

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 126**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/62** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A01K 67/033** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/IB2013/002848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14049447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13841434 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2895178**

54 Título: **Extracto de saliva completa de sanguijuela**

30 Prioridad:

**17.09.2012 US 201261701735 P**  
**21.09.2012 US 201213624847**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2019**

73 Titular/es:

**BIOPEP SOLUTIONS, INC. (100.0%)**  
**220-13071 Vanier PI**  
**Richmond BC V6V 2J1, CA**

72 Inventor/es:

**MERZOUK, AHMED;**  
**GHAWI, ABBAS, MOHAMMAD;**  
**ABDUALKADER, ABDUALRAHMAN, M. y**  
**ALAAMA, MOHAMED**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 710 126 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

Extracto de saliva completa de sanguijuela

5 **Antecedentes****Campo de la invención**

10 Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento generalmente se refieren a procedimientos de aislamiento y uso de un extracto de saliva completa de sanguijuela en el tratamiento de un sujeto.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 La historia de seres humanos que usan sanguijuelas se remonta a varios miles de años, y prácticamente todas las civilizaciones humanas describieron el uso de sanguijuelas para tratar diferentes enfermedades. Desafortunadamente, debido, al menos, a una falta de comprensión de los procesos químicos y mecanismos asociados con tales usos, el estado actual de la técnica no ha podido comercializar con éxito el uso de extractos de saliva de sanguijuela en el tratamiento de enfermedades.

20 Ha habido intentos de sacrificar sanguijuelas para extraer compuestos activos de todo el cuerpo de las sanguijuelas, de las cabezas de las sanguijuelas o de sus glándulas salivales. Se ha investigado mucho para identificar proteínas a partir de extractos de saliva de sanguijuela. Ninguno de estos esfuerzos, sin embargo, ha podido reproducir el efecto de usar una sanguijuela entera viva, con la excepción de, quizás, del aislamiento y uso de la hirudina como anticoagulante.

25 Ha habido intentos de no sacrificar sanguijuelas pero, más bien, extrayendo una solución de saliva muy diluida de una sanguijuela viva. Desafortunadamente, estos esfuerzos se han enfrentado a dos grandes problemas: (i) la extracción de saliva requiere una compresión manual de la sanguijuela y, como tal, no es fácilmente escalable; y (ii) la saliva permanece diluida, que solo se puede usar en fresco y cualquier intento de liofilización reducirá o eliminará completamente la actividad terapéutica del extracto de saliva de sanguijuela. Como tal, un tratamiento dependiente de la dosis o un tratamiento a concentraciones elevadas, no está disponible para la prueba.

30 Un experto apreciará (i) un procedimiento para aislar un extracto refinado activo de saliva de sanguijuela (LSE) que puede almacenarse con éxito durante meses o incluso años; (ii) un procedimiento para reutilizar las sanguijuelas para producir el LSE; (iii) un procedimiento para comercializar el aislamiento y la reutilización de las sanguijuelas a una cantidad escalable que sea práctico para la comercialización; (iv) un procedimiento para tratar un tumor sólido con la LSE; (v) un procedimiento para tratar un tumor líquido con el LSE; (vi) un procedimiento para tratar la diabetes con el LSE; (vii) un procedimiento para tratar un virus con el LSE; (viii) un procedimiento para tratar una enfermedad parasitaria con el LSE; (ix) un procedimiento para usar el LSE como antioxidante; y (x) un procedimiento para usar el LSE como antibacteriano.

45 Ghawi et al.: "Free radical scavenging activity of the medicinal Malaysian leech saliva extract, *Hirudinaria manillensis*", J Bioequiv Availab, 2012, S14 desvela estudios dirigidos hacia el examen de la actividad antioxidante de la secreción de la glándula salival de la sanguijuela malaya medicinal mediante el procedimiento de la actividad de captación de radicales libres DPPH.

50 Ghawi et al.: "Season variation and starvation period influence on the antithrombotic activity of leech saliva extract from the medicinal Malaysian leech, *Hirudinaria manillensis*", J Bioequiv Availab, 2012, S14 desvela la recolección de extracto de saliva de sanguijuela (LSE) después de suministrar sanguijuelas en la solución fagoestimulante a través de una membrana de parafilm. La concentración de proteína total se estimó utilizando el ensayo de Bradford. La actividad antitrombina se evaluó utilizando el ensayo amidolítico del sustrato sintético S-2238 y el ensayo del tiempo de trombina *in vitro*.

**Sumario**

55 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de la hipoglucemia diabética, la formulación comprende un extracto de saliva completa de una sanguijuela y un vehículo farmacéuticamente eficaz, en el que el extracto es un extracto de saliva completa liofilizado.

60 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de la hipoglucemia diabética como se ha descrito anteriormente, en el que la formulación se prepara mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas de:

65 alimentar un agente fagoestimulante a una sanguijuela;  
inducir una regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura inferior a 0 °C;

recoger una saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada;  
retirar componentes sólidos de la saliva completa sin refinar crear una saliva completa refinada; y,  
liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa, sin que los volúmenes superen los 2 ml cada uno.

5 Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento generalmente se refieren a procedimientos de aislamiento y uso de un extracto de sanguijuela de saliva completa en el tratamiento de un sujeto. Se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden los extractos de sanguijuela y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Las enseñanzas incluyen un procedimiento para eliminar la saliva completa de una sanguijuela. En estas realizaciones, los procedimientos pueden incluir la alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela; inducir una regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura inferior a aproximadamente 0 °C; y, recoger la saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada.

15 Las enseñanzas incluyen un procedimiento para crear un liofilizado, extracto de saliva completa de una sanguijuela que tiene una estabilidad mejorada. En estas realizaciones, el procedimiento puede incluir la alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela; inducir la regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura que varía de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 15 °C;  
20 recoger una saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada; retirar componentes sólidos de la saliva completa sin refinar crear una saliva completa refinada; y, liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa refinada, sin que los volúmenes superen aproximadamente los 2 ml cada uno.

25 En algunas realizaciones, la recolección incluye apretar la sanguijuela para aumentar la cantidad de la saliva completa sin refinar recogida. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además revitalizar la sanguijuela calentando la sanguijuela en un baño de agua que tiene una temperatura que oscila entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además la creación de un extracto de saliva completa refinada; incluyendo la creación extraer los componentes sólidos de la saliva completa sin refinar. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además la creación de un extracto de saliva completa refinada; incluyendo la creación extraer los componentes sólidos de la saliva completa sin refinar. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa refinada, sin que los volúmenes superen aproximadamente los 2 ml cada uno. Y, en algunas realizaciones, la sanguijuela es *Hirudinaria manillensis*.

35 Las enseñanzas incluyen un extracto de saliva completa de una sanguijuela liofilizado estable. En estas realizaciones, el extracto comprende un extracto de saliva completa de una sanguijuela refinada liofilizada en volúmenes que no excedan de 2 ml cada uno, el extracto refinado mediante la extracción de componentes sólidos de saliva completa sin refinar para crear saliva completa refinada; en la que, el extracto tiene una actividad estable cuando se almacena para su uso a una temperatura inferior a aproximadamente -20 °C, manteniendo el extracto al menos el 70 % de la actividad durante al menos 6 meses. Y, la sanguijuela puede ser *Hirudinaria manillensis*.

### Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 ilustra un procedimiento de alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela usando una membrana, de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 2A-2C ilustran la recolección de extracto de saliva completa sin refinar, de acuerdo con algunas realizaciones.

50 La figura 3 ilustra un espectro UV del extracto de saliva de sanguijuela refinado, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 4 ilustra una curva estándar para un ensayo de proteína de Bradford colorimétrico, de acuerdo con algunas realizaciones.

55 La figura 5 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, de acuerdo con algunas realizaciones.

60 La figura 6 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, en la que el LSE se concentró usando precipitación con acetona, de acuerdo con algunas realizaciones.

