

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 515**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007** **E 10188590 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016** **EP 2363140**

54 Título: **Proteína antisecretora para uso en el tratamiento del síndrome compartimental**

30 Prioridad:

**27.04.2006 SE 0600933**

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

**07.06.2017**

73 Titular/es:

**LANTMÄNNEN AS-FAKTOR AB (100.0%)**

**Box 30192**

**104 25 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**HANSSON, HANS-ARNE;**

**LANGE, STEFAN;**

**JENNISCHE, EVA y**

**BERGSTRÖM, TOMAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 615 515 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

Proteína antisecretora para uso en el tratamiento del síndrome compartimental

### Campo de la invención

La invención se encuentra en el campo del síndrome compartimental, y en diversas afecciones asociadas con el mismo. Más específicamente, la invención concierne a la transferencia de líquido, sales y sustancias entre células por un lado y por el otro los espacios extracelulares y el sistema vascular en un compartimento, formado por un tejido, órgano y/o una estructura definida, en un organismo, opcionalmente con el propósito de su normalización. El compartimento cerrado comprende estructuras que varían de tamaño y se extienden de un tejido, una unidad anatómica definida a un órgano en un organismo. La estructura afectada patológicamente podría presentar un mal funcionamiento debido a agentes tóxicos, fármacos, hemorragia, tumores, que ocasionan una presión de líquido intersticial anormalmente elevada. La invención se refiere a proteínas antisecretoras específicas para usar dentro del campo del síndrome compartimental en condiciones patológicas, como se define en las reivindicaciones.

### Antecedentes de la invención

El término síndrome compartimental se utiliza en la práctica médica para caracterizar un estado patológico caracterizado por un aumento anormal de presión dentro de un volumen cerrado, un compartimento, que está causando reducción o incluso bloqueo del flujo de sangre y linfa a través de un volumen definido, especificado. Una presión demasiado alta sobre los vasos sanguíneos impide el flujo sanguíneo a través de las venas, los capilares e incluso las arteriolas y las arterias, altera las condiciones de trabajo para el líquido intersticial en el entorno extracelular, dando como resultado la disminución del suministro adecuado de nutrientes y oxígeno para las células y los tejidos dentro de dicho espacio. Un factor igualmente importante es la carencia de drenaje de productos de desecho y metabolitos, a menudo ácidos, que a través de su acumulación se añaden adicionalmente al deterioro de la función y el metabolismo de las células dentro de dicho compartimento. Un efecto neto de dichas alteraciones es que la presión en el compartimento aumenta y a la larga se acerca a niveles próximos a la presión arterial sistémica. La presión sanguínea real a la entrada del sistema vascular arterial en el compartimento constituye de este modo un elemento clave, determinando el nivel máximo al que puede aumentar la presión. En estructuras avasculares, tales como cartílago y discos intervertebrales, el suministro adecuado depende de la transferencia de líquido y otros componentes hacia y desde la zona de difusión, por medio de iones celulares y sistemas de bombeo de líquido y por medio de gradientes de presión osmótica, que requieren funciones celulares apropiadas. Si persiste una PC (presión compartimental) fuertemente elevada, ésta ocasionará una lesión grave a las células, tejidos y órganos implicados. Las hemorragias y la hinchazón de las células y los tejidos en dicho compartimento se pueden añadir adicionalmente al daño como lo hace la subsiguiente isquemia. Cuanto mayor es el tiempo transcurrido con PC elevada, más extenso y grave es el daño, que finalmente se vuelve irreversible y sigue la muerte celular necrótica. Al daño se añaden distorsión, deslocalización y rotura mecánicas. La muerte celular apoptótica se puede añadir con posterioridad a la lesión inicial. El SC (síndrome compartimental) crea señales de alarma clínica tales como dolor, sensibilidad, hinchazón y reducción o incluso pérdida de función, y finalmente necrosis. La gravedad del daño depende de la localización del compartimento, los tipos de células y tejidos implicados, las características del entorno extracelular, la PC real, las alteraciones metabólicas y su duración por mencionar alguno de los factores clave de importancia para el resultado y las consecuencias a largo plazo.

La mayoría de los compartimentos en el organismo están delimitados por tejido conectivo denso, a menudo especializado como vainas, fascias, tendones, ligamentos, cápsulas articulares o membranas colágenas no distensibles similares, tales como el pericardio. Adicionalmente, muchos órganos endocrinos, tales como el tiroides, y las glándulas exocrinas están englobados y subdivididos por membranas y vainas de tejido conectivo, formando de ese modo compartimentos. Otro ejemplo de compartimento recubierto, cerrado, rígido son las estructuras óseas, tales como las extremidades, el cráneo, las vértebras y los huesos faciales. Cada tipo de célula y tejido expuesto a PC elevada está caracterizado por su propia tolerancia a las alteraciones metabólicas y mecánicas preponderantes. Sin embargo, el relajamiento de la PC a niveles normales en un tiempo razonable alivia el daño.

La proteína antisecretora es una proteína de 41 kDa que originalmente fue descrita por proporcionar protección contra enfermedades diarreicas e inflamación intestinal (para una revisión, véanse Lange y Lönnroth, 2001). La proteína antisecretora se ha secuenciado y se ha clonado su ADNc. Parece ser que la actividad antisecretora es ejercida principalmente por un péptido localizado entre las posiciones 35 y 50 de la secuencia de la proteína antisecretora. Investigaciones inmunoquímicas e inmunohistoquímicas han revelado que está presente la proteína antisecretora y también puede ser sintetizada por la mayoría de los tejidos y órganos en un organismo. Se han caracterizado péptidos sintéticos, que comprenden la secuencia antidiarreica, (documento WO 97/08202; documento WO 05/030246). Los factores antisecretos se han descrito previamente para normalizar el transporte de líquidos patológico y/o las reacciones inflamatorias, por ejemplo en el intestino y el plexo coroideo en el sistema nervioso central después de la sensibilización con la toxina del cólera (documento WO 97/08202). También se sugirió por lo tanto que la adición de factores antisecretos a comidas y alimentos era útil para el tratamiento del edema, la diarrea, la deshidratación y la inflamación en el documento WO 97/08202. El documento WO 98/21978 describe el uso de productos que tienen actividad enzimática para la producción de una comida que induce la formación de

proteínas antiseoretoras. El documento WO 00/038535 describe adicionalmente productos alimenticios enriquecidos en proteínas antisecretoras tal cual.

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

En la actualidad no hay fármacos disponibles que bloqueen inequívocamente el aumento de presión y la devuelvan a niveles normales en un SC establecido, ni que prevengan el daño en desarrollo en un SC amenazante o en curso. En la actualidad se utilizan soluciones hipertónicas p. ej. de urea o manitol para pacientes seleccionados que sufren de PIC (presión intracraneal) elevada, pero los efectos son transitorios durando solo unas pocas horas, dependiendo de la localización anatómica y del programa de tratamiento final. También se han utilizado corticosteroides para contrarrestar la PIC elevada, pero se pueden desarrollar frecuentemente efectos secundarios graves. También se han recomendado fármacos adicionales, pero principalmente para recluir los síntomas que se presentan. La disminución de la temperatura interna corporal en combinación con anestesia de barbiturato se considera beneficiosa. Esta no es, sin embargo, una terapia con fármacos fiable para el SC que se presenta p. ej. en músculos, articulaciones y nervios. La intervención quirúrgica constituye un tratamiento utilizado frecuentemente, pero adolece de la desventaja de añadir per se daño e incomodidad adicional así como riesgos para el desarrollo de complicaciones.

Una diagnosis fiable de un SC inminente, en desarrollo o establecido puede ser difícil de realizar incluso para un médico experimentado. Las ayudas al diagnóstico basadas en el uso p. ej. de ultrasonido y formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI por las siglas en Inglés de "Magnetic Resonance Imaging") se han utilizado, en la actualidad a menudo junto con programas computarizados. En el presente contexto, se ha realizado la determinación de la presión del líquido intersticial en el compartimento que se va a investigar midiendo la presión real con la ayuda de un sensor muy pequeño en la punta de una fibra de vidrio que guía la luz. El diámetro de la sonda fue de 0,4 mm y el diámetro de la fibra de vidrio flexible solo de 0,3 mm, lo que significa que es probable que la lesión por el equipo de medición no sea de importancia, añadiendo a penas un efecto perceptible sobre los niveles de presión. De ese modo, se debe considerar que el equipo utilizado presenta valores fiables sobre la presión que prevalece en el compartimento, tanto en el líquido extracelular como en ciertos casos también intracelularmente en células y/o agregados celulares adyacentes.

Los factores antiseoretos (AF por sus siglas en Inglés de "Antisecretory Factors"), específicamente proteínas y péptidos, como se ha descrito en detalle en el documento WO 97/08202, son eficaces para abolir las afecciones hipersecretoras y las enfermedades en el intestino, tales como la diarrea. Otros ejemplos relacionados con los efectos de los AF en relación con las afecciones hipersecretoras son p. ej. las enfermedades intestinales inflamatorias, el edema cerebral, el glaucoma, la presión intracraneal elevada, la enfermedad de Ménière, y la mastitis. Los AF también han sido considerados para el tratamiento del glaucoma (documento WO 97/08202).

### **Compendio de la presente invención**

La presente invención es según las reivindicaciones.

Se describe el uso de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo, derivado y/o uno fragmento del mismo, que tienen actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, para la fabricación de una composición farmacéutica y/o un producto nutricional médico para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental. También se describe el tratamiento y/o la prevención de diversas afecciones asociadas con el síndrome compartimental, tales como la hinchazón de células y tejidos.

Además, también se describe un método para el tratamiento y/o prevención de un síndrome compartimental, tal como se ha mencionado antes, comprendiendo dicho método administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica y/o un producto nutricional médico que comprende una proteína antisecretora, un derivado, homólogo, y/o fragmento del mismo, que tiene actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas.

Además se describen diversas dosis y rutas de administración adecuadas para el propósito de tratamiento pretendido así como la edad, el género, la afección del paciente etc.

El tratamiento es probable que sea muy útil para pacientes en riesgo de desarrollar y/o padecer síndrome compartimental, y/o absorción y/o liberación de sustancias patógenas. Además, tal tratamiento es beneficioso también en otras afecciones caracterizadas por el recambio anómalo de líquido e iones de compartimentos cerrados, tales como compartimentos con presiones anormales.

### **Breve descripción de los dibujos**

**Figura 1:** La Fig. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína antisecretora de acuerdo con el SEQ ID NO 6 de la presente invención. La secuencia corresponde al SEQ ID NO 2 del documento US 6344440.

**Figura 2:** PIC en ratas medida con una sonda guiada por luz de fibra óptica implantada en la corteza cerebral en la región de los ventrículos laterales. La Fig. 2a demuestra que la infección HSV-1 el día 5 da como resultado un aumento de la PIC en un exceso de 40 mm Hg. En contraste, el tratamiento de ratas infectadas con HSV-1 dos veces al día con AF, como se muestra en la Fig. 2 b, casi devolvió la PIC a niveles normales. La Fig. 2 c demuestra la PIC baja demostrable en una rata no infectada, no tratada, normal. La sonda se calibró frente a la presión de aire ambiente.

**Figura 3:** Frecuencia de supervivencia de las ratas infectadas con HSV-1 por medio de la administración de una solución de virus en la fosa nasal derecha el día 0. La mitad de las ratas (n = 15) se trataron dos veces al día con 1 µg AF-16 (línea superior) dos veces al día intranasalmente, mientras que la otra mitad recibió solo el vehículo después de la infección con HSV-1 (línea inferior). De las tratadas solo con el vehículo únicamente 10% sobrevivió el día 14, contrastando con 60% de las tratadas con AF-16. De este modo, AF-16 aumentó significativamente la tasa de supervivencia en la encefalitis por HSV.

**Figura 4:** Secciones de cerebro a pocos (a, b) y muchos (c, d) aumentos de secciones de cerebro después de la infección por HSV en roedores mediante instilación de una solución de virus en la fosa nasal derecha. Las células nerviosas con proteína de HSV en su citoplasma se tiñen perfectamente de oscuro. Las células gliales (d) en el tálamo quedan subrayadas perfectamente debido a su abundancia de proteínas de HSV en su citoplasma. Obsérvese que muchas de las células nerviosas son no reactivas (no teñidas). No hubo diferencia en la frecuencia o la distribución de las células cerebrales positivas al HSV-1 entre los animales que fueron tratados con AF-16 o solo con el vehículo.

**Figura 5:** PCR cuantitativa realizada sobre tejidos cerebrales de ratas infectadas en su fosa nasal derecha con HSV-1. Los especímenes de cerebro se obtuvieron entre 5 a 14 días después de la inoculación del virus en la fosa nasal derecha. Los resultados no demuestran ninguna diferencia entre los grupos tratados con vehículo y con AF por lo que se refiere a la cantidad de ADN de HSV-1. De este modo, AF-16 no afecta significativamente a la producción HSV-1 a pesar de que el tratamiento con AF-16 mejoró significativamente la tasa de supervivencia (Fig. 2 b), en comparación con los tratados solamente con el vehículo (Fig. 2 a).

**Figura 6:** Secciones a través de la lamina cribiforme, una estructura ósea que separa el cerebro de la nariz y a través de la cual para el nervio olfativo. En la figura izquierda (a) el complejo de colorante-proteína de azul de Evans-albúmina (EBA) se infundió en el espacio subaracnoideo el día 5 después de la infección por HSV-1. El animal padeció encefalitis moderada. Obsérvese que no hay EBA rojo en la lámina cribiforme, ni en la nariz, puesto que el paso entre el cerebro y la cavidad nasal se bloquea. En la figura derecha ( b ) el EBA se infundió en el espacio subaracnoideo de una rata normal, no infectada. Obsérvese la coloración de rojo intenso a lo largo de la placa cribiforme, que revela el paso de LCE desde el cerebro (arriba) a la cavidad nasal (abajo). El tratamiento de animales infectados por HSV-1 con AF-16 abrió el paso para el LCE a través de la placa cribiforme y de este modo dio como resultado una visión que parecía idéntica a la de un animal no infectado, normal, como se esboza en la Fig. b.

