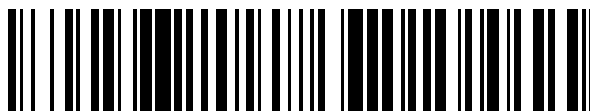


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 659**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/409 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2007 PCT/US2007/023887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08063514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2007 E 07862004 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2091530**

54 Título: **Composición para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa**

30 Prioridad:

13.11.2006 US 858559 P

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

12.04.2017

73 Titular/es:

**PCB ASSOCIATES, INC. (100.0%)
2235 E Flamingo Rd, STE 201 G
Las Vegas, NV 89119, US**

72 Inventor/es:

**MCCARTY, MARK FREDRICK;
HENDLER, SHELDON SAUL;
RORVIK, DAVID MICHAEL y
INOBUCHI, TOYOSHI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 608 659 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

Composición para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones útiles en métodos para la profilaxis o el tratamiento de afecciones médicas asociadas o ligadas a una actividad de la NADPH oxidasa. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones que usan ficobilinas como profármacos y que se convierten en fikorubina tras la administración a un sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa.

Antecedentes:

10 La enzima NADPH oxidasa transfiere electrones de NADPH a oxígeno, dando como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo O_2 y H_2O_2 . La NADPH oxidasa se expresa en neutrófilos donde se utilizan ráfagas de especies reactivas de oxígeno para matar patógenos. La expresión y actividad de la NADPH oxidasa también se observa en otras células y tejidos del cuerpo de mamífero, en los que funciona como un modulador de vías de señalización intracelular.

15 Desafortunadamente, en una alta proporción de patologías no infecciosas, la NADPH oxidasa se sobreexpresa y/o se hiperactiva en tejidos afectados, y la producción resultante de oxidantes a menudo media o agrava la patología. De hecho, la NADPH oxidasa activada parece ser la principal fuente de exceso de estrés oxidante en la mayoría de los trastornos patológicos. La hiperactividad de la NADPH oxidasa puede estimular mecanismos proinflamatorios, promover la fibrosis tisular y la resorción ósea y, en el sistema vascular, antagonizar la actividad protectora crucial del óxido nítrico. Los oxidantes producidos por la NADPH oxidasa también pueden inducir daño estructural a blancos celulares críticos, incluyendo el ADN, y pueden aumentar la actividad del factor de crecimiento de los cánceres. (Meyer JW et al. FEBS Lett 2000;472:1-4; Zalba G et al. Hypertension 2001;38:1395-9; Inoguchi T et al. J Am Soc Nephrology 2003;14:S227-32; Li JM et al. Hypertension 2002;40:477-84; Bateller R et al. J Clin Invest 2003;112:1383-94; Darden AG et al. J Bone Mineral Res 1996;11:671-5; Ohshima H et al. Arch Biochem Biophys 2003;417:3-11; Mander P et al. J Neuroinflammation 2005;2:20; Brar SS et al. Am J Physiol Cell Physiol 2002;282:C1212-24; y otros citas a continuación).

20 Por lo tanto, existe un amplio consenso entre los científicos médicos que las estrategias seguras para lograr la inhibición parcial de la actividad de la NADPH oxidasa podrían tener una utilidad considerable para la prevención y/o el tratamiento de un amplio intervalo de trastornos.

25 De hecho, ahora se cree que los efectos beneficiosos de ciertos fármacos de uso común, incluidas las estatinas y los inhibidores de ACE, están mediados en parte por una supresión indirecta de la actividad de la NADPH oxidasa en ciertos tejidos. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone actualmente de fármaco o fitonutriente para uso clínico o dietético que pueda inhibir directamente la actividad de la NADPH oxidasa en la mayoría o en todos los tejidos.

30 Por lo tanto, lo que se necesita es un inhibidor de la NADPH oxidasa que pueda ser fácilmente producido en masa, que se pueda usar para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa, y que pueda usarse para prevenir o tratar afecciones asociadas con la actividad de la NADPH oxidasa.

35 Resumen:

Un aspecto de la invención se refiere a una composición ficoquímica para administración a un sujeto mamífero. La composición ficoquímica tiene una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. La composición ficoquímica comprende una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador farmacéuticamente aceptable y una cápsula que tiene una caja gelatinosa para contener dicha ficobilina aislada. La ficobilina aislada se convierte en una fikorubina cuando se administra a dicho sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, comprendiendo cada ficobilina un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. En una realización preferida adicional, el portador farmacéuticamente aceptable es seco y la cápsula es opcionalmente un gel duro. En otra realización preferida, el portador farmacéuticamente aceptable es líquido y la cápsula es opcionalmente blanda. En otras realizaciones preferidas, la composición ficoquímica comprende además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en ácido fólico, L-arginina, policosanol, isoflavona de soja, extracto de té verde, taurina, coenzima Q10, sal de potasio, magnesio, aceite de pescado, vitamina C, selenio, luteína, zeatantina, zinc, benfotiamina y piridoxamina. Este aspecto de la invención, a saber, cápsulas que contienen una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador farmacéuticamente aceptable, puede ser fabricado fácilmente por personas con conocimientos ordinarios en la técnica adaptando métodos convencionales conocidos dentro de este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

55 Otro aspecto de la invención está dirigido a otra composición ficoquímica para administración a un sujeto mamífero. Sin nuevo, la composición ficoquímica tiene una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, en este aspecto de la invención, la composición ficoquímica comprende una ficobilina aislada mezclada con un material portador farmacéuticamente aceptable o un agente de carga de grado alimenticio y comprimido en un

comprimido. La ficobilina aislada se convierte en una ficorubina cuando se administra al sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa.

5 La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, cada ficobilina incluyendo un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. En otras realizaciones preferidas, la composición ficoquímica comprende además uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en ácido fólico, L-arginina, policosanol, isoflavona de soja, extracto de té verde, taurina, coenzima Q10, sal de potasio, magnesio, aceite de pescado, vitamina C, selenio, luteína, zeaxantina, zinc, benfotiamina y piridoxamina. Este aspecto de la invención, a saber, comprimidos hechos por compresión de una ficobilina aislada mezclada con un material portador farmacéuticamente aceptable o un agente de carga de grado alimenticio, puede ser fabricado fácilmente por personas con conocimientos ordinarios en la técnica adaptando métodos convencionales conocidos en este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición ficoquímica adicional para administración parenteral a un sujeto mamífero. De nuevo, la composición ficoquímica tiene una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, en este aspecto de la invención, la composición ficoquímica comprende una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un solvente estéril fisiológicamente aceptable apropiado para inyección. La ficobilina aislada se convierte en una ficorubina cuando se administra al sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, comprendiendo cada ficobilina un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. El solvente estéril fisiológicamente aceptable apropiado para inyección se puede fabricar por medios convencionales conocidos por los expertos en la técnica y descritos en este documento.

15 Este aspecto de la invención, a saber, una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un solvente estéril fisiológicamente aceptable apropiado para inyección, puede ser fabricado fácilmente por personas con conocimientos ordinarios en la técnica adaptando los métodos convencionales conocidos en este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición ficoquímica para administración tópica a un sujeto mamífero. De nuevo, en este aspecto de la invención, la composición ficoquímica tiene una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, la composición ficoquímica comprende una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador emoliente dermatológicamente aceptable. La ficobilina aislada se convierte en una ficorubina cuando se administra por vía tópica al sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa. La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, cada ficobilina incluyendo un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. En otra realización preferida, la composición ficoquímica sirve como protector solar. Este aspecto de la invención, a saber, una composición tópica hecha de una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador emoliente dermatológicamente aceptable, puede ser fabricada fácilmente por personas con experiencia ordinaria en la técnica adaptando métodos convencionales conocidos dentro de este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición nutracéutica. La composición nutracéutica comprende una sustancia nutriente mezclada con una ficobilina aislada. La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, cada ficobilina incluyendo un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. Este aspecto de la invención, es decir, una composición nutracéutica que tiene una sustancia nutriente mezclada con una ficobilina aislada, puede ser fabricada fácilmente por personas con conocimientos ordinarios en la técnica adaptando los métodos convencionales conocidos dentro de este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición cosmeceútica. La composición cosmeceútica comprende una sustancia cosmética mezclada con una ficobilina aislada. La ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, cada ficobilina incluyendo un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. Este aspecto de la invención, es decir, la composición cosmeceútica comprende una sustancia cosmética mezclada con una ficobilina aislada, puede ser fácilmente fabricada por personas con experiencia ordinaria en la técnica adaptando métodos convencionales conocidos dentro de este campo de acuerdo con la descripción proporcionada en este documento.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición para uso en un método para profilaxis o tratamiento de un sujeto para una afección médica asociada o ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. El método comprende la etapa de administrar una o más ficobilinas aisladas a un sujeto en una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz para la profilaxis o el tratamiento de una afección médica asociada o ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La afección médica se puede seleccionar del grupo que consiste en cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis periférica, aterosclerosis cerebrovascular, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, disfunción eréctil, síndrome metabólico, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, enfisema pulmonar, asma, alergia, osteoporosis, osteoartritis, úlcera gástrica, choque séptico, fibrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, enfermedad de Parkinson, demencia de Alzheimer, daño UV a la piel, cáncer, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, esclerodermia,

angiogénesis patológica, rechazo de trasplante y síndrome de dolor crónico/hiperalgesia. La ficobilina se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, cada ficobilina incluyendo un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada al mismo. La ficobilina se puede administrar por vía oral, parenteral o tópica.

Breve descripción de los dibujos:

5 Las figuras 1A y 1B ilustran la inhibición por un extracto de ficobilina de la NADPH oxidasa en células endoteliales aórticas humanas. Cultivos de células humanas derivadas de endotélio aórtico se incubaron con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 1A) o biliverdina (BVD, Figura 1B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que oscilaban entre 300 nM y 20 μ M. La biliverdina es otro inhibidor conocido de la NADPH oxidasa. La ficocianobilina y la biliverdina ambas mostraron una inhibición dependiente de la dosis de producción de superóxido de NADPH oxidasa. El efecto inhibidor de la ficocianobilina 20 μ M sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células endoteliales de la aorta humana fue equivalente a la de DPI.

20 Las figuras 2A y 2B ilustran la inhibición por un extracto de ficobilina de la NADPH oxidasa en células de músculo liso aórtico humano. Se incubaron cultivos celulares humanos derivados del músculo liso aórtico con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 2A) o biliverdina (BVD, Figura 2B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que oscilaban entre 300 nM y 20 μ M. La biliverdina es otro inhibidor conocido de la NADPH oxidasa. La ficocianobilina y biliverdina ambas mostraron una inhibición dependiente de la dosis de producción de superóxido de NADPH oxidasa. El efecto inhibidor de la ficocianobilina 20 μ M sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células del músculo liso aórtico humano fue equivalente a la de DPI.

30 Las figuras 3A y 3B ilustran la inhibición por un extracto de ficobilina de actividad de la NADPH oxidasa en células mesangiales renales humanas. Los cultivos de células humanas derivadas del tejido mesangial renal se incubaron con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 3A) o biliverdina (BVD, Figura 3B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que oscilaban entre 300 nM y 20 μ M. La biliverdina también funciona para inhibir la NADPH oxidasa, ya que se convierte intracelularmente a bilirrubina. La ficocianobilina y biliverdina ambas mostraron una inhibición dependiente de la dosis de producción de superóxido de NADPH oxidasa. El efecto inhibidor de la ficocianobilina 20 μ M sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células mesangiales renales humanas fue menor que el del DPI, pero fue estadísticamente significativo.

40 Las figuras 4A y 4B ilustran la conversión de biliverdina y ficobilinas en bilirrubina y fícorubinas mediadas por biliverdina reductasa. La figura 4A representa las estructuras químicas homólogas de la biliverdina y las principales ficobilinas: ficocianobilina, fitocromobilina y ficoeritrobilina. La figura 4B representa las estructuras químicas homólogas de la bilirrubina y las fícorubinas: ficocianorubina, fitocromorubina y ficoeritrorubina. Las flechas representan la actividad catalítica de la biliverdina reductasa, presente en células de mamífero.

Descripción detallada:

45 Se describe en este documento que las fícorubinas inhiben directa y potentemente la enzima NADPH oxidasa y que las ficobilinas, cuando se administran a sujetos mamíferos o de otra manera se ponen en contacto con la enzima biliverdina reductasa, se convierten en fícorubinas. De acuerdo con lo anterior, las ficobilinas sirven como profármacos o precursores de fícorubinas y se pueden emplear para la profilaxis o el tratamiento de afecciones médicas asociadas o ligadas a una actividad de la NADPH oxidasa.