65 La figura 7 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, en el que el LSE se precipitó de la solución utilizando una precipitación con ácido tricloroacético (TCA), de acuerdo con

algunas realizaciones.

5 La figura 8 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando la electroforesis en gel SDS-PAGE sin urea de Okajima, de acuerdo con algunas realizaciones.

10 La figura 9 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando el procedimiento de electroforesis en gel Tricina SDS-PAGE, de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 10A y 10B muestran los resultados de RP-HPLC en el análisis de LSE, de acuerdo con algunas realizaciones.

15 La figura 11 muestra el aislamiento de proteínas del LSE usando RP-HPLC, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 12 muestra los pesos moleculares de las dos proteínas aisladas utilizando electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE, de acuerdo con algunas realizaciones.

20 La figura 13 ilustra la CI50 del LSE con respecto a la actividad antitrombina, de acuerdo con algunas realizaciones.

25 La figura 14 muestra la relación entre el tiempo de trombina y la concentración de proteína LSE, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 15 muestra los efectos de las condiciones de liofilización y las condiciones de almacenamiento sobre la actividad y la estabilidad del LSE, de acuerdo con algunas realizaciones.

30 La figura 16 muestra el efecto del tiempo de liofilización sobre la actividad antitrombina del LSE, de acuerdo con algunas realizaciones.

35 La figura 17 muestra el efecto de la luz y el recipiente sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE (liofilizadas y no liofilizadas) almacenadas a temperatura ambiente hasta durante 7 días, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 18 muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento, la luz y el recipiente sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE (liofilizadas y no liofilizadas) durante hasta 180 días a 4 °C, de acuerdo con algunas realizaciones.

40 La figura 19 muestra el efecto del recipiente y la liofilización sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE durante hasta 180 días a -20 °C, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 20 muestra que el LSE mostró una notable actividad antiproliferativa contra el cáncer de pulmón microcítico (línea celular SW1271), de acuerdo con algunas realizaciones.

45 Las figuras 21 y 22 muestran el efecto citotóxico de mezclas de LSE con irinotecán o carboplatino, de acuerdo con algunas realizaciones.

50 Las figuras 23 y 24 muestran el efecto de diferentes dosis de LSE e insulina sobre la glucemia en ayunas (mmol/l) en ratas normales y diabéticas a diversos intervalos de tiempo (h), de acuerdo con algunas realizaciones.

55 La figura 25 muestra que el LSE tiene un efecto profiláctico sobre el inicio de la diabetes, de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 26 y 27 comparan la actividad de secuestro de radicales libres del LSE con ácido L-ascórbico (vitamina C), de acuerdo con algunas realizaciones.

### 60 Descripción detallada

65 Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento generalmente se refieren a procedimientos de aislamiento y uso de un extracto de saliva completa de sanguijuela en el tratamiento de un sujeto. Se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden los extractos de sanguijuela y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Debe apreciarse que el término "extracto" se puede usar para hacer referencia a una forma en polvo de los

compuestos de interés, una forma líquida de los compuestos de interés o uno cualquiera o cualquier combinación de los compuestos de interés en forma de polvo o líquido. Un experto apreciará que el término "extracto" se puede usar para hacer referencia a los compuestos de interés antes, durante, o después de su extracción de la sanguijuela. En algunas realizaciones, los compuestos de interés pueden sintetizarse químicamente utilizando procedimientos estándar conocidos por un experto, de tal manera que puedan sintetizarse y usarse solos, o en cualquier combinación, por los expertos en la materia sin el uso de los procedimientos de extracción enseñados en el presente documento. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden denominarse extractos, composiciones, compuestos, agentes, agentes activos, agentes bioactivos, suplementos, fármacos y similares. En algunas realizaciones, los términos "LSE", "extracto", "composición de LSE", "composición", "compuesto", "agente", "sustancia activa", "agente activo", "agente bioactivo", "suplemento", y "fármaco" se puede usar indistintamente y, debería apreciarse que, una "formulación" puede comprender uno cualquiera o cualquier combinación de estos. Análogamente, en algunas realizaciones, la composición también puede estar en forma líquida o seca, donde una forma seca puede ser una forma de polvo en algunas realizaciones y una forma líquida puede incluir un componente acuoso o no acuoso. Por otra parte, los términos "actividad" o "bioactividad" pueden hacer referencia a la función del compuesto *in vitro*, en un ensayo, por ejemplo, o *in vivo* cuando se administra a un sujeto.

Debe apreciarse que los extractos de sanguijuela pueden aislarse o purificarse. En algunas realizaciones, los términos "aislado" y "purificado" se pueden usar indistintamente. En algunas realizaciones, el término "aislado" se puede usar para hacer referencia al extracto que se extrae del ambiente químico natural de la sanguijuela, de tal manera que el extracto no está en la forma en que existe en la naturaleza. Debe apreciarse que el término "purificado" se puede usar para hacer referencia a un extracto de una sanguijuela *Hirudinaria manillensis*, en algunas realizaciones, de tal manera que los compuestos de interés se aislen del resto de la sanguijuela en una forma que se pueda administrar a un sujeto, tal como una forma soluble o una forma que puede ir en solución acuosa. Como tal, un experto apreciará que los compuestos de interés a veces pueden ir acompañados de otros componentes que se llevan junto con el extracto. Por ejemplo, dichos otros componentes pueden incluir una o cualquier combinación de proteínas que se encuentran activas en la sanguijuela. En algunas realizaciones, el término "purificado" se puede usar para hacer referencia a un extracto que consiste en, o que consiste esencialmente en, uno cualquiera o cualquier combinación de los compuestos de interés. En algunas realizaciones, el extracto incluye una solución fagoestimulante o un componente de la solución fagoestimulante. En algunas realizaciones, un extracto "consiste esencialmente en" uno cualquiera o cualquier combinación de los compuestos de interés, en el que la presencia de cualquier otro componente de la sanguijuela o del procedimiento de extracción tenga un efecto insignificante sobre la actividad de los compuestos de interés. La expresión "efecto despreciable" se puede usar para significar que la actividad no aumenta ni disminuye más de aproximadamente el 10 % en comparación con uno cualquiera o cualquier combinación de los compuestos de interés, respectivamente, sin los otros componentes. En algunas realizaciones, el término "efecto despreciable" puede usarse para hacer referencia a un cambio inferior al 10 %, inferior al 9 %, inferior al 8 %, inferior al 7 %, inferior al 6 %, inferior al 5 %, inferior al 4 % e inferior al 3 %. En algunas realizaciones, la expresión "efecto despreciable" se puede usar para hacer referencia a un cambio que oscila entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 10 %, en incrementos del 1 %. Por ejemplo, la actividad de los compuestos de interés se puede mejorar en una cantidad que oscila entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 300 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 200 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 250 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 300 %, de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 275 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 225 %, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 100 %, o cualquier intervalo en ellos en incrementos del 1 %.

Se proporcionan procedimientos para extraer saliva completa de una sanguijuela. En estas realizaciones, los procedimientos pueden incluir la alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela; inducir una regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura inferior a aproximadamente 0 °C; y, recoger la saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada.

Un experto apreciará que cualquier sanguijuela que tenga una saliva terapéutica puede usarse en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia hirudinidae, a la subfamilia hirudinariae, o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en hirudo; hirudinaria; aliolimantis; limantis; asiaticobdella; goddardobdella; limnodbella; macrobdella; oxytychus; philobdella. En algunas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en hirudo medicinalis; hirudo troctina; hirudo nipponia; hirudo orientalis; hirudo verbania; hirudinaria manillensis; hirudinaria javanica; aliolimantis africana; aliolimantis michaelsoni; aliolimantis oligodonta; aliolimantis buntonesis; limantis nilotica; limantis of. nilotica; limantis paluda; asiaticobdella fenestrata; goddardobdella elegans; limnodbella mexicana; macrobdella decora; macrobdella diploteria; macrobdella diletra; oxytychus brasiliensis; oxytychus striatus; philobdella floridana; philobdella gracilis.