## Definiciones y abreviaturas

### Abreviaturas

PIC: presión intracraneal; LCE: líquido cerebrospinal; SNC: sistema nervioso central, es decir el cerebro y la médula espinal; PLI: presión de líquido intersticial; HSV: virus herpes simplex; PBS: solución salina tamponada con fosfato; PC: presión compartimental; CC: compartimento cerrado; SC: síndrome compartimental; AF: factor antisecretor, AF-16: un péptido compuesto de los aminoácidos VCHSKTRSNPENNVGL; octapéptido IVCHSKTR; heptapéptido VCHSKTR; hexapéptido CHSKTR; pentapéptido HSKTR.

### Definiciones

En la presente memoria, "síndrome compartimental" se define como una presión elevada que da como resultado alteraciones metabólicas y finalmente daño dentro de un espacio definido en células, tejidos, estructuras y/u órganos definidos delimitados por estructuras resistentes a la presión. El término síndrome compartimental se utiliza en la práctica médica para caracterizar una afección patológica caracterizada por un aumento de presión anómalo dentro de un volumen cerrado, es decir un compartimento, lo que ocasiona la reducción o incluso el bloqueo p. ej. del flujo de sangre y/o linfa a través de un volumen definido, especificado. El síndrome compartimental puede causar así como estar causado por una variedad de afecciones, tales como tumores, según se describe en la presente memoria. En el presente contexto, el término "compartimento cerrado" se refiere a un espacio definido en tejidos, órganos y/o una estructura anatómica delimitada por estructuras resistentes a la presión.

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también denominados polipéptidos. Por lo general, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos y por tanto tienen pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 6.000 a aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se denominan péptidos u oligopéptidos. Los términos "proteína" y "péptido" se pueden utilizar indistintamente en el presente contexto.

- Una "composición farmacéutica", en el presente contexto, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente activa de una proteína antisecretora, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente activo, tal como un portador o un vehículo. Dicha composición farmacéutica se formula para la ruta de administración apropiada, que puede variar dependiendo del estado del paciente, así como de otros factores, tales como la edad o la elección preferida. Una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora sirve como un sistema de liberación de fármaco. La composición farmacéutica después de la administración presenta la sustancia activa al organismo de un ser humano o un animal. Dicha composición farmacéutica puede estar en forma p. ej. de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, píldoras para la deposición, geles, etc., pero no está limitada a las mismas.
- El término "sal farmacéuticamente activa", se refiere a una sal de una proteína antisecretora, que puede ser cualquier sal derivada de allí, basada en la serie de Hofmeister. Otros ejemplos de las sales farmacéuticamente activas comprenden trifluoroacetato, acetato y cloruro de lisina, pero la invención no está limitada estas.
- El término "antisecretor" se refiere en el presente contexto a inhibir o disminuir la secreción, especialmente secreciones intestinales. Por tanto, el término "proteína antisecretora" se refiere a una proteína capaz de inhibir o disminuir la secreción en un organismo.
- Un "producto nutricional médico", en el presente contexto, se refiere a una comida, que ha sido preparada con una composición con una proteína antisecretora, de acuerdo con la invención. Dicha comida puede ser una comida adecuada, en forma líquida o sólida, tal como un líquido o un polvo, o cualquier otro producto comestible adecuado. Los ejemplos de tal materia se pueden encontrar en el documento WO 0038535.
- En el presente contexto, una "proteína antisecretora", o uno de sus homólogos y/o fragmentos, se puede utilizar indistintamente con el término "factores antisecretores" o "proteínas del factor antisecretor" como se ha definido en la patente WO 97/08202, y se refiere a una proteína antisecretora o uno de sus péptidos o uno de sus homólogos, derivados y/o fragmento que tienen actividad antisecretora. Por tanto, se debe entender que un "factor antisecretor", una "proteína del factor antisecretor", un "péptido antisecretor", un "fragmento antisecretor", o una "proteína antisecretora" en el presente contexto, también se pueden referir a un derivado, homólogo y/o fragmento del mismo. Todos estos términos se pueden utilizar indistintamente en el contexto de la presente invención. Además, en el presente contexto, el término "factor antisecretor" se puede abreviar como "AF". La proteína antisecretora en el presente contexto también se refiere a una proteína con propiedades antisecretoras como se ha definido previamente en el documento WO97/08202 y el documento WO 00/38535. Los factores antisecretores también se han descrito p. ej. en el documento WO 05/030246. También se pretende que el término factor antisecretor signifique la yema de huevo enriquecida en factores antisecretores como se ha descrito en el documento SE 900028-2 y el documento WO 00/38535 como se describe más abajo adicionalmente.
- Un "nebulizador", en el presente contexto, se refiere a un dispositivo médico que libera medicación en forma de niebla a las vías respiratorias. Los compresores del "nebulizador" impelen el aire a través de tubos a un recipiente de medicamento relleno de medicamento líquido. La fuerza del aire rompe el líquido en partículas diminutas de tipo niebla que pueden ser inhaladas profundamente en las vías respiratorias.
- Un "inhalador", en el presente contexto, se refiere a un dispositivo médico que libera medicación en forma de polvo seco a las vías respiratorias. El aire inhalado hace pasar el polvo seco que va a ser inhalado y distribuye las partículas diminutas que pueden ser inhaladas profundamente en las vías respiratorias. O bien el sujeto que va a ser tratado inhala para proporcionar la fuerza requerida al aire, o bien se utiliza aire comprimido, alternativamente se combinan los mismos.
- El término "aerosol" en el presente contexto, se refiere a una suspensión gaseosa de partículas finas sólidas o líquidas.
- Un "microbio", según se describe en la presente memoria, se refiere a un organismo vivo microscópico, tal como p. ej. una bacteria, un hongo, un protozoo así como un virus. Otros ejemplos de microbios se proporcionan en la presente memoria.

### Descripción detallada de la invención

- Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que el tratamiento de un organismo vivo con proteínas antisecretoras y/o péptidos (AF) restaura y normaliza la transferencia de nutrientes, productos de desecho, metabolitos, iones, agua y/u otras moléculas en el síndrome compartimental (SC). De este modo se ha encontrado sorprendentemente que las proteínas y péptidos antisecretores restauran y/o normalizan la transferencia de agua, iones, metabolitos y sustancias que son p. ej. transferidas desde las células, así como desde los vasos sanguíneos a un compartimento cerrado (CC). Las proteínas antisecretoras de ese modo reducen y/o contravienen los efectos perjudiciales, y pueden evitar también la internalización y/o la liberación de sustancias que entran y/o están siendo liberadas desde las células. Las proteínas antisecretoras, homólogos, derivados, fragmentos y/o péptidos de las mismas trabajan con independencia de si la causa inicial del síndrome compartimental es una hemorragia, un trauma, una carga pesada, una alteración vascular, una infección por microbios y/o virus, agentes tóxicos o una combinación de cualquiera de dichas causas. Las proteínas antisecretoras, los homólogos, los derivados, los

fragmentos y/o péptidos de las mismas ayudan de este modo a mejorar la supervivencia de células y tejidos en el CC. Por consiguiente, el daño inducido de otro modo debido al SC se puede reducir, o incluso prevenir.

Existía la necesidad desde hace mucho tiempo de fármacos mejorados con el objetivo del tratamiento farmacológico del síndrome compartimental, puesto que en la actualidad no está disponible una terapia adecuada. Los efectos beneficiosos de las proteínas antiseoretoras de acuerdo con la presente invención se ilustran en el siguiente texto.

Los autores de la presente invención han encontrado que las proteínas antisecretoras, homólogos, derivados, fragmentos y/o péptidos de las mismas tienen efectos beneficiosos en casos de SC de diferente patogénesis en una diversidad de localizaciones diferentes. Sin desear limitar la presente invención a una explicación científica específica, se cree en la actualidad que las proteínas y péptidos antisecretorios (AF) pueden ser capaces de abolir el establecimiento del SC en de una manera poderosa, y normalizar las afecciones anteriormente mencionadas, debido a un efecto ejercido que se ha encontrado que tienen las proteínas y los péptidos antisecretorios (AF) sobre los conglomerados de lípidos y las caveolas de las membranas celulares.

Los conglomerados de lípidos son dominios de membrana con un tamaño medio de nanómetros, caracterizados por altas concentraciones centrales colesterol y esfingomielina (véanse Lodish et al., 2004; Pollard & Earnshaw, 2002; Ross & Pawlina, 2006). Los conglomerados de lípidos contienen una variedad de proteínas de membrana integrantes y periféricas implicadas en la transferencia de masas y la señalización celular. Tales plataformas de señalización flotan en las membranas celulares y se equipan con los elementos necesarios para las funciones apropiadas como receptores, factores de acoplamiento, sistemas de proteínas G, efectores, enzimas y compuestos, y sustratos, siendo capaces de ese modo de recibir y transportar iones, moléculas y señales específicas. Estos dominios están interactuando además p. ej. con el citoesqueleto, y adicionalmente, influyen en la composición y el recambio del líquido intersticial así como en su presión. La flotilina-1 es una proteína, que es un indicador de la prevalencia de los conglomerados de lípidos. Otro marcador de conglomerados de lípidos es el esfingolípido GMi. Adicionalmente, los conglomerados de lípidos están relacionados con las caveolas, invaginaciones con forma de botella demostrables en una gran variedad de células de mamífero y los sitios para importantes funciones celulares tales como el tráfico vesicular y la transducción de la señal así como la absorción, la internalización y procesos intracelulares adicionales de p. ej. virus. Existe un recambio de caveolas, que están relacionadas con la liberación y la internalización no solo de virus sino también de microbios. Existe un agrupamiento en las membranas celulares de conglomerados de lípidos y caveolas de receptores del factor de crecimiento, receptores de la señal inflamatoria, receptores de neurotransmisores y sistemas para la reabsorción de neurotransmisores, canales iónicos, acuaporinas, y otros transportadores. Los conglomerados de lípidos y caveolas experimentan cambios dinámicos, rápidos relacionados con la función preponderante de células y órganos en cada momento.

Los autores de la presente invención han sido capaces recientemente de demostrar que esas proteínas antisecretoras, homólogos, derivados o fragmentos de las mismas, que tienen actividad antisecretora y/o su equivalente funcional y/o análoga, o una de sus sales farmacéuticamente activas, tienen efectos beneficiosos en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción de los conglomerados de lípidos y/o las caveolas en membranas celulares, tales como hipo- y/o hiper-función anormal, insuficiente.

De este modo, se ha demostrado que las proteínas antisecretoras, derivados, homólogos, y/o fragmentos de las mismas, que tienen una actividad funcional equivalente, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, tienen un efecto beneficioso sobre la disfunción de los conglomerados de lípidos y/o las caveolas en membranas celulares y se pueden utilizar por lo tanto para controlar y/o afectar beneficiosamente a la estructura, la distribución y a múltiples funciones de los conglomerados de lípidos y/o caveolas en las membranas celulares. Los ejemplos de tales efectos beneficiosos pueden ser contrarrestar la función anormal, tal como la hipo- o hiper-función, restaurar y/o normalizar los conglomerados de lípidos o caveolas estructuralmente y funcionalmente, mejorar la supervivencia y/o auxiliar en enfermedades, lesiones, procedimientos de reparación y otras disfunciones. adicionalmente, dichas proteínas antisecretoras se pueden emplear para controlar el transporte intracelular y liberar productos celulares, así como para normalizar la distribución de componentes del tejido.

Los ejemplos de las afecciones con un alto riesgo de desarrollo de SC son el trauma, asociado con tumores. El uso excesivo de fármacos son otros compuestos patógenos. Los tumores, primarios o metástasis, se añaden a la lista de ejemplos de causas potenciales que dan como resultado un SC.

En el presente contexto, la determinación de la presión del líquido intersticial en el compartimento que se va a investigar se realiza midiendo la presión real con la ayuda de un sensor en la punta de una fibra de vidrio guiada por luz. De este modo, se obtienen valores fiables de la presión preponderante en el compartimento, y en algunos casos también en células adyacentes.

Se sabe de las publicaciones especializadas p. ej. que muchos tumores sólidos tienen una alta presión de líquido intersticial, que dificulta el transporte por los capilares entre las células tumorales y la circulación sanguínea y linfática. De ese modo se crea un obstáculo en lo que se refiere al tratamiento del tumor, debido a la absorción insuficiente de agentes terapéuticos, tales como los fármacos citotóxicos (Véase Heldin et al., 2004). Adicionalmente, la generación de radicales libres será insuficiente en la terapia de radiación debido a limitaciones en la capacidad de oxígeno debido a la circulación sanguínea restringida. Existe por lo tanto una gran necesidad de

nuevos programas de tratamiento, que mejoren la eficacia de la terapia contra el cáncer por medio de la disminución de la presión de líquido intersticial.

El uso de proteínas y péptidos antiseoretos (AF) no está limitado a los tejidos, los órganos y las estructuras anatómicas descritas en los ejemplos, pero incluye síntomas y enfermedades adicionales también caracterizados por elevada presión intersticial de líquido en el tejido y por la absorción y liberación de sustancias específicas.

La proteína del factor antisecretor para usar de acuerdo con la presente invención se puede administrar en un contexto por medio de la aplicación tópicamente, localmente in situ, oralmente, en la nariz, subcutáneamente y/o sistémicamente vía vasos sanguíneos o vía tracto respiratorio.

El factor antisecretor es una clase de proteínas que se produce naturalmente en el organismo. La proteína humana del factor antisecretor es una proteína de 41 kD, que comprende 382 aminoácidos cuando se aísla de la glándula pituitaria. El sitio activo con relación al efecto del síndrome compartimental, de acuerdo con la presente invención, parece que está localizado respecto a la proteína en una región próxima al extremo N de la proteína, localizado muy probablemente en los aminoácidos 1-163 del SEQ ID NO 6, o en un fragmento de esta región.