50 Las ficobilinas son una familia de compuestos cromóforos que se encuentran en plantas, algas y cianobacterias. Las ficobilinas para uso en este documento se seleccionan entre ficocianobilina, ficoeritrobilina y fitocromobilina. En la naturaleza, las ficobilinas se conjugan covalentemente a apoproteínas; las holoproteínas resultantes, denominadas ficocianinas, funcionan para recoger energía luminosa.

1. Definiciones

55 La NADPH oxidasa se refiere a un complejo enzimático que oxida la forma reducida de fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP), reduciendo al mismo tiempo el oxígeno molecular a superóxido.

Como se define en este documento, el término "aislado" indica que el compuesto o compuestos en cuestión se han purificado sustancialmente lejos del medio en donde el compuesto o compuestos en cuestión se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, en la naturaleza, las ficobilinas se conjugan a apoproteínas en donde las formas conjugadas de apoproteína se denominan ficocianinas.

5 Como se define en este documento, el término "composición ficoquímica" indica una composición que se deriva de una planta o fruta.

Como se define en este documento, el término "composición nutracéutica" indica un alimento procesado para el que se reivindica un efecto medicinal sobre la salud humana o, alternativamente, composición que tiene un componente químico presente en un alimento convencional.

10 Como se define en este documento, el término "sustancia nutriente" indica un componente químico presente en un alimento convencional y que tiene un valor nutricional.

Como se define en este documento, el término "composición cosmética" indica un cosmético para el que se reivindica un efecto medicinal o un beneficio similar al fármaco sobre la salud humana.

15 Como se define en este documento, el término "sustancia cosmética" indica cualquier componente químico funcional presente en un cosmético convencional que imparte una propiedad cosmética.

Como se define en este documento, el término "administración tópica" indica cualquier modo de administración en donde se aplica una sustancia bioactiva a la piel.

20 Como se define en este documento, el término "portador emoliente" indica cualquier portador o ungüento capaz de transportar una sustancia y que se aplica externamente a la piel para suavizar o calmar la piel. A menudo, el "portador emoliente" suaviza o alivia la piel evitando o retardando la pérdida de agua. La mayoría de los aceites naturales realizan esta función. Para una revisión de técnicas convencionales para la fabricación de portadores emolientes que se pueden utilizar con la presente invención, véase: Nair B. "Cosmetic Ingredients Review Expert Panel. Final report..." International Journal of Toxicology. 22 Suppl 2:11-35, 2003.

25 Como se define en este documento, el término "protector solar" indica cualquier sustancia que ayuda a proteger la piel de los rayos nocivos del sol mediante la reflexión, absorción y/o dispersión tanto de la radiación ultravioleta A como de la radiación B.

30 Como se define en este documento, el término "cápsula" indica cualquier estructura empleada en la fabricación de productos farmacéuticos para encerrar una sustancia bioactiva en una envoltura relativamente estable, permitiéndoles tomar, por ejemplo, por vía oral o utilizarse como un supositorio. Los dos tipos principales de cápsulas son cápsulas de cubierta dura, que se utilizan normalmente para ingredientes secos, en polvo y cápsulas de cubierta blanda, utilizadas principalmente para aceites y para ingredientes activos que se disuelven o suspenden en aceite. Ambas clases de cápsulas tienen un caso gelatinoso, hecho de gelatina o de sustancias gelificantes vegetales como carragenanos y/o formas modificadas de almidón, celulosa y sustancias funcionalmente equivalentes. Para una revisión de las técnicas convencionales de encapsulación que se pueden emplear para poner en práctica la invención descrita en este documento, véase Bill Bennett and Graham Cole (2003). Pharmaceutical Production, an Engineering Guide. IChemE, 126-129.

40 Como se define en este documento, el término "comprimido" indica cualquier mezcla de sustancias activas y excipientes, en polvo, prensada o compactada en un sólido por medios convencionales. Los excipientes incluyen aglutinantes, deslizantes (auxiliares de flujo) y lubricantes para asegurar una compresión eficiente; desintegrantes para asegurar que el comprimido se rompa en el tracto digestivo; edulcorantes o sabores para enmascarar el sabor de los ingredientes activos de mal gusto; y pigmentos para hacer los comprimidos no recubiertos visualmente atractivos. Se puede aplicar un recubrimiento para ocultar el sabor de los componentes del comprimido, para hacer el comprimido más liso y más fácil de tragar, y para hacerlo más resistente al medio ambiente, prolongando su vida útil.

45 Como se define en este documento, el término "solución estéril fisiológicamente aceptable apropiada para inyección" indica cualquier solución que sea inofensiva cuando se inyecta en un sujeto humano y que es capaz de transportar y suministrar una sustancia bioactiva de interés.

50 Las ficocianinas se digieren, o se digieren parcialmente (por ejemplo, con tripsina u otra proteasa), formando péptidos libres y péptidos conjugados a las ficobilinas, en donde las ficobilinas conjugadas con péptidos sustancialmente purificadas son útiles de acuerdo con la presente invención. En la presente divulgación aislada significa que la composición de ficobilina aislada no incluye ficobilinas conjugadas con todo el polipéptido de la apoproteína a la que las ficobilinas se encuentran conjugadas en la naturaleza (excepto en trazas, en una realización). Con respecto a los conjugados peptídicos de ficobilina, el péptido tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos. En una realización con respecto a los conjugados peptídicos de ficobilina, el péptido tiene 75 aminoácidos de longitud o menos. En una realización con respecto a los conjugados peptídicos de ficobilina, el péptido tiene 50 aminoácidos de longitud o menos.

En una realización con respecto a conjugados de ficobilina de péptido, el péptido tiene 25 aminoácidos de longitud o menos. En una realización con respecto a conjugados de ficobilina de péptido, el péptido tiene 10 aminoácidos de longitud o menos.

5 Sustancialmente purificado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden al menos un quince por ciento o más del peso seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, sustancialmente purificado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden al menos veinticinco por ciento o más del peso en seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, aislado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden cincuenta por ciento o más del peso seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, el término aislado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden el setenta y cinco por ciento o más del peso seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, aislado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden noventa por ciento o más del peso seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, el término aislado indica que el compuesto o compuestos en cuestión comprenden noventa y cinco por ciento o más del peso seco de una composición que contiene el compuesto o compuestos en cuestión. En una realización, aislado indica que el compuesto o compuestos en cuestión son esencialmente puros.

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en un cinco por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en un diez por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en quince por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en veinte por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en veinticinco por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en treinta por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en un cuarenta por ciento o más. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en cincuenta por ciento o más.

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es de 1 mg a 5000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es de 1 mg a 2000 mg de uno o más conjugados péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es de 1 mg a 1000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es de 100 mg a 5000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es de 100 mg a 2000 mg de uno o más conjugados péptido-ficobilina administrados al día.

En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en cincuenta por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en un diez por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en quince por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en veinte por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en veinticinco por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en treinta por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en un cuarenta por ciento o más. En una realización, una cantidad profiláctica es una cantidad que inhibe la actividad de la NADPH oxidasa en cincuenta por ciento o más.

En una realización, una cantidad profiláctica es de 1 mg a 5000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad profiláctica es de 1 mg a 2000 mg de uno o más conjugados péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad profiláctica es de 1 mg a 1000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad profiláctica es de 100 mg a 5000 mg de uno o más conjugados de péptido-ficobilina administrados al día. En una realización, una cantidad profiláctica es de 100 mg a 2000 mg de uno o más conjugados péptido-ficobilina administrados al día.

Una condición es cualquier enfermedad, trastorno, síndrome médico o similar.

2. La bilirrubina es un inhibidor de la actividad de la oxidasa de NADPH y es útil en el tratamiento y/o profilaxis de las condiciones ligadas al estrés oxidativo producido a partir de la actividad de la oxidasa de NADPH.

Un inhibidor fisiológico de la NADPH oxidasa es la bilirrubina (Lanone S et al., FASEB J 2005;19:1890-2; Matsumoto H et al., Mol Cell Biochem 2006; Apr 20 epub; Jiang F et al., Hypertension 2006;48:1-8) que se produce en el cuerpo mediante la reducción de biliverdina por la enzima biliverdina reductasa. La biliverdina, a su vez, es producida por la actividad de hemo oxigenasa que convierte hemo en biliverdina, monóxido de carbono y el hierro ferroso libre.

La potente actividad inhibidora de la bilirrubina sobre la NADPH oxidasa -observada en las concentraciones intracelulares nanomolares- se refleja en numerosos estudios epidemiológicos que correlacionan el aumento de los niveles séricos de bilirrubina libre con riesgo reducido de enfermedad aterosclerótica y cáncer (Schwertner HA et al., Clin Chem 1994;40:18-23; Novotny L et al., Exp Biol Med 2003;228:568-71; Temme EH et al., Cancer Causes Control 2001;12:887-94; Zucker SD et al., Hepatology 2004;40:827-35; Ching S et al., J Nutr 2002;132:303-6). Por ejemplo, en la variante genética humana conocida como síndrome de Gilbert, la reducción de la expresión de la UDP-glucuronosiltransferasa hepática tipo 1A1 (el mediador primario de la conjugación de la bilirrubina) conduce a un aumento de la bilirrubina sérica libre de varios veces, se asocia con un riesgo marcadamente inferior de enfermedad coronaria (Vitek L, et al., Atherosclerosis 2002;160:449-56; Vitek L, et al., Cerebrovascular Dis 2006;21:408-14). Además, los polimorfismos de alta expresión del gen heme oxigenasa-1 (HO-1, una forma inducible de heme oxigenasa) están ligados a un menor riesgo de trastornos en los que los oxidantes desempeñan un papel patógeno clave, reflejando la protección proporcionada por el aumento de los niveles tisulares de la bilirrubina en condiciones que incluyen enfermedades vasculares, cáncer y patologías ligadas a la inflamación (Shibahara S, Tohoku J Exp Med 2003; 200:167-86; Exner M et al., Free Radical Biol Med 2004;37:1097-1104; Kikuchi A et al., Hum Genet 2005;116:354-60). Sorprendentemente, los polimorfismos de alta expresión de HO-1 se han relacionado con el aumento de la longevidad general en la población japonesa (Yamaya M et al., J Med Genet 2003;40:146-80). Estas observaciones sugieren que la inhibición parcial de la actividad de la NADPH oxidasa es útil en el tratamiento y/o profilaxis de condiciones relacionadas con el estrés oxidativo resultante de la actividad de la NADPH oxidasa.

La biliverdina es mucho más soluble que la bilirrubina, y dentro del cuerpo se convierte eficientemente en bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa expresada de forma ubicua (Baranano DE et al., Proc Natl Acad Sci 2002;99:16093; Sedlak TW et al., Pediatrics 2004;113:1776-82). Debido a su solubilidad, la biliverdina tiene una biodisponibilidad mayor que la bilirrubina tras la administración oral, y de hecho la biliverdina oral ha mostrado intrigantes efectos fisiológicos en estudios de roedores que probablemente están mediados por la inhibición de la NADPH oxidasa (Nakao A et al., Circulation 2005;112:587-91; Sarady-Andrews JK et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;289:L1131-7; Rodella L et al., Free Radic Biol Med 2006;40:2198-205; Yamashita K et al., FASEB J 2004;18:765-7; Nakao A et al., Gastroenterology 2004;127:595-606; Fondevila C et al., Hepatology 2004;40:1333-41; Nakao A et al., Am J Transplant 2005;5:282-91; Berberat PO et al., Inflamm Bowel Dis 2005;11:350-9; Ollinger R et al., Circulation 2005;112:1030-9).

La producción endógena diaria de bilirrubina es del orden de 300-400 mg (Meyer UA, Schweiz Med Wochenschr 1975;105:1165-8). La administración de bilirrubina exógena y/o biliverdina se podría utilizar para inhibir adicionalmente la actividad de la NADPH oxidasa más y por encima de la inhibición observada por la bilirrubina endógena y/o biliverdina y, por lo tanto, se podría utilizar para tratar o prevenir condiciones asociadas con la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, hay una oferta limitada comercial de bilirrubina y biliverdina, ya que la bilirrubina se deriva actualmente de la bilis del buey, y la biliverdina es producida por la síntesis orgánica compleja y costosa. En otras palabras, biliverdina se produce ya sea por síntesis nueva, o por oxidar la bilirrubina preexistente. Esta última estrategia hace poco para que la biliverdina sea comercialmente factible, ya que depende de la escasa bilirrubina.