En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de haemadipsidae, o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en chtonobdella; haemadipsa; idiobdella; malagdbdella; nesophilaemon. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en chtonobdella bilineata; chtonobdella whitmani; haemadipsa interrupta; haemadipsa sylvestris; haemadipsa

sumatrana; idiobdella seychellensis; malagdbdella fallax; nesophilaemon skottsbergi.

5 En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de xerobdellidae o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en diestecostoma; mesobdella; xerobdella. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en diestecostoma magna; diestecostoma mexicana; diestecostoma trujillensis; mesobdella gemmata; xerobdella lecomtei.

10 En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de haemopidae o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en haemopis; whitmania. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en haemopis grandis; haemopis kingi; haemopis sanguisuga; haemopis terrestris; whitmania laevis.

15 En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de semiscolecidae o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en patagoniobdella; semiscolex. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en patagoniobdella fraternal; patagoniobdella variabilis; semiscolex intermedius; semiscolex lamothai; semiscolex similis.

20 En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de americobdellidae o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en americobdella. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en americobdella valdiviana.

25 En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia de cyclicobdellidae o puede pertenecer a un género seleccionado del grupo que consiste en cyclicobdella. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en cyclicobdella coccinea.

En algunas realizaciones, la sanguijuela puede pertenecer a la familia erpobdellidae. En estas realizaciones, la sanguijuela se puede seleccionar de una especie seleccionada del grupo que consiste en erpobdella mentezuma.

30 Las sanguijuelas se pueden clasificar de acuerdo con la Tabla 1, en algunas realizaciones.

Tabla 1.

Familia	Subfamilia	Género	Especie
Hirudinidae	Hirudinariinae	Hirudo	Hirudo medicinalis
			Hirudo nipponia
			Hirudo orientalis
			Hirudo troctina
			Hirudo verbana
		Aliolimantis	Aliolimantis Africana
			Aliomantis michaelsoni
			Aliomantis oligodonta
			Aliomantis buntonesis
		Asiaticobdella	Asiaticobdella fenestrata
		Goddardobdella	Goddardobdella elegans
		Hirudinaria	Hirudinaria javanica
			Hirudinaria manillensis
		Limantis	Limantis nilotica
			Limantis cf. nilotica
			Limantis paluda
		Limnodbella	Limnodbella mexicana
		Macrobdella	Macrobdella decora

ES 2 710 126 T3

			Macrobdella diploteria
			Macrobdella diletra
		Oxyptychus	Oxyptychus brasiliensis
			Oxyptychus striatus
		Philobdella	Philobdella floridana
			Philobdella gracilis
Haemadipsidae	No aplicable	Chtonobdella	Chtonobdella bilineata
			Chtonobdella whitmani
		Haemadipsa	Haemadipsa interrupta
			Haemadipsa sylvestris
			Haemadipsa sumatrana
		Idiobdella	Idiobdella seychellensis
		Malagadbdella	Malagadbdella fallax
		Nesophilaemon	Nesophilaemon skottsbergi
Xerobdellidae	No aplicable	Diestecostoma	Diestecostoma magna
			Diestecostoma Mexicana
			Diestecostoma trujillensis
		Mesobdella	Mesobdella gemmata
		Xerobdella	Xerobdella lecomtei
Haemopidae	No aplicable	Haemopsis	haemopsis grandis
			Haemopsis kingi
			Haemopsis sanguisuga
			Haemopsis terrestris
		Whitmania	Whitmania laevis
Semiscolecidae	No aplicable	Patagoniobdella	Patagoniobdella fraternal
			Patagoniobdella variabilis
		Semiscolex	Semiscolex intermedius
			Semiscolex lamothei
			Semiscolex similis
Americobdellidae	No aplicable	Americobdella	Americobdella valdiviana
Cylicobdellidae	No aplicable	Cylicobdella	Cylicobdella coccinea
Erpobdellidae	No aplicable	Erpobdella	Erpobdella montezuma

5 Se puede usar cualquier agente fagoestimulante conocido por un experto. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante puede incluir una proteína, un polipéptido, un oligopéptido o un aminoácido. En algunas realizaciones, el aminoácido es un L-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, alanina, leucina, ácido aspártico, serina, treonina, isoleucina, histidina, lisina, triptófano, glicina, fenilalanina, tirosina, valina, ácido glutámico, asparagina, glutamina, cisteína, metionina y prolina. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante es arginina. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante es glicina. En algunas realizaciones, el agente

fagoestimulante es prolina. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante es un azúcar. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante es un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, trehalosa, robosa y galactosa. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante es aceite de maíz. En algunas realizaciones, el agente fagoestimulante comprende una cualquiera o cualquier combinación de aminoácidos y/o azúcares mostrados en el presente documento. Se puede utilizar cualquier disolvente adecuado para portar el fagoestimulante, polar o no polar, siempre que el disolvente no afecte sustancialmente a la actividad o la estabilidad del extracto de saliva de sanguijuela.

La temperatura de la sanguijuela que induce la regurgitación puede oscilar entre aproximadamente -5° C y aproximadamente 15 °C, de aproximadamente -4 °C a aproximadamente 14 °C, de aproximadamente -3 °C a aproximadamente 13 °C, de aproximadamente -2 °C a aproximadamente 12 °C, de aproximadamente -1 °C a aproximadamente 11 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente -2 °C a aproximadamente 2 °C, de aproximadamente -3 °C a aproximadamente 3 °C, de aproximadamente -4 °C a aproximadamente 4 °C, de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 5 °C, o cualquier temperatura o intervalo de temperaturas en los mismos en incrementos de 1 °C. La temperatura se puede establecer utilizando cualquier procedimiento conocido por un experto. En algunas realizaciones, la temperatura se establece a 0 °C o aproximadamente 0 °C utilizando un baño de agua helada. En algunas realizaciones, se puede usar un baño de agua salada para bajar la temperatura por debajo de 0 °C, y en algunas realizaciones, se pueden utilizar otros líquidos para obtener otras temperaturas. Se puede usar cualquier procedimiento de enfriamiento que conozca a un experto para inducir el vómito a las sanguijuelas. La velocidad de congelación puede ser de 0,1 a 2 °C por minuto y, en algunas realizaciones, de 1 °C a 1,5 °C por minuto. El tiempo a la temperatura fría puede variar y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 25 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 35 minutos, de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 12 minutos, o cualquier tiempo en los intervalos en incrementos de 1 minuto.

Los procedimientos de creación de un extracto de saliva completa liofilizada de una sanguijuela que tiene una estabilidad mejorada se proporcionan en las enseñanzas del presente documento. En estas realizaciones, el procedimiento puede incluir la alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela; inducir la regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura que varía de aproximadamente -5 °C a aproximadamente 15 °C; recoger una saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada; retirar componentes sólidos de la saliva completa sin refinar crear una saliva completa refinada; y, liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa refinada, sin que los volúmenes superen aproximadamente los 2 ml cada uno.

En algunas realizaciones, la recolección incluye apretar la sanguijuela para aumentar la cantidad de la saliva completa sin refinar recogida. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además revitalizar la sanguijuela calentando la sanguijuela en un baño de agua que tiene una temperatura que oscila entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 40 °C. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además la creación de un extracto de saliva completa refinada; incluyendo la creación extraer los componentes sólidos de la saliva completa sin refinar. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa refinada, sin que los volúmenes superen aproximadamente los 2 ml cada uno. Y, en algunas realizaciones, la sanguijuela es *Hirudinaria manillensis*.

Las enseñanzas del presente documento proporcionan extractos de saliva completa liofilizada estable de una sanguijuela. En estas realizaciones, el extracto comprende un extracto de saliva completa de una sanguijuela refinada liofilizada en volúmenes que no excedan de 2 ml cada uno, el extracto refinado mediante la extracción de componentes sólidos de saliva completa sin refinar para crear saliva completa refinada; en la que, el extracto tiene una actividad estable cuando se almacena para su uso a una temperatura inferior a aproximadamente -20 °C, manteniendo el extracto al menos el 70 % de la actividad durante al menos 6 meses. Y, la sanguijuela puede ser *Hirudinaria manillensis*.