Los autores de la presente invención han demostrado que el factor antisecretor es homólogo hasta cierto punto a la proteína S5a, también denominada Rpn 10, que constituye una subunidad de un componente preponderante en todas las células, el proteosoma 26 S, más específicamente en el CAP 19 S/PA 700. En la presente invención, las proteínas antisecretoras se definen como una clase de proteínas homólogas que tienen las mismas propiedades funcionales. Los proteosomas tienen una multitud de funciones relacionadas con la degradación de proteínas sobrantes así como proteínas plegadas erróneamente, desnaturalizadas y por lo demás anormales no deseadas, de vida corta. Adicionalmente, el factor antisecretor/S5a/Rpn10 está implicado en la distribución y el transporte de componentes celulares, muy evidentemente proteínas.

Los homólogos, derivados y fragmentos de las proteínas y/o péptidos antiseoretos para usar de acuerdo con la presente invención tienen todos la actividad biológica análoga de ser susceptibles de ser utilizados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental, así como en un método para el tratamiento del síndrome compartimental. Los homólogos, derivados y fragmentos, en el presente contexto, comprenden al menos 4 aminoácidos de una proteína antisecretora de origen natural, que se puede modificar adicionalmente cambiando uno o más aminoácidos con el fin de optimizar la actividad biológica de los factores antisecretos en el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental.

Además, también se considera que cualquier secuencia de aminoácidos que sea al menos idéntica en 70%, por ejemplo que sea idéntica al menos en 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de una proteína, péptido, homólogo, derivado y/o fragmento antisecretos para usar de acuerdo con la invención, está dentro del alcance de la presente invención. En el presente contexto los términos homología e identidad se utilizan indistintamente, es decir una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad especificado con otra secuencia de aminoácidos tiene el mismo grado de homología con una secuencia de aminoácidos especificada.

Se pretende que un derivado en el presente contexto sea una proteína que tiene actividad antisecretora como se define en la presente memoria, estando derivada de otra sustancia bien directamente o por modificación o sustitución parcial, en donde uno o más aminoácidos ha sido sustituido por otro aminoácido, aminoácido el cual puede ser un aminoácido modificado o no natural. Por ejemplo, los derivados del factor antisecretor según la invención pueden comprender un grupo protector N terminal y/o C terminal. Un ejemplo de un grupo protector N terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C terminal incluye amida.

Se pretende que para las proteínas, los homólogos, los derivados, los péptidos y/o los fragmento de los mismo que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica al menos, por ejemplo en 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, la secuencia de aminoácidos p. ej. del péptido sea idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5% de los aminoácidos en la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir por otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta 5% de los aminoácidos totales en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre las posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la presente invención, un programa de algoritmos locales es el que mejor se ajusta para determinar la identidad. Los programas de algoritmos locales, (tal como el de Smith Waterman) compara una subsecuencia en una secuencia con una subsecuencia en una segunda secuencia, y encuentra la combinación de las sub-secuencias y el alineamiento de esas sub-secuencias, que produce la puntuación de similitud global más alta. Los espacios internos,

si se permitieran, están penalizados. Los algoritmos locales trabajan bien para comparar dos proteínas multidominio, que tienen un solo dominio, o solo un sitio de unión en común.

Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas disponibles para el público. Los métodos del programa para ordenador preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN, y AFSTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX está disponible para el público del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de análisis de secuencia tiene una matriz de puntuación por defecto y penalidades del espacio por defecto. En general, un biólogo molecular utilizaría los ajustes por defecto establecidos en el programa de soporte lógico utilizado.

10 Las proteínas antiseoretoras o uno de sus péptidos u homólogos, derivados y/o fragmentos que tienen actividad antisecretora como se ha definido la presente memoria, pueden comprender 4 aminoácidos o más, tal como 5-16 aminoácidos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos o más. En otras realizaciones preferidas el factor antisecretor consiste en 42, 43, 45, 46, 51, 80, 128, 129 o 163 aminoácidos. En realizaciones preferidas el factor antisecretor consiste en 5, 6, 7, 8 o 16 aminoácidos.

15 En una realización preferida, dicha proteína antisecretora se proporciona a una concentración de al menos 1000 unidades FIL/ml en dicha yema de huevo. En el presente contexto una unidad FIL corresponde a una reducción de 50% del flujo de líquido en el intestino en comparación con un control sin suministro de factores antisecretos, como se ha descrito en el documento WO 00/38535 y el documento SE 900028-2.

20 En otra realización preferida, las proteínas antisecretoras o uno de sus péptidos u homólogos, derivados o fragmentos que tiene actividad antisecretora para usar de acuerdo con la presente invención consisten en una secuencia de acuerdo con las siguientes fórmulas:

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

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

25 El factor antisecretor para usar de acuerdo con la presente invención, se puede producir *in vivo* o *in vitro*, p. ej. sintetizado recombinantemente, sintéticamente y/o químicamente, y/o aislado de una fuente de origen natural de factores antisecretos, tal como a partir de glándulas pituitarias de cerdo o de huevos de aves. Después de su producción, los factores antisecretos se pueden procesar adicionalmente, por ejemplo mediante escisión química o enzimática a fragmentos activos antisecretos más pequeños o mediante modificación de aminoácidos. En la actualidad no es posible obtener factor antisecretor en forma pura mediante purificación. Sin embargo es posible producir una proteína biológicamente activa del factor antisecretor recombinantemente o sintéticamente, como se ha descrito previamente en el documento WO 97/08202 y el documento WO 05/030246. El documento WO 97/08202 también describe la producción de fragmentos biológicamente activos de esta proteína de 7-80 aminoácidos.

35 El factor antisecretor para usar de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente un grupo protector N terminal y/o C terminal. Un ejemplo de un grupo protector N terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C terminal incluye amida.

40 En una realización preferida de la presente invención el factor antisecretor es uno seleccionado entre los SEQ ID NO 1-6, es decir VCHSKTRSNPENNVL (SEQ ID NO 1, en este contexto también denominado AF-16), IVCHSKTR (SEQ ID NO 2), VCHSKTR (SEQ ID NO 3), CHSKTR (SEQ ID NO 4), HSKTR (SEQ ID NO 5), o la secuencia de aminoácidos de una proteína antisecretora de acuerdo con el SEQ ID NO 6 utilizando las abreviaturas de una letra comunes para aminoácidos. Los SEQ ID NO 1, 2, y 3 se han descrito previamente p. ej. en el documento WO 05/030246. Como se especifica en la lista de secuencia adjunta, algunos de los aminoácidos en las secuencias anteriormente especificadas se pueden reemplazar por otros aminoácidos. A continuación en este párrafo, la posición de un aminoácido concreto en una secuencia de aminoácidos concreta se calcula desde la izquierda, indicando que el aminoácido más N-terminal está en la posición 1 en esa secuencia concreta. Se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos cualesquiera como se especifica más abajo independientemente de otra u otras sustituciones de aminoácido cualesquiera en esa secuencia. En el SEQ ID NO 1, C en la posición 2 se puede reemplazar por S, H en la posición 3 se puede reemplazar por R o K, S en la posición 4 se puede reemplazar por L, y/o T en la posición 6 se puede reemplazar por A. En el SEQ ID NO 2, C en la posición 3 se puede reemplazar por S, H en la posición 4 se puede reemplazar por R o K, S en la posición 5 se puede reemplazar por L, y/o T en la posición 7 se puede reemplazar por A. En el SEQ ID NO 3, C en la posición 2 se puede reemplazar por S, H en la posición 3 se puede reemplazar por R o K, S en la posición 4 se puede reemplazar por L, y/o T en la posición 6 se puede reemplazar por A. En el SEQ ID NO 4, C en la posición 1 se puede reemplazar por S, H en la posición 2 se puede reemplazar por R o K, S en la posición 3 se puede reemplazar por L, y/o T en la posición 5 se puede reemplazar por A. En el SEQ ID NO 5, H en la posición 1 se puede reemplazar por R o K, S en la posición 2 se puede reemplazar por L, y/o T en la posición 4 se puede reemplazar por A.

También se puede usar la combinación de dos o más de cualquiera de los fragmentos de acuerdo con el SEQ ID NO 1-6, opcionalmente también en combinación con yema de huevo enriquecida en factores antisecretos.

También se describe la posibilidad de tratar y/o prevenir el síndrome compartimental por medio de la administración de yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos. El documento SE 9000028-2 describe cómo la formación de factores antiseoretos puede ser estimulada en aves y la posterior recuperación de los factores antiseoretos a partir de productos digeridos de yema de huevo. El documento WO 00/38535 describe adicionalmente como se pueden administrar tales factores antiseoretos recuperados o concentrados a animales o seres humanos con una comida o un alimento, o, en forma de productos más o menos aislados, formulados en productos farmacéuticos. Por lo tanto, también se describe el uso de yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos para la preparación de productos, tales como composiciones farmacéuticas, para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental o para su uso en un método de tratamiento.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección de los excipientes farmacéuticamente aceptables y su concentración óptima para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica por medio de experimentación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, agentes tamponadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, agentes suspensores y/o diluyentes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, p. ej. de acuerdo con "Remington: The science and practice of pharmacy", 21ª edición, ISBN 0-7817-4673-6 o "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2ª edición, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es sustancialmente inocua para el individuo al que se va a administrar la composición. Tal excipiente normalmente satisface los requerimientos proporcionados por las autoridades sanitarias nacionales. Farmacopeas oficiales tales como p. ej. la Farmacopea Británica, la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Europea establecen patrones para los excipientes farmacéuticamente aceptables.

Lo siguiente es una revisión de las composiciones relevantes para el uso opcional en una composición farmacéutica. La revisión está basada en la ruta de administración concreta. Sin embargo, se aprecia que en aquellos casos en los que se puede emplear un excipiente farmacéuticamente aceptable en diferentes formas de dosificación o composiciones, la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable concreto no está limitada a una forma de dosificación concreta o a una función concreta del excipiente. Se debe hacer énfasis en que la invención no está limitada al uso de las composiciones mencionadas a continuación.

#### **Composiciones parenterales:**

Para la aplicación sistémica, las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden contener portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales no tóxicos, incluyendo microesferas y liposomas. La liberación transcutánea constituye una ruta alternativa para la administración sistémica.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden incluir toda clase de composiciones sólidas, semisólidas y líquidas.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes tamponadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes suspensores y/o diluyentes. Los ejemplos de los diferentes agentes se proporcionan más abajo.

#### **Ejemplos de los diversos agentes:**

Los ejemplos de los disolventes incluyen pero no están limitados a agua, alcoholes, sangre, plasma, fluido espinal, fluido de ascitis y fluido linfático.

Los ejemplos de los agentes tamponadores incluyen pero no están limitados a ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido hidrogenofosfórico, bicarbonatos, sales fosfato, dietilamina, etc.

Los ejemplos de los agentes quelantes incluyen pero no están limitados a sal sódica de EDTA y ácido cítrico.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen pero no están limitados a anisol hidroxibutilado (BHA), ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, cisteína, y sus mezclas.

Los ejemplos de los diluyentes y los agentes disgregantes incluyen pero no están limitados a lactosa, sacarosa, Emdex, fosfatos de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio, manitol, almidones y celulosa microcristalina.

Los ejemplos de los agentes aglutinantes incluyen pero no están limitados a sacarosa, polisacáridos, sorbitol, goma de acacia, alginato de sodio, gelatina, almidones, celulosa, quitosanas, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención se puede administrar en un contexto de administración local o vía infusión periférica intravenosa o vía inyección intramuscular o subcutánea al paciente o vía rutas bucal, pulmonar, nasal, cutánea u oral. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica a través de una derivación insertada quirúrgicamente en un ventrículo cerebral del paciente.

En una realización, la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la presente invención se formula para su administración intraocular, local, intranasal, oral, subcutánea y/o sistémica. En una realización preferida, la composición para su uso de acuerdo con la invención se administra mediante aplicación en forma de una suspensión o, incluso más preferiblemente, un polvo para su inhalación con un pulverizador, aerosol, inhalador o nebulizador nasalmente y/o al tracto respiratorio.

La administración de un polvo que comprende factores antisecretorios tiene ventajas adicionales en términos de estabilidad y dosificación. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención se puede administrar también tópicamente, intraocularmente, intranasalmente, oralmente, subcutáneamente y/o sistémicamente vía vasos sanguíneos. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para su administración intravenosa, intramuscular, local, oral o nasal. Por lo general, cuando se utiliza para la aplicación tópica al ojo, la concentración aplicada en la composición de la invención es de 1 µg a 10 mg por aplicación, por ejemplo de 1 µg a 1 mg por aplicación, preferiblemente 50 - 1000 µg preferiblemente 50 - 250 µg, ya sea en una sola dosis por día o repetida varias veces por día (dosis múltiples), pero no está limitada a ello.

Sistémicamente administrada a la sangre, la dosis se encuentra dentro del intervalo de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal, por ejemplo 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal, preferiblemente 1 - 1000 µg/kg de peso corporal, por ejemplo preferiblemente 1 - 50, 10 - 100, 100 - 250, o 50 - 500 µg/kg de peso corporal, sea en una sola dosis por día o repetida varias veces por día. Cuando se utiliza yema de huevo enriquecida en factores antisecretorios de acuerdo con la presente invención, esta formulación se administra preferiblemente oralmente.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una proteína antisecretora, homólogo, y/o fragmento de la misma, que tiene actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, para uso en el tratamiento y/o prevención del síndrome compartimental causado por la presencia de un tumor benigno y/o maligno en un cuerpo. En una realización, dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula

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

donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 del SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 del SEQ ID NO 6, o está ausente. En otra realización, la proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:1. En otra realización, la proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:2. En otra realización más, la proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:3. En otra realización más, la proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:4. En otra nueva realización, la proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:5.