Los presentes inventores han observado que las ficobilinas son análogos estructurales estrechos de biliverdina, lo que refleja el hecho de que las ficobilinas se derivan biosintéticamente de la biliverdina o mediante la oxidación de la bilirrubina (véase la Figura 4). Además, los inventores encontraron evidencia de que las ficobilinas son buenos sustratos para la biliverdina reductasa, que los convierte en compuestos conocidos como fikorubinas que son análogos estrechos de la bilirrubina (Terry MJ et al., J Biol Chem 1993;268:26099-106).

Los inventores descubrieron, en parte, que las fikorubinas administradas como sus precursores de ficobilina a células de mamífero (que contienen biliverdina reductasa) inhiben la actividad de la NADPH oxidasa celular. Este descubrimiento se demuestra por los datos presentados a partir de estudios de cultivo celular en las figuras 1, 2 y 3.

Por lo tanto, las ficobilinas son útiles para inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno en células y tejidos de mamíferos y son útiles para prevenir y/o tratar cualquier condición asociada con la actividad de la NADPH oxidasa.

Además, en la medida en que las ficobilinas constituyen hasta 1% del peso seco de ciertas cianobacterias tales como Spirulina (Patel A et al., Protein Express Purification 2005;40:248-55), su producción a granel es práctica.

Al igual que la bilirrubina, la biliverdina y cientos de otros ficoquímicos, se ha informado que las ficobilinas actúan como eliminadores de oxidantes versátiles en sistemas libres de células (Hirata T et al., J Appl Phycology 2000; 12:435-9). Sin embargo, no hay informes o sugerencias anteriores de que las ficobilinas puedan inhibir la NADPH oxidasa. De hecho, de acuerdo con los conocimientos de los inventores, no se han realizado estudios previos en los que se hayan administrado ficobilinas aisladas a humanos, animales o cultivos de células de mamíferos. Además, no ha habido sugerencias anteriores de que ficobilinas aisladas podrían ser utilizadas en suplementos dietéticos, alimentos funcionales o cosméticos.

Las plantas no tienen biliverdina reductasa. Las células y tejidos de mamíferos expresan universalmente la biliverdina reductasa.

3. Composiciones de ficobilina

5 Las composiciones de ficobilina se pueden fabricar de cualquier manera que se conoce en la técnica (incluyendo, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, emulsión, encapsulación, atrapamiento, liofilización o suspensión). Se prefiere que la fabricación esté de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación, cuyos procedimientos y regulaciones son conocidos en la técnica. En una realización, la ficobilina es de grado alimenticio. En una realización, la ficobilina es de calidad alimentaria humana.

10 En ciertas realizaciones, la composición de ficobilina se fabrica para incluir adicionalmente un portador, excipiente, auxiliar, conservante u otro ingrediente farmacéuticamente aceptable (denominado colectivamente en este documento como un "portador farmacéuticamente aceptable"). El término "portador" se refiere en este documento a un "portador farmacéuticamente aceptable" e incluye agentes de carga de grado alimenticio. Preferiblemente, un portador farmacéuticamente aceptable es apropiado para la administración a un mamífero humano o no humano. Se pueden encontrar más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA).

15 Los portadores fluidos pueden incluir soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones reguladoras fisiológicamente compatibles (por ejemplo, solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente estandarizada). Los portadores fluidos también incluyen suspensiones no acuosas y oleosas. Los solventes o vehículos lipófilos apropiados pueden incluir aceites grasos (por ejemplo, aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, oleato de etilo, triglicéridos o liposomas). Los liposomas útiles incluyen liposomas catiónicos, liposomas aniónicos y liposomas con densidad de carga neutra. Se pueden incluir agentes potenciadores de la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano). También se pueden incluir estabilizadores, adhesivos o agentes que aumentan la solubilidad. Ingredientes inertes adicionales pueden incluir cualquiera o todos de goma arábiga, jarabe, lanolina o almidón. Otro excipiente que puede usarse es polietilenglicol (PEG). El PEG se puede mezclar con la formulación o estar unido a la propia molécula de ficobilina. El PEG puede ser útil, por ejemplo, como agente deshidratante o concentrador. De acuerdo con lo anterior, los portadores pueden ser acuosos, no acuosos (hidrófobos) o anfífilos. Los portadores de liberación retardada y/o de liberación sostenida, y las formulaciones farmacéuticas de los mismos, son conocidos en la técnica y pueden usarse en las realizaciones de la presente memoria, a la luz de la presente divulgación.

25 La composición de ficobilina se puede proporcionar como una sal y se puede formar con un ácido (por ejemplo, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico y similares). En otra realización, la composición de ficobilina puede ser un polvo liofilizado que preferiblemente se combina con una solución reguladora antes de su uso.

30 La ficobilina se puede incorporar en una base de loción, base de máscara facial, base de champú, base de acondicionador, base de tóner para la piel u otra base cosmética para formar un cosmético que comprende una ficobilina (o ficobilina aislada). El cosmético que contiene la ficobilina es útil, por ejemplo, para reducir el daño oxidativo del cabello, la piel y similares.

4. Administrar una composición de ficobilina

35 Las composiciones de ficobilina se pueden administrar por cualquier vía deseable que incluye, pero no se limita a, vía oral, intravenosa, intramuscular, nasal, intratraqueal, intraarticular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intratumoral, enteral, tópica, sublingual, vaginal o rectal. A la luz de la presente invención, el experto en la técnica es capaz de seleccionar una ruta apropiada para administrar una composición de ficobilina a un sujeto.

40 5. Dosificación de una composición de ficobilina

A la luz de la presente invención y del conocimiento en la técnica, la determinación de una dosis eficaz de una composición de ficobilina está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

45 Una dosis o rango terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales; usualmente en ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o primates no humanos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración preferido y la vía de administración. Dicha información puede usarse entonces para seleccionar las dosis y rutas preferidas para la administración en seres humanos.

50 La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares, animales de experimentación u otros sistemas de modelo de trasplante. Por ejemplo, se puede determinar la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) en un sistema modelo. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la relación, LD50/ED50. Se prefieren composiciones de ficobilina que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos del (de los) sistema(s) modelo se utilizan en la formulación de un intervalo de dosis para uso humano. La dosificación contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED50 con baja toxicidad o, más preferiblemente, esencialmente sin toxicidad. De acuerdo con lo anterior, la dosificación de la composición de ficobilina que se usa en un sujeto se determina preferiblemente por el médico, a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento.

La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la(s) unidad(es) estructural(es) activa(s) (por ejemplo, concentración circulante y/o local) o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso, el género, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación de fármacos, la sensibilidad a la reacción, la tolerancia a la terapia y la respuesta a la terapia.

Los siguientes ejemplos pretenden explicar adicionalmente realizaciones de la invención sin limitar la invención.

Consideraciones de dosis: Comparaciones con espirulina y ficocianobilina:

La ficocianina constituye aproximadamente el 14% del peso seco total de la espirulina; la ficocianobilina (PCB) representa aproximadamente el 4.7% de la masa de la ficocianina (Padyana AK, et al., Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 April 13;282(4):893-8.). De ello se desprende que aproximadamente 0.66% de la masa seca de espirulina es PCB. En otras palabras, 15 g de espirulina - aproximadamente una cucharada colmada- contiene aproximadamente 100 mg de PCB.

Asumiendo que la absorción y el metabolismo de la PCB unida a la espirulina es similar en roedores y humanos, entonces los regímenes de dosis clínicamente útiles de espirulina (y quizás PCB) se pueden estimar extrapolando de regímenes que demuestran eficacia antioxidante en roedores. Dicha extrapolación de dosis se puede realizar directamente sobre una base de mg/kg. Sin embargo, en la práctica clínica, la dosis se ajusta a menudo por el área superficial relativa del cuerpo, que corresponde a la potencia 2/3 de la relación de pesos corporales. Evidentemente, esta última norma produce un factor de corrección mucho más bajo. Un compromiso comúnmente empleado entre estas dos normas es ajustar la dosis por la 3/4 de la potencia de la relación de pesos corporales; esto se ha encontrado para ofrecer un "mejor puño" cuando se extrapolan varios parámetros metabólicos cuantificables entre especies de mamíferos. (Travis CC. Interspecies extrapolation in risk analysis. *Ann Ist Super Sanita* 1991;27(4):581-93; Darveau CA, et al., Allometric cascade as a unifying principle of body mass effects on metabolism. *Nature* 2002 May 9;417(6885):166-70; Lindstedt L, et al. Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals. *Lab Anim* 2002 January;36(1):1-19). El estándar de potencia 3/4 produce un factor de corrección de aproximadamente 80 si se compara una rata de 200 g con un humano de 70 kg; o un factor de 450 si se compara un ratón de 20 g con un humano de 70 kg. (En otras palabras, si una rata recibe x mg de un agente, la dosis humana correspondiente sería de 80x mg). En una extensa serie de investigaciones, Romay y colegas han informado que la ficocianina oral administrada por vía oral a ratones y ratas ejerce una serie de efectos antiinflamatorios dependientes de la dosis en un intervalo de dosis de 50-300 mg/kg/día. (Romay C, et al., Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998 January;47(1):36-41; Romay C, et al., Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. *Arzneimittelforschung* 2001 September; 51(9):733-6; Romay C, et al., C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci* 2003 June;4(3):207-16; Rimbau V, et al., Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1999 December 3;276(2):75-8). Esto equivale a una ingesta de PCB de 2.35-14.1 mg/kg. Si se extrapola en una base de mg/kg, esto corresponde a una ingesta diaria de 165-990 mg en un humano de 70 kg. La extrapolación por los 3/4 de potencia estándar da a las ingestiones diarias de humanos de 21.2-127 mg (utilizando ratones) y 37.6-226 mg (utilizando ratas).

Estudios recientes en los que la espirulina entera se ha administrado por vía oral a roedores también han mostrado efectos antiinflamatorios, en dosis que van desde 150-1.000 mg/kg/día. (Remirez D, et al., Inhibitory effects of *Spirulina* in zymosan-induced arthritis in mice. *Mediators Inflamm* 2002 April;11(2):75-9; Rasool M, et al., Anti-inflammatory effect of *Spirulina fusiformis* on adjuvant-induced arthritis in mice. *Biol Pharm Bull* 2006 December; 29(12):2483-7; Chamorro G, et al., *Spirulina* máxima pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Nutr Neurosci* 2006 October;9(5-6):207-12; Khan M, et al., Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* 2005 December; 19(12):1030-7; Mohan IK, et al., Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by *Spirulina* in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 December;58(6):802-8; Khan M, et al., *Spirulina* attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2006 September; 26(5):444-51) Esto equivale a ingestas de 1-6.6 mg/kg/día de PCB. Extrapolando sobre la base del peso relativo, esto corresponde a una ingesta de 70-462 mg de PCB en un humano de 70 kg. Extrapolando sobre la base del estándar de potencia 3/4, esto corresponde a una ingesta de 9-59 mg (estudios en ratones) o 16-106 mg (estudios en ratas). Los síndromes en los que la espirulina demostró tener protección incluyeron artritis adyuvante, parkinsonismo inducido por MPTP, cardiomiopatía inducida por doxorubicina y nefropatía mediada por cisplatino y ciclosporina; es poco probable que sea una coincidencia que la activación de la NADPH oxidasa ha demostrado ser un mediador clave de cada uno de estos síndromes. (Bart BA, et al., The newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin inhibits joint-swelling in rat collagen arthritis. *Agents Actions Suppl* 1991;32:179-84; van Lent PL, et al., NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(4):R885-R895; Miesel R, et al., Antiinflammatory effects of NADPH oxidase inhibitors. *Inflammation* 1995 June;19(3):347-62; Hougee et al., Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2006 February 15;531(1-3):264-9.)

Como se ha indicado, una cucharada colmada de espirulina contiene aproximadamente 100 mg de PCB. Por lo tanto, un régimen de dos cucharadas colmadas por día - posiblemente el mayor consumo que sería factible a largo plazo con pacientes bien motivados - proporcionaría alrededor de 200 mg de PCB al día. Esta ingesta está así dentro - y en algunos casos más allá - de los intervalos de dosis extrapolados anotados anteriormente. Debe seguirse esto -
 5 asumiendo que los seres humanos digieren y metabolizan la PCB unida a la espirulina como los roedores - una ingesta diaria de 2 cucharadas de espirulina diariamente debe tener actividad antioxidante clínicamente útil en los seres humanos. Mientras que podría ser clínicamente factible utilizar espirulina entera como una estrategia para inhibir la NADPH oxidasa, esto implica dificultades prácticas debido a granel y al olor y sabor sucio de las dosis altas de espirulina requeridas. Por lo tanto, existe una necesidad de suplementos que proporcionan ficobilinas aisladas.