En el presente documento se ha demostrado que la temperatura de almacenamiento tiene un gran efecto sobre la estabilidad de los extractos. En algunas realizaciones, por ejemplo, la saliva completa refinada se puede almacenar a una temperatura que varía entre 0 °C y -80 °C, de -20 °C a -270 °C, de -20 °C a -196 °C, de -20 °C a -80 °C, de -80 °C a -196 °C, o cualquier temperatura, o cualquier intervalo entre ellos en incrementos de 1 °C.

Un experto apreciará que los extractos pueden variar en estabilidad, pero que las enseñanzas proporcionadas en el presente documento muestran extractos con mayor estabilidad en comparación con el estado actual de la técnica. Un experto apreciará que las composiciones o formulaciones deben permanecer estables, o al menos sustancialmente estables, hasta que se use o active, y esto puede relacionarse con una vida útil, o un tiempo entre la creación y administración de la composición, o alguna combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la composición es estable, o sustancialmente estable, cuando sea utilizable según lo previsto dentro de un período de tiempo razonable, un tiempo que sea considerado razonable por un experto en las aplicaciones que se enseñan en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición debe ser utilizable dentro de un tiempo razonable

desde la fabricación hasta la administración de la composición y, en algunas realizaciones, la composición debe tener una vida útil comercial razonable, una vida útil que un experto considera razonable. Una vida útil razonable puede ser de al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 18 meses, al menos 2 años, al menos 3 años, o cualquier tiempo intermedio en incrementos de aproximadamente 1 mes, en algunas realizaciones.

5 En algunas realizaciones, una composición o formulación puede considerarse "estable" si pierde menos del 10 %, menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % de su actividad original. En algunas realizaciones, la composición o formulación puede considerarse "sustancialmente estable" si  
10 pierde más de aproximadamente el 10 % de su actividad original, siempre que la composición pueda realizar su uso previsto con un grado razonable de eficacia. En algunas realizaciones, la composición puede considerarse sustancialmente estable si pierde actividad en una cantidad superior a aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, o incluso aproximadamente el 70 %. La pérdida de actividad se puede medir comparando la actividad en el momento del envasado con la actividad en el momento de la administración, y esto  
15 puede incluir una vida útil razonable. En algunas realizaciones, la composición es estable o sustancialmente estable, si sigue siendo útil por un período que varía desde 3 meses a 3 años, 6 meses a 2 años, 1 año, o cualquier período de tiempo en el mismo en incrementos de aproximadamente 1 mes.

20 Métodos de tratamiento

Los términos "tratar" "que trata" y "tratamiento" se pueden usar indistintamente en algunas realizaciones y se refieren a la administración o aplicación de las composiciones y formulaciones que se enseñan en el presente documento, incluyendo dicha administración como un suplemento saludable o nutricional, y todas las administraciones dirigidas a la prevención, la inhibición, la mejora de los síntomas, o incluso la cura de una afección que se enseña en el presente documento. Los términos "enfermedad", "afección", "trastorno" y "dolencia" se puede  
25 usar indistintamente en algunas realizaciones.

El término "sujeto" y "paciente" se pueden usar indistintamente en algunas realizaciones y se refieren a un animal tal como un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, no primates tales como, por ejemplo, una vaca, cerdo, un caballo, un gato, un perro, rata y ratón; y primates tales como, por ejemplo, un mono o un ser humano. Como tal, los términos "sujeto" y "paciente" también se pueden aplicar a aplicaciones biológicas no humanas, incluyendo, pero sin limitación, veterinaria, animales de compañía, ganado comercial, y similares.

35 Tratamiento del cáncer (No forma parte de la invención)

El LSE enseñado en el presente documento se puede usar en el tratamiento de cáncer. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen el tratamiento de un tumor sólido y, en algunas realizaciones, los procedimientos incluyen el tratamiento de un tumor líquido. Un experto apreciará que los cánceres que pueden tratarse usando los procedimientos enseñados en el presente documento pueden incluir cualquier tejido hiperproliferativo. En algunas  
40 realizaciones, por ejemplo, cualquier cáncer enumerado en la Tabla 2 puede tratarse usando los procedimientos que se enseñan en el presente documento.

Tabla 2.

Línea celular	Tipo de cáncer	Subtipo de cáncer
CCRF-CEM	Leucemia	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
HL-60 (TB)	Leucemia	Leucemia mielógena aguda (LMA)
K-562	Leucemia	Leucemia mielógena crónica (LMC)
MOLT-4	Leucemia	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
RPMI-8226	Mieloma múltiple	Plasmocitoma, mieloma
SR	Leucemia	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
A549/ATCC	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
EKVX	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
HOP-62	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
HOP-92	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
NCI-H226	de pulmón no microcítico	Carcinoma escamoso
NCI-H23	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
NCI-H322M	de pulmón no microcítico	Carcinoma bronquioloalveolar
NCI-H460	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
NCI-H522	de pulmón no microcítico	Adenocarcinoma
COLO 205	Colon	Adenocarcinoma

## ES 2 710 126 T3

HCC-2998	Colon	Adenocarcinoma
HCT-116	Colon	Carcinoma
HCT-15	Colon	Adenocarcinoma
HT-29	Colon	Adenocarcinoma
KM12	Colon	Colorrectal
SW-620	Colon	Adenocarcinoma
SN-268	CNS	Glioblastoma
SF-295	CNS	Glioblastoma
SF-539	CNS	Gliosarcoma
SNB-19	CNS	Glioblastoma
SNB-75	CNS	Glioblastoma
LOX IMVI	Cáncer de piel	Melanoma
MALME-3M	Cáncer de piel	Melanoma
M14	Cáncer de piel	Melanoma, amelanótico
SK-MEL-2	Cáncer de piel	Melanoma, maligno
SK-MEL-28	Cáncer de piel	Melanoma, maligno
SK-MEL-5	Cáncer de piel	Melanoma, maligno
UACC-257	Cáncer de piel	Melanoma
UACC-62	Cáncer de piel	Melanoma
IGROVI	Ovárico	Adenocarcinoma
OVCAR-3	Ovárico	Adenocarcinoma
OVCAR-4	Ovárico	Carcinoma
OVCAR-5	Ovárico	Carcinoma
OVCAR-8	Ovárico	Carcinoma
SK-OV-3	Ovárico	Adenocarcinoma
786-0	Renal	Carcinoma
A498	Renal	Carcinoma
ACHN	Renal	Adenocarcinoma
CAKI-1	Renal	Carcinoma
RXF-393	Renal	Carcinoma
SN12C	Renal	Carcinoma
TK-10	Renal	Carcinoma
UO-31	Renal	Carcinoma
PC-3	Próstata	Adenocarcinoma
DU-145	Próstata	Carcinoma
MCF7	Mama	Adenocarcinoma
NCI/ADR-RES	Mama	Adenocarcinoma
MDA-MB-231/ATCC	Mama	Adenocarcinoma
HS 578T	Mama	Carcinosarcoma
MDA-MB-435	Mama	Carcinoma, ductal
MDA-MB-468	Mama	Adenocarcinoma
BT-549	Mama	Carcinoma
T-47D	Mama	Carcinoma, ductal

### Tratamiento de la diabetes

- 5 El LSE enseñado en el presente documento se puede usar en el tratamiento de la diabetes. Ejemplos de diabetes incluyen diabetes de tipo 1, de tipo 2 y gestacional. Como tal, un experto apreciará que el LSE enseñado en el presente documento se puede usar para tratar y prevenir desequilibrios metabólicos, diabetes mellitus, un estado prediabético, síndrome metabólico y otros trastornos relacionados, tales como diabetes autoinmune latente en adultos (denominada diabetes de tipo 1.5). Como tal, las afecciones médicas secundarias relacionadas con la diabetes también pueden tratarse utilizando el LSE que se enseña en el presente documento, indirecta o

directamente, incluyendo cardiopatías, ictus, tensión arterial alta, complicaciones oculares (retinopatía, cataratas), enfermedad renal (nefropatía), enfermedad del sistema nervioso (neuropatía), vasculopatía periférica, enfermedad dental, gastroparesia, disfunción sexual, y complicaciones durante el embarazo.