Además, en otra realización más, la proteína antisecretora es una proteína con una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO 6, o uno de sus homólogos, y/o fragmentos que comprenden los aminoácidos 38-42 del SEQ ID NO 6.

En otra realización más, la composición farmacéutica según se describe en la presente memoria, comprende dos o más proteínas antisecretoras seleccionadas entre las proteínas descritas en los SEQ ID NO:1-6, y SEQ ID NO 6 o sus homólogos, derivados y/o fragmentos que comprenden los aminoácidos 38-42 del SEQ ID NO 6, o una secuencia como se ha descrito mediante las fórmulas generales descritas en la presente memoria. Dichas secuencias son todas igualmente preferidas para ser utilizadas en la presente invención.

En una realización preferida, dicha proteína antisecretora se proporciona en yema de huevo enriquecida en tal proteína antisecretora, y donde dicha proteína antisecretora se proporciona preferiblemente a una concentración de al menos 1000 unidades FIL/ml en dicha yema de huevo.

En una realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal excipiente puede ser cualquier excipiente preferible elegido para que sea apropiado para el propósito específico. Los ejemplos de los excipientes se describen en la presente memoria.

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

En otra realización, la composición farmacéutica se formula para su administración en forma de una pulverización, un aerosol o mediante un nebulizador o un inhalador. En otra realización más, la invención se refiere a una composición farmacéutica y/o un producto nutricional médico que se formula para su administración sistémicamente a la sangre a una dosis de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal, por ejemplo de 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal, preferiblemente 1 - 1000 µg/kg de peso corporal, tal como preferiblemente 1 - 50, 10 - 100, 100 - 250, o 50 - 500 µg/kg de peso corporal, ya sea en una sola dosis por día o repetida varias veces por día. En otra realización, dicha dosis es 1 - 100 µg por aplicación y kg de peso corporal y día. La cantidad de la composición farmacéutica que es distribuida al paciente que lo necesite variará por supuesto dependiendo del

paciente que se vaya a tratar, y será decidida por el experto en la técnica, tal como un médico, para cada ocasión. Dicha administración se puede realizar en forma de una sola dosis o en forma de aplicaciones diarias múltiples.

También se describe el uso de una proteína antiseecretora, sus derivados, homólogos, y/o fragmentos, que tienen actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, para la fabricación de una composición farmacéutica y/o un producto nutricional médico para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental, donde dicho síndrome ocasiona la hinchazón anómala de células y tejidos. Adicionalmente, los fármacos pueden ocasionar la elevación de las presiones de líquido intersticial en los tejidos así como hinchazón celular.

Según la invención, el síndrome compartimental está causado por un tumor benigno y/o maligno presente en cualquier parte en un organismo y/o está relacionado con el tratamiento del tumor y/o estructuras adyacentes. Los tumores están caracterizados por presiones intersticiales elevadas, que pueden reducir la disponibilidad de las células tumorales a los fármacos y las medidas terapéuticas. Además, la presión elevada en un tumor puede afectar su tendencia a la diseminación metastásica. Adicionalmente, los tumores pueden ocasionar debido a su expansión de tamaño aumento de presión en tejidos y órganos normales adyacentes, generando un SC. De este modo el SC es una complicación frecuente y grave en muchas víctimas que padecen tumores. En otra realización más, dicho síndrome está causado por un fármaco y/o una composición farmacéutica. En otra realización más, dicho síndrome está causado por efectos secundarios causados por el tratamiento de un tumor con rayos X, radiación de alta energía, enfriamiento local, calentamiento local, fototerapia y fármacos utilizados para el tratamiento del tumor.

Se describe un método para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental en un mamífero que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o uno de sus derivados, homólogos, y/o fragmentos, que tienen actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas. Dicha proteína antisecretora puede consistir en una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 del SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 del SEQ ID NO 6, o está ausente. En otro método, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:1. En otro método más, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:2. En otro método más, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:3. Además, en otro método dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:4. En otro método más, dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO:5. En otro método más, dicha proteína antisecretora es una proteína con una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID NO 6, o uno de sus homólogos, derivados y/o fragmentos que comprenden los aminoácidos 38-42 del SEQ ID NO 6. En un método, dicha composición farmacéutica comprende dos o más proteínas antisecretoras seleccionadas entre las proteínas del SEQ ID NO:1-6, y SEQ ID NO 6 o uno de sus homólogos, derivados y/o fragmentos que comprenden los aminoácidos 38-42 del SEQ ID NO 6, o una secuencia como la descrita por la fórmula general en la presente memoria. Además, en un método como se describe en la presente memoria, dicha proteína antisecretora se proporciona en yema de huevo enriquecida en tal proteína antisecretora, y dicha proteína antisecretora preferiblemente se proporciona a una concentración de al menos 1000 unidades FIL/ml en dicha yema de huevo. En otro método más, dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica se puede formular para su administración intraocular, intranasal, oral, local, subcutánea y/o sistémica. Dicha composición farmacéutica y/o producto nutricional se puede formular para su administración en forma de una pulverización, un aerosol, o mediante un nebulizador o un inhalador. En otro método, la composición farmacéutica se formula para su administración sistémicamente a la sangre a una dosis de 0,1 µg a 10 mg/kg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg por aplicación y kg de peso corporal y día. En un método, dicha administración se realiza en forma de una sola dosis o en forma de aplicaciones diarias múltiples. También se describe un método para el tratamiento y/o la prevención del síndrome compartimental en un mamífero que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora o uno de sus derivados, homólogos, y/o fragmentos, que tienen actividad antisecretora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, donde dicho síndrome ocasiona la hinchazón anormal de células y tejidos.

## Sección experimental

### Ejemplo Núm. 1

Se infectaron ratas adultas mediante instilación en su fosa nasal derecha de una solución de virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1; cepa 2762, lote 041028;  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL; 25 µL). Un grupo de animales ( $n = 6$ ) recibió 10 min después de la infección 25 µL (10 µg) de AF-16 en su fosa nasal derecha, y después de eso se le instiló la misma dosis de AF-16 dos veces al día, cada mañana a las 8 AM y cada noche a las 6 PM, hasta que terminó el experimento el día 6. Ratas infectadas con HSV-1 adicionales ( $n = 6$ ) recibieron en la nariz a los mismos intervalos de tiempo 25 µL del vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS). El día 6, los animales se anestesiaron, se realizó una incisión quirúrgica a lo largo de la piel de la cabeza, y se liberó el hueso del cráneo del periostio y el tejido conectivo. Se taladró un agujero con un diámetro de aproximadamente 1 mm a través del hueso parietal derecho y se insertó un sensor de presión en miniatura 3-5 mm en el cerebro o en el ventrículo lateral. Se utilizó un sistema de medición de la presión de fibra óptica (Samba System 3200 & Samba Preclin 420 Sensor; Samba

Sensors AB, V Frölunda, Suecia) con un diámetro muy pequeño,  $\approx 0,4$  mm. Las ratas normales no infectadas tenían una presión intracraneal (PIC) que oscilaba entre 4-8 mm Hg, ocasionalmente hasta 12 mm Hg (Fig. 2c). Se midió que las ratas infectadas con HSV-1 tratadas solamente con el vehículo tenían presiones tal elevadas como 30 - 45 mm Hg (Fig. 2a), afectando considerablemente a los animales como reflejaban los síntomas de disfunción neurológica de gravedad creciente. En contraste, Las ratas infectadas con HSV-1 tratadas desde el momento de la infección con AF-16 dos veces diariamente tenían PIC casi normales, 8 - 14 mm Hg (Fig. 2 b). Una observación clave fue que el tratamiento intranasal dos veces al día con AF-16 evitó el desarrollo de disfunciones neurológicas tales como nariz húmeda, ojos enrojecidos, hipersalivación, dificultad respiratoria, inestabilidad motora, agitación, agresividad, letargo, cambios rápidos de estado de animo, movimientos repetitivos, ataques, signos de paresia y eventualmente pérdida de conocimiento.

Todos los animales infectados con HSV-1 adicionales con síntomas claramente manifiestos fueron tratados con 10 o 25  $\mu$ g de AF-16 intranasalmente, empezando el día 5, 6 o 7, esto es, después de haber tomado el vehículo durante los días previos. En tales casos los síntomas de disfunciones neurológicas descritos más arriba se redujeron en media hora y no volvieron a manifestarse durante una hora. Al mismo tiempo, los efectos reductores de la presión beneficiosos de AF-16 en tales ratas infectadas y tratadas con AF-16 fueron detectables en una hora y se prolongaron durante varias horas. De este modo, ninguna de las ratas tratadas con AF-16 agudamente tuvo signos persistentes de PIC deletérea y por tanto no desarrollaron SC.

La infusión del colorante azul de Evans, conjugada con albúmina de suero bovino (EBA), en el espacio subaracnoideo y en los ventrículos laterales dio como resultado ratas normales en las que podía presentarse el marcador en la mucosa nasal después de 15-30 minutos (Fig. 5 b). Esto demuestra que una considerable porción de LCE es drenado de los vasos linfáticos en la mucosa nasal y adicionalmente a través de las glándulas linfáticas cervicales, volviéndolas de color azul (de color Rojo si se investiga mediante microscopía de fluorescencia). Las ratas infectadas con HSV-1 con signos de disfunciones neurológicas no mostraron, habiendo tenido EBA infundido de un modo similar, tinción de la lámina cribiforme, ni de la mucosa nasal (Fig. 5 a). Esto se observa en la figura mencionada (Fig. 5 a ) ya que no hay tinción de rojo en la mitad derecha de la figura. Sin embargo, el tratamiento con 10 o 25  $\mu$ g de AF-16 intranasalmente convirtió la imagen de las ratas infectadas con HSV-1 en la de las no infectadas, normales. De este modo, la infusión intranasal de AF-16 revirtió el bloqueo de flujo de LCE, inducido por la infección por HSV-1. De ese modo se restauró el flujo de LCE y la PIC volvió a la normalidad.

Los autores de la presente invención concluyeron que el tratamiento de roedores con AF-16 minimiza los síntomas clínicos de la encefalitis por HSV-1 y, muy evidentemente, normaliza la PIC elevada de otro modo, contrastando con los efectos deletéreos por la PIC muy elevada medida en aquellas infectadas con HSV-1 y tratadas solamente con el vehículo, PBS. Se sabe a partir de la práctica clínica que las víctimas que padecen encefalitis tienen una PIC elevada, que es de capital importancia ya que causa una lesión cerebral no solamente aguda sino también persistente. En realidad, se considera que la PIC elevada tiene una importancia clave al ser a la larga causa de disfunción neurológica y muerte. De este modo, los resultados del experimento núm. 1 de los autores de la presente invención describieron que la administración de AF-16 a un organismo que padece una afección que satisface los criterios de un SC contrarrestaba rápidamente la PIC elevada patológicamente, la reducía e incluso la devolvía a un nivel normal, evitando el desarrollo de disfunciones neurológicas y promoviendo la supervivencia con un mal funcionamiento que radica en el cerebro o sistémico persistente mínimo o nulo.

## Ejemplo núm. 2

En un segundo experimento los autores de la presente invención investigaron si el AF-16, a una dosis que reducía la PIC elevada, como se ha descrito en el ejemplo núm. 1, también mejoraba la supervivencia de roedores adultos infectados con HSV-1. Por lo tanto, se infectaron ratas mediante instilación en su fosa nasal derecha de 25  $\mu$ L de una solución del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1; cepa 2762, lote 041028;  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL). La mitad de los animales recibieron 10 min más tarde 25  $\mu$ L (1, 10 o 25  $\mu$ g) de AF-16 en su fosa nasal derecha, y después de eso tomaron la misma dosis de AF-16 instilado cada mañana a las 8 AM y cada noche a las 6 PM hasta que terminó el experimento el día 14. La otra mitad del grupo de ratas infectadas con HSV-1 recibieron 25  $\mu$ L del vehículo, PBS, con el mismo horario. Los animales fueron estrechamente vigilados varias veces al día para determinar los signos de disfunción de comportamiento o de enfermedad general. Si era así, los animales se sacrificaban. La Fig. 3 ilustra las tasas de supervivencia para los animales, que estaban todos infectados con HSV-1. Las ratas tratadas con 1  $\mu$ g de AF-16 (n = 15; línea superior), sobrevivieron en un grado significativamente mayor, aproximadamente 60%, al final de las 2 semanas de estar funcionando el experimento (Fig. 3). En contraste, las ratas infectadas con HSV-1, que recibieron solamente el vehículo (n = 15), murieron en gran medida y solamente 10% estuvieron todavía vivas al final de período de ensayo, día 14 (Fig. 3). Todas las ratas infectadas tratadas con vehículo desarrollaron signos de disfunciones neurológicas. El tratamiento dos veces al día intranasalmente con 10  $\mu$ g o con 25  $\mu$ g de AF-16 dio como resultado que todos los animales infectados sobrevivieran, y ninguno mostró signos de disfunción neurológica. La microscopía óptica de los especímenes, fijados en formalina y tratados de acuerdo con los procedimientos rutinarios para las investigaciones histopatológicas e inmunohistoquímicas (Cf. Zhu, Wang y Hansson 2003), revelaron alteraciones inflamatorias, degenerativas y reactivas en el hipocampo, el cerebelo y el bulbo raquídeo, muy evidentemente en aquellos infectados y tratados después con el vehículo. Se debería enfatizar que el grado y la gravedad de la lesión serán dependientes de la duración de la exposición y del nivel de PIC elevada así como del tiempo de supervivencia. La investigación inmunohistoquímica de cerebros de rata infectadas tratadas con vehículo

describió que p. ej. las reactividades con flotilina-1 y acuaporina 1 en el plexo coroide eran difícilmente demostrables por más tiempo. En contraste la inmunorreactividades con flotilina-1 y acuaporina 1 definidas fueron fácilmente demostrables en el plexo coroide en animales infectados tratados con AF-16, de modo parecido a los cerebros de la ratas no tratadas, no infectadas, normales. De este modo, el tratamiento con AF-16 dificultó la pérdida de células y facilitó la normalización de la aparición y la distribución de estructuras ordenadas tales como vasos, neuronas incluyendo sinapsis y sustentando las células en el sistema nervioso. Adicionalmente, la pérdida de inmunorreactividades con flotilina-1 y acuaporina 1 inmunoquímicamente demostrable en el plexo coroide indica fuertemente una grave alteración de la prevalencia, distribución y organización de los conglomerados de lípidos, como se describe mediante la pérdida de tinción de flotilina-1, y la distribución alterada de agua entre compartimentos, p. ej. producción recambio y flujo de LCE, como se revela por medio de la baja inmunorreactividad con acuaporina 1. Se concluye que el tratamiento con AF-16 de animales con encefalitis por HSV-1 normaliza las funciones esenciales en el sistema nervioso central, aboliendo de ese modo el desarrollo de una PIC elevada, que da como resultado un SC.