10 Ejemplos

1. Preparación de composiciones de ficobilina

La ficocianobilina se preparó a partir de 20 gramos de algas secas de espirulina, utilizando extracción en metanol caliente como se ha descrito anteriormente (O Carra P et al., *Phytochemistry* 1966;5:993-7). Las algas se extrajeron tres veces con metanol a temperatura ambiente para eliminar clorofila y carotenoides. Después de la filtración, el sólido, que aún retenía la ficocianobilina unida a proteína, se transfirió a un matraz de 250 ml, se suspendió en metanol (160 ml) que contiene ácido ascórbico (1.6 g) y se agitó a 60°C. En estas condiciones, la metanólisis fracciona gradualmente los enlaces tioéter que unen la ficocianobilina a la apoproteína de la ficocianina. Después de 8 hr, el extracto filtrado se evaporó bajo presión reducida a 40°C. El residuo se disolvió en un volumen pequeño de metanol y se adicionó en acetato de etilo/hexano (1/1); la fase orgánica se extrajo tres veces con HCl 0.1 N. Los extractos de ácidos combinados se lavaron con acetato de etilo/hexano (1/1) y se neutralizaron con acetato de sodio sólido; el pigmento azul se extrajo tres veces en acetato de etilo/hexano, y los extractos combinados se lavaron con acetato de sodio al 1%. Luego el pigmento azul se volvió a extraer de la fase orgánica en HCl 0.1 N y finalmente se extrajo en cloroformo (50 ml x 2). Los extractos de cloroformo se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a presión reducida a 40°C. El residuo oleoso se disolvió en un volumen pequeño de acetato de etilo, se transfirió a un vial (4 ml) y se trató con un exceso de hexano. El pigmento precipitado se centrifugó y el sedimento se volvió a disolver en un volumen pequeño de acetato de etilo y se precipitó de nuevo con un exceso de hexano. Después de la centrifugación, el gránulo se secó a alto vacío. Se obtuvieron 12 mg de ficocianobilina, esencialmente pura.

La muestra de ficocianobilina obtenida se analizó utilizando un sistema de HPLC Waters 600E: columna C8 (Varian), como fase móvil acetonitrilo/fosfato de amonio (0.1 M, pH 2.5), y la detección fue a 375 nm. El análisis mostró un producto principal de la ficocianobilina.

2. El extracto de ficobilina inhibe la NADPH oxidasa en células endoteliales aórticas humanas.

Se incubaron cultivos celulares humanos derivados de endotelio aórtico con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 1A) o biliverdina (BVD, Figura 1B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que varían de 300 nM a 20 µM. La biliverdina es otro inhibidor conocido de la NADPH oxidasa. La ficocianobilina y biliverdina ambas mostraron una inhibición dependiente de la dosis de producción de superóxido de NADPH oxidasa. El efecto inhibitorio de la ficocianobilina 20 µM sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células endoteliales de la aorta humana fue equivalente a la de DPI.

Experimental: Se adquirieron células endoteliales aórticas humanas de Clonetics® (East Rutherford, NJ). La célula endotelial se cultivó en un medio basado en células endoteliales (Clonetics®) suplementado con hFGFB, BEGF, IGF-1, ácido ascórbico hEGF, hidrocortisona y suero fetal bovino al 2%. En los experimentos se utilizaron las células del segundo al quinto pasaje. La producción celular de anión superóxido se determinó por el método de lucigenina. Para los experimentos, las células se separaron con tripsina/EDTA y se volvieron a suspender en solución reguladora HEPES modificada que contiene NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0.8 mM, CaCl₂ 1.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, HEPES 25 mM y glucosa al 1% (pH 7.2) y se incubaron con o sin diversas concentraciones de ficocianobilina (PCB) o biliverdina (BVD) de 300 nM a 20 µM durante 1 h. Inmediatamente antes del registro, se adicionaron NADPH (100 µM) y lucigenina adaptada a la oscuridad (5 µM) a la suspensión celular. La emisión de luz se registró cada minuto durante 20 min y se expresó como media arbitraria unidad de luz/min. Los experimentos se realizaron por triplicado. En experimentos con inhibición de NAD(P)H oxidasa, se adicionó cloruro de difenilnyodonio (DPI, 10⁻⁵ M), un inhibidor de NAD(P)H oxidasa, 10 min antes de la adición de NADPH y registro de quimioluminiscencia. Este es el primer experimento para ver el efecto de la ficocianobilina purificada sobre la actividad de la NADPH oxidasa utilizando células endoteliales aórticas humanas.

3. El extracto de ficobilina inhibe la NADPH oxidasa en células del músculo liso aórtico humano.

Se incubaron cultivos celulares humanos derivados del músculo liso aórtico con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 2A) o biliverdina (BVD, Figura 2B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que oscilaban entre 300 nM y 20 μ M. La biliverdina es otro inhibidor conocido de la NADPH oxidasa. La ficocianobilina y biliverdina ambos mostraron una dosis-dependiente de la inhibición de la NADPH oxidasa superóxido producción. El efecto inhibidor de 20 μ M ficocianobilina sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células del músculo liso aórtico humano fue equivalente a la de DPI.

Experimental: Se adquirieron células de músculo liso aórtico humano de Clonetics[®] (East Rutherford, NJ). Las células de músculo liso se cultivaron en un medio de crecimiento de células musculares lisas (Clonetics[®]) que contiene suero fetal bovino al 5%. En los experimentos se utilizaron las células del segundo al quinto pasaje. La producción celular de anión superóxido se determinó por el método de lucigenina. Para los experimentos, las células se separaron con tripsina/EDTA y se volvieron a suspender en solución reguladora HEPES modificada que contiene NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0.8 mM, CaCl₂ 1.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, HEPES 25 mM y glucosa al 1% (pH 7.2) y se incubaron con o sin diversas concentraciones de ficocianobilina (PCB) o biliverdina (BVD) de 300 nM a 20 μ M, durante 1 h. Inmediatamente antes del registro, se adicionaron NADPH (100 μ M) y lucigenina (5 μ M) adaptada a la oscuridad a la suspensión celular. La emisión de luz se registró cada minuto durante 20 min y se expresó como media arbitraria unidad de luz/min. Los experimentos se realizaron por triplicado. En experimentos con inhibición de NAD(P)H oxidasa, se adicionó cloruro de difenilnyodonio (DPI, 10⁻⁵ M), un inhibidor de NAD(P)H oxidasa, 10 min antes de la adición de NADPH y registro de quimioluminiscencia. Este es el primer experimento para ver el efecto de la ficocianobilina purificada sobre la actividad de la NADPH oxidasa utilizando células de músculo liso aórtico humano.

4. El extracto de ficobilina inhibe la NADPH oxidasa en células mesangiales renales humanas.

Se incubaron cultivos de células humanas derivadas de tejido mesangial renal con NADPH para inducir la producción de superóxido por NADPH oxidasa celular. La producción de superóxido se cuantificó mediante quimioluminiscencia de lucigenina. La lucigenina es un detector específico de superóxido. Se demostró que el difenilnyodonio (DPI), un inhibidor conocido de la NADPH oxidasa, inhibe completamente la producción de superóxido en exceso inducida por la NADPH adicionada. Se adicionaron ficocianobilina (PCB, Figura 3A) o biliverdina (BVD, Figura 3B) a los cultivos celulares tratados con NADPH en concentraciones que oscilaban entre 300 nM y 20 μ M. La biliverdina es otro inhibidor conocido de la NADPH oxidasa. La ficocianobilina y biliverdina ambas mostraron una inhibición dependiente de la dosis de producción de superóxido de NADPH oxidasa. El efecto inhibidor de la ficocianobilina 20 μ M sobre la actividad de la NADPH oxidasa en las células mesangiales renales humanas fue menor que el del DPI, pero fue estadísticamente significativo

Experimental: Se adquirieron células mesangiales humanas de Clonetics[®] (East Rutherford, NJ). Las células de músculo liso se cultivaron en un medio de cultivo de células mesangiales (Clonetics[®]) que contiene suero fetal bovino al 5%. En los experimentos se utilizaron las células del segundo al quinto pasaje. La producción celular de anión superóxido se determinó por el método de lucigenina. Para los experimentos, las células se separaron con tripsina/EDTA y se volvieron a suspender en solución reguladora HEPES modificada que contiene NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0.8 mM, CaCl₂ 1.8 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, HEPES 25 mM y glucosa al 1% (pH 7.2) y se incubaron con o sin diversas concentraciones de ficocianobilina (PCB) o biliverdina (BVD) de 300 nM a 20 μ M durante 1 h. Inmediatamente antes del registro, se adicionaron NADPH (100 μ M) y lucigenina adaptada a la oscuridad (5 μ M) a la suspensión celular. La emisión de luz se registró cada minuto durante 20 min y se expresó como media arbitraria unidad de luz/min. Los experimentos se realizaron por triplicado. En experimentos con inhibición de NAD(P)H oxidasa, se adicionó cloruro de difenilnyodonio (DPI, 10⁻⁵ M), un inhibidor de NAD(P)H oxidasa, 10 min antes de la adición de NADPH y registro de quimioluminiscencia. Este es el primer experimento para ver el efecto de la ficocianobilina purificada sobre la actividad de la NADPH oxidasa utilizando células mesangiales renales humanas.

Condiciones médicas asociadas o relacionadas con una actividad de la NADPH Oxidasa:

La cardiopatía isquémica está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La activación de la NADPH oxidasa en células endoteliales, células de músculo liso vascular y macrófagos intimaes juega un papel central en la inducción de la aterosclerosis coronaria que subyace a este síndrome. Se sabe que numerosos factores de riesgo para la cardiopatía isquémica -incluyendo niveles elevados de colesterol LDL, proteína C reactiva y homocisteína, así como hipertensión arterial- activan la NADPH-oxidasa en las células endoteliales vasculares. El aumento resultante en el estrés oxidante estimula la inflamación de la íntima, en parte aumentando la activación de NF-kappaB en células endoteliales, y también antagonizando la actividad antiinflamatoria, antihipertrófica y antitrombótica protectora del óxido nítrico. El estrés oxidante vascular también promueve la oxidación de LDL. De acuerdo con la potencial actividad anti-aterosclerótica de las ficobilinas, se ha informado que la alimentación de ficocianina a hamsters alimentados con colesterol inhibe considerablemente la producción de vetas grasas arteriales. Además, la enfermedad coronaria parece ser relativamente rara en personas con síndrome de Gilbert (una variante genética caracterizada por niveles plasmáticos elevados de bilirrubina libre). Existe un amplio acuerdo entre científicos expertos en enfermedad coronaria

que la inhibición farmacológica de la NADPH oxidasa tiene un potencial considerable para la prevención y el tratamiento de este síndrome. (Soccio M et al., *Eur J Clin Invest* 2005;35:305-14; Cai H et al., *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:471-8; Rueckschloss U et al., *Antiox Redox Signal* 2003;5:171-80; Griendling KK et al., *Circ Res* 2000;86:494-501; Meyer JW et al., *FEBS Lett* 2000;472:1-4; Riss J, et al., *J Agric Food Chem* 2007;55:7962-7; Vitek L, et al., *Atherosclerosis* 2002;160:449-56; Vitek L, et al., *Cerebrovasc Dis* 2006;21:408-14).

El infarto de miocardio está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. Aunque la activación del NADPH contribuye evidentemente al riesgo de infarto de miocardio mediante la promoción de la aterosclerosis coronaria que es una condición previa para este síndrome, también puede contribuir al infarto de forma más aguda promoviendo la inestabilidad de la placa (reflejando, en parte, la activación de las enzimas proteolíticas derivadas de macrófagos por oxidantes) y agregación plaquetaria. La activación de la NADPH oxidasa en las plaquetas contribuye al proceso de agregación, y el superóxido derivado de la NADPH oxidasa del endotelio también promueve la agregación plaquetaria menos directamente antagonizando la actividad estabilizadora de plaquetas del óxido nítrico. Además, se sabe que la activación de la NADPH oxidasa tanto en el endotelio como en las células inflamatorias infiltrantes es un mediador del daño de isquemia-reperusión que promueve la muerte de células miocárdicas en la zona infartada. (Channon KM, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1751-2; Rupin A et al., *Cardiovascular Res* 2004;63:323-30; Chlopicki S et al., *Antiox Redox Signal* 2004;6:691-8; Herkert O et al., *Antiox Redox Signal* 2004;6:765-76)

El accidente cerebrovascular está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. Aunque la activación de la NADPH oxidasa en las arterias cerebrovasculares contribuye de manera importante al remodelado estructural de estas arterias que contribuye a la génesis del accidente cerebrovascular isquémico y posiblemente hemorrágico, la activación de la NADPH oxidasa dentro del tejido cerebral infartado así como la infiltración de leucocitos también potencian la pérdida de neuronas cerebrales y la incapacidad funcional que resulta. Por lo tanto, en roedores que son genéticamente deficientes en actividad de la NADPH oxidasa, o que son pretratados con fármacos inhibidores de la NADPH oxidasa tales como apocinina o estatinas, el daño al tejido cerebral observado después de la inducción temporal de isquemia es notablemente menos grave. También es probable que la activación de la NADPH oxidasa en las plaquetas contribuya a la formación de trombos que desencadenan el accidente cerebrovascular isquémico. (Walder CE et al., *Stroke* 1997;28:2252-8; Wang Q et al., *Brain Res* 2006;1090:182-9; Miller AA et al., *Brain Res* 2006;1111:111-6; Hong H et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; Jun 9 epub)

La aterosclerosis periférica y cerebral está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Si bien la activación de la NADPH oxidasa es claramente un mediador importante de la aterogénesis coronaria, también es un mediador clave de la aterogénesis en las arterias periféricas - como comúnmente se encuentran en los diabéticos y los fumadores - y en las arterias cerebrales. (Meyer JW et al., *FEBS Lett* 2000;472:1-4)

La hipertrofia ventricular izquierda está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Durante el proceso de hipertrofia ventricular izquierda (LVH), la NADPH oxidasa se activa en los cardiomiocitos, así como en las células endoteliales vasculares. Existen pruebas convincentes de que el estrés oxidante resultante desempeña un papel crucial en la activación de vías de señalización intracelulares que promueven la hipertrofia cardiomiocítica, la fibrosis intersticial y la remodelación de la cámara resultante. (Li JM et al., *Hypertension* 2002; 40:477-84; Byrne JA et al., *Circ Res* 2003;93:802-5; Murdoch CE et al., *Cardiovasc Res* 2006;71:208-15)

La insuficiencia cardíaca congestiva está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. El estrés oxidativo, derivado en gran medida de la NADPH oxidasa, es también un mediador de la disfunción cardíaca - reducción de la eficacia tanto de la contracción como de la relajación - que caracteriza la fase descompensatoria de la insuficiencia cardíaca en pacientes con LVH. (Murdoch CE et al., *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:148-53; MacCarthy PA, *Circulation* 2001;104:2967-74; Takayama T et al., *Circ J* 2004;68:1067-75; Heymes C et al., *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-710)

La hipertensión arterial está asociada o ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. El aumento de la activación de la NADPH oxidasa en las células endoteliales y en las células del músculo liso vascular se observa comúnmente en la hipertensión arterial y contribuye a la elevación de la presión sanguínea al antagonizar la acción vasodilatadora del óxido nítrico. Este estrés oxidativo también es un mediador de la señalización de la angiotensina II, y promueve la hipertrofia mediana que frecuentemente complica la hipertensión. En el cerebro, la activación de la NADPH oxidasa en centros que regulan la actividad simpática promueve la elevación de la actividad simpática, un mediador clave de la hipertensión asociada con la obesidad. La hipertensión parece ser notablemente rara en sujetos con síndrome de Gilbert (Touyz RM et al., *Histochem Cell Biol* 2004;122:339-52; Touyz RM et al., *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;24:471-8; Morawietz H et al., *Biochem Biophys Res Comm* 2001;285:1130-5; Jung O et al., *Circulation* 2004;109:1795-801; Zalba G et al., *Hypertension* 2001;38:1395-9; Wang HD et al., *Circ Res* 2001;88:947-53; Vitek L, et al., *Atherosclerosis* 2002;160:449-56).

La hipertensión pulmonar está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La actividad y expresión de la NADPH oxidasa en las arterias intrapulmonares aumenta cuando la hipoxia crónica induce hipertensión pulmonar. Este estrés oxidante contribuye tanto a la elevación de la presión arterial pulmonar como a la remodelación hipertrófica asociada de las arterias pulmonares y del ventrículo derecho; por lo tanto, estos fenómenos se reducen sustancialmente cuando ratones genéticamente deficientes en NADPH oxidasa están expuestos a hipoxia crónica. El

tratamiento con agentes que dismute superóxido también son protectores en este sentido. (Liu JQ et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;290:L2-10; Brennan LA, et al., Circ Res 2003;92:683-91)

5 La disfunción eréctil está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La disfunción eréctil (DE) de origen vascular - la forma más común - refleja un fracaso relativo de la vasodilatación mediada por óxido nítrico. Los fármacos usados para tratar la DE compensan por lo general este defecto suprimiendo el catabolismo de cGMP (un mediador clave de la actividad vasodilatadora del óxido nítrico). Existe ahora evidencia de que la DE de origen vascular está asociada con un mayor estrés oxidante en la vasculatura del pene, y es probable que la NADPH oxidasa sea la fuente principal de este estrés. Además, este estrés oxidante puede ser en gran parte responsable del fracaso relativo de la bioactividad del óxido nítrico en la DE vascular. Este modelo racionaliza el gran aumento en el riesgo de DE asociado a factores de riesgo vascular como hiperlipidemia, hipertensión y diabetes. (Koupparis A et al, BJU Int 2004;94:257-8; Jeremy JY et al. J Urol 2006;175:1175-6; Jeremy JY et al., Int J Impot Res 2006; Oct 19 epub)

10 El síndrome metabólico se asocia o se liga a una actividad de la NADPH oxidasa. La sobreactivación de la NADPH oxidasa juega un papel clave tanto en la génesis como en las complicaciones patológicas del síndrome metabólico. Existen pruebas recientes de que la resistencia a la insulina que se desarrolla en los adipocitos hipertrofiados -y que induce resistencia sistémica a la insulina mediante la promoción de la sobreexposición de ácidos grasos libres y la desregulación de las adipocitoquinas- depende del aumento del estrés oxidativo de los adipocitos mediado por la NADPH oxidasa activada. Por lo tanto, el tratamiento con apocinina mejora el síndrome de resistencia a la insulina en ratones gordos alimentados con grasa. Además, la sobreexposición de ácidos grasos libres que es característica del síndrome de resistencia a la insulina activa la NADPH oxidasa en el endotelio vascular, promoviendo así el marcado incremento del riesgo vascular asociado con el síndrome de resistencia a la insulina. La sobreactivación de la NADPH oxidasa en las células beta pancreáticas en sujetos resistentes a la insulina puede contribuir al inicio de la disfunción de las células beta que puede conducir a la diabetes tipo 2. (Talior I et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;288: E405-11; Furukawa S et al., J Clin Invest 2004;114:1752-61; Inoguchi T et al., Curr Drug Targets 2005;6:495-501; Delbosc S et al., Atherosclerosis 2005;179:43-9; Roberts CK et al., Metabolism 2006;55:928-34)

25 Complicaciones Diabéticas - Retinopatía, Neuropatía,

La nefropatía está asociada o está relacionada con una actividad de la NADPH oxidasa. Las elevaciones concurrentes de glucosa y ácidos grasos libres, como se observa por lo general en la diabetes, promueven la activación crónica de NADPH oxidasa en células permeables a la glucosa (incluyendo endotelio vascular, pericitos retinales y células mesangiales renales) mediante la estimulación de la actividad de varias isoformas de proteína quinasa C. El estrés oxidante resultante es un mediador clave de algunas de las complicaciones a largo plazo más importantes de la diabetes - incluyendo retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad vascular aterogénica. Por lo tanto, se ha demostrado que los agentes que suprimen la activación de la NADPH oxidasa, incluyendo la apocinina, previenen la hiperplasia mesangial y mejoran la disfunción neural en roedores diabéticos. Un estudio epidemiológico reciente revela que el riesgo de retinopatía, disfunción renal y enfermedad coronaria es casi un 80% menor en los diabéticos que tienen síndrome de Gilbert (asociado con niveles crónicamente elevados de bilirrubina libre) en comparación con los diabéticos que no tienen este síndrome. Funciona fisiológicamente para inhibir la NADPH oxidasa, esto constituye evidencia indirecta convincente de que la activación de la NADPH oxidasa es un mediador prominente de complicaciones diabéticas en seres humanos. (Inoguchi T et al., Curr Drug Targets 2005;6:495-501; Inoguchi T et al., J Am Soc Nephrol 2003;14:S227-32; Manea A et al, Biol Cell 2005;97:123-34; Ushio-Fukai M et al, Mol Cell Biochem 2004;264:85-97; Cotter MA et al, Life Sci 2003;73:1813-24; Coppey LJ et al, Free Radical Res 2003;37:33-400; Li JM et al, J Am Soc Nephrol 2003;14:S221-6; Xia L et al., Am J Physiol Renal Physiol 2005;290:F345-56; Lee HB et al., J Am Soc Nephrol 2003;14:S241-5; Inoguchi T, et al., JAMA 2007;298:1398-400)

45 La glomerulosclerosis está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La activación de la NADPH oxidasa en células mesangiales juega un papel patógeno en la glomerulosclerosis asociada con hipertensión crónica o trastornos autoinmunes. Esta respuesta hipertrófica está mediada en gran parte por una mayor actividad del factor de crecimiento transformante-beta; el estrés oxidativo generado por NADPH oxidasa juega un papel clave en la transducción de señales de TGF-beta, y también actúa para aumentar la expresión de esta hormona. Además, la actividad antihipertrófica del óxido nítrico es antagonizada por el estrés oxidante. (Modlinger PS et al., Semin Nephrol 2004;24:354-65; Kondo S et al., J Am Soc Nephrol 2006;17:783-94; Yang ZZ et al., Kidney Int 2003;63:1012-20; McCarty MF, Med Hypoth 2006;67:1277-96)

55 El enfisema se asocia o se liga a una actividad de la NADPH oxidasa. Los oxidantes derivados de la NADPH oxidasa también desempeñan un papel patogénico en el enfisema asociado con el tabaquismo crónico. Por lo tanto, la apocinina bloquea la capacidad de la exposición al humo del cigarrillo para inducir la expresión de la metaloproteínasa-12 de la matriz en el epitelio de las vías respiratorias humanas; esta proteínasa es conocida por ser un mediador clave del daño proteolítico en modelos de roedores de enfisema. También, en un modelo de hamster de enfisema, inducido por instilación intratraqueal de lipopolisacárido, el tratamiento con apocinina ayuda a preservar la actividad del inhibidor secretor de la proteasa leucocitaria, que funciona para controlar la actividad proteolítica pulmonar; este fenómeno refleja el hecho de que los oxidantes pueden desactivar este inhibidor clave de la proteasa. (Stolk J et al., Am J Respir Crit Care Med 1994;150:1628-31; Lavigne MC et al., Biochem Biophys Res Comm 2005; 330:194-203)

El asma está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. La activación de la NADPH oxidasa juega un papel mediador en muchas fases de la inflamación asmática: activación de mastocitos (permitiendo la secreción de histamina y producción de leucotrienos), migración mediada por VCAM de eosinófilos en tejido pulmonar, actividad proinflamatoria de eosinófilos y neutrófilos y la hiperproliferación de las células del músculo liso de las vías respiratorias que contribuye a la remodelación pulmonar en el asma crónica. La capacidad de la exposición al ozono para estimular las respuestas broncoconstrictoras en pacientes asmáticos se ve mejorada en gran medida por la inhalación de apocinina. En un paciente con asma crónica severa, se observó una mejora substancial temporal en los síntomas cuando los niveles séricos de bilirrubina aumentaron debido a la hepatitis B aguda; la función pulmonar empeoró nuevamente cuando los niveles de bilirrubina volvieron a la normalidad. (Hoidal JR et al., *Antiox Redox Signal* 2003;5:751-8; Brar SS et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L782-95; Peters EA et al., *Free Radic Biol Med* 2001;31:1442-7; Taille C et al., *J Biol Chem* 2003;278:27160-8; Caramori G et al., *Thorax* 2004;59:170-3; Ohru T et al., *Tohoku J Exp Med* 2003;199:193-6)

La alergia está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La liberación provocada por antígeno de histamina y leucotrienos de los mastocitos - una característica central de los síndromes alérgicos- depende de una ruta de señalización en donde la activación de la NADPH oxidasa desempeña un papel obligatorio, lo que permite un aumento agudo del calcio libre intracelular. De este modo, el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI bloquea la liberación de histamina y leucotrienos por mastocitos expuestos a antígenos. (Suzuki Y et al., *Chem Immunol Allergy* 2005;87:32-42; Yoshimaru T et al., *Clin Exp Allergy* 2002;32:612-8; Suzuki Y et al., *J Immunol* 2003;171:6119-27)

La osteoporosis está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Los osteoclastos, las células óseas que median la resorción ósea, son macrófagos modificados con una alta capacidad para generar oxidantes vía NADPH oxidasa. Se ha demostrado que los inhibidores de NADPH-oxidasa inhiben la resorción ósea in vitro en explantes óseos, al parecer porque el peróxido de hidrógeno es un mediador de la transducción de señales requerida para la resorción ósea. En ratones ovariectomizados, se ha demostrado que la infusión de catalasa pegilada (que tiene una semivida prolongada) contrarresta la resorción ósea, lo que sugiere una clave para el peróxido de hidrógeno en la mediación de la pérdida ósea posmenopáusica. Los oxidantes derivados de NADPH también parecen desempeñar un papel en la diferenciación de los osteoclastos. (Darden AG et al., *J Bone Miner Res* 1996;11:671-5; Yang S et al., *J Cell Biochem* 2004;92:238-48; Steinbeck MJ et al., *J Cell Physiol* 1998;176:574-87; Bax BE et al., *Biochem Biophys Res Comm* 1992;183:1153-8; Lean JM et al., *Endocrinology* 2005;146:728-35)

La osteoartritis está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La osteoartritis es una condición inflamatoria de bajo grado en la que ciertas citoquinas -especialmente la interleucina-1- perturban la función de los condrocitos, bloqueando la síntesis de proteoglicanos de la matriz al tiempo que promueven la degradación proteolítica de la matriz. Los estudios con condrocitos cultivados revelan que los oxidantes derivados de NADPH son mediadores clave de estos efectos de la interleucina-1 en los condrocitos. El peroxinitrito, formado por la reacción espontánea de superóxido y óxido nítrico, suprime la síntesis de proteoglicanos, al tiempo que promueve la apoptosis en los condrocitos tratados con interleucina-1; el estrés oxidativo promueve la producción de peroxinitrito directamente, y también ayudando a la inducción de la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa. (Biernacki P, et al., *Ann Rheum Dis* 1986;45:249-55; Lo YY et al., *J Cell Biochem* 1998;69:19-29; Mendes AF et al., *J Cell Biochem* 2003;88:783-93; Jouzeau JY et al., *Biorheology* 2002;39:201-14; Oh M et al., *J Rheumatol* 1998; 25:2169-74)

La úlcera gástrica está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Los oxidantes derivados de neutrófilos, dependientes de la actividad de la NADPH oxidasa, son mediadores clave de la ulceración gástrica inducida por los fármacos NSAID. Por lo tanto, el pretratamiento con superóxido dismutasa protege a los roedores del daño inducido por indometacina a la mucosa gástrica. Si la sobreactivación de la NADPH oxidasa en las células inflamatorias o en las células de la mucosa gástrica podría contribuir al riesgo de úlcera gástrica o de cáncer gástrico durante una infección crónica con *H. pylori*, es una cuestión de investigación en curso. (Vanaanen PM et al., *Am J Physiol* 1991;261:G470-5; Park S, et al., *Antiox Redox Signal* 2001;4:6:549-60)

El choque séptico está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. El shock inducido por endotoxina, que culmina en hipotensión severa y muerte, es considerablemente mejorado en ratas Gunn (una variante genética con niveles plasmáticos de bilirrubina elevados), en ratas que reciben infusiones sostenidas de bilirrubina y en ratones pretratados con ficocianina oral. Estos resultados son coherentes con un papel clave para la activación de la NADPH oxidasa en choque séptico. De hecho, hay evidencia de que el estrés oxidante inducido es crucial para la inducción vascular del óxido nítrico sintetasa inducible, cuya hiperactividad conduce al colapso circulatorio. En un modelo de conejo de exposición a endotoxina, se ha demostrado que el tratamiento concurrente con apocinina previene diversos tipos de aberraciones histológicas. (Lanone S et al., *FASEB J* 2005; 19:1890-2; Wang WW et al., *Hepatology* 2004;40:424-33; Kadl A et al., *FASEB J* 2005;19:685.19; Lomnitzki L et al., *Toxicol Pathol*2000;28:580-7)

La fibrosis pulmonar está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La actividad del factor de crecimiento transformante beta desempeña un papel mediador clave en los síndromes fibróticos y, como se ha indicado anteriormente, la activación de la NADPH oxidasa es un mediador de la transducción de señales de TGF-beta. Por lo tanto, no es sorprendente que se haya demostrado que la administración de bilirrubina o la inducción de hemo oxigenasa-1 (que promueve la generación intracelular de bilirrubina) suprimen la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en roedores. Además, la bleomicina tiene una capacidad reducida para inducir fibrosis pulmonar en ratones

genéticamente deficientes en actividad de la NADPH oxidasa. Se ha presentado un caso de resolución de la fibrosis pulmonar idiopática en un paciente cuyos niveles séricos de bilirrubina se elevaron crónicamente debido a la obstrucción de las vías biliares. (Manoury B et al., *Respir Res* 2005;6:11; Thannickal VJ et al., *J Biol Chem* 1995;270:30334-8; Wang HD et al., *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:406-11; Morse D, *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:S82-6; Ohru T et al., *Tohoku J Exp Med* 2001;193:245-9)

La fibrosis hepática está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La fibrosis hepática refleja la activación mediada por hepatotoxina de células estrelladas hepáticas, dando lugar a su proliferación y transformación a miofibroblastos que secretan colágeno. La producción de oxidantes por NADPH oxidasa desempeña un papel obligado en la activación de células estrelladas, y también promueve la proliferación de estas células. La inducción de fibrosis hepática se suprime en ratones que son genéticamente deficientes en NADPH oxidasa, e inductores de hemo oxigenasa-1 inhiben la proliferación y síntesis de colágeno de miofibroblastos humanos in vitro. (Adachi T et al., *Hepatology* 2005;41:1272-81; Bateller R et al., *J Clin Invest* 2003;112:1383-94; Li L et al., *Gastroenterology* 2003;125:460-9)

La enfermedad de Parkinson está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. El peroxinitrito producido por las células microgliales activadas es un mediador clave de la muerte neuronal y la disfunción asociada con enfermedades neurodegenerativas crónicas como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer. El superóxido producido por la NADPH oxidasa activada reacciona con el óxido nítrico para generar este peroxinitrito. En roedores, la lesión neural inducida por MTPT o rotenona se considera un modelo para la enfermedad de Parkinson humana; el cocultivo, in vitro con microglia exagera la lesión neuronal inducida por MPTP o rotenona; la exposición concurrente a los inhibidores de la NADPH oxidasa apocinina o DPI invierte este efecto. Además, existe un reciente informe de que la alimentación de espirulina a ratones, antes y después de la administración de MTPT, protege parcialmente las neuronas dopaminérgicas estriadas de esta toxina. Este estudio es de particular interés porque sugiere que la ficocianobilina administrada por vía oral (PCB) puede pasar a través de la barrera hematoencefálica, inhibiendo la actividad de la NADPH oxidasa de la microglia cerebral. (Tieu K et al., *IUBMB Life* 2003; 55:329-35; Gao HM et al., *FASEB J* 2003;17:1954-6; Mander P et al., *J Neuroinflammation* 2005;2:20; Gao HM et al., *J Neurochem* 2002;81:1285-97; Gao HM et al., *J Neurosci* 2003;23:181-7; Chamorro G et al., *Nutr Neurosci* 2006;9:207-12)

La enfermedad de Alzheimer está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Beta amiloide, que se cree que es el mediador clave de la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer, puede activar NADPH oxidasa en microglia. Además, los estudios histológicos demuestran que la NADPH oxidasa microglial está activada en este trastorno. En los cultivos de células neuronales, beta amiloide es capaz de matar neuronas directamente; este fenómeno está asociado con la activación de la NADPH oxidasa en neuronas, y la inhibición antisentido de esta actividad impide la muerte neuronal. Por lo tanto, hay motivos para sospechar que los oxidantes derivados de NADPH, producidos tanto en microglia como en neuronas, pueden contribuir a la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer. (Zekry D et al., *IUBMB Life* 2003;55:307-13; Shimohama S et al., *Biochem Biophys Res Comm* 2000;273:5-9; Mander P et al., *J Neuroinflammation* 2005;2:20; Jana A et al., *J Biol Chem* 2004;279:51451-9)

El daño de la piel mediado por UV está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. El fotoenvejecimiento de la piel asociado con la exposición excesiva al sol refleja los efectos mediados por uv sobre los queratinocitos epidérmicos que dan como resultado una hiperproliferación de queratinocitos y melanocitos, acompañada de alteraciones de la sustancia dérmica del suelo (degradación del colágeno, acumulación de elastina). Esta alteración del comportamiento de los queratinocitos a su vez depende de un aumento desencadenado por uv en el estrés oxidativo de queratinocitos que ahora se sabe que está mediado por la activación de la NADPH oxidasa. Este aumento en el estrés oxidativo también es probable que contribuya a las alteraciones mutagénicas en el ADN que pueden dar lugar a cáncer de piel (aunque uv también puede mutación del ADN más directamente mediante la inducción de la formación de dímeros de timina). De acuerdo con lo anterior, las medidas que suprimen la actividad de la NADPH oxidasa también retardan el proceso de fotoenvejecimiento, proporcionan protección contra las quemaduras solares y reducen el riesgo de cáncer de piel. (Beak SM et al., *Biochimie* 2004;86:425-9; Wang H et al., *Free Radical Biol Med* 2005;38:890-7)

El cáncer está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. La actividad de la NADPH oxidasa se ha identificado en muchos cánceres, y en algunos cánceres, la actividad de la NADPH oxidasa crónica o estimulada aumenta la señalización del factor de crecimiento; en parte, esto refleja la capacidad de los oxidantes para inhibir las enzimas tirosina-fosfatasa que se oponen a la actividad de los receptores del factor de crecimiento de la tirosina quinasa. El aumento resultante en la actividad del factor de crecimiento no sólo promueve una mayor proliferación del cáncer, sino que también hace que los cánceres sean relativamente resistentes a la apoptosis y estimula su producción de factores angiogénicos.

Además, la activación de la NADPH oxidasa en células endoteliales se produce durante el proceso angiogénico; esto regula el impacto de ciertos factores de crecimiento angiogénicos, tales como VEGF, y contribuye más específicamente a la formación de tubo endotelial. Y hay evidencia reciente de que la activación de la NADPH oxidasa en las fibras musculares es un mediador de la pérdida de masa del músculo esquelético asociada con la caquexia del cáncer. Por lo tanto, la inhibición de la NADPH oxidasa puede retardar el crecimiento y la propagación de ciertos cánceres, impedir el proceso angiogénico que apoya su propagación y ayudar a prevenir la pérdida caquética de la masa muscular.

Dicha inhibición también tiene potencial para la prevención del cáncer. El aumento del riesgo de ciertos cánceres asociados con la inflamación crónica puede reflejar, en parte, la mutagénesis mediada por el oxidante; peroxinitrito en particular tiene notable actividad mutagénica. NADPH oxidasa es la principal fuente de oxidantes en los leucocitos activados, por lo que su inhibición puede reducir la mutagénesis en los tejidos inflamados. Además, el estrés oxidativo crónico puede desempeñar un papel promocional en la inducción del cáncer amplificando las actividades del factor de crecimiento. (Kim HW et al., *Carcinogenesis* 2003;24:235-41; Ohshima H et al., *Arch Biochem Biophys* 2003;417:3-11; Teufelhofer O et al., *Carcinogenesis* 2005;26:319-29; Brar SS et al., *Protoplasma* 2003;221:117-27; Szanto I et al., *J Pathol* 2005;207:64-76; Vaquero EC et al., *J Biol Chem* 2004;279:34643-54; Brar SS et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C353-69; Lim SD et al., 2005;62:200-7; Brar SS et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1212-24; Dong JM et al., *Free Radic Res* 2004; 38:629-379)

La artritis reumatoide está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La actividad de la NADPH oxidasa aumenta en los neutrófilos obtenidos del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y la afección relacionada espondilartropatía. Es razonable sospechar que este estrés oxidativo contribuye al proceso inflamatorio en la sinovia. En ratones, la administración de apocinina es protectora en la artritis inducida por zimosan; en particular, impide la degradación del cartílago articular. La apocinina también disminuye la inflamación articular en la artritis inducida por colágeno en ratas. De forma análoga, la administración oral de espirulina ha mostrado protección en la artritis inducida por zimosan y adyuvante en ratones, un efecto que probablemente refleja la inhibición de la NADPH oxidasa por PCB. Sin embargo, varias mutaciones en ratones que afectan negativamente a la actividad de la NADPH oxidasa de neutrófilos están asociadas con una mayor gravedad de ciertos tipos de artritis inducida. Por lo tanto, la inhibición de la NADPH-oxidasa tiene efectos complejos y compensatorios sobre el proceso artrítico, y requerirá una evaluación clínica antes de que puedan hacerse predicciones confiables. (El Benna J et al., *Inflammation* 2002;26:273-8; Hougee S et al. *Eur J Pharmacol* 2006;531:264-9; 't Hart BA et al., *Free Radic Biol Med* 1990;9:127-31; Lafeber FP et al., *Rheumatology* 1999;38:1088-93; Ramirez D, et al., *Mediators Inflamm* 2002;11:75-9; Rasool M, et al., *Biol Pharm Bull* 2006;29:2483-7; Hultqvist M et al., *J Immunol* 2007;179:1431-7)