- 5 El término "diabético" en una rata puede hacer referencia a una glucemia aleatoria > 225 mg/dl o un nivel de glucemia en ayunas de > 110 mg/dl. El término "diabético" en un ser humano puede hacer referencia a una concentración aleatoria de glucosa en sangre o en plasma de  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) o un nivel de glucosa en plasma en ayunas  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l) o un nivel de glucosa poscarga de 2 horas  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa. El término "no diabético" en una rata generalmente significa un nivel de glucosa en plasma en ayunas de  $\leq 80$  mg/dl o un nivel de glucosa en plasma aleatorio <200 mg/dl. El término "no diabético" en un ser humano puede hacer referencia a un nivel de glucosa en plasma en ayunas de <100 mg/dl (5,6 mmol/dl) o una glucosa poscarga de 2 horas <140 mg/dl (<7,8 mmol/dl) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa. El término "prediabético" en una rata puede hacer referencia a un nivel de glucosa en plasma en ayunas de aproximadamente 80 a aproximadamente 110 mg/dl. El término "prediabético" en un ser humano puede hacer referencia a un nivel de glucosa en plasma en ayunas de 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) o un nivel de glucosa poscarga de 2 horas de 140-199 mg/l (7,8- 11,1 mmol/l) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa. Los términos "aleatorio" y "sin ayuno" se pueden usar en referencia a cualquier hora del día o de la noche sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última comida, y el término "ayuno" generalmente significa que no hay ingesta calórica durante al menos 12 horas. La expresión "desequilibrio metabólico" puede hacer referencia a cualquier Afección asociada con un aumento del nivel de glucosa en plasma. Un desequilibrio metabólico, por ejemplo, comprende diabetes mellitus, diabetes gestacional, defectos genéticos de la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, infecciones inducidas por fármacos o productos químicos, otros síndromes genéticos asociados a la diabetes, un estado prediabético y síndrome metabólico. La expresión "síndrome metabólico" puede hacer referencia a un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona, incluyendo, pero sin limitación, obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión, resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (nivel alto del inhibidor 1 del activador del plasminógeno o fibrinógeno) y estado proinflamatorio (proteína C reactiva elevada). En algunas realizaciones, el síndrome metabólico puede ser la presencia de tres o más de los siguientes componentes: circunferencia de la cintura elevada (varones:  $\geq 40$  pulgadas, mujeres  $\geq 35$  pulgadas), triglicéridos en ayunas  $\geq 150$  mg/dl, HDL reducido (varones: <40 mg/dl, mujeres <50 mg/dl), presión arterial  $\geq 130/85$  mm Hg, y glucosa en ayunas  $\geq 100$  mg/dl.

Las definiciones anteriores para la diabetes siguen los patrones de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la Asociación Americana del Corazón (AHA) y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre. Se pueden usar otras definiciones y pueden variar según la región o el país, y pueden depender del grupo o institución (por ejemplo, ADA, Organización Mundial de la Salud (OMS), Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK/NIH), Centro para el Control de Enfermedades (CDC), etc.) proporcionando otras pautas. Los médicos también pueden utilizar la experiencia clínica, el historial médico pasado de un paciente, y similares al decidir sobre un diagnóstico y tratamiento. Como tal, un experto apreciará que los intervalos y medidas particulares son meramente relativos en lugar de críticos para establecer un diagnóstico o planificar un tratamiento. En algunas realizaciones, por ejemplo, cualquiera de las medidas anteriores puede variar en aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, el 40 %, el 50 %, o cualquier intervalo o cantidad en el mismo en incrementos de 0,1 %.

#### 45 Tratamiento de una enfermedad viral (no parte de la invención)

El LSE enseñado en el presente documento se puede usar en el tratamiento de varios tipos diferentes de enfermedades virales. En algunas realizaciones, el virus puede ser una especie de Adenoviridae, Herpesviridae, Papillomaviridae, Polyomaviridae, Poxviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae, Astroviridae, Caliciviridae, Picornaviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae o Reoviridae.

En algunas realizaciones, las especies de virus tratados pueden seleccionarse del grupo que consiste en Adenovirus, herpes simple, tipo 1, herpes simple, tipo 2, virus Varicela zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus humano, herpesvirus humano, tipo 8, virus del papiloma humano, virus BK, virus JC, viruela, virus de la hepatitis B, bocavirus humano, parvovirus B19, astrovirus humano, virus de Norwalk, virus coxsackie, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, virus del síndrome respiratorio agudo severo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la rubeola, virus de la hepatitis E y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En algunas realizaciones, la afección viral puede ser una afección identificada regionalmente seleccionada de las afecciones virales en la Tabla 3:

65

Tabla 3.

Australia	Hong Kong	Malasia	Reino Unido	Estados Unidos
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)		Síndrome de inmunodeficiencia adquirida		
infecciones por arbovirus: Bosque de Barmah, fiebre del dengue, encefalitis japonesa, virus de Kunjin, virus de la encefalitis del valle del Murray, virus del río Ross	infecciones por arbovirus: virus del Nilo occidental			infecciones por arbovirus: virus del serogrupo de California, virus de la encefalitis equina del este, virus de Powassan, virus de la encefalitis de St. Louis, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis equina occidental
	viruela aviar			varicela, solo morbilidad y muertes
	fiebre Chikungunya			
	dengue	dengue		dengue
	infección por enterovirus 71			
	Hantavirus			Hantavirus
	infección			
Hepatitis		Hepatitis	Hepatitis	
Hepatitis A	Hepatitis A			Hepatitis A
Hepatitis B	Hepatitis B			Hepatitis B
Hepatitis C	Hepatitis C			Hepatitis C
Hepatitis D	Hepatitis D			
Hepatitis E	Hepatitis E			
Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)		Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)		Infección por VIH
Gripe	Gripe A (H2), Gripe A (H5), Gripe A (H7) o Gripe A (H9)			Mortalidad pediátrica asociada con gripe e infección nueva por gripe A
	encefalitis japonesa			
Lyssavirus				
Sarampión	Sarampión	Sarampión	Sarampión	Sarampión
Paperas	Paperas		Paperas	Paperas
Poliomielitis	Poliomielitis aguda	Poliomielitis	Poliomielitis	poliomielitis, paralítica y no paralítica
	Rabia	Rabia	Rabia	Rabia

Rubéola	Rubéola y síndrome de rubéola congénita		Rubéola	Rubéola
	Síndrome respiratorio agudo severo		Síndrome respiratorio agudo severo	Síndrome respiratorio agudo severo
Viruela	Viruela		Viruela	Viruela
Fiebre amarilla	Fiebre amarilla	Fiebre amarilla	Fiebre amarilla	Fiebre amarilla
	Fiebre hemorrágica viral	Fiebre hemorrágica viral, incluyendo la fiebre de Lassa, virus de Marburg,	Fiebre hemorrágica viral	Fiebre hemorrágica viral, incluyendo Arenavirus (nuevo mundo), virus del ébola y fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
				fiebre, Fiebre hemorrágica del dengue, virus del Ébola, virus Lassa, virus de Marburg

En algunas realizaciones, las composiciones enseñadas en el presente documento pueden administrarse con un segundo agente, tal como abacavir, aciclovir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, ampligen, arbidol, atazanavir, atripla, acoeprevir, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de la entrada, famciclovir, fomivirsén, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidor de la fusión, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidor de la integrasa, interferón de tipo III, interferón de tipo II, interferón de tipo I, interferón, lamivudina, lopinavir, lovirodina, maraviroc, moroxidina, metisazona, nelfinavir, nevirapina, nexavir, oseltamivir, peginterferón alfa-2a, penciclovir, peramivir, pleconarilo, podofilotoxina, inhibidor de la proteasa. Raltegravir, inhibidor de la transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, piramidina, saquinavir, estavudina, potenciador sinérgico (antirretroviral), aceite del árbol del té, telaprevir, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir y zidovudina.

Tratamiento de una enfermedad parasitaria (no parte de la invención)

El LSE enseñado en el presente documento se puede usar en el tratamiento de varios tipos diferentes de enfermedades parasitarias. En algunas realizaciones, la enfermedad parasitaria tratada puede clasificarse como una afección causada por protozoos (que causan una infección por protozoos), helmintos (helminCIAS) y ectoparásitos.

En algunas realizaciones, la enfermedad parasitaria puede seleccionarse del grupo que consiste en queratitismo por Acanthamoeba, amebiasis, ascariasis, babesiosis, balantidiasis, bailisascariasis, enfermedad de Chagas, clonorquiasis, cochlomyia, criptosporidiosis, difilobotriasis, dracunculiasis (causada por el gusano de Guinea), equinococosis, elefantiasis, enterobiasis, fascioliasis, fasciolopsiasis, filariasis, giardiasis, gnatostomiasis, himenolepiasis, isosporiasis, fiebre de Katayama, leishmaniasis, enfermedad de Lyme, Malaria, metagonimiasis, miasis, oncocercosis, pediculosis, sarna, esquistosomiasis, enfermedad del sueño, strongiloidiasis, teniasis (causa de cisticercosis), toxocariasis, toxoplasmosis, triquinosis y tricuriasis.

En algunas realizaciones, las composiciones enseñadas en el presente documento pueden administrarse con un segundo agente, tal como tiabendazol, pamoato de pirantel, mebendazol, praziquantel, niclosamida, bitionol, oxamniquina, metrifonato, ivermectina, albendazol, benznidazol, nifurtimox y nitroimidazol.

Tratamiento de una enfermedad bacteriana (no parte de la invención)

El LSE enseñado en el presente documento puede usarse en el tratamiento de varios tipos diferentes de enfermedades bacterianas. En algunas realizaciones, la enfermedad bacteriana puede incluir, por ejemplo, tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis*; neumonía por estreptococos y pseudomonas; una enfermedad transmitida por los alimentos de Shigella, Campylobacter o Salmonella; y, ya sea tétanos, fiebre tifoidea, difteria, sífilis o lepra. En algunas realizaciones, la enfermedad bacteriana puede ser una vaginosis bacteriana; meningitis bacteriana; neumonía bacteriana; infección del tracto urinario, incluyendo infecciones por E. coli; gastroenteritis bacteriana, incluyendo también E. coli; e infecciones bacterianas de la piel, incluyendo impétigo por S. aureus y S. pyogenes, erisipelas por Streptococcus y celulitis que puede incluir tejido conjuntivo. En algunas realizaciones, la enfermedad bacteriana puede seleccionarse del grupo que consiste en las enfermedades de la Tabla 4.

ES 2 710 126 T3

Tabla 4.

Australia	Hong Kong	Malasia	Reino Unido	Estados Unidos
				Anaplasmosis
	Antrax		Antrax	Antrax
Botulismo	Botulismo		Botulismo	Botulismo
Brucelosis			Brucelosis	Brucelosis
Campilobacteriosis				
				Chancroide
Clamidia				Chlamydia trachomatis
Cólera	Cólera	Cólera	Cólera	Cólera
Difteria	Difteria	Difteria	Difteria	Difteria
Donovanosis				
				Erliquiosis
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga y verocitotoxina (STEC/VTEC)	Infección por <i>Escherichia coli</i> O157: H7			<i>Escherichia coli</i> O157: H7 o <i>Escherichia coli</i> productora de la toxina Shiga
		Encefalitis	Encefalitis	
Infección gonocócica		Infección gonocócica/gonorrea		Gonorrea
Síndrome urémico hemolítico (SUH)			Síndrome urémico hemolítico (SUH)	Síndrome urémico hemolítico, post-diarrea
<i>Haemophilus influenzae</i> de serotipo b (Hib)	infección por <i>Haemophilus influenzae</i> de tipo b (invasiva)			<i>Haemophilus influenzae</i> , enfermedad invasiva
Legionelosis	Enfermedad del legionario		Enfermedad del legionario	Legionelosis
Lepra	Lepra	Lepra	Lepra	Enfermedad de Hansen (lepra)
Leptospirosis	Leptospirosis			
Listeriosis	Listeriosis			Listeriosis
				Enfermedad de Lyme
Enfermedad meningocócica	Infección meningocócica (invasiva)		Septicemia meningocócica/meningitis aguda	Enfermedad meningocócica aguda

ES 2 710 126 T3

	MSRA: infección por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina asociada a la comunidad			
	Fiebre paratifoidea	Fiebre paratifoidea	Fiebre paratifoidea	
Pertussis (tos ferina)	Pertussis (tos ferina)	Pertussis (tos ferina)	Pertussis (tos ferina)	
Peste	Peste (bubónica, septicémica, neumónica y faríngea)	Peste	Peste	Peste (bubónica, septicémica, neumónica y faríngea)
Psitacosis	Psitacosis			Psitacosis
Fiebre Q	Fiebre Q			Fiebre Q, aguda y crónica
	Fiebre recurrente	Fiebre recurrente		
		Rickettsiosis		Rickettsiosis, fiebre manchada
	escarlatina		escarlatina	
Salmonelosis				Salmonelosis
Shigelosis	Disentería bacilar			Shigelosis
			Enfermedad estreptocócica del grupo A	Enfermedad estreptocócica del grupo A
Enfermedad neumocócica				<i>Streptococcus pneumoniae</i> , enfermedad invasiva
	Infección por <i>Streptococcus suis</i>			
Sífilis		Sífilis		Sífilis
Tétanos	Tétanos	Tétanos	Tétanos	Tétanos
				Síndrome del shock tóxico (estreptocócico y otro que no sea estreptocócico)
Tuberculosis	Tuberculosis	Tuberculosis	Tuberculosis	tuberculosis, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Tularemia				Tularemia
Fiebre tifoidea	Fiebre tifoidea	Fiebre tifoidea	Fiebre tifoidea	Fiebre tifoidea
	Tifus y otras enfermedades rickettsiales	Tifus	Tifus	
				Staph aureus de resistencia intermedia a vancomicina (VISA), Staph aureus resistente a vancomicina (VRSA)

Administración de una terapia antioxidante

5 El LSE enseñado en el presente documento se puede usar en terapia antioxidante. Un experto apreciará que se cree ampliamente que las especies reactivas de oxígeno (ROS) causan o agravan varias patologías humanas, tales como artritis, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, cardiopatía, accidente cerebrovascular y muchas otras dolencias. Se pueden usar antioxidantes para contrarrestar los efectos dañinos de las ROS y, por lo tanto, prevenir o tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. En algunas realizaciones, el LES enseñado en el presente documento puede usarse como secuestrante de radicales libres, o para prevenir la oxidación en el cuerpo. En algunas realizaciones, el LES enseñado en el presente documento se puede usar para tratar trastornos inflamatorios, trastornos endocrinos, enfermedad cardiovascular, envejecimiento, así como servir como agente neuroprotector. En algunas realizaciones, el LES enseñado en el presente documento puede usarse para tratar la aterosclerosis. Y, en algunas realizaciones, el LES se puede administrar en combinación con un medicamento para el colesterol como un bloqueador de la absorción, un inhibidor de síntesis y un fármaco a base de niacina. En algunas realizaciones, se puede utilizar una alternativa no farmacológica, tal como beta-glucano de avena o cebada completas; psilio del salvado de trigo; o, fitoesteroles y/o fitostanoles.

20 En algunas realizaciones, el bloqueador de la absorción puede ser colestiramina o ZETIA. En algunas realizaciones, el inhibidor de la síntesis puede ser una estatina, incluyendo, pero sin limitación, MEVACOR, PRAVACHOL, ZOCOR, LIPITOR, LESCOL, CRESTOR o LIVALO. En algunas realizaciones, el inhibidor de la síntesis puede ser LOVASTATINA, PRAVASTATINA o SIMVASTATINA. En algunas realizaciones, la medicación a base de niacina puede ser NIASPAN o NIACOR. En algunas realizaciones, la medicación para el colesterol puede ser una combinación de productos como MEVACOR con NIASPAN o ZETIA con ZOCOR.

25 Métodos de administración

Cualquier vehículo de administración conocido por un experto es adecuado para la administración de los compuestos, composiciones y formulaciones enseñadas en el presente documento. Un "vehículo" puede hacer referencia a, por ejemplo, un diluyente, excipiente o portador con el que se administra un compuesto a un sujeto.

30 Los términos "administración" o "administrar" pueden usarse para hacer referencia a un procedimiento para incorporar una composición en o sobre las células o tejidos de un sujeto, ya sea *in vivo* o *ex vivo* para probar la actividad de un sistema, así como para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar un síntoma de una enfermedad o afección. En un ejemplo, se puede administrar un compuesto a un sujeto *in vivo* usando cualquier medio de administración que se enseña en el presente documento. En otro ejemplo, un compuesto puede administrarse *ex vivo* combinando el compuesto con tejido celular del sujeto para fines que incluyen, pero sin limitación, Ensayos para determinar la utilidad y eficacia de una composición. Y, por supuesto, las composiciones se pueden usar *in vitro* para probar su estabilidad, actividad, toxicidad, eficacia y similares. Cuando el compuesto se incorpora en el sujeto en combinación con uno o agentes activos, los términos "administración" o "administrar" pueden incluir la incorporación secuencial o concurrente del compuesto con los otros agentes tales como, por ejemplo, cualquier agente descrito anteriormente. Una composición puede formularse, en algunas realizaciones, de modo que sea compatible únicamente con su vía de administración prevista.

45 Cualquier forma de dosificación conocida por un experto puede usarse para administraciones que incluyen, por ejemplo, administraciones parenterales y no parenterales. En algunas realizaciones, la composición está en una forma de dosificación para administración tópica. Y, en algunas realizaciones, la composición está en una forma de dosificación para administración por vía oral. En algunas realizaciones, la forma de dosificación puede ser una cápsula o un fluido inyectable. La composición también se puede utilizar como suplemento dietético. La expresión "unidad de dosificación" puede hacer referencia a cantidades pequeñas predeterminadas de un compuesto que pueden administrarse como dosis unitarias a un sujeto. Se puede seleccionar una cantidad predeterminada de

compuesto activo para producir un efecto terapéutico deseado y se puede administrar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad predeterminada en cada dosis unitaria puede depender de factores que incluyen, pero sin limitación, (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe lograrse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de crear y administrar tales unidades de dosificación.

5 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" es un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la composición. Un vehículo es farmacéuticamente aceptable después de la aprobación por parte de una agencia reguladora estatal o federal, o de su inclusión en la Convención de la Farmacopea de Estados Unidos u  
10 otras fuentes generalmente reconocidas para su uso en sujetos. Los vehículos farmacéuticos incluyen cualquiera y todos los disolventes fisiológicamente compatibles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, líquidos estériles, tal como agua, aceites y lípidos, tales como, por ejemplo, fosfolípidos y glicolípidos. Estos líquidos estériles incluyen, pero sin limitación, los derivados del petróleo, de origen animal,  
15 vegetal o sintético tal como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, azúcares, polímeros inertes, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. En  
20 algunas realizaciones, la composición también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores del pH, o una combinación de los mismos. Las formulaciones orales, por ejemplo, pueden incluir vehículos estándar tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Véase Martin, E.W. Remington's Pharmaceutical Sciences.

25 Como se describe en el presente documento, las composiciones pueden tomar la forma de lociones, cremas, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones pueden administrarse a un sujeto de cualquier manera no parenteral conocida por un experto, mientras que, por el contrario, una administración  
30 parenteral implica perforar la piel o una membrana mucosa. Dependiendo del tejido objetivo, la administración puede ser tópica, oral, ocular, ótica, nasal, urogenital, rectal, dérmica, vaginal o de otro tipo a una membrana mucosa. La administración oral, por ejemplo, puede incluir la administración en el tracto digestivo, bucal y sublingual, y se puede usar un vehículo sólido o líquido. Un experto apreciará que el programa terapéutico seleccionado, los agentes administrados, el estado del sujeto y los efectos deseados pueden afectar a la pauta posológica y al programa  
35 utilizado.

Las composiciones o formulaciones pueden estar contenidas en formas que incluyen comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, bebidas, suspensiones, jarabes, obleas, chicles, geles, hidrogeles y similares. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos líquidos y similares también pueden contener aglutinantes, excipientes, agente  
40 disgregante, lubricantes, emolientes, agentes quelantes, tampones, modificadores de la tonicidad, tensioactivos, agentes edulcorantes y aromatizantes. Algunos ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina. Algunos ejemplos de excipientes incluyen almidón o maltodextrina. Algunos ejemplos de agentes disgregantes incluyen ácido algínico, almidón de maíz y similares. Algunos ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio o estearato de potasio. Un ejemplo de un agente quelante es EDTA. Algunos ejemplos de  
45 tampones son acetatos, citratos o fosfatos. Algunos ejemplos de modificadores de la tonicidad incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Algunos ejemplos de tensioactivos para la micelización o el aumento de la permeación celular incluyen jabón de coco, detergentes aniónicos, catiónicos o etoxilados. Un ejemplo de un deslizante es el dióxido de silicio coloidal. Algunos ejemplos de agentes edulcorantes incluyen sacarosa, sacarina y similares. Algunos ejemplos de agentes aromatizantes incluyen menta, camomila, saborizante de naranja y similares.

50 En el tracto digestivo, por ejemplo, un sólido puede incluir una píldora, una cápsula, comprimido o tecnología de liberación en el tiempo en algunas realizaciones; y, un líquido puede incluir una solución, gel suave, suspensión, emulsión, jarabe, elixir, tintura o un hidrogel. La administración del tracto digestivo puede incluir la administración oral o rectal utilizando cualquier procedimiento conocido por un experto. Para la administración bucal, sublingual y  
55 sublabial, un sólido puede incluir un comprimido de disgregación oral, una película, una piruleta, una pastilla o goma de mascar; y, un líquido puede incluir un colutorio bucal, una pasta de dientes, un ungüento, o un pulverizador oral.

Un experto entiende que la cantidad de agentes administrados puede variar de acuerdo con factores tales como, por ejemplo, el tipo de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, así como el procedimiento de administración.  
60 Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para optimizar una respuesta terapéutica. En algunas realizaciones, se puede administrar un único bolo; se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo; la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente; o, cualquier combinación de los mismos, según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica y los factores conocidos por un experto en la técnica. Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar, así como si la  
65 administración es profiláctica, de tal manera que la afección en realidad no ha comenzado o producido síntomas. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio

profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y cualquier intervalo de dosis establecido en el presente documento es solo un ejemplo y no limita los intervalos de dosis que se pueden seleccionar.

5 Se puede usar una "cantidad eficaz" de un compuesto para describir una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz. Una cantidad eficaz también puede ser una cantidad que mejore los síntomas de una enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede hacer referencia a una cantidad que es eficaz a las dosis y períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado terapéutico deseado y también puede hacer referencia a una cantidad de compuesto activo, profármaco o agente farmacéutico que provoca cualquier respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, o tema que buscado un investigador, veterinario, médico u otro médico

10 clínico que pueda ser parte de un plan de tratamiento que lleve a un efecto deseado. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz debe administrarse en una cantidad suficiente para dar como resultado una mejoría de uno o más síntomas de un trastorno, prevención del avance de un trastorno o regresión de un trastorno. En algunas realizaciones, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede hacer referencia a la cantidad de un agente que proporciona una respuesta medible de al menos el 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % de una acción deseada de la composición.