Se concluye que el tratamiento mediante instilación de 1, 10 o 25 µg de AF-16 dos veces al día en una de las fosas nasales aumentaba significativamente la tasa de supervivencia de ratas adultas infectadas con HSV-1 encefalolitogénico y abolía el desarrollo de disfunciones neurológicas. Tales efectos se deben probablemente a que el tratamiento con AF-16 evitaba que la PIC aumentara hasta niveles perjudiciales, como se demostró en el ejemplo núm. 1, en el CC formado por el cráneo, y hacía volver la PIC a valores aproximadamente normales, evitando el desarrollo de un SC nocivo.

#### **Ejemplo núm. 3**

Una explicación alternativa a la mejora de la supervivencia de animales infectados con HSV-1 podría ser que el tratamiento con AF-16 evitaba que el virus se multiplicara y/o se propagara en el cerebro. Se demostró que éste no era el caso por medio del siguiente experimento. Se infectaron ratas adultas instilando una solución del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1; cepa 2762, lote 041028;  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL) en su fosa nasal derecha. La mitad de los animales recibieron 10 min más tarde 25 µL (1 o 10 µg) de AF-16 en su fosa nasal derecha, y después de eso se les instiló la misma dosis de AF-16 cada mañana a las 8 AM y cada noche a las 6 PM hasta que terminó el experimento el día 6. Los otros grupos de las ratas infectadas con HSV-1 recibieron a los mismos intervalos de tiempo 25 µL del vehículo, PBS. Los animales se vigilaron estrechamente para determinar signos de enfermedad general y disfunción de comportamiento y motora. Los animales se sacrificaron por medio de una sobredosis de anestésico el día 6, se les abrió el cráneo y se separó el cerebro. Los cerebros, incluyendo los bulbos olfativos, se fijaron mediante inmersión en formalina tamponada durante al menos un día. Los cerebros se diseccionaron y se dividieron en varios especímenes, que se trataron para su investigación con microscopía óptica después de embeberlos en parafina y seccionarlos. Las secciones se procesaron para la tinción rutinaria y para la visualización inmunohistoquímica de las proteínas de HSV-1 (Fig. 4). Un descubrimiento sorprendente fue que las proteínas de HSV-1 se podían manifestar no solamente en células nerviosas (Fig. 4a-c) sino también en células gliales (Fig. 4d) en el cerebro, incluyendo en el lóbulo olfativo y en los ganglios del trigémino. Obsérvese la clara tinción de las células nerviosas (negro en la Fig. 4a-c). No hubo, sin embargo, una diferencia obvia con respecto a la prevalencia y distribución de las proteínas de HSV-1 en los cerebros de los animales infectados tratados con AF-16 en comparación con aquellos tratados solamente con vehículo. Paralelamente, los ratones fueron infectados con HSV-1 y tratados o bien con AF-16 o bien con vehículo mediante instilación dos veces al día en la fosa nasal derecha y después de seis días se sacrificaron y los especímenes de cerebro se trataron como antes para la manifestación de los antígenos de HSV, como se ha descrito. Como para las ratas no hubo una diferencia obvia en la distribución o el grado de antígenos del virus relacionada con el tratamiento.

Los autores de la presente invención concluyen por lo tanto que el tratamiento con AF-16 de roedores infectados con una cepa de HSV-1 encefalolitogénica, aislada originalmente de un caso fatal humano, no altera ni la prevalencia, ni la distribución celular, de las proteínas virales de HSV-1 en el cerebro, en comparación con las tratadas solamente con vehículo. De este modo, el tratamiento con AF-16 no altera la distribución de HSV-1 en el SNC. La causa probable del aumento significativo de la supervivencia de los roedores, como se ilustra en el ejemplo núm. 2, es por lo tanto, que se evitaba que la PIC aumentara a niveles perjudiciales por medio del AF-16 en el CC formado por el hueso del cráneo, como se informa en el ejemplo núm. 1. De ese modo, se suprimió el desarrollo de un SC perjudicial.

#### **Ejemplo núm. 4**

La mejora de la supervivencia de los roedores infectados con HSV-1, como se ilustra en el ejemplo núm. 2, se pudo deber con ciertas vacilaciones a que AF-16 bloqueaba o al menos reducía la proliferación del virus HSV-1 en el cerebro infectado. Por lo tanto, se infectaron ratas adultas instilando una solución del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1; cepa 2762, lote 041028;  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL) en su fosa nasal derecha. La mitad de los animales infectados recibieron 10 min más tarde 25 µL (1 o 10 µg) de AF-16 en su fosa nasal derecha, y se les instiló la misma dosis AF-16 cada mañana a las 8 AM y cada noche a las 6 PM hasta que terminó el experimento el día 6. Los otros grupos de ratas infectadas con HSV-1 recibieron en los mismos intervalos de tiempo 25 µL del vehículo, PBS. Los animales se vigilaron estrechamente para determinar los signos de enfermedad general y de disfunción de comportamiento y motora. Los animales se sacrificaron por medio de una sobredosis de anestésico el día 6, después se les abrió

rápidamente el cráneo y se separó el cerebro. Después de eso, se trataron las muestras de tejido cerebral mediante RT-PCR para la evaluación del número de copias de HSV-1 demostrable en el tejido cerebral, de acuerdo con los procedimientos rutinarios utilizados en Clinical Virology Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia. Un descubrimiento sorprendente fue que no hubo una diferencia significativa con respecto a la prevalencia y distribución de las copias de ADN de HSV-1 en los roedores tratados con AF-16 en comparación con los que habían recibido solamente el vehículo (Fig. 5). El experimento descrito más arriba también se realizó en ratones paralelamente, y se alcanzaron resultados similares, confirmando la eficacia de AF-16 en múltiples especies. De este modo, el AF-16 no tuvo ningún efecto significativo sobre la multiplicación del virus HSV-1, como se demostró mediante los datos de la PCR (Fig. 5). Es probable que los efectos beneficiosos fueran debidos a que AF-16 suprimía la elevación anormal de la PIC (Fig. 2) en el CC formado por el cráneo, como se ha descrito en el ejemplo núm. 1, que si no se trataba debía dar como resultado un SC perjudicial, dañando gravemente el SNC de los animales infectados.

#### Ejemplo núm. 5

Los efectos beneficiosos de AF-16 sobre los animales que padecían encefalitis por HSV-1 podrían estar debidos, con ciertas vacilaciones, a que los AF reducían las reacciones inflamatorias en el SNC. Para someter a ensayo esa hipótesis, se infectaron ratas adultas instilando una solución del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1; cepa 2762, lote 041028;  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL) en su fosa nasal derecha. La mitad de los animales recibieron 10 min más tarde 25  $\mu$ L (1 o 10  $\mu$ g) de AF-16 en su fosa nasal derecha, y después de eso se instiló la misma dosis de AF-16 cada mañana a las 8 AM y cada noche a las 6 PM hasta que terminó el experimento el día 6. La otra mitad de las ratas infectadas con HSV-1 recibieron en los mismos intervalos de tiempo 25  $\mu$ L del vehículo, solución salina tamponada con fosfato. El día 6, se recogieron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCE) de los animales, o bien tratados con AF-16 ( $n = 3$ ), o bien con vehículo ( $n = 3$ ), de acuerdo con el procedimiento descrito por Huang, Säljö y Hansson (1996). Cuando se analizaron las concentraciones de los marcadores de inflamación IL-1, IL-6, y TNF- $\alpha$ , se encontró que no había ninguna diferencia significativa en las concentraciones de cualquiera de ellas en el LCE de los animales infectados tratados con AF-16 en comparación con las de aquellos que habían sido tratados con el vehículo. Se concluye que no es probable que el tratamiento con AF-16 mejore la supervivencia de los roedores que padecen encefalitis por HSV-1 alterando la respuesta inflamatoria, sino normalizando la presión intracraneal, evitando de ese modo la prevalencia de una PIC elevada en un CC y de ese modo el desarrollo de un SC. De ese modo se consideró que los efectos deletéreos causados por la encefalitis por HSV-1 estuvieron debidos a que el AF impedía el desarrollo de un SC.

#### Ejemplo núm. 6

Se indujo un tipo diferente de SC cerebral por medio de una inyección de sangre completa autóloga en el espacio subaracnoideo, un procedimiento conocido de la literatura para producir el desarrollo de un edema cerebral y una PIC elevada. Se depositaron 50 – 350  $\mu$ L de sangre autóloga heparinizada en el espacio subaracnoideo de ratas adultas a través de un pequeño agujero taladrado en el hueso occipital o mediante inyección en la cisterna magna a través de la membrana atlanto-occipital. Los agujeros taladrados en el cráneo se taparon finalmente con pegamento SuperBond®. Tales tratamientos con sangre depositada subaracnoideamente aumentaron la PIC, induciendo el desarrollo de un SC en un día o en una semana, dependiendo el tiempo exacto de las afecciones y de la cantidad de sangre depositada, en concordancia con los informes de la literatura médica. En los experimentos de los autores de la presente invención, la inyección de 0,2-0,3 mL de sangre heparinizada, autóloga en la cisterna magna en ratas Sprague-Dawley adultas dio como resultado en 1-3 días una elevación de la PIC de 13 a 30 mm Hg, evaluada con una sonda guiada por luz para la presión en miniatura implantada (Samba System 3200 & Samba Preclin 420 Sensor; Samba Sensors AB, Gruvatan 6, SE 42130 V. Frölunda, Suecia). La PIC en ratas adultas normales, ya sean no tratadas o a las que se ha inyectado en lugar de eso solución salina tamponada con fosfato (PBS), fue de 6 - 9 mm Hg. El tratamiento con 25  $\mu$ g de AF-16 intranasalmente dos veces al día dio como resultado una reducción de la PIC elevada, que volvía reproduciblemente a niveles casi normales en 1 - 2 h. Los roedores tratados con AF no mostraron signos de función cerebral deteriorada ni ningún deterioro obvio grueso de las funciones de comportamiento o motoras, en contraste con aquellas en las que se había depositado sangre subaracnoideamente y después se habían tratado con vehículo. Se concluye que el tratamiento con AF-16 redujo el grado y la gravedad de la lesión cerebral inducida por el depósito de subaracnoideo de sangre en comparación con los animales que sólo habían recibido vehículo, PBS. Esto significa que el AF-16 está suprimiendo y, en caso de SC cerebral ya establecido, reduciendo su gravedad. La pronta respuesta a AF-16 fue decisiva para el efecto beneficioso ejercido por AF-16.

#### Ejemplo núm. 7

Las articulaciones están encerradas por cápsulas de colágeno no distensibles, sensibles, caracterizadas adicionalmente por una baja elasticidad pero con plasticidad. En la artritis, la presión en el líquido sinovial en la cavidad de la articulación se vuelve elevada, y se añade la inflamación a los síntomas. Es prevalente un CS. Con el fin de investigar si el tratamiento con AF-16 podría prevenir o al menos reducir el desarrollo de dicho SC, se infectaron ratas adultas mediante inyección sistémica de una solución de un *Staphylococcus aureus* artrítogénico (SA; cepa LS1). Un grupo de animales ( $n = 3$ ) se trató con AF-16 mientras un segundo grupo de ratas ( $n = 3$ ) recibió solo el vehículo, PBS. Después de unos pocos días las articulaciones de las rodillas y más tarde las articulaciones

de la mano y el pie se volvieron sensibles, se hincharon y se elevó la presión en las cavidades de las articulaciones, medida con la sonda para la Presión de Fibra Óptica Samba (Samba System 3200 & Samba Preclin 420 Sensor; Samba Sensors AB, Gruvgatan 6, SE 42130 V. Frölunda, Suecia), así como en el tejido inmediatamente circundante. La presión en una articulación grande normal es de 0-5 mm Hg, pero podría aumentar más de cinco veces en las articulaciones inflamadas infectadas. Se midió la presión del líquido intersticial en el tejido subcutáneo a una distancia de la articulación infectada para su comparación y se encontró que permanecía dentro de los límites normales,  $\pm 2$  mm Hg. En contraste, los roedores con una articulación grande infectada con SA y tratados con AF-16 no tenían esas articulaciones hinchadas y doloridas, sensibles, y tenían una presión próxima a la normal en la articulación. Los animales infectados, que solamente recibieron tratamiento con el vehículo, PBS, desarrollaron SC

crecientemente grave con el transcurso del tiempo. Las muestras de líquido sinovial analizadas para determinar la prevalencia de la bacteria cuantitativamente y cualitativamente de cualquier grupo revelaron que el número de *S. aureus* era aproximadamente el mismo en las articulaciones más grandes, con independencia de si las ratas habían sido tratadas con AF-16 o no.

Los autores de la presente invención concluyeron que el tratamiento con AF-16 reducía la presión en la articulación infectada después de la inoculación de microbios artritogénicos, p. ej. bacterias, y probablemente también virus y agentes inmunológicos. No había, sin embargo, diferencia en la multiplicación o distribución en las articulaciones de la bacteria patogénica, p. ej. *Staphylococcus aureus* (cepa LS1). Por lo tanto, era probable que las articulaciones infectadas estuvieran dañadas por la infección con SA, ya que no se administraron antibióticos. Sin embargo, no se dejó que los animales sobrevivieran durante tanto tiempo.