La colitis ulcerosa está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Los linfocitos derivados de lesiones mucosas en pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn tienen actividad de la NADPH oxidasa elevada. Esta actividad también se encuentra en células epiteliales de colon y, por supuesto, en otros leucocitos que se infiltran en estas lesiones. Varios grupos de investigación han revelado que el estrés oxidante es un mediador clave del daño tisular en la enfermedad inflamatoria intestinal; la NADPH oxidasa es la fuente más probable de este estrés oxidante. La colitis inducida en ratones con sulfato de sodio de dextrano oral, se mejora sustancialmente mediante la administración simultánea de un inductor de hemo oxigenasa-1 o de biliverdina. (Szanto I et al., *J Pathol* 2005; 207:164-76; Otamiri T et al., *Dig Dis* 1991;9:133-41; Berberat PO, et al., *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:350-9)

La esclerodermia está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. Los fibroblastos derivados de las lesiones de escleroderma producen más estrés oxidante que los fibroblastos de la piel sana, y la NADPH oxidasa ha sido identificada como la fuente de este estrés oxidante. Además, la inhibición de este estrés oxidante suprime la proliferación de fibroblastos de escleroderma *in vitro*, y también reduce su producción de colágeno. Estas consideraciones enseñan que la activación de la NADPH oxidasa en los fibroblastos de la piel puede ser un mediador importante de la hiperproliferación de los fibroblastos y de la producción excesiva de colágeno característica de las lesiones cutáneas esclerodérmicas. (Sambo P et al., *Arthritis Rheum* 2001;44:2653-64)

La angiogénesis patológica está asociada con o está ligada a una actividad de la NADPH oxidasa. La angiogénesis estimulada juega un papel patógeno en ciertos trastornos, incluyendo cáncer, degeneración macular, artritis reumatoide y retinopatía diabética. Como se ha indicado anteriormente, la activación de la NADPH oxidasa en las células endoteliales que participan en el proceso de neovascularización aumenta la capacidad de respuesta a estas células a ciertos factores clave de crecimiento, al tiempo que contribuye a la migración de células endoteliales y la formación de tubos. Por tanto, la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa ralentiza el proceso angiogénico. (Ushio-Fukai M et al., *Mol Cell Biochem* 2004;264:85-97; Abid MR et al., *FEBS Lett* 2000;486:252-6)

El rechazo de trasplante está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. Estudios recientes muestran que la administración de inductores de hemo oxigenasa-1, o de biliverdina, ayuda a prevenir el rechazo de aloinjertos cardíacos o renales en ratas, y también mejora el daño de isquemia-reperfusión que a menudo afecta a órganos trasplantados. Por lo tanto, la inhibición de la NADPH oxidasa tiene potencial en la medicina de trasplante. (Yamashita K et al., *FASEB J* 2004;18:765-7; Bach FH, *Hum Immunol* 2006;67:430-2; Nakao A et al., *Am J Transplant* 2005;5:282-91)

El síndrome de dolor crónico/hiperalgesia está asociado con o está ligado a una actividad de la NADPH oxidasa. Se ha encontrado que una elevación crónica de la producción de superóxido en las neuronas sensoriales es un mediador clave de la hiperalgesia que a menudo acompaña a la inflamación crónica. Por lo tanto, se ha demostrado que los fármacos que dismutan potentemente superóxido previenen la inducción de síndromes hiperalgésicos en ratas. Aunque la fuente de este exceso de estrés oxidante aún no se ha identificado definitivamente, la NADPH oxidasa se expresa en neuronas y es probablemente una fuente clave del estrés oxidante que media la hiperalgesia. (Chung JM, *Mol Interv* 2004;4:248-50; Wang ZQ et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:869-78; Kim HK et al., *Pain* 2004;111:116-24).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición ficoquímica para administración a un sujeto mamífero, teniendo la composición ficoquímica una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa, comprendiendo la composición ficoquímica: una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador farmacéuticamente aceptable y una cápsula que tiene un envase gelatinoso para contener dicha ficobilina aislada, siendo dicha ficobilina aislada convertida en una fikorubina cuando se administra a dicho sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa,
- 10 en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de una ficobilina conjugada con la misma para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
2. Una composición ficoquímica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es
- (a) seco y dicha cápsula es opcionalmente un gel duro; o
- (b) líquido y dicha cápsula es opcionalmente blanda.
- 15 3. Una composición ficoquímica para administración a un sujeto mamífero, teniendo la composición ficoquímica una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa, comprendiendo la composición ficoquímica: una ficobilina aislada mezclada con un material portador farmacéuticamente aceptable o un agente de carga de grado alimenticio y comprimida en forma de comprimido, siendo dicha ficobilina aislada convertida en una fikorubina cuando se administra a dicho sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa,
- 20 en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de ficocianina conjugada con este para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
- 25 4. Una composición ficoquímica de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, que comprende además uno o más ingrediente seleccionados del grupo que consiste en: ácido fólico, L-arginina, policosanol, isoflavona de soja, extracto de té verde, taurina, coenzima Q10, sal de potasio, magnesio, aceite de pescado, vitamina C, selenio, luteína, zeatantina, zinc, benfotiamina y piridoxamina.
- 30 5. Una composición ficoquímica para administración parenteral a un sujeto mamífero, teniendo la composición ficoquímica una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa, comprendiendo la composición ficoquímica: una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de una solución estéril fisiológicamente aceptable apropiada para inyección, dicha ficobilina aislada que se convierte en una fikorubina cuando se administra a dicho sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa,
- 35 en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada a ésta para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
- 40 6. Una composición ficoquímica para administración tópica a un sujeto mamífero, teniendo la composición ficoquímica una actividad profármaco para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa, comprendiendo la composición ficoquímica: una ficobilina aislada disuelta o suspendida dentro de un portador emoliente dermatológicamente aceptable, dicha ficobilina aislada que se convierte en una fikorubina cuando se administra por vía tópica a dicho sujeto mamífero para inhibir la actividad de la NADPH oxidasa,
- 45 en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada a éste para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
7. Una composición ficoquímica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha ficobilina aislada sirve adicionalmente como protector solar.
8. Una composición ficoquímica de acuerdo con las reivindicaciones 1, 3, 5 ó 6, en donde:
- 50 (a) el fragmento peptídico tiene 75 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo 50 aminoácidos de longitud o menos, tales como 25 aminoácidos de longitud o menos y pueden tener 10 aminoácidos de longitud o menos.

- 5 9. Una composición nutracéutica que comprende una sustancia nutriente mezclada con una composición ficoquímica que comprende una ficobilina aislada, en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada a este para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
10. Una composición nutracéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde:
- (a) el fragmento peptídico tiene 75 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo 50 aminoácidos de longitud o menos, tal como 25 aminoácidos de longitud o menos y pueden tener 10 aminoácidos de longitud o menos.
- 10 11. Una composición cosmecéutica que comprende una sustancia cosmética mezclada con una composición ficoquímica que comprende una ficobilina aislada, en donde dicha ficobilina aislada se selecciona del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina y en donde dicha ficobilina incluye un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada con este para formar una ficobilina conjugada con un péptido, y en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos, y en donde la ficobilina conjugada con un péptido está sustancialmente purificada.
- 15 12. Una composición cosmecéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:
- (a) el fragmento peptídico tiene 75 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo, 50 aminoácidos de longitud o menos, tales como 25 aminoácidos de longitud o menos y pueden tener 10 aminoácidos de longitud o menos.
- 20 13. Una ficobilina aislada seleccionada del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, incluyendo dicha ficobilina un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada con el mismo para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos y en donde la ficobilina conjugada con un péptido se purifica sustancialmente, para uso terapéutico.
- 25 14. Una ficobilina aislada seleccionada del grupo que consiste en ficocianobilina, ficoeritrobilina, fitocromobilina, incluyendo dicha ficobilina un fragmento peptídico de una ficocianina conjugada con el mismo para formar una ficobilina conjugada con un péptido, en donde el fragmento peptídico tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos y la ficobilina conjugada con un péptido se purifica sustancialmente, para uso en la profilaxis o tratamiento de un sujeto para cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis periférica, aterosclerosis cerebrovascular, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, disfunción eréctil, síndrome metabólico, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, glomerulosclerosis, enfisema pulmonar, asma, alergia, osteoporosis, osteoartritis, úlcera gástrica, shock séptico, fibrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, enfermedad de Parkinson, demencia de Alzheimer, daño UV a la piel, cáncer, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, esclerodermia, angiogénesis patológica, rechazo de trasplante y síndrome de dolor crónico/hiperalgesia.
- 30 15. La ficobilina aislada de la reivindicación 14, en donde la ficobilina conjugada con un péptido se formula para administración oral, parenteral o tópica.
- 35 16. Una ficobilina aislada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 - 15, en donde:
- (a) el fragmento peptídico tiene 75 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo, 50 aminoácidos de longitud o menos, tales como 25 aminoácidos de longitud o menos y pueden tener 10 aminoácidos de longitud o menos.

Células endoteliales aórticas humanas

*P<0.05 vs. Lucigenina + NADPH

**P<0.01 vs. Lucigenina + NADPH

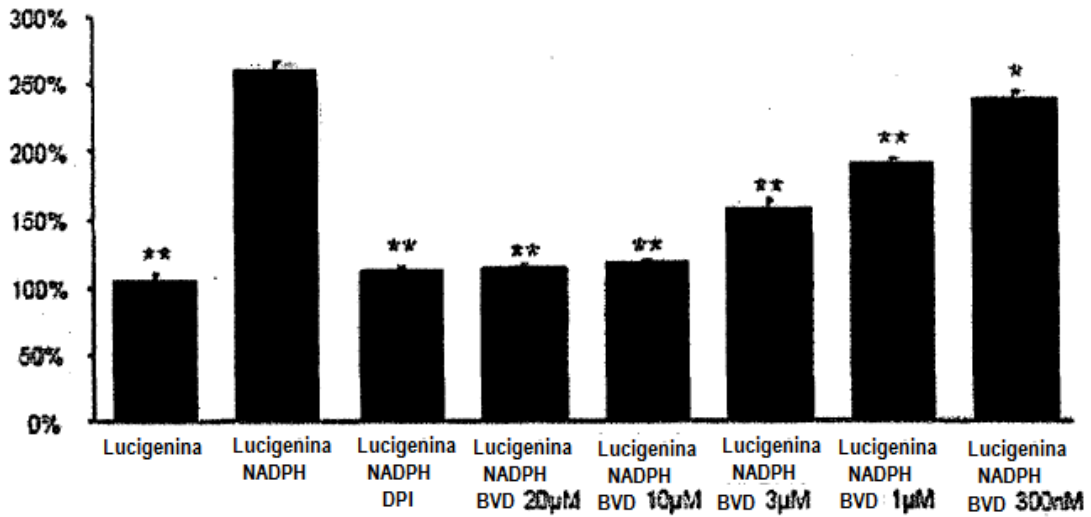
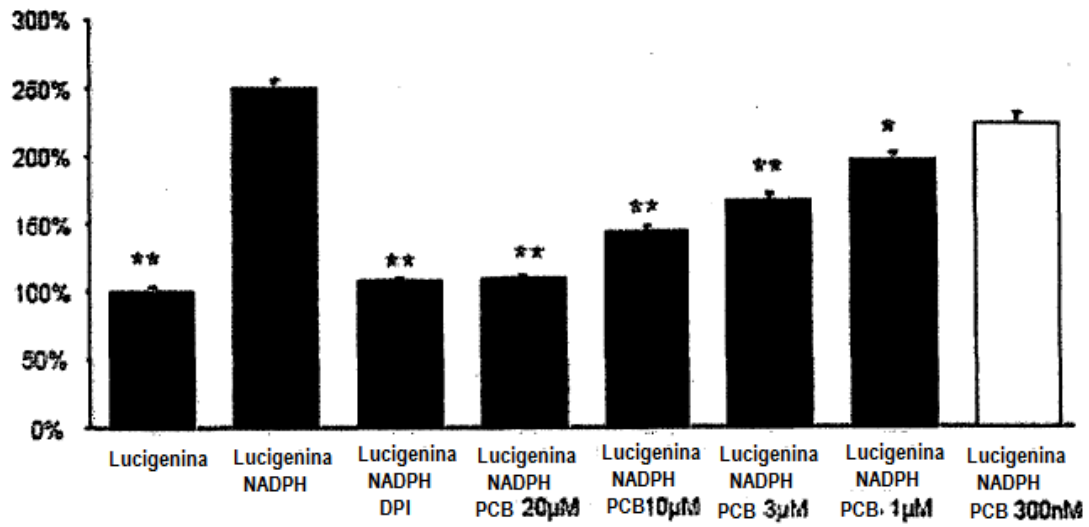


