.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica que comprende dos o más proteínas antisecretoras.
- 20 **5.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 6.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica que se formula para administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica.
- 25 **7.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica que se formula para administración como un spray, aerosol, inhalador o mediante un nebulizador.
- 8.** Una proteína antisecretora para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica que se formula para administración sistémicamente en sangre con una dosis de aplicación de 0,1 µg a 10 mg por kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg por kg de peso corporal y día.
- 30 **9.** Una proteína antisecretora para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína antisecretora debe administrarse en una composición farmacéutica cuya administración debe realizarse en una dosis individual o como múltiples aplicaciones diarias.
- 35 **10.** El uso de una proteína antisecretora, un homólogo y/o un fragmento de la misma, que tenga una actividad equivalente, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de una afección asociada a la disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en membranas celulares, donde dicha afección se selecciona del grupo que consiste en disfunción vascular, disfunción cardiovascular, disfunción pulmonar, diabetes mellitus, complicaciones relacionadas con diabetes mellitus, hiperplasia y/o hipertrofia de células y/o tejido, cardiomiopatía, trastorno pulmonar y tumores y complicaciones de los mismos, o para uso terapéutico para facilitar una mejor biointegración de material extraño implantado en un mamífero.
- 40

**Figura 1**