#### Ejemplo núm. 8

El mayor descubrimiento fue que el tratamiento con AF-16 contrarrestó reproduciblemente la presión elevada en la articulación afectada de otra manera, que constituía un CC. De ese modo, no se desarrolló SC después del tratamiento con AF-16 en articulaciones infectadas como se evaluó en el presente estudio.

Ratas adultas tenían una afección de CC inducida y evaluada en los músculos esqueléticos. En la pata trasera, los grandes vasos que se introducían en el *Musculus extensor digitorum longus* (EDL) fueron ocluidos durante 1 - 3 horas aplicando una carga de presión externa (Véase Jennische y Hansson, 1987; Jennische, Skottner y Hansson, 1987). Después de eso, se dejó que el flujo sanguíneo se reanudara, y la envoltura del músculo y la incisión en la piel se repararon y se suturaron. Este tratamiento dio como resultado una lesión isquémica que ocasionó la necrosis de una fracción de las fibras del músculo esquelético de EDL. Se desarrolló un SC a medida que el tejido y el tejido intersticial acumulaban líquido en dicho compartimento cerrado y adicionalmente el tejido muscular se hinchó y se volvió edematoso. La presión en dicho compartimento cerrado aumentó, dando como resultado el desarrollo de un SC. Se requirió la intervención quirúrgica para evitar que partes del tejido del músculo esquelético se necrosaran, si no había un tratamiento adicional. Sin embargo, si se trataba con AF-16, no se desarrollaba síndrome compartimental cerrado, ya que se pudo demostrar con sensores de presión Samba que la hinchazón reactiva del tejido lesionado y de ese modo la presión dentro del compartimento retornaban aproximadamente a la normalidad. La microscopía óptica de muestras del músculo EDL confirmó que el tratamiento con AF-16 reducía el grado y el volumen de la lesión del tejido, en comparación con el tratamiento con vehículo. De este modo, el tratamiento con AF-16 evitó el desarrollo de un SC, reduciendo a la larga el perjuicio y la pérdida de tejido.

#### Ejemplo núm. 9

Ratas adultas tenían experimentalmente una afección de CC inducida que afectaba al pericardio y fueron evaluadas con respecto a los efectos del tratamiento con el péptido AF-16. La cavidad pericárdica está delimitando el corazón, formando un saco lleno de un volumen mínimo de líquido, que permite el acomodo de los movimientos deslizantes resultantes de las bruscas y enérgicas contracciones del corazón. La cavidad pericárdica está rodeada hacia su periferia por una membrana parietal rica en colágeno. En ratas anestesiadas el pericardio es abierto quirúrgicamente, a través de una pequeña "ventana" en el diafragma y el mediastino. Se ocasionó un trauma en interior del pericardio frotándolo quirúrgicamente a través de la incisión. Estos animales se dividieron en dos grupos, uno se trató con AF-16 mientras el otro sólo recibió el vehículo, PBS. Aquellos que habían sido tratados con AF-16 durante una semana, sólo tenían una leve acumulación de líquido en su cavidad pericárdica, a baja presión. En contraste, aquellos animales que se habían tratado con el vehículo después de la fricción tenían su pericardio lleno de líquido a presión, y tenían numerosas hebras de fibrina y células inflamatorias. Adicionalmente, la envoltura pericárdica parietal estaba hinchada, inflamada e infiltrada por numerosos vasos sanguíneos dilatados, en parte recién formados.

El hígado, el bazo, el riñón y el tiroides fueron lesionados mecánicamente de un modo similar mediante compresión y expuestos a abrasión. Se pudo demostrar, también en esos casos, que el tratamiento con AF-16 reducía el edema y la hinchazón de estas estructuras, respectivamente, en comparación con lo logrado en el tratamiento con vehículo. Adicionalmente, se redujo la prevalencia de ascitis y tipos relacionados de excesivo líquido extracelular a presión elevada. De este modo, AF-16 redujo el grado y la gravedad del SC en órganos y tejidos parenquimatosos.

El desastre del CC, alteró gravemente las funciones del corazón, fue menos propenso a desarrollarse en animales tratados con AF. De este modo, el AF-16 dificultó el desarrollo de un SC cardíaco. Se verificaron los mismos efectos beneficiosos de AF para las otras estructuras y órganos parenquimáticos investigados.

#### Ejemplo núm. 10

5 Los discos intervertebrales, que separan los cuerpos vertebrales en la columna, ajustan sus dimensiones de acuerdo con la carga real muchas veces al día. El contenido de agua en el nucleus pulposus avascular y el annulus fibrosus en un disco es dependiente del suministro de líquido, iones, nutrientes y oxígeno de los ligamentos adyacentes y de las placas finales de las vértebras (Véase, Holm et al., 2007). Los inmensos productos de un disco avascular deben pasar a través de los mismos obstáculos antes de alcanzar los sistemas vasculares. Por lo tanto, roedores, conejos y cerdos han sido evaluados con respecto a los efectos de la proteína AF y de los péptidos AF en lo que se refiere a los efectos sobre los discos intervertebrales cuando están cargados y descargados. Se pudo demostrar que el tratamiento con AF-16 reducía la hinchazón y las reacciones inflamatorias de los discos intervertebrales dañados. Adicionalmente, cuando se examinaban mediante microscopía óptica secciones coloreadas preparadas a partir de tales discos se demostró que habían sufrido menos daño en el nucleus pulposus los animales tratados con AF-16 así como que tenían alteraciones reactivas menos prominentes, lo que se esperaba reconocer por lo demás en el annulus fibrosus y los ligamentos acompañantes y el tejido conectivo adyacente. Adicionalmente, los efectos de AF y AF-16 d después de cargas supramáximas así como después de un trauma en los discos intervertebrales revelaron que la rigidez de las conexiones intervertebrales y la deformación inducida estaban más cerca de la normalidad después del tratamiento con AF-16 que lo registrado después del tratamiento con vehículo. De este modo se describe que los compuestos de AF son beneficiosos en la reducción de la hinchazón y la lesión de tejidos en un trauma o deformación y/o una carga excesiva sobre los discos intervertebrales.

#### Ejemplo núm. 11

Se investigaron ratas adultas que tenían un SC inducido experimentalmente desarrollado en estructuras definidas englobadas por un cierre sensible, tal como un tendón y un nervio, con respecto a si AF-16 afectaba a su destino. Todos los nervios periféricos y autonómicos están bien delimitados por un endoneurio, un perineurio y un epineurio exterior. Múltiples fascículos nerviosos forman un nervio (Véase Hansson et al., 1987). Los tendones y algunos de los ligamentos de un organismo están delimitados por una estructura de tipo membrana de colágeno sensible, la vaina sinovial. La capa límite interna de esta última conecta el tendón con su vaina sinovial, lo que permite el deslizamiento a la mínima fricción. La periferia de esta última estructura está englobada por una capa de tipo membrana, fibrosa, la vaina fibrosa. El peritendineo englobante está en alguna localizaciones sujeto en la posición y recibe nutrición por medio de los mesotendones y por medio de las vínculas (Véase Hansson et al., 1980). Adicionalmente, otros dispositivos lubricantes son las bursas, los sacos fibrosos cerrados que tienen una fina película de líquido y que evitan el roce y la carga pesada contra y entre las estructuras firmes adyacentes. La hinchazón y el edema debidos a una carga excesiva y al trauma así como la inflamación deterioran la estructura y la función de los nervios periféricos, los tendones y las bursas.

En ratas anestesiadas se rompió el nervio ciático con la ayuda de un fórceps diseñado especialmente, como se ha descrito previamente (Stemme et al., 1985; Hansson et al., 1987). Dicho procedimiento dio como resultado no solamente el deterioro de la función y la estructura del nervio sino también una reducción de la circulación de sangre y linfa, y ocasionó la hinchazón del nervio ciático, el desarrollo de un edema, que incluía estructuras adyacentes y de la envoltura. La PLI se volvió elevada, como se evaluó mediante la inserción de una sonda de medición de la presión de fibra óptica Samba en el tejido afectado. Una de cada dos ratas se trató con AF-16 a una dosis elevada, empezando en el momento de la lesión. Una de cada dos ratas tratadas de forma idéntica recibió solamente el vehículo. Se determinó que la presión en el perineo se elevaba en un día en las tratadas solamente con vehículo, en concordancia con la hinchazón y el edema local reconocidos macroscópicamente, esto es, habían desarrollado un SC. En contraste, resultó que los nervios ciáticos tratados con AF-16 tenían una presión intraneural que era en la mayor parte de los casos ligeramente elevada o próxima a la medida en un nervio normal. La microscopía óptica de las secciones teñidas débilmente de los nervios ciáticos lesionados confirmó que AF-16 reducía la inflamación y el edema y la distorsión del tejido.

Se lograron resultados similares cuando se trataron tendones dañados (Hansson H A et al., 1980) con AF-16, en comparación con los observados después de la administración de vehículo. Aquellos que habían sido tratados con el vehículo desarrollaron signos de SC en contraste con los tratados con AF y AF-16.

Se concluye que AF-16 impide el desarrollo de un SC en una lesión p. ej. un nervio, un tendón o una bursa.

#### Ejemplo núm. 12

55 Durante la cirugía y en los traumas las arterias se pueden dañar, haciendo que la pared vascular se hinche. Estos eventos darán como resultado el desarrollo de una PLI elevada en la pared vascular, produciendo reacciones inflamatorias y reconstrucción (Hansson, Jennische & Skottner, 1987). A las ratas de un grupo se les implantó subcutáneamente una minibomba osmótica Alza pre-iniciada, rellena con AF-16, y conectada al lugar de la lesión con un tubo fino de silicona, que permitía la liberación del péptido AF-16 directamente en el tejido traumatizado. Los

otros animales tenían sus bombas rellenas de vehículo, con fines comparativos. Las arterias dañadas se investigaron 3, 5, 7 o 14 días más tarde. Los vasos sanguíneos recuperados de los animales tratados con vehículo eran sensibles, tenían un diámetro incrementado y estaban hinchados. En contraste, aquellos tratados con AF-16 fueron reconocidos como menos hinchados e inflamados. La tasa de permeabilidad fue mayor para aquellos tratados con AF-16 en comparación con los expuestos al vehículo. Cuando se investigaron especímenes teñidos y seccionados de la arteria femoral después de 14 días resultó obvio que los de las ratas tratadas con AF-16 mostraban menos daño y reacciones inflamatorias menos prominentes y alteraciones reactivas menos extensas tales como formación de una neointima que comprende células de la musculatura lisa, en comparación con los tratados solamente con el vehículo. Además, el número de macrófagos, células espumosas y linfocitos también resultaba reducido por el tratamiento con AF-16. Se concluye que AF-16 tenía efectos beneficiosos sobre la curación de vasos sanguíneos dañados.

### Ejemplo núm. 13

Se han implantado tumores, malignos y benignos, subcutáneamente e intramuscularmente en roedores. Uno de cada dos animales, que tienen tumores con un diámetro que oscila de 10 mm a 15 mm, se trató con proteínas AF o AF-16, sistémicamente con la ayuda de minibombas osmóticas Alzet implantadas subcutáneamente, por medio de inyección de AF-16 en o dentro del tumor. En otro experimento, se liberó el péptido AF-16 desde una bomba Alzet 2001 implantada directamente sobre y/o dentro del tumor con un tubo fino de silicona. Las ratas adicionales tenían la proteína AF inducida por su alimento o tomando AF en la yema de huevo. Para la comparación, un número igual de ratas recibieron el mismo tratamiento pero con vehículo. Se determinó la presión del líquido intersticial (PLI) en el tumor así como en sus regiones adyacentes con la ayuda de un sensor de presión de fibra de vidrio Samba (diámetro 0,4 mm), con y sin un tubo protector, así como con un equipamiento que permite la determinación de la presión del líquido intersticial por medio de la técnica del catéter de tipo "wick". La PLI en los tumores de los animales tratados con vehículo fue significativamente elevada, excediendo de 12 mm Hg. La PLI en el tejido conectivo adyacente estaba oscilante entre 0 y 4 mm Hg, pero ocasionalmente podía ser negativa. Los tumores en el intervalo de 10-15 mm, y tratados con AF-16 como se ha descrito más arriba, obtuvieron una reducción de la PLI, que se redujo normalmente a 12 mmHg o menos. Además, AF-16 redujo la intensidad y el grado de la reacción inflamatoria evaluados mediante microscopía óptica de las secciones finas teñidas, preparadas a partir de especímenes fijados y procesados.

En experimentos paralelos realizados en roedores, se pudieron demostrar los efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la diseminación de tumores implantados tratados con yema de huevo enriquecida en proteínas, en comparación con los efectos del vehículo.

Se concluye que es probable que la disminución de la PLI en tumores mejore la microcirculación, volviendo de ese modo el medio menos hipóxico y promoviendo una mejor penetración de los fármacos anti-tumorales, que también serán más eficazmente distribuidos. Se concluye que la capacidad de AF-16 para reducir la PLI en tumores mejorará la eficacia del tratamiento con fármacos específicos. Adicionalmente, es probable que la terapia con radiación sea más eficaz ya que la mejora de la microcirculación después del tratamiento con AF-16 aumentará los niveles de oxígeno en el tejido expuesto, promoviendo de ese modo la formación de radicales libres, de importancia clave en la obstaculización del crecimiento del tumor, produciendo a la larga una mejor eliminación de las células tumorales. Se considera que tales efectos de AF-16 sobre la PLI contribuyen a una mejor erradicación de los tumores, y permite controlar la diseminación en una víctima.

### Ejemplo núm. 14

Se investigaron los efectos de AF en la adición a células procarióticas, que están encerradas por una pared celular completa, permitiendo de ese modo el desarrollo de una presión elevada debido a la obstaculización de las funciones de membrana. Esto se realizó en bacterias, que sintetizan y liberan una amplia variedad de sustancias que pueden ocasionar daños en células de mamífero y de este modo en un organismo. Los ejemplos de tales productos son pigmentos, enzimas y toxinas, que son transferidos a través de la membrana bacteriana externa al entorno extracelular. La inhibición de dichas actividades de la membrana reduciría o incluso bloquearía la transferencia y/o liberación de tales sustancias patogénicas. Con el fin de investigar si el péptido AF-16 afectaba a la transferencia de productos bacterianos desde su síntesis en la bacteria a su entorno, se realizó el siguiente experimento. Se cultivó durante la noche, u ocasionalmente durante 2 días, la bacteria *Staphylococcus aureus*, que sintetiza un pigmento amarillo, en presencia o ausencia del péptido AF-16. Después de un día o dos se enjuagó el cultivo bacteriano, y después se concentró mediante centrifugación. El pigmento amarillo formado por *Staphylococcus aureus* se extrajo de la bacteria sedimentada, permeabilizada con metanol y se determinó la absorción de luz mediante espectrometría. Los cultivos de bacteria desarrollados en presencia de AF-16 tenían mucho más pigmento amarillo que los expuestos solamente al vehículo, después de la corrección de los valores medidos para el número de bacterias. Estos resultados demostraron inequívocamente que el tratamiento con AF-16 anulaba la transferencia y liberación de los constituyentes formados en las bacterias al entorno.

Se concluye que el experimento presentado prueba que AF-16 influye eficazmente en el transporte de la masa intracelular y la liberación de productos desde la bacteria viva.

## Resumen y conclusiones

El tratamiento con el péptido AF-16 anuló o al menos redujo el desarrollo de presiones elevadas en compartimentos cerrados. El tratamiento con AF redujo además los signos clínicos adversos en la exposición a una carga excesiva, lesión, isquemia, agentes tóxicos, fármacos y en infecciones. Si se trata con AF-16 la presión en los compartimentos cerrados, no se elevó a los niveles perjudiciales esperados, como resultaba evidente si el animal se trataba solamente con el vehículo. Los afecciones patológicas tratadas no se relacionaron con la anulación de las afecciones hipersecretoras por las proteínas y péptidos de AF. El efecto descrito de la administración de péptidos y proteínas de AF fue normalmente evidente en una hora y duró varias horas. La respuesta a la administración de AF fue rápida y redujo los efectos perjudiciales de la presión elevada en los compartimentos cerrados considerablemente. Las proteínas y péptidos de AF fueron de ese modo efectivos en el tratamiento del SC en un organismo vivo anulando el desarrollo de un SC cerrado, deletéreo por lo demás para la función del tejido y el órgano afectados. Un experto en la técnica comprende que la normalización de la presión en un compartimento cerrado facilita la administración de otras preparaciones farmacéuticas, con el objetivo de reducir la causa de la presión elevada y sus complicaciones, así como de dirigir estos fármacos a su diana.

## Referencias

1. Hansson H.-A., Jennische E, & Skottner A. Regenerating endothelial cells express insulin-like growth factor-I immunoreactivity after arterial injury. *Cell Tissue Res.*, 1987; 250: 499-505, 1987.
2. Hansson H.-A., Lundborg G & Rydevik B. Restoration of superficially damaged flexor tendons in synovial environment. An experimental ultrastructural study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 14, 109-114, 1980.
3. Hansson H.-A., Rozell B, & Skottner A. Rapid axoplasmic transport of insulin-like growth factor I in the sciatic nerve of adult rats. *Cell Tissue Res.* 1987; 247: 241-247, 1987.
4. Heldin CH, Rubin k, Pietras K & Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4, 806-13, 2004.
5. Holm S, Baranto A, Kaigle Holm A, Ekström L, Sward L, Hansson T & Hansson H.-A. Reactive changes in the adolescent porcine spine with disc degeneration due to endplate injury. *Vet Comp Orthop Traumatol* 20, 12-17, 2007.
6. Jennische E & Hansson H.-A. Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I. *Acta Physiol Scand.* Jun;130, 327-332, 1987
7. Jennische E, Skottner A & Hansson H.-A. Satellite cells express the trophic factor IGF-I in regenerating skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 129, 9-15, 1987
8. Kumar V, Abbas, AK & Fausto N: Robbins and Cotran Pathologic Basis de Disease, 7th ed., W.B.Saunders Co., Philadelphia, 2005.
9. Lange S, & Lönnroth I. The antiseecretory factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. *Intern Rev. Cytology* 210, 39-75, 2001.
10. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL & Darnell J. Molecular biology of the cell. 5th edit. WH Freeman & Co., New York, 2004.
11. Pollard TD & Earnshaw WC. Cell biology, Saunders, Philadelphia, 2002.
12. Ross MH & Pawlina W. Histology, a text and atlas. 5th edit., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2006.
13. Stemme S, Hansson H.-A., Holmgren A, & Rozell B. Axoplasmic transport of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1985; 359 :140-146.
14. WO 05/030246
15. WO 97/08202
16. WO 98/21978
17. US 6344440

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lantmannen AS Faktor AB

<120> Nuevo enfoque en el tratamiento del síndrome compartimental

5 <130> PD53689PC00

<160> 6

10 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> 6

20 <223> se puede reemplazar por A

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> se puede reemplazar por R o K

25 <221> VARIANTE

<222> 4

<223> se puede reemplazar por L

30 <221> VARIANTE

<222> 2

<223> se puede reemplazar por S

<400> 1

35 Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn Val Gly Leu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> VARIANTE

<222> 7

45 <223> se puede reemplazar por A

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> se puede reemplazar por R o K

50 <221> VARIANTE

<222> 5

<223> se puede reemplazar por L

55 <221> VARIANTE

<222> 3

<223> se puede reemplazar por S

<400> 2

60 Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg

1 5

<210> 3

<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5    <220>  
      <221> VARIANTE  
      <222> 6  
      <223> se puede reemplazar por A

10 <221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> se puede reemplazar por R o K

15      <221> VARIANTE  
         <222> 4  
         <223> se puede reemplazar por L

<221> VARIANTE  
<222> 2  
20 <223> se puede reemplazar por S

```

<400> 3
Val Cys His Ser Lys Thr Arg
  1             5

```

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 5  
<223> se puede reemplazar por A

<221> VARIANTE  
<222> 2  
<223> se puede reemplazar por R o K

40 <221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> se puede reemplazar por L

45      <221> VARIANTE  
         <222> 1  
         <223> se puede reemplazar por S

<400> 4  
Cys His Ser Lys Thr Arg  
1 5

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 1  
<223> se puede reemplazar por R o K

<221> VARIANTE  
<222> 2  
<223> se puede reemplazar por L

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> se puede reemplazar por A

5 <400> 5  
His Ser Lys Thr Arg  
1 5

<210> 6

<211> 382

10 <212> PRT

<213> humano

<400> 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Val | Leu | Glu | Ser | Thr | Met | Val | Cys | Val | Asp | Asn | Ser | Glu | Tyr | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Arg | Asn | Gly | Asp | Phe | Leu | Pro | Thr | Arg | Leu | Gln | Ala | Gln | Gln | Asp | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Asn | Ile | Val | Cys | His | Ser | Lys | Thr | Arg | Ser | Asn | Pro | Glu | Asn | Asn |
|     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Val | Gly | Leu | Ile | Thr | Leu | Ala | Asn | Asp | Cys | Glu | Val | Leu | Thr | Thr | Leu |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Thr | Pro | Asp | Thr | Gly | Arg | Ile | Leu | Ser | Lys | Leu | His | Thr | Val | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Lys | Gly | Lys | Ile | Thr | Phe | Cys | Thr | Gly | Ile | Arg | Val | Ala | His | Leu | Ala |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Leu | Lys | His | Arg | Gln | Gly | Lys | Asn | His | Lys | Met | Arg | Ile | Ile | Ala | Phe |
|     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val | Gly | Ser | Pro | Val | Glu | Asp | Asn | Glu | Lys | Asp | Leu | Val | Lys | Leu | Ala |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Lys | Arg | Leu | Lys | Lys | Glu | Lys | Val | Asn | Val | Asp | Ile | Ile | Asn | Phe | Gly |
|     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Glu | Glu | Glu | Val | Asn | Thr | Glu | Lys | Leu | Thr | Ala | Phe | Val | Asn | Thr | Leu |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |
| Asn | Gly | Lys | Asp | Gly | Thr | Gly | Ser | His | Leu | Val | Thr | Val | Pro | Pro | Gly |
|     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Pro | Ser | Leu | Ala | Asp | Ala | Leu | Ile | Ser | Ser | Pro | Ile | Leu | Ala | Gly | Glu |
|     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Gly | Gly | Ala | Met | Leu | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Asp | Phe | Glu | Phe | Gly | Val |
|     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Pro | Ser | Ala | Asp | Pro | Glu | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu | Arg | Val | Ser | Met |
|     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Glu | Glu | Gln | Arg | His | Ala | Gly | Gly | Gly | Ala | Arg | Arg | Ala | Ala | Arg | Ala |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Ser | Ala | Ala | Glu | Ala | Gly | Ile | Ala | Thr | Thr | Gly | Thr | Glu | Asp | Ser | Asp |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Met | Thr | Ile | Ser | Gln | Gln | Glu | Phe | Gly | Arg | Thr |
|     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Gly | Leu | Pro | Asp | Leu | Ser | Ser | Met | Thr | Glu | Glu | Glu | Gln | Ile | Ala | Tyr |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala | Met | Gln | Met | Ser | Leu | Gln | Gly | Ala | Glu | Phe | Gly | Gln | Ala | Glu | Ser |
|     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ala | Asp | Ile | Asp | Ala | Ser | Ser | Ala | Met | Asp | Thr | Ser | Glu | Pro | Ala | Lys |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Glu | Glu | Asp | Asp | Tyr | Asp | Val | Met | Gln | Asp | Pro | Glu | Phe | Leu | Gln | Ser |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Val | Leu | Glu | Asn | Leu | Pro | Gly | Val | Asp | Pro | Asn | Asn | Glu | Ala | Ile | Arg |
|     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Asn | Ala | Met | Gly | Ser | Leu | Pro | Pro | Arg | Pro | Pro | Arg | Thr | Ala | Arg | Arg |
|     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Thr | Arg | Arg | Arg | Lys | Thr | Arg | Ser | Glu | Thr | Gly | Gly | Lys | Gly |     |     |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |

15

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, y/o un fragmento de la misma, que tiene actividad antiselectora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, para uso en el tratamiento y/o prevención de un síndrome compartimental causado por la presencia de un tumor benigno y/o maligno en un cuerpo.
- 5 2. Una proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, y/o un fragmento de la misma, que tiene actividad antiselectora, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas, para uso según la reivindicación 1, donde el síndrome compartimental está causado por el tratamiento de un tumor y/o estructuras adyacentes.
3. Una proteína de factor antiselector (AF) para uso según la reivindicación 1, donde dicha proteína de factor antiselector (AF) corresponde a una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 6:, o un homólogo  
10 y/o fragmento de la misma que comprende aminoácidos 38-42 de SEQ ID NO: 6 y/o una de sus sales farmacéuticamente activas.
4. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo y/o un fragmento de la misma, para uso según la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de acuerdo con la siguiente fórmula  
X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5  
15 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 del SEQ ID NO: 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 del SEQ ID NO: 6, o está ausente y/o una de sus sales farmacéuticamente activas.
5. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según la reivindicación 1, donde dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en el SEQ ID  
20 NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, y/o una de sus sales farmacéuticamente activas.
6. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho tumor es un tumor primario o una metástasis.
7. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho síndrome compartimental está causado por efectos secundarios causados  
25 por el tratamiento de dicho tumor con rayos X, radiación de alta energía, enfriamiento local, calentamiento local, fototerapia y/o fármacos utilizados para el tratamiento del tumor.
8. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento de dicho síndrome compartimental mejora la eficacia de la terapia del cáncer mediante la disminución de la presión intersticial.
9. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína de factor antiselector (AF), un homólogo y/o fragmento de la  
30 misma, está presente en una composición farmacéutica y/o un producto nutricional médico.
10. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según la reivindicación 9, donde dicha composición farmacéutica y/o producto nutricional médico comprende dos o más  
35 proteínas antiselectoras, o un homólogo y/o fragmento de las mismas según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
11. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, donde dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde dicha composición farmacéutica se formula para administración  
40 dentro de una cavidad corporal, intraocularmente, intranasalmente, oralmente, localmente, cutáneamente, subcutáneamente, intramuscularmente y/o sistémicamente.
13. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, donde dicha composición farmacéutica se formula para administración como  
45 un pulverizador, aerosol, inhalador o mediante un nebulizador.
14. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, donde la composición farmacéutica se formula para administración sistémicamente a la sangre a una dosis de aplicación de 0,1 µg a 10 mg por kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg por kg de peso corporal y día.
15. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, donde dicha administración se lleva a cabo bien como una sola dosis o como aplicaciones múltiples diarias.

16. Una proteína de factor antiselector (AF) o un homólogo, y/o un fragmento de la misma, para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha proteína antiselectora se proporciona en yema de huevo enriquecida en tal proteína antiselectora, y donde dicha proteína antiselectora se proporciona preferiblemente en dicha yema de huevo.

```

Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr Met
1          5          10          15

Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asp Ala
20          25          30

Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn
35          40          45

Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu Thr Thr Leu
50          55          60

Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr Val Gln Pro
65          70          75          80

Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala His Leu Ala
85          90          95

Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile Ile Ala Phe
100         105         110

Val Gly Ser Pro Val Gln Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val Lys Leu Ala
115         120         125

Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile Asn Phe Gly
130         135         140

Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu
145         150         155         160

Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly
165         170         175         180

Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu
185         190         195

Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val
200         205         210

Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met
215         220         225

Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
230         235         240

Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp
245         250         255

Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Gln Gln Phe Gly Arg Thr
260         265         270

Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Glu Glu Glu Gln Ile Ala Tyr
275         280         285

Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser
290         295         300

Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys
305         310         315         320

Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser
325         330         335

Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg
340         345         350

Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg
355         360         365

Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly
370         375         380

```

Fig.1

PIC: HSV-1 5 d, vehículo

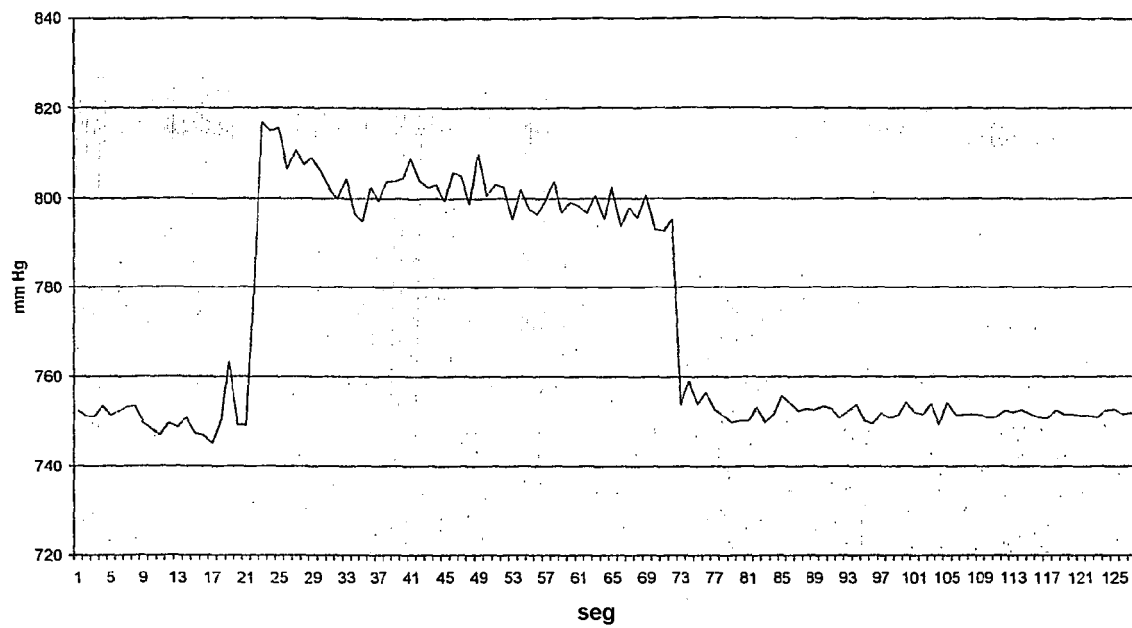


Fig 2a

PIC , HSV-1 & AF-16, 5 d

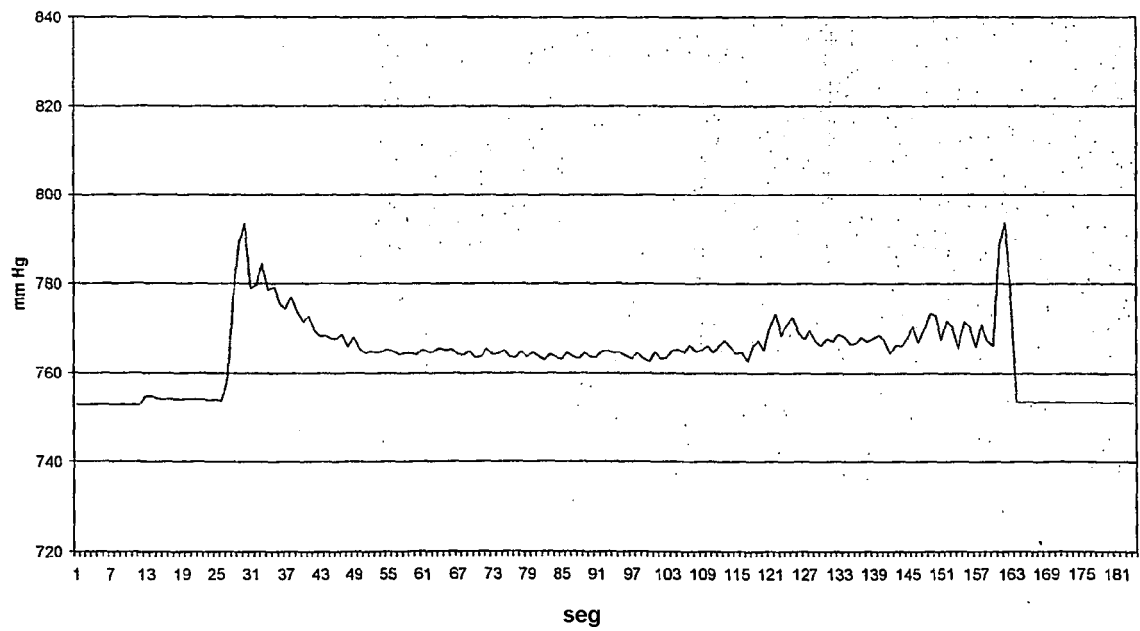


Fig 2b

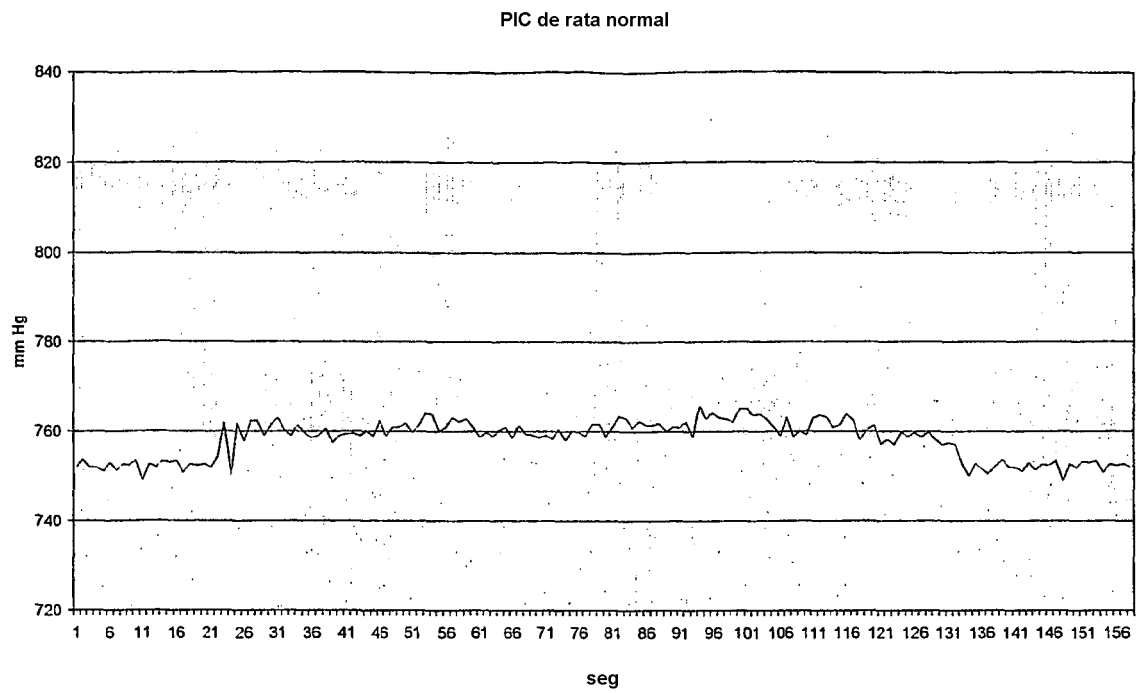
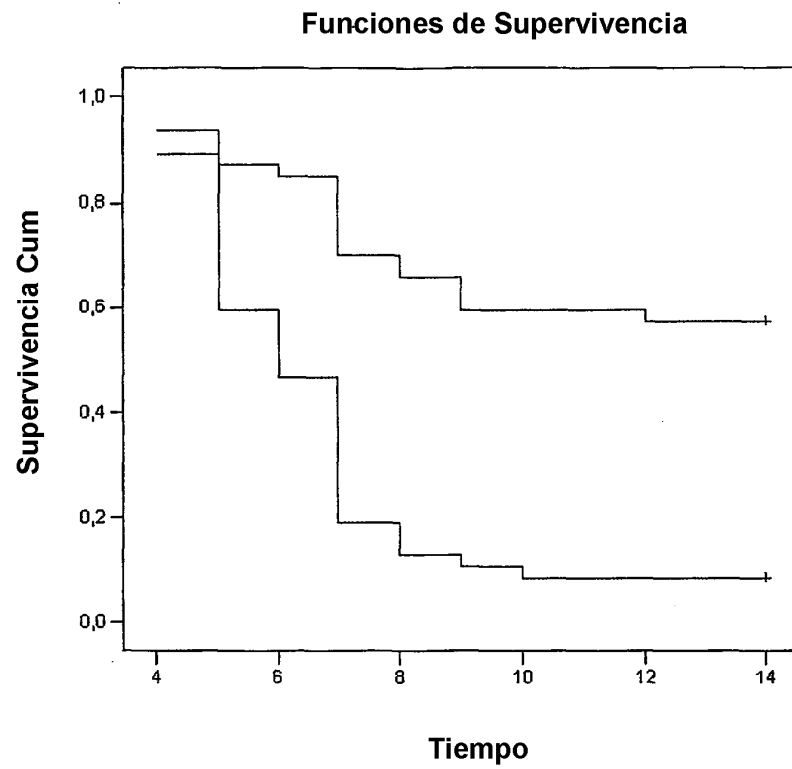


Fig 2c



**Fig 3**



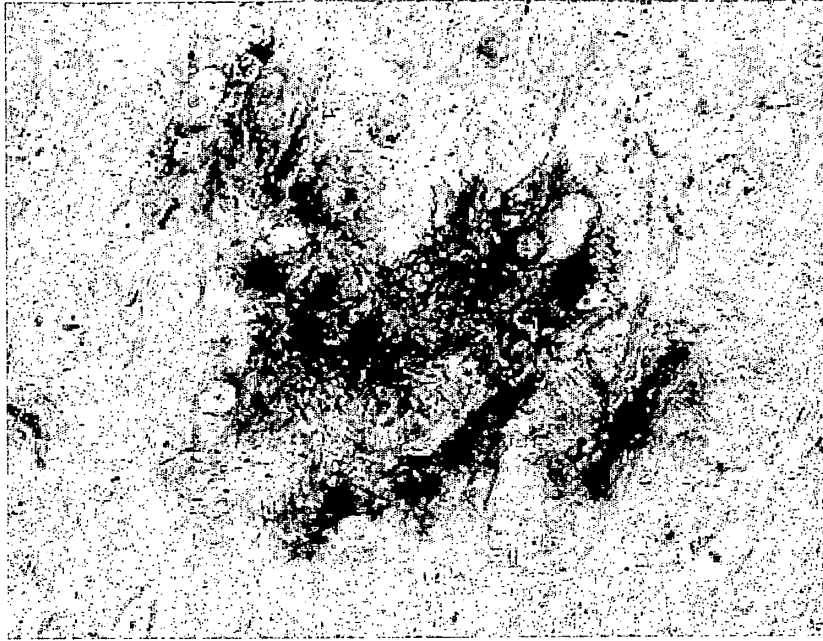
**Fig 4a**



**Fig 4b**



**Fig 4c**



**Fig 4d**

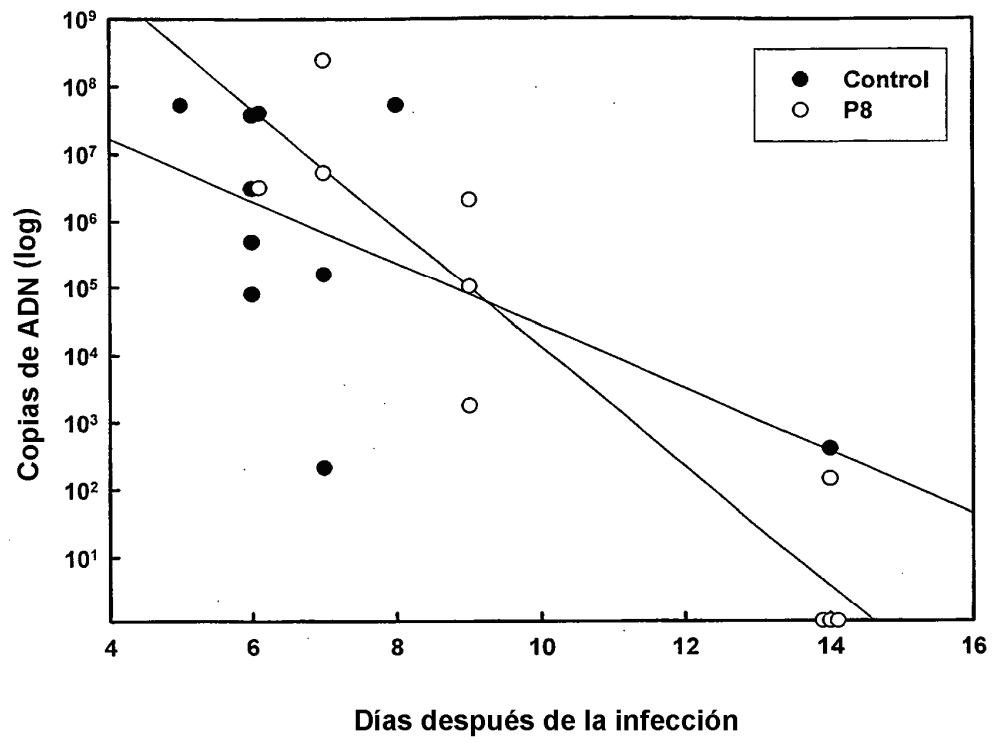


Fig. 5



**Fig. 6a**



**Fig. 6b**