FIGURA 1 A (panel superior) y B (panel inferior)

Células del músculo liso aórticas humanas

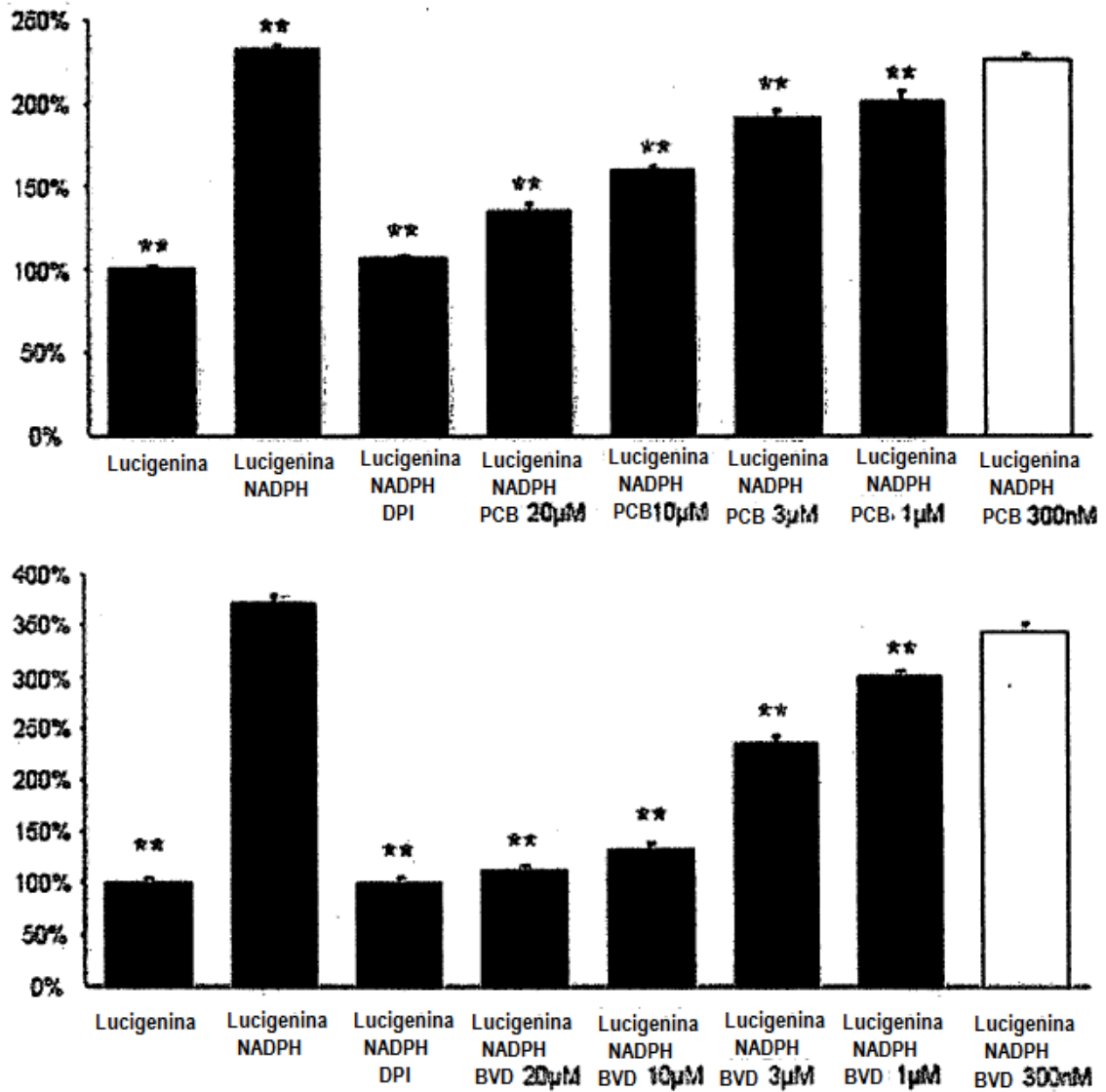


FIGURA 2 A (panel superior) y B (panel inferior)

Células mesangiales renales humanas

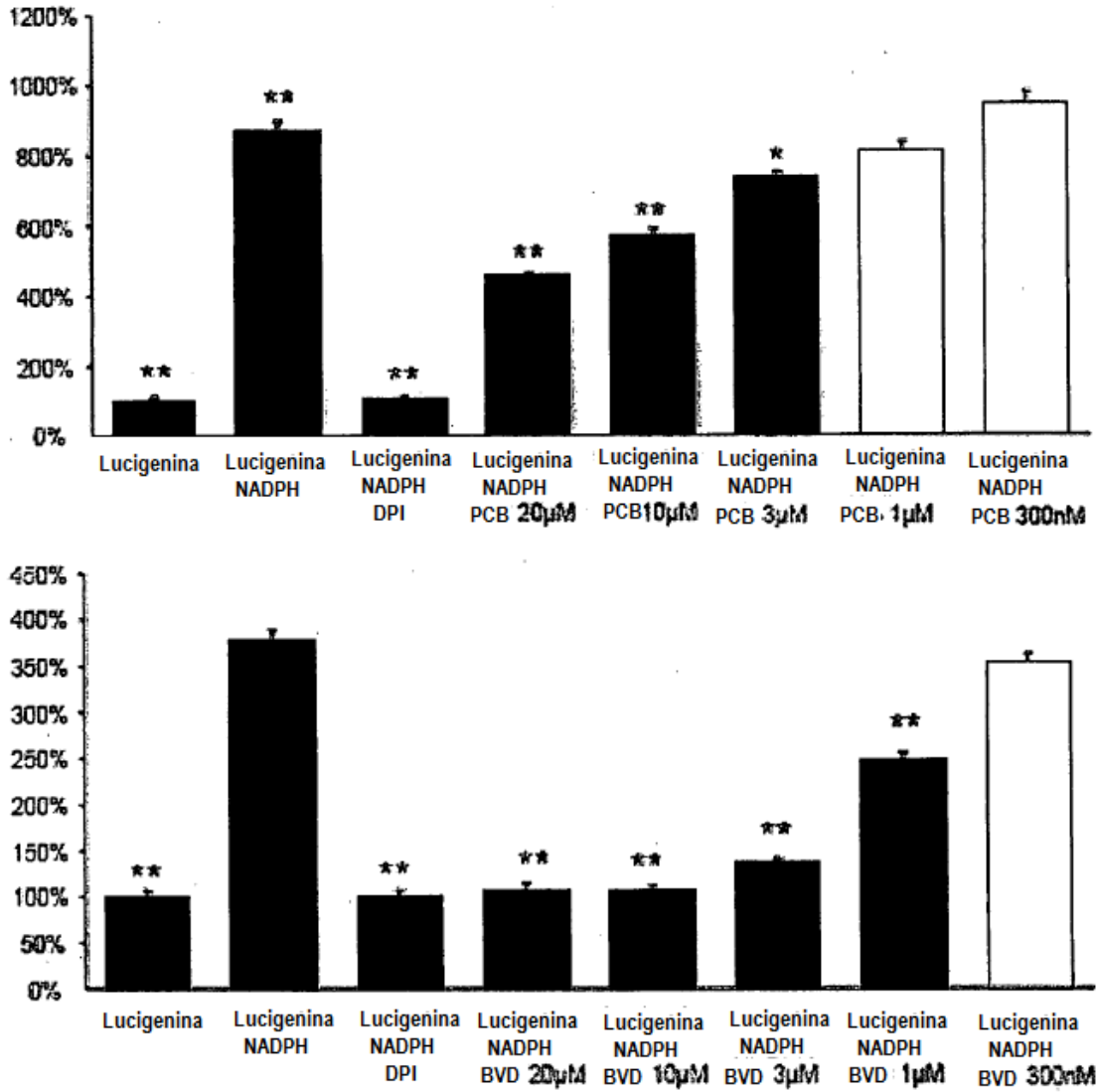


FIGURA 3 A (panel superior) y B (panel inferior)

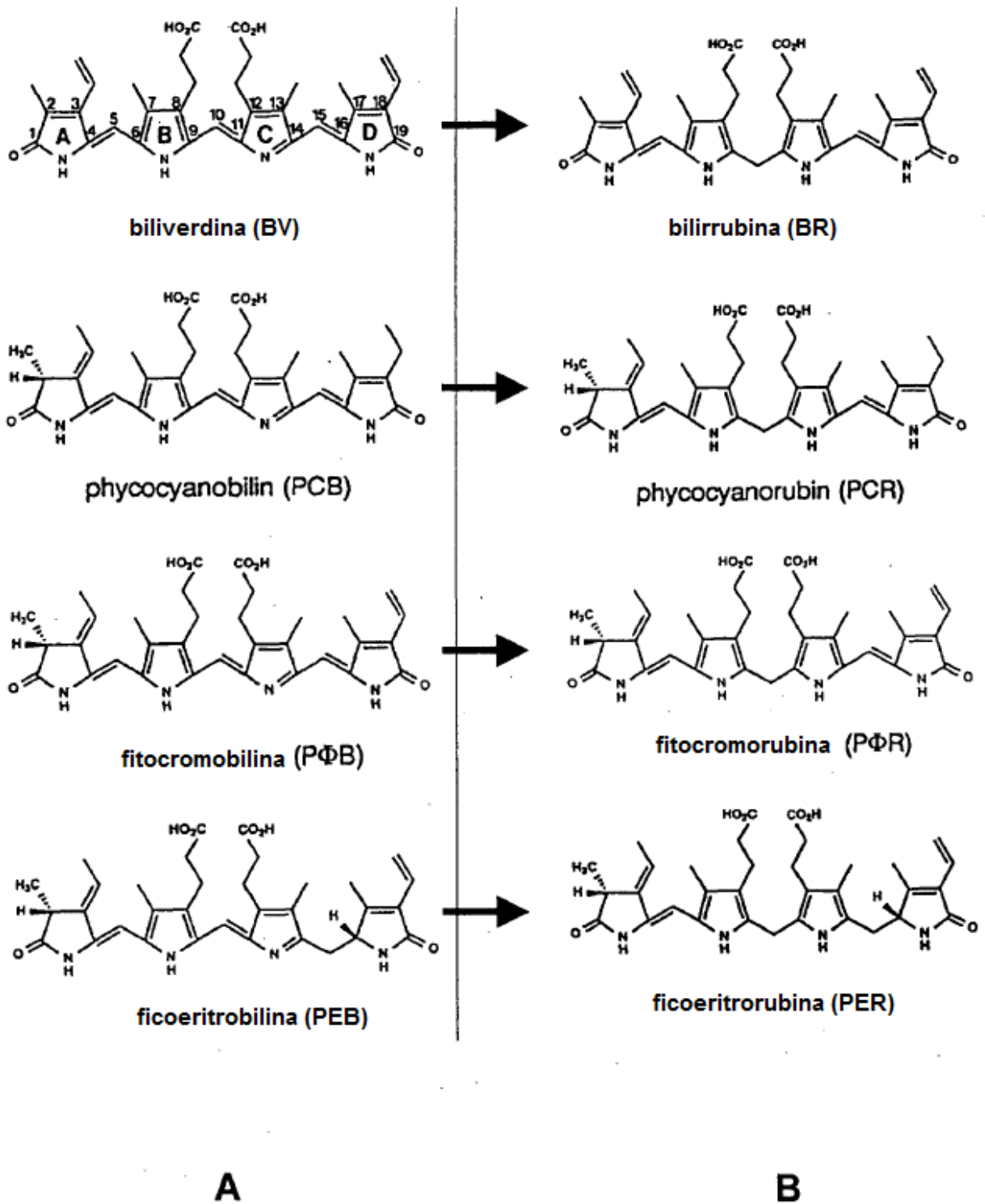


FIGURA 4