20 En los casos de prevención o inhibición de la aparición de una enfermedad o trastorno, o cuando una administración se considere profiláctica, se puede usar una cantidad profilácticamente eficaz de una composición o formulación enseñada en el presente documento. Una "cantidad profilácticamente eficaz" puede hacer referencia a una cantidad que es eficaz a las dosis y períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado profiláctico deseado, tales como prevenir la aparición de una quemadura de sol, una inflamación, alergia, náuseas, diarrea, infección, y similares.

25 Normalmente, una dosis profiláctica se usa en un sujeto antes de la aparición de una enfermedad, o en una etapa temprana de la aparición de una enfermedad, para prevenir o inhibir la aparición de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que, mayor que o igual que una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 En algunas realizaciones, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una composición puede variar en concentración desde aproximadamente 0,01 nM hasta aproximadamente 0,10 M; desde aproximadamente 0,01 nM hasta aproximadamente 0,5 M; desde aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 150 nM; desde aproximadamente 0,1 nM hasta aproximadamente 500 µM; desde aproximadamente 0,1 nM hasta aproximadamente 1000 nM, 0,001 µM a aproximadamente 0,10 M; desde aproximadamente 0,001 µM hasta aproximadamente 0,5 M;

35 desde aproximadamente 0,01 µM hasta aproximadamente 150 µM; desde aproximadamente 0,01 µM hasta aproximadamente 500 µM; desde aproximadamente 0,01 µM hasta aproximadamente 1000 nM, o cualquier intervalo en los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse en una cantidad que oscila de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg; desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg; desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg; desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg; desde aproximadamente 0,2 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg; desde aproximadamente 0,4 mg/kg hasta aproximadamente 120 mg/kg; de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, o cualquier intervalo en los mismos, en el que a

45 menudo se supone que un sujeto humano tiene un promedio de alrededor de 70 kg.

En algunas realizaciones, las composiciones o formulaciones pueden administrarse junto con al menos otro agente terapéutico para la afección que se está tratando. Las cantidades de los agentes se pueden reducir, incluso sustancialmente, de tal manera que la cantidad del agente o agentes deseados se reduzca en la medida en que se observe una respuesta significativa del sujeto. Una "respuesta significativa" puede incluir, aunque sin limitación, una reducción o eliminación de un síntoma, un aumento visible en un efecto terapéutico deseable, una respuesta más rápida al tratamiento, una respuesta más selectiva al tratamiento o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico puede administrarse, por ejemplo, en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 250 µg/kg, desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 µg/kg desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 50 µg/kg, o cualquier intervalo en ellos. Pueden administrarse terapias de combinación, por ejemplo, durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, cualquier combinación de los

60 mismos, o cualquier cantidad de tiempo considerada deseable por un experto. Los agentes pueden administrarse concomitantemente, secuencialmente, o cíclicamente a un sujeto. La terapia de ciclado implica administrar un primer agente durante un período de tiempo predeterminado, administrar un segundo agente o terapia durante un segundo período de tiempo predeterminado, y repetir este ciclo para cualquier propósito deseado tal como, por ejemplo, para mejorar la eficacia del tratamiento. Los agentes también pueden administrarse concurrentemente. El término "concurrentemente" no se limita a la administración de agentes exactamente al mismo tiempo, sino que más bien significa que los agentes pueden administrarse en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que los agentes

65

pueden trabajar juntos para proporcionar un beneficio adicional. Cada agente puede administrarse por separado o en conjunto en cualquier forma apropiada utilizando cualquier medio apropiado de administrar el agente o agentes. Un experto puede seleccionar fácilmente la frecuencia, la duración, y quizás el ciclo de cada administración concurrente.

5 Cada uno de los agentes descritos en el presente documento puede administrarse a un sujeto en terapia de combinación. En algunas realizaciones, los agentes pueden administrarse en puntos en el tiempo que varían en aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas o 1 semana en el tiempo. En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes es un agente inmunomodulador.

10 En otras realizaciones, los agentes pueden incluir antiproliferativos, antineoplásicos, antimetabólicos, antiinflamatorios, antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes, antifibrinas, antitrombinas, antibióticos, antialérgicos, antioxidantes, y cualquier profármaco, cofármaco, metabolitos, análogos, homólogos, congéneres, derivados, sales y combinaciones de los mismos.

15 Sin pretender limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las enseñanzas presentadas en el presente documento. Debe apreciarse que hay varias variaciones contempladas dentro de la experiencia en la técnica, y que los ejemplos no pretenden interpretarse como que proporcionan limitaciones a las reivindicaciones.

20 Ejemplo 1. Un procedimiento para extraer toda la saliva de una sanguijuela.

Este ejemplo muestra que las sanguijuelas pueden ser alimentadas con un agente fagoestimulante, inducidas a regurgitar el agente para recolectar toda la saliva como una saliva completa sin refinar en la regurgitación, y luego revitalizar para reprocesar para recolectar más saliva. La regurgitación puede inducirse, por ejemplo, reduciendo significativamente la temperatura corporal de las sanguijuelas a un estado de parálisis o casi parálisis para inducir un vómito. A continuación, se pueden calentar las sanguijuelas para reanimar, o revitalizar, las sanguijuelas para el almacenamiento y/o el reprocesamiento para recoger más saliva.

25

Las sanguijuelas fueron recolectadas por un proveedor local del lago natural, Cheneh, localizado en Terengganu, Malasia. Las sanguijuelas se mantuvieron a temperatura ambiente durante un ciclo de 12 horas:12 horas de luz y oscuridad en recipientes de plástico bien aireados llenos de agua corriente sin clorar, que se cambió regularmente cada 2-3 días.

30

La figura 1 ilustra un procedimiento de alimentación de un agente fagoestimulante a una sanguijuela usando una membrana, de acuerdo con algunas realizaciones. Como se muestra en la figura 1, las sanguijuelas 105 se alimentaron con una solución del agente fagoestimulante 110 que comprendía arginina 0,001 M en solución salina normal. Las sanguijuelas 105 se alimentaron utilizando el dispositivo de alimentación que tiene la membrana 120 de parafilm estirada a través del embudo de vidrio 100 lleno con la solución fagoestimulante 110 calentada a una temperatura de 37 °C. Las sanguijuelas muertas de hambre 105 se unen a la membrana 120, se alimentan succionando la solución fagoestimulante 110 a través de la membrana 120 hasta que se hayan saciado y se caen espontáneamente.

35

40

Las figuras 2A-2C ilustran la recolección de extracto de saliva completa sin refinar, de acuerdo con algunas realizaciones. Las sanguijuelas engordadas 105 que se alimentaron con la solución fagoestimulante 110 se transfirieron a recipientes de polipropileno 205 como se muestra en la figura 2A, se sumergieron en un baño de hielo 210 durante aproximadamente 15 a aproximadamente 20 minutos como se muestra en la figura 2B y se indujo el vómito de una saliva sin refinar 215 como se muestra en la figura 2C.

45

La baja temperatura indujo una regurgitación de la solución fagoestimulante 110, así como una especie de parálisis o casi parálisis de la sanguijuela 105. Las sanguijuelas paralizadas 105 se exprimieron para extraer la saliva completa sin refinar 215 adicional sin dañar a las sanguijuelas 105. Una valiosa consideración del proceso es que se encontró que las sanguijuelas 105 recuperan fácilmente su actividad al sumergirlas en un baño de agua tibia a 37 °C durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos, después de lo cual se revitalizan y se pueden almacenar para su reutilización.

50

55

La saliva completa sin refinar fue un fluido incoloro que se agrupó y centrifugó a 4 °C y 9000 rpm durante 15 minutos para eliminar los sólidos y refinar toda la saliva. Para refinar aún más la saliva completa, el sobrenadante se filtró utilizando un papel de filtro de 0,45 µm. El extracto refinado de saliva de sanguijuela se dividió en alícuotