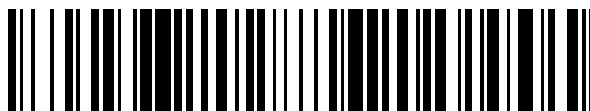


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 352**

51 Int. Cl.:

A61K 35/16 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61K 35/50 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2012 PCT/EP2012/076962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098333**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2012 E 12816671 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2797609**

54 Título: **Combinación de factores de crecimiento, citoquinas, factores antibacterianos/antivíricos, factores estimulantes de células madre, proteínas del complemento C3a/C4a, inmunoglobulinas y factores quimiotácticos**

30 Prioridad:

30.12.2011 IT MI20112432

30.12.2011 IT MI20112433

30.12.2011 IT MI20112435

30.12.2011 IT MI20112439

30.12.2011 IT MI20112440

30.12.2011 IT MI20112441

30.12.2011 IT MI20112443

30.12.2011 IT MI20112445

30.12.2011 IT MI20112446

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

19.04.2017

73 Titular/es:

INNOMED S.A. (100.0%)

1, rue Jean Piret

2350 Luxembourg, LU

72 Inventor/es:

BARTORELLI, ALBERTO y

GOBBI, MARIA ROSA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 609 352 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

Combinación de factores de crecimiento, citoquinas, factores antibacterianos/antivíricos, factores estimulantes de células madre, proteínas del complemento C3a/C4a, inmunoglobulinas y factores quimiotácticos

La presente invención se refiere a una combinación de factores de crecimiento, citoquinas, factores antibacterianos/antivíricos, factores estimulantes de células madre, proteínas del complemento C3a/C4a, inmunoglobulinas y factores quimiotácticos. La invención también se refiere a un proceso para la preparación de dicha combinación a partir de suero, placenta o calostro y a una composición que contiene dicha combinación para uso en el tratamiento de afecciones que requieren reparación y regeneración de tejido y para la sustitución de terapias de células madre.

Antecedentes de la invención

Según la bibliografía científica actual, la acción terapéutica de las células madre puede ser debida a dos mecanismos: diferenciación de células madre a células residentes y liberación de factores tróficos regenerativos por las células madre. Las contribuciones respectivas de estos dos mecanismos se deben clarificar, aunque se ha sugerido que las células madre no se desarrollan a células maduras del tejido lesionado, sino que más bien transportan factores vitales a este tejido, que pueden después volver a proliferar y diferenciarse, regenerándose él mismo (Al Caplan y JE Denni, Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. Bioch J. Cell 98:1076-1084, 2006).

La terapia con células madre tiene muchos problemas relacionados no solo con los costes y complicaciones técnicas y prácticas sino también con escrúpulos éticos y religiosos.

La terapia con células madre es factible solo por inyección o, en algunos casos, por vía tópica, y no oral. El sobrenadante de células madre cultivadas contiene factores de crecimiento, citoquinas, factores quimiotácticos, etc., que se cree que son responsables para el efecto beneficioso de la terapia con células madre sobre el crecimiento y/o reparación de tejido.

El uso de factores vitales aislables del sobrenadante de células madre tiene, sin embargo, no solo los mismos problemas éticos del uso de las células madre mismas, sino también costes muy altos.

Se sabe que algunos tejidos y fluidos biológicos de mamífero, es decir, suero, placenta y calostro, contienen citoquinas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, y otros componentes habitualmente encontrados también en el sobrenadante de cultivos de células madre.

Se han divulgado varias aplicaciones terapéuticas en el pasado para calostro puro o de extractos o fracciones del mismo, así como para extracto de placenta. Por ejemplo, se describe una revisión de los usos clínicos del calostro en *Alternative Medicine Review* 8(4), 2003, página 378 y en *Int. J. Clin. Pharmacol and Therap.*, 46(5), 2008, 211-225 y en *International Dairy Journal*, 16, 2006, 1415-1420.

También se describen los usos terapéuticos del calostro o fracciones del mismo en los documentos EP 743060, WO 98/51316, WO 94/16675, WO 98/36759, WO 95/00155, WO 2007/000648, FR 2487676, WO 98/14473, WO 99/64022, WO 2008/103023 y WO 2006/029494. El último divulga la extracción de factores de crecimiento y diferenciación del calostro, pero el proceso divulgado necesariamente implica la pérdida de componentes importantes (por ejemplo, citoquinas, factores estimulantes de células madre, factores quimiotácticos y factores antibacterianos/antivíricos) de calostro puro. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga composiciones derivadas de fuentes de mamíferos fácilmente disponibles que contienen la mayoría de si no todos los componentes del sobrenadante de cultivos de células madre, como un sustituto para terapia de células madre.

Descripción de la invención

Se ha encontrado que una combinación de factores de crecimiento, citoquinas, factores antibacterianos/antivíricos, factores estimulantes de células madre, proteínas del complemento C3a/C4a, inmunoglobulinas y factores quimiotácticos es particularmente eficaz en el tratamiento de un número de patologías gracias a sus actividades multifuncionales sobre diferentes dianas biológicas.

La combinación de la invención se caracteriza por un contenido de:

Citoquinas: desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 pg/mg, preferiblemente de 47,81 a 264,56;
Factores de crecimiento: desde aproximadamente 650 hasta aproximadamente 1900 pg/mg, preferiblemente desde 670,80 a 1869,40;
Factores quimiotácticos; desde aproximadamente 2 a 20 pg/mg;
Factores estimulantes de células madre; desde aproximadamente 100 a 1200 pg/mg, preferiblemente de 136 a 1120;
Factores antibacterianos/antivíricos: desde aproximadamente 30 a 80 µg/mg, preferiblemente de 21,30 a 71,50;

Proteínas del complemento C3a/C4a: desde aproximadamente 1 a 5 pg/mg, preferiblemente de 1,10 a 2,70;
 Inmunoglobulinas: desde aproximadamente 0,3 a 0,9 mg/mg, preferiblemente de 0,35 a 0,85.

5 Las citoquinas presentes en la combinación de la invención, de aquí en adelante denominada PMF Ab, se describen en la tabla 1:

Tabla 1: Citoquinas en PMF Ab (pg/mg)

	Val min	Val max
IL-1a	0,80	2,90
IL-1b	0,02	0,09
IL-2	0,75	5,00
IL-4	0,04	0,17
IL-6	0,10	1,20
IL-8	0,50	2,50
IL-9	0,50	3,60
IL-10	0,50	2,80
IL-12	0,50	2,00
IL-15	1,10	4,30
IL-17	15,00	150,00
IFN gamma	3,00	30,00
TNF α	15,00	30,00
IL-1 Ra	10,00	30,00
total	47,81	264,56

10 Los factores de crecimiento presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 2:

Tabla 2: Factores de crecimiento en PMF Ab (pg/mg)

	Val min	Val max
TGF- β 1	150,00	300,00
IGF-1	300,00	800,00
NGF	1,00	10,00
PDGF	5,00	100,00
EGF	4,80	9,40
BMP2	15,00	50,00
b.FGF	100,00	200,00
FGF-2	5,00	20,00
HGF	40,00	80,00
VEGF	50,00	300,00
total	670,80	1869,40

Los factores estimulantes de células madre presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 3:

15 **Tabla 3:** Factores estimulantes de células madre en PMF Ab (pg/mg)

	Val min	Val max
G-CSF	10,00	20,00
GM-CSF	100,00	1000,00
LIF	15,00	50,00
SCF	1,00	10,00
SDF-1	10,00	40,00
total	136,00	1120,00

Los factores quimiotácticos presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 4:

Tabla 4: Factores quimiotácticos en PMF Ab (pg/mg)

	Val min	Val max
EOTAXINA	1,00	15,00
MCP-1	1,00	5,00
total	2,00	20,00

20 Los factores antibacterianos/antivíricos presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 5:

Tabla 5: Factores antibacterianos/antivíricos en PMF Ab (microgramos/mg)

Transferrina	0,50	1,00
Lactoferrina	0,80	2,50

Lisozima	10,00	40,00
Lactoperoxidasa	10,00	30,00
total	21,30	73,5

Las proteínas del complemento C3a C4a presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Proteínas del complemento en PMF Ab

	Val min	Val max
C3A	0,20	0,70
C4A	0,90	2,00
total	1,10	2,70

5

Las inmunoglobulinas presentes en la combinación de la invención se describen en la tabla 7.

Tabla 7: Inmunoglobulinas en PMF Ab (mg/mg)

	Val min	Val max
IgG	0,20	0,50
IgA	0,10	0,20
IgM	0,05	0,15
total	0,35	0,85

10 Los datos descritos en las tablas 1-7 se obtuvieron por métodos de ELISA sándwich comercialmente disponibles específicos para moléculas bovinas y sistema Bio-Plex® flexible (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, EE UU). El término “aproximadamente” significa una variación del $\pm 10\%$, preferiblemente del $\pm 5\%$ del valor dado.

15 Los principales papeles fisiológicos de los componentes de la combinación se describen a continuación.

Proteínas del complemento C3/C4: El complemento consiste en proteínas circulantes capaces de interactuar con las membranas biológicas y con receptores específicos situados en la superficie de varios tipos celulares, que inducen reacciones inflamatorias que ayudan a combatir la infección.

20 Factores de crecimiento

TGF- β 1 – Factor de crecimiento transformante: estimula la producción de inmunoglobulinas de clase A, que son responsables para defensas inmunitarias en la mucosa. Modula la proliferación celular y estimula el depósito de matriz extracelular.

25 EGF – Factor de crecimiento epidérmico: regula el desarrollo de la mucosa. Fomenta la formación de células epiteliales.

30 IGF 1 – Factor de crecimiento de tipo insulínico: modula la proliferación adhesión y migración celular e induce madurez de la mucosa.

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular: estimula la producción de vasos sanguíneos. Presenta actividad mitogénica y activación de la permeabilidad vascular.

35 FGF-b – Factor de crecimiento de fibroblastos básico: estimula la proliferación de células de origen mesenquimatoso tal como fibroblastos, células endoteliales, astrocitos y queratinocitos. También actúa como un factor quimiotáctico.

GH – Hormona de crecimiento: factor de crecimiento general para todos los tejidos.

40 GHRF – Factor de liberación de la hormona de crecimiento: estimula la liberación de GH. Requerido para el crecimiento posnatal normal, crecimiento de hueso, efectos reguladores sobre el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y lípidos.

45 NGF – Factor de crecimiento nervioso: estimula la actividad y regula el crecimiento y diferenciación del sistema simpático.

PDGF – Factor de crecimiento derivado de plaquetas: crecimiento/diferenciación de células de origen mesodérmico.

50 BMP-2 – Proteína morfogenética de hueso 2: Desarrollo de hueso y cartílago, diferenciación de células cardíacas.

Factores quimiotácticos.

Eotaxina: se une a los receptores de quimioquina para reclutar eosinófilos a tejidos inflamados.

MCP-1 Factor quimiotáctico de monocitos: fomenta la agregación de monocitos a tejidos inflamados.

Citoquinas

5 IL-1Ra inhibe las actividades de interleuquina 1 alfa e interleuquina 1-beta, modulando una variedad de respuestas inmunitarias e inflamatorias relacionadas con IL 1.

10 IL-2 induce proliferación de linfocitos T.

IL-4 posee actividad antiinflamatoria.

IL-6 estimula la inmunidad innata y adaptativa.

15 IL-9 es un regulador de células hematopoyéticas, estimula la proliferación celular y previene la apoptosis.

IL-17 regula las actividades de NF-KB y aumenta la producción de óxido nítrico (NO).

20 IL-10 tiene efectos pleotrópicos en inmunorregulación e inflamación. Mejora la supervivencia de células B y, por tanto, la producción de anticuerpos. Estudios realizados en ratones deficientes demuestran que esta proteína es esencial en la inmunorregulación de la mucosa.

IL-12 estimula células T y citolíticas naturales.

25 IL-15 regula la activación y proliferación de células T y citolíticas naturales.

El interferón gamma tiene actividades antivíricas, antitumorales e inmunorreguladoras conocidas. Es un potente activador de macrófagos y activa la actividad celular contra bacterias y virus.

30 TNF- α – Factor de necrosis tumoral estimula la migración de neutrófilos y monocitos al sitio de infección.

Factores estimulantes de células madre

35 GM-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos: está implicado en la estimulación y rechazo periférico de progenitores inmunitarios desde la médula ósea.

40 LIF - Factor inhibidor de leucemia: citoquina pleotrópica con papeles en varios sistemas diferentes, implicada, por ejemplo, en la inducción de diferenciación hematopoyética en células normales y de leucemia mieloide, inducción de diferenciación celular neuronal, regulador de conversión mesenquimatoso a epitelial durante el desarrollo del riñón.

SCF – Factor de células madre: actúa en el útero en el desarrollo de células germinales y células neurales y hematopoyesis.

45 SDF-1 – Factor derivado del estroma 1: actúa como un factor quimiotáctico de células madre-progenitoras que expresan el ligando de CXCR4.

Antibacterianos

50 Transferrina: administra hierro a los glóbulos rojos y previene que las bacterias y virus se unan al hierro.

Lactoferrina: priva a bacterias y virus del hierro requerido para su crecimiento.

55 Lisozima: tiene efectos antibacterianos en vista de su actividad enzimática y como consecuencia de sus propiedades catiónicas e hidrofóbicas.

Lactoperoxidasa; inhibe el metabolismo bacteriano por oxidación de grupos SH de proteínas esenciales.

60 La combinación de la invención se puede preparar por extracción de calostro, suero de mamíferos preparto o placenta según los métodos detallados a continuación.

El suero tiene el mayor pico de los factores en los últimos días antes del nacimiento, el calostro en las primeras horas después del nacimiento y no más tarde de la 6ª hora.

65 Después de 12 horas del parto, los factores en el calostro disminuyen significativamente y a las 24 horas muchos de ellos ya no son detectables.

ES 2 609 352 T3

Estos factores están genéticamente muy conservados en diferentes especies y, por tanto, es posible usar factores aislados de otra especie de mamíferos tal como ganado, caballos, camellos, mamíferos marinos, etc.

5 Los factores se controlan con ensayos ELISA, específicos para la especie, incluso si la reacción cruzada interespecie es muy alta porque los factores están filogenéticamente muy conservados y por tanto son cualitativamente medibles también con el ELISA usado para especies diferentes (por ejemplo, humano-bovino y viceversa).

10 No es necesario añadir conservantes antibacterianos al calostro, suero o placenta, ya que el procedimiento de extracción permite la preparación de un producto que tiene un recuento bacteriano muy bajo (<40 u.f.c.), mucho menor que el valor admitido para los usos considerados (<1000 u.f.c.). La presencia de pirógenos para la administración oral o tópica es irrelevante.

15 Extracción de suero de mamífero

El suero de hembras preñadas de mamíferos tiene el pico más alto de los componentes de la combinación de la invención en los últimos días antes del parto o nacimiento, habitualmente en los últimos 5-15 días.

20 Se describe en procedimiento típico para la preparación de la combinación de la invención.

Se saca 1 litro de sangre en 4 días para un total de 4 muestras para prevenir daño al animal, preferiblemente bovino o equino.

25 Se separa el suero de la sangre a temperatura ambiente durante 24 horas y después se centrifuga para apretar el coágulo.

Se recupera el suero (aproximadamente el 30/40% del volumen total) y después se somete a los siguientes pasos.

30 Ultrafiltración de 300.000 Da:

La muestra de suero (congelada a -20°C) obtenida por coagulación y centrifugación de sangre de mamífero se descongela a temperatura ambiente y se diluye con 2 volúmenes de agua desmineralizada. La solución resultante se ultrafiltra a través de una membrana de flujo tangencial plano Millipore Biomax Pellicon 300.000 Da en polietersulfona a Pi de 0,5 a 1 bar, en una cámara fría a 4°C.

35 El retenido y la fracción correspondiente a aproximadamente 1:10 del permeado se transfieren a una bolsa de diálisis de 1000 Da de Spectrum SpectraPor en celulosa regenerada y se dializa frente a agua desmineralizada.

40 Ultrafiltración de 5.000 Da:

El permeado restante se ultrafiltra a través de una membrana de 5000 Da. El permeado de la ultrafiltración de 300.000 Da se concentra en una membrana de flujo tangencial plano de 5000 Da Millipore Biomax Pellicon en polietersulfona a Pi de 0,5 a 1 bar, cámara fría a 4°C.

45 El retenido se transfiere a una bolsa de diálisis de 1.000 Da en celulosa regenerada de Spectrum SpectraPor y se dializa frente a agua desmineralizada. El producto se liofiliza después inmediatamente.

Extracción de placenta

50 Preferiblemente se usa placenta bovina equina o porcina.

Homogenización:

55 La placenta (congelada a -20°C) se descongela a temperatura ambiente, se corta en trozos pequeños, se lava con cantidades copiosas de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) fría (4°C) y se homogeniza usando un cortador Siramm en un tampón de lisis que tiene la siguiente composición: Tris/HCl 50 mM, EDTA 25 mM, triton X-100 al 0,001% a pH 7,4. Se añade NaCl a una concentración del 0,9% a la suspensión obtenida. La suspensión se agita (agitador magnético) durante 2 horas y se mantiene estática durante la noche en una cámara fría a 4°C.

60 Centrifugación

La suspensión se centrifugó a 13.000 rpm con una Sorvall RC6 y rotor SLA 15000 durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante de la centrifugación se recupera, se prefiltra al vacío en filtros Dicalite y de celulosa regenerada de 0,45 µm a 0,22 µm.

65 Ultrafiltración de 300.000 Da:

El producto se filtra y ultrafiltra a través de una membrana de flujo tangencial plano Millipore Biomax Pellicon de 300.000 Da en polietersulfona a Pi de 0,5 a 1 bar, en una cámara fría a 4°C.

5 Ultrafiltración de 5.000 Da:

10 El permeado de la ultrafiltración de 300.000 Da se concentra en una membrana de flujo tangencial plano de 5000 Da Millipore Biomax Pellicon en polietersulfona a Pi de 0,5 a 1 bar, cámara fría a 4°C. El retenido se transfiere a una bolsa de diálisis de 1.000 Da de Spectrum SpectraPor en celulosa regenerada y se dializa frente a agua desmineralizada y después se liofiliza inmediatamente.

Extracción de calostro

15 Se prefiere calostro bovino, en particular de vacas Holstein (frisona) y Guernsey. Se ha demostrado que estas vacas producen el calostro con la mayor concentración de factores de crecimiento, moduladores inmunitarios, factores quimiotácticos y factores antibacterianos/antiviricos. Las vacas preferiblemente están de parto por segunda o tercera vez. El calostro preferiblemente se recoge no más tarde de la 5ª-6ª hora después del parto, preferiblemente el calostro se recoge una hora después del parto, porque la mayor concentración de sustancias activas se encuentra durante ese periodo, mientras que a partir de la sexta hora los factores activos disminuyen rápidamente (solo un 20% están presentes 24 horas después del parto).

El calostro recogido se ensaya para tuberculosis, citotoxicidad en cultivos celulares, micoplasma, priones y virus humanos y bovinos.

25 El calostro en la cisterna de la ubre es prácticamente estéril, pero una vez ordeñado, a pesar de todas las precauciones, debido a la alta concentración de factores de crecimiento, su recuento de bacterias sube muy rápidamente durante la congelación y descongelación, que son procesos bastante lentos en vista de la alta densidad del calostro en las primeras horas.

30 El calostro se diluye después con solución salina: esta dilución no solo produce mejor filtración sin atascar los poros del filtro, sino que sobre todo permite la liberación de factores activos unidos a grasas y caseína. El calostro así diluido experimenta microfiltración tangencial (membranas cerámicas con un límite entre 2 y 6 µm, temperatura 5/20°C, presión transmembrana entre 0,2 y 2 bares), que se puede repetir, para obtener una solución opalescente libre de caseína, matriz grasa y proteínas de la leche. Todas estas sustancias constituyen más del 90% del contenido alérgico del calostro y la leche de vaca. La solución se pasa después a través de membranas, o 35 alternativamente un tamiz molecular con un límite de 300.000 dalton, para la purificación adicional de los factores activos, que pesan todos menos de 200.000 dalton.

40 La solución se dializa después por ultrafiltración (límite 1000/2000 dalton) a alta presión, y después se liofiliza inmediatamente. El resultado es un polvo sin conservantes analérgico (la caseína y la lactoalbúmina son responsables de más del 95% de las alergias a la leche de vaca) de solubilidad muy alta, con la máxima concentración posible de factores activos y caracterizado por un recuento bacteriano muy bajo (<40 UFC).

45 Los productos obtenidos de suero, placenta o calostro se pueden usar por separado o se pueden juntar. Los productos en cualquier caso cumplen los intervalos cuantitativos especificados en las tablas 1-7.

50 La combinación de la invención se usa ventajosamente, sea por vía oral o tópica, en el tratamiento de afecciones que requieren reparación y regeneración de tejido, para la sustitución de terapias de células madre. En particular, la combinación de la invención, que contiene los mismos componentes del sobrenadante de cultivos de células madre, es útil para el tratamiento oral de:

- enfermedades autoinmunitarias, específicamente diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis, hepatitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa;
- dolor neuropático;
- 55 - enfermedades gastrointestinales tales como enterocolitis aguda necrotizante, enfermedad de Crohn, reflujo gastroesofágico, enterocolitis inducida por SIDA, síndrome del intestino irritable, colitis infecciosa, colitis espástica, colitis inducida antibióticos, hernias de hiato, síndrome del esófago corto y similares;
- osteoporosis;

60 La combinación de la invención también es útil para el tratamiento tópico de:

- diferentes formas de alopecia;
- lesiones de córnea;
- heridas, quemaduras, úlceras de piel;
- 65 - lesiones de la mucosa oral.

Para el tratamiento oral, la combinación de la invención se formulará con soportes y excipientes adecuados en formas farmacéuticas adecuadas tal como cápsulas, comprimidos, polvos, granulados, suspensiones, alimentos funcionales y formas similares convencionalmente usadas en el campo nutracéutico.

5 La dosis diaria de la combinación dependerá del tipo y gravedad de la afección que se va a tratar, así como de las condiciones del paciente, edad y sexo. Generalmente variará de 10 a 30 g diarios, en una o más administraciones, típicamente de tres a cuatro administraciones.

10 Para el tratamiento tópico, las formas de administración adecuadas incluyen cremas, pomadas, geles, polvos, lociones, colutorios, parches, que comprenden típicamente del 10 al 20% en peso de la combinación de la invención. La combinación de la invención obtenida de calostro, suero o placenta, si se desea se puede recubrir para aplicaciones específicas, por ejemplo, en formas de liberación controlada, preferiblemente en microesferas.

15 Las formulaciones pueden contener otros ingredientes útiles para usos específicos. Por ejemplo, para el tratamiento de heridas y úlceras, se pueden añadir adecuadamente óxido de cinc y extracto de *Arnica montana*.

La invención se describirá en más detalle en la siguiente parte experimental, dada a modo de ejemplos.

Ejemplo 1 – Enfermedad autoinmunitaria

20 Se evaluaron los efectos de la administración oral preventiva de PMF Ab en diferentes modelos de enfermedades autoinmunitarias como encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), diabetes de tipo I, colitis ulcerosa inducida por TNBS, hepatitis inducida por ConA y artritis inducida por adyuvante y por colágeno.

Ejemplo 1a – Encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)

25 Se indujo EAE en ratones SJL hembras de 6-7 semanas de edad como se divulga en J. St. Louis et al. Los ratones se inmunizaron con 75 µg de proteína proteolipídica PLP (139-151) (Genemed sybthesis, San Francisco, CA), emulsionada en CFA que contenía 0,6 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37A (Difco, Detroit, MI, EE UU) para dar una emulsión 1:1. Cada ratón recibió 200 µl de la emulsión sc en cuatro sitios proximales a ganglios linfáticos axilares e inguinales. Se usó la toxina pertúsica (Calbiochem, Nottingham, RU) como coadyuvante, disuelta en agua a la concentración de 2 µg/ml se administró ip en un volumen de 100 µl el día 0 y el día 2 después de la inmunización. La evaluación clínica se llevó a cabo según la siguiente puntuación: 0 = sin signos de enfermedad, 1 = cola flácida, 2 = paraparesia moderada, 3 = paraparesia grave, 4 = moribundo, 5 = muerte.

35 Dos grupos de 6-10 ratones cada uno se administraron por vía oral respectivamente PMF Ab a la dosis de 0,1 g/ratón y su vehículo (agua) empezando el día 0.

40 PMF Ab se disolvió en agua a una concentración de 0,1 mg/ml y se administró en un volumen final de 0,25 ml.

Resultados

Efectos de P.M.F. Ab en el desarrollo de EAE inducida por PLP (proteína del proteolípido) y toxina pertúsica.

45 Después de 42 días de tratamiento con P.M.F. Ab (25 microgramos), la enfermedad se desarrolló solo en 2 de 6 ratones (33,3%) comparado con 9 de 10 ratones en el grupo de ratones tratados con vehículo (90%). Además, los ratones tratados con P.M.F. Ab desarrollaron un curso más moderado de la enfermedad con menor puntuación acumulada media y una duración más corta de la enfermedad que los ratones tratados con el vehículo (tabla 8).

50 **Tabla 8.** Efectos de PMF Ab en los parámetros clínicos en EAE inducida en ratones SJL por PLP

Media	puntuación acumulada	duración	Incidencia
P.M.F. Ab	9.2	4.3	33.3
Vehículo	29.4	13.6	90.0
Desv. est.	puntuación acumulada	duración	Incidencia
P.M.F. Ab	15.4	7.2	
Vehículo	18.6	8.5	
Prueba de la T	puntuación acumulada	duración	
P.M.F. Ab	0.042	0.040	

Ejemplo 1b – Diabetes de tipo I

55 La diabetes mellitus de tipo I (DM de tipo I) es un síndrome multifactorial causado por el fallo de producción de insulina endógena como resultado de la respuesta inmunitaria de linfocitos T autorreactivos y macrófagos contra las células beta pancreáticas de Langerhans.

Se administraron 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ) ip durante 5 días consecutivos a ratones C57Bl6J machos de 7-8 semanas de edad.

5 Se trataron dos grupos de 7-8 ratones por vía oral desde el día 0 al día 21 seis veces a la semana con PMF Ab a una dosis de 0,2 g/ratón o con el vehículo. PMF Ab se disolvió en agua a una concentración de 0,4 mg/ml y se administró en un volumen final de 0,5 ml.

10 Los ratones se controlaron una vez a la semana midiendo la glucemia. Se diagnosticó diabetes cuando la glucemia superaba 11.8 mmol/l.

Resultados

15 Como se esperaba, los ratones que pertenecían al grupo control tratado con vehículo desarrollaron hiperglucemia 2 semanas después de la última inyección de STZ y alcanzaron el 100% de incidencia a las 3 semanas.

En contraste, el tratamiento profiláctico con P.M.F. Ab tiene ratones completamente protegidos de hiperglucemia inducida por STZ.

20 El tratamiento con P.M.F. Ab durante 21 días a una dosis de 0,2 g/ratón era bien tolerado.

Ejemplo 1c – Colitis ulcerosa inducida por TNBS

25 Para estudiar los posibles efectos de P.M.F. Ab en esta patología autoinmunitaria específica de órgano se usó el modelo experimental de EII inducida por TNBS.

En el modelo, una única administración de TNBS es responsable de la aparición, a los 4 días, de una enfermedad con características inmunohistológicas muy similares a las encontradas en la enfermedad intestinal inflamatoria humana tal como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

30 Se indujo la colitis en 20 ratones Balb/C machos, que pesaban 20-25 g, por una única administración intracólica el día 0 de una solución de 4 mg de sulfato de trinitrobenzeno (TNBS) en 0,1 ml etanol al 50%.

35 Se trataron 10 animales por vía oral con PMF Ab a la dosis de 0,2 g/ratón y 10 animales (controles) se trataron con el vehículo correspondiente (agua), a diario durante 4 días consecutivos empezando desde la inducción (días 0, 1, 2 y 3).

40 Los animales se sacrificaron el día 4 y se evaluó el daño en la mucosa (ADM) en un segmento de colon distal de 7 cm. La evaluación de la puntuación del daño macroscópico (SDM) se evaluó según los siguientes criterios: 0 = sin daño; 1 = hiperemia y/o edema localizado; 2 = úlcera lineal < de la mitad de la anchura del colon; 3 = úlcera lineal > de la mitad de la anchura del colon; 4 = úlcera circular < 1 cm; 5 = úlcera circular de 1 a 2 cm; 6 = úlcera circular > 2 cm.

Resultados

45 Como se esperaba, en el grupo control hubo una reducción significativa en el peso corporal entre el día 0 y el día del sacrificio (-18%), un aumento del peso del colon (0,47 ± 0,16 g), y un marcado daño en la mucosa del colon (ADM media = 68 ± 57 mm², tabla 9).

50 El tratamiento con PMF Ab a una dosis de 0,1 g/ratón mostró una reducción significativa en el área de necrosis y una tendencia positiva hacia la disminución del peso del colon.

Tabla 9. Efectos de PMF Ab en los parámetros clínicos en colitis inducida por TNBS en ratones.

	Puntuación de heces	Peso del colon	Área de necrosis
P.M.F. Ab	0.9	0.342	19.98
Vehículo	1.8	0.469	67.61
Fingido	0	0.130	0
P.M.F. Ab	1.05	0.08	12.71
Vehículo	1.67	0.16	57.09
Fingido		0.05	
P.M.F. Ab	0.217	0.053	0.027

Ejemplo 1 d – Hepatitis autoinmunitaria

55 Se usó el modelo experimental de hepatitis inducida por ConA en ratones NMRI.

En este modelo, la única inyección de Con A es suficiente para desarrollar lesión hepática inmunomediada, evaluada por los niveles en plasma de glutamato-piruvato transaminasa (GPT).

5 Se inocularon 20 ratones NMRI albino machos, de 6-7 semanas de edad, iv con 20 mg/kg de Con A (Sigma Chemical, St. Louis, MO) en PBS estéril.

10 animales se trataron por vía oral con PMF Ab a la dosis de 0,2 g/ratón y 10 animales (controles) se trataron con el vehículo correspondiente (agua), 24 horas antes y 1 hora antes de la inoculación con Con A.

10 Los animales se sacrificaron 8 horas después de las inyecciones de Con A y se determinó la glutamato-piruvato transaminasa en plasma.

Resultados

15 Después del sacrificio, se encontraron signos de daño hepático agudo en todos los ratones del grupo control inyectado con Con A y tratados con agua. Estos animales tenían, de hecho, aumentos marcados en GPT en plasma, alcanzando una media de 1556 ± 869 U/I (tabla 10). El tratamiento con PMF Ab a una dosis de 0,2 g/ratón redujo significativamente los niveles de GPT en el plasma (p.01 por prueba de la t de Student).

20 **Tabla 10:** Valores de GPT en ratones tratados con Con A

GPT	Vehículo	P.M.F. Ab
MEDIA	1555.9	442.8
DESV. EST.	868.7	622.4
Prueba de la T		0.004

Ejemplo 1e – Artritis inducida por colágeno de tipo II en ratones DB/1j (CIA)

25 La enfermedad se puede inducir en ratones y en ratas por inyección intradérmica de homólogos o heterólogos de colágeno de tipo II emulsionados en adyuvante de Freund completo.

Los efectos de PMF Ab se evaluaron probando el PMF Ab a una dosis de 0,2 g/ratón. Los animales se observaron en días alternos para la evaluación de parámetros clínicos significativos.

30 Se usaron 40 ratones DBA/j1 macho, de 8-9 semanas de edad. La enfermedad se indujo por medio de una inoculación intradérmica de una emulsión de 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl emulsionado en adyuvante de Freund completo (CFA) (Sigma, Milán, Italia). Los animales recibieron un segundo recuerdo el día 21 tras la inmunización por medio de inoculación intradérmica de 100 µg de colágeno de tipo II en un volumen total de 100 µl de adyuvante de Freund completo.

35 Cuatro grupos de 10 animales cada uno se trataron respectivamente por vía oral a diario con PMF Ab (0,2 g/ratón), con el vehículo correspondiente (PBS estéril) y con dexametasona (0,3 mg/kg), empezando desde el día de la inducción hasta el día 30 tras la inducción. Un grupo adicional de 10 ratones sanos se añadió (referencia). Se evaluó el índice clínico de artritis puntuando la pata de cada animal (espesor, hinchamiento/edema, implicación de una, dos o más articulaciones).

Resultados

45 Los animales del grupo control desarrollaron signos clínicos asociados a artritis a los 29 días después de la inducción, mostrando un aumento gradual tanto en la puntuación clínica de la enfermedad como en el espesor de la pata, alcanzando un valor máximo el día 40. No se encontró diferencia entre el aumento en pesos corporal en el grupo tratado y en el grupo control.

50 PMF Ab a una dosis de 0,2 g/ratón redujo significativamente la puntuación clínica de la enfermedad (p < 0,05 frente a vehículo por prueba de la t) desde el día 30 al día 33 tras la inducción, con una tendencia positiva a partir del día 34 hasta el final del estudio.

Se obtuvieron resultados similares con ratas Lewis, en un modelo de artritis inducida por adyuvante.

55 **Ejemplo 2 – Dolor neuropático**

Ejemplo 2a – Experimentos en animales

60 Se usó el modelo de lesión de constricción crónica (LCC, Bennett y Xie, 1998) porque produce una degeneración Waleriana robusta e inflamación. Además, puesto que algunas fibras sobreviven a la lesión, permanece la posibilidad de realizar pruebas de comportamiento para evaluar los síntomas de dolor.

Se indujo la neuropatía en ratones C57BL/6J macho de nueve semanas, que pesaban 20-25 g. Con anestesia de barbiturato, con la ayuda de un microscopio de disección, el nervio ciático se expuso en el medio de la pata derecha y antes de la trifurcación y se hicieron tres ligaduras flojas a su alrededor, teniendo cuidado de conservar la circulación epineural.

5

Animales con operación falsa (exposición del nervio sin ligación) sirvieron como control.

Se evaluó la hiperalgesia térmica según el procedimiento de Hargreaves modificado para la rata, usando una prueba plantar de herramienta. Brevemente, los ratones se colocan en cajas pequeñas de Plexiglas y una fuente de calor radiante de intensidad constante se dirige hacia la parte central de la pata trasera. Se registró el tiempo (segundos) desde la activación de la fuente hasta la retirada de la pata.

10

Se administró PMF Ab por vía oral a una dosis de 0,4 g/ratón cada día desde el momento de la lesión durante tres semanas.

15

Resultados

Los resultados se describen en la siguiente tabla 11

DÍAS		14	21	28
UMBRALES DE LATENCIA (DÍAS)	Controles	18	20	18
	Neuropatía	12	14	18
	Tratamiento con PMF Ab	8	7	9

20

El tratamiento con PMF Ab produjo un aumento en los umbrales de analgesia que fueron significativamente mayores que en los animales neuropáticos tratados con diluyente ya desde el día 21 hasta alcanzar los mismos niveles de los animales normales el día 28 de tratamiento.

25

Ejemplo 2b – Experimentos clínicos en seres humanos

Seis sujetos 4 hombres y 2 mujeres, que padecían dolor posherpético después de herpes desde dos a tres años, se trataron cada día durante treinta días con PMF Ab por vía oral (10 g/diario).

30

Se evaluó el dolor subjetivamente usando VAS (Escala análoga visual) y objetivamente, usando una prueba de hiperalgesia representada por estimulación con filamentos de von Fey de las áreas afectadas por la enfermedad y sus áreas circundantes.

35

El estudio era “abierto”, evaluando los niveles de dolor e hiperalgesia desde el basal (inicio del tratamiento).

Los sujetos tratados con PMF Ab experimentaron una mejora de la sensación de dolor subjetivo, con una variación en VAS después de 15 días de tratamiento de 6,0 a 2,0. El último valor se mantuvo hasta el final del tratamiento (30 días). La estimulación con filamento de von Frey (secuencia de presiones de 0,05 a 140 g) produjo curvas significativamente diferentes de VAS/fuerza aplicada lo que indica una mejora progresiva de la hiperalgesia desde el vigésimo día de tratamiento hasta el final.

40

Ejemplo 3 – Tratamiento de anorexia

Veinte pacientes mujeres con edades entre dieciséis y treinta años, que padecían anorexia nerviosa con pérdida de peso entre el 15 y el 30% de lo que se considera normal para la edad y la estructura física, se trataron a diario con 40 g de PMF Ab por vía oral. Es interesante indicar que todas las pacientes, a pesar de los graves problemas nutricionales, estuvieron de acuerdo en tomar el producto ya que se les aseguró que el producto mismo no aumenta la grasa corporal sino solo la masa muscular, influyendo positivamente en los parámetros cardiovasculares, respiratorios y neurológicos.

50

Después de tres meses de terapia adyuvante, el 50% había recuperado más del 30% del peso corporal con una mejora significativa en las capacidades físicas y mentales. Los parámetros químicos de la sangre se normalizaron.

55

Sorprendentemente, el 25% de estas pacientes incluso volvieron a comer normalmente con recuperación total de la masa corporal. El 25% restante no respondió.

Ejemplo 4 – Osteoporosis

Se evaluó el efecto de P.M.F. Ab en ensayos in vitro e in vivo para la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimatosas osteogénicas, progenitores de hueso, y osteoblastos.

60

Ejemplo 4a – Pruebas in vitro

Proliferación

5 Se evaluaron los efectos de P.M.F. Ab sobre la proliferación celular usando células osteoblastos humanos (Saos-2 y MG-63) y células madre mesenquimatosas humanas, como modelo de precursor de osteoblastos (células madre derivadas de tejido adiposo humanas, hASC).

10 Las ASC se aislaron (Zuk PA et al., 2001) de 6 voluntarios donantes y se mantuvieron en medio control (DMEM suplementado con piruvato de sodio, SFT al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml y anfotericina B 250 ng/ml). Se compraron la línea de osteoblastos Saos-2 (número ATCC: HTB-85) y MG-63 (número ATCC: CRL-1427) de la ATCC. Saos-2 y MG-63 se mantuvieron respectivamente en McCoy'5A (Gibco, Life Technologies) con SBF al 15%, y en DMEM con SFT al 10%.

15 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se sometieron a prueba de MTT los días 1, 3, 5 y 7 y se mantuvieron en una atmósfera humidificada de CO2 al 5% en aire a 37°C. PMF Ab muestra un potente efecto proliferativo dependiente de la dosis en todas las líneas estudiadas, alcanzando un techo a una concentración de 5 mg/ml.

Ejemplo 4b – Pruebas in vivo en ratas hembras ovariectomizadas

20 Se investigaron los efectos de PMF Ab en la masa ósea en un modelo animal de osteopenia (ovariectomía quirúrgica) en rata madura comparado con osteoporosis posmenopáusica humana.

25 Se usaron ratas Sprague-Dawley de 5 meses de edad sometidas a ovariectomía bilateral quirúrgica. Se evaluaron los efectos de PMF Ab en la masa ósea midiendo la densidad mineral del hueso (BMD) femoral tanto planar como volumétrico (metáfisis distal y diáfisis medial) por medio de densidad mineral del hueso computarizada (DXA) y tomografía computarizada de hueso (pQCT). Se estimaron los ARNm para interleuquina-8, el factor RANKL y péptido osteoprotegina como marcadores bioquímicos de recambio de hueso. Las ratas se trataron durante 60 días desde el momento de la ovariectomía con PMF Ab por vía oral (2-4-8 g/kg) durante 5 días/semana. Se evaluaron tanto BMD como los parámetros bioquímicos del recambio óseo tanto antes (T0), durante (T30) como al final del tratamiento (T60).

35 El tratamiento indujo una recuperación dependiente de la dosis de osteopenia y una normalización de los parámetros bioquímicos relacionados.

Ejemplo 5 – Tratamiento de colitis necrotizante aguda (NEC)

40 Se usó un modelo de NEC en cerdos, idéntico a los efectos patológicos macroscópicos y microscópicos en seres humanos.

1. Comparación de sujetos alimentados con leche maternizada + PMF Ab y sujetos solo alimentados con leche maternizada

45 Los sujetos alimentados con leche maternizada más 20 g/día de PMF Ab tienen un crecimiento regular comparable al del grupo control mantenido con la cerda. Los cochinitos alimentados desde el nacimiento solo con leche maternizada, después del primer día de crecimiento regular, muestran desde el segundo día postración, ataxia locomotora, interrupción de alimentación espontánea, regurgitación y diarrea. Después de una rápida pérdida de peso en 24-48 horas adicionales, los animales murieron. El examen histopatológico de varias secciones del intestino grueso tomadas tras la muerte permitió el diagnóstico de enterocolitis necrotizante aguda letal, confirmado por microscopía electrónica (figura 1a y 1b).

2. Comparación de grupos alimentados con dosis crecientes de PMF Ab

55 Sujetos alimentados con leche maternizada + 20 g/día de PMF Ab: crecimiento regular, enteramente comparable al del grupo control mantenido con la cerda.

Sujetos alimentados con leche maternizada + 1 g/día de PMF Ab: Los sujetos adelgazan rápidamente y en 24-48 horas adicionales, el grupo entero muere.

60 Sujetos alimentados con leche maternizada + 5 g/día de PMF Ab: se produce un estado de caquexia real y a los pocos días la muerte del grupo entero. El examen histopatológico de varias secciones del intestino grueso tomados de grupos de sujetos alimentados respectivamente con 1 g/día y 5 g/día de PMF Ab, permite el diagnóstico, también en este caso, de una enterocolitis necrotizante aguda letal.

Grupo de sujetos alimentados con leche maternizada + 10 g/día de PMF Ab: Se produce diarrea en todos los sujetos. El día 13-14, estas manifestaciones patológicas empeoran súbitamente y los animales mueren en unas pocas horas de colitis necrotizante aguda.

5 Grupo de sujetos alimentados con leche maternizada + 15 g/día de PMF Ab: crecimiento regular, sin manifestación patológica observada de ningún tipo, pero el rendimiento del crecimiento es ligeramente inferior que los del grupo de sujetos alimentados con leche maternizada + 20 g/día de PMF Ab.

10 Grupo de sujetos alimentados con leche maternizada + 20 g/día de PMF Ab (mantenido hasta el día 15): crecimiento regular, enteramente comparable al del grupo control mantenido con la cerda.

3. Comparación de sujetos alimentados con leche maternizada + PMF Ab y sujetos alimentado solo con PMF Ab + solución de azúcar a voluntad

15 Los cochinitos alimentados con solución de azúcar + 20 g/día de PMF Ab, sin adición de leche maternizada, no tienen ningún tipo de enfermedad, pero pierden peso constantemente, una señal de un suministro insuficiente de nutrientes proporcionados por la solución de azúcar en lugar de la leche maternizada. Estos individuos finalmente mueren, pero el colon, en el examen histopatológico, es absolutamente normal sin signos de enterocolitis necrotizante aguda.

Ejemplo 6 – Tratamiento tópico de úlceras de piel

25 Diez pacientes (6 hombres – 4 mujeres) afectados por úlceras diabéticas de las piernas, sabido que son particularmente difíciles de tratar ya que están relacionadas con una enfermedad sistémica, se trataron dos veces al día con aplicación tópica de una solución acuosa al 5% de PMF Ab. La recuperación completa se produjo después de 4-6 semanas en siete pacientes con úlceras diabéticas con una superficie que varía de 2,5 a 24,5 cm; en tres casos, la lesión inicial mejoró a un nivel desde el 60% al 85%.

Ejemplo 7 – Tratamiento de lesiones orales

30 Se probó la eficacia de PMF Ab, sea en forma libre o incorporado en microesferas, en un ensayo clínico en el que 50 pacientes (hombres de edad entre 18 y 43 años, edad media 28,73), sin estados patológicos diferentes de estomatitis oral recurrente se inscribieron (No. 25) en el grupo I del estudio (aplicación tópica de una solución acuosa al 5% de PMF Ab, 3 veces al día) y en un grupo control II (enjuague con clorhidrato de bencidamina 3 veces al día durante 2 minutos).

35 Se han evaluado el tamaño de las úlceras, dolor (con puntuación VAS) y el grado de satisfacción del tratamiento. La aplicación tópica de PMF Ab produjo la resolución completa de úlceras en 8 pacientes en 2-4 días, 4-7 días en 10 pacientes, en 7-10 días en los restantes 7 pacientes en el grupo I. En el grupo control II, hubo cicatrización completa de úlceras aftosas en 3 pacientes en 2-4 días, 4-7 días en 9 pacientes, en 7-10 días en los restantes 10 pacientes, con 3 pacientes que aún padecían la enfermedad. El tamaño medio de las úlceras en los dos grupos era significativamente menor a partir de cuarto día para el grupo de estudio (I) comparado con el grupo control (II).

Ejemplo 8 – Terapia de lesiones corneales en perros

45 La investigación se realizó en 5 perros que tenían fotofobia, epifora, blefaroespasmos. Los perros tenían lesiones corneales debido a traumatismo de tipo genérico (lesión por cuerpo extraños, arañazos de gatos, etc.).

50 Se administraron gotas oculares que contenían PMF AB al 5% dos veces al día por instilación conjuntival durante un periodo de 8-10 días.

Resultados

55 Se detectaron dos úlceras superficiales, una úlcera indolente recurrente y dos úlceras profundas en los cinco perros en ensayo.

60 La cicatrización de la lesión corneal se produjo en todos los sujetos. Cicatrización significa la cicatrización completa de la lesión y la negativización de la prueba de fluoresceína, así como la desaparición de síntomas descritos en el examen clínico (blefaroespasmos, fotofobia, epifora). En todos los casos también fue posible conservar la vista de los animales y no se observó leucoma cicatricial permanente a pesar de que no se había usado ningún otro tratamiento (por ejemplo, corticoesteroides locales) o ningún otro agente terapéutico.

65 La recuperación media fue 6 días. Se debe indicar que, además de cicatrización de la úlcera, probablemente debido a un efecto similar al de las células madre límbicas, PMF Ab también ha actuado como un agente antibacteriano, previniendo el desarrollo de infecciones secundarias, y como un agente antiinflamatorio, produciendo una cicatrización completa sin cicatrices residuales.

Ejemplo 9 – Tratamiento de alopecia

5 La alopecia se puede prevenir y tratar eficazmente con PMF Ab, preferiblemente aplicando en sucesión una primera composición tópica que actúa sobre el bulbo piloso en la fase catágena y una segunda composición tópica que estimula la fase anágena de recrecimiento del pelo.

10 La primera formulación tópica comprende como principios activos resina de aceite de capsicum, vitamina PP y cafeína además de excipientes convencionales. La segunda composición, que se va a aplicar al cuero cabelludo de 15 a 30 minutos después de la aplicación de la primera composición, comprende PMF Ab parcialmente en forma libre y parcialmente encapsulada en microesferas y otros ingredientes seleccionados de sericina, extracto de aloe vera, cafeína, melatonina y pantenol. A continuación, se describen ejemplos de formulaciones adecuadas:

1 pretratamiento

15 Resina de aceite de capsicum al 0,05%
 Vitamina PP al 0,20%
 Cafeína al 0,01%
 excipientes cs

2 tratamiento

20 P.M.F. Ab al 10%
 P.M.F. Ab microencapsulado al 2,5%
 Sericina al 1,00%
 Aloe al 1,00%
 25 Pantenol al 0,20%
 Melatonina al 0,005%
 Cafeína al 0,01%
 excipientes cs

30 Las formulaciones se ensayaron clínicamente en 30 casos de pérdida de pelo recurrente (telógena), especialmente en primavera y otoño. La pérdida de pelo se ha prevenido en el 88% de los hombres y el 75% de las mujeres.

35 En 20 pacientes sometidos a quimioterapia (mujeres con cáncer de mama), solo el 12% de las pacientes perdió el pelo, el 20% tuvieron el pelo más fino, pero no se cayó, en todos los casos sin efectos adversos.

Las formulaciones también se ensayaron en 10 pacientes con pérdida de pelo aguda, 10 pacientes con pérdida de pelo crónica, 5 pacientes con alopecia areata, 40 pacientes con alopecia androgenética y 7 pacientes con alopecia cicatricial

40 En pérdida de pelo aguda, la respuesta a la terapia de pacientes, 8 mujeres y 2 hombres, fue variable.

45 Después de dos meses de aplicación del producto, una vez al día, se detectó una clara reducción den la pérdida de pelo en 8 pacientes (7 mujeres – 1 hombre) con una recuperación modesta en solo un caso (hombre) en el tercer mes de terapia mientras que en los dos casos restantes (respectivamente, un hombre y una mujer), la situación no cambió.

En la pérdida de pelo crónica, de los 10 casos tratados (9 mujeres y 1 hombre) 8 pacientes tuvieron una disminución después de dos meses de terapia. Dos pacientes no respondieron a la terapia.

50 En alopecia areata todos los sujetos tratados (5 pacientes, 3 mujeres y 2 hombres) tuvieron poca o ninguna respuesta después de dos meses de terapia.

55 Se trataron 40 sujetos (30 hombres y 10 mujeres) afectados por alopecia androgenética. Después de dos meses de terapia, una reducción en la pérdida de peso y mejora en el aspecto del pelo, cuantificable con un mayor diámetro del barril, mayor volumen y mayor brillo del pelo en 30 de los casos tratados.

En los otros 10 casos, el estado clínico ha permanecido sin cambiar.

60 En 7 casos de alopecia cicatricial (4 mujeres y 3 hombres), en los que también había una reacción inflamatoria de la piel con una sensación fuerte de picor, la respuesta fue sorprendente después de un mes de terapia.

Ha habido una disminución e incluso desaparición del picor, atenuación de la forma irritante cutánea y una estabilización de la alopecia.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de citoquinas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, factores estimulantes de células madre, proteínas del complemento, inmunoglobulinas y factores antibacterianos/antivíricos, que consiste esencialmente en:

5

Citoquinas (pg/mg):

	Val min	Val max
IL-1a	0,80	2,90
IL-1b	0,02	0,09
IL-2	0,75	5,00
IL-4	0,04	0,17
IL-6	0,10	1,20
IL-8	0,50	2,50
IL-9	0,50	3,60
IL-10	0,50	2,80
IL-12	0,50	2,00
IL-15	1,10	4,30
IL-17	15,00	150,00
IFN gamma	3,00	30,00
TNF α	15,00	30,00
IL-1 Ra	10,00	30,00
total	47,81	264,56

10

Factores de crecimiento (pg/mg):

	Val min	Val max
TGF- β 1	150,00	300,00
IGF-1	300,00	800,00
NGF	1,00	10,00
PDGF	5,00	100,00
EGF	4,80	9,40
BMP2	15,00	50,00
b.FGF	100,00	200,00
FGF-2	5,00	20,00
HGF	40,00	80,00
VEGF	50,00	300,00
total	670,80	1869,40

15

Factores estimulantes de células madre (pg/mg):

	Val min	Val max
G-CSF	10,00	20,00
GM-CSF	100,00	1000,00
LIF	15,00	50,00
SCF	1,00	10,00
SDF-1	10,00	40,00
total	136,00	1120,00

Factores quimiotácticos (pg/mg):

	Val min	Val max
EOTAXINA	1,00	15,00
MCP-1	1,00	5,00
total	2,00	20,00

20

Factores antibacterianos/antivíricos (μ g/mg):

Transferrina	0,50	1,00
Lactoferrina	0,80	2,50
Lisozima	10,00	40,00

ES 2 609 352 T3

Lactoperoxidasa	10,00	30,00
total	21,30	73,5

Proteínas del complemento (pg/mg):

	Val min	Val max
C3A	0,20	0,70
C4A	0,90	2,00
total	1,10	2,70

5 Inmunoglobulinas (mg/mg):

	Val min	Val max
IgG	0,20	0,50
IgA	0,10	0,20
IgM	0,05	0,15
total	0,35	0,85

caracterizada en que está en forma de polvo.

- 10 2. Una combinación según la reivindicación 1 obtenible por extracción de calostro.
3. Una combinación según la reivindicación 1, obtenible por extracción de placenta.
- 15 4. Una combinación según la reivindicación 1, obtenible por extracción de suero recogido 5-15 días antes del parto.
- 20 5. Una combinación de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento de afecciones que requieren reparación y regeneración de tejido y para la sustitución de terapia de células madre, en donde las afecciones se seleccionan de enfermedades autoinmunitarias, dolor neuropático, osteoporosis, heridas, quemaduras, úlceras de piel, lesiones orales, colitis aguda necrotizante, enfermedades de Crohn, reflujo gastroesofágico, enterocolitis inducida por SIDA, síndrome del intestino irritable, colitis infecciosa, colitis espástica, colitis inducida por antibióticos, hernias de hiato, síndrome del esófago corto.
- 25 6. Composiciones farmacéuticas que comprenden las combinaciones de las reivindicaciones 1-4 como los principios activos en mezcla con soportes y/o excipientes adecuados.
7. Composiciones farmacéuticas de la reivindicación 6 para administración oral.
- 30 8. Composiciones farmacéuticas de la reivindicación 7 para administración tópica.

FIGURA 1A

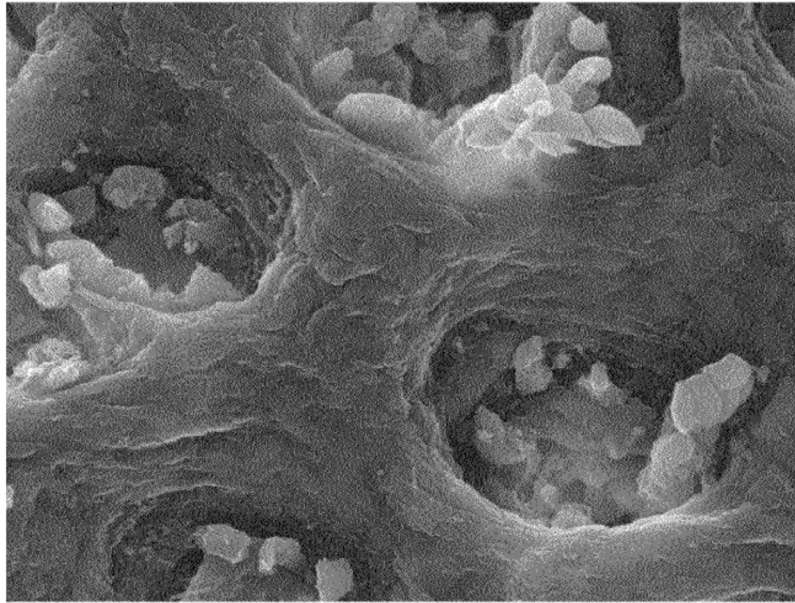


FIGURA 1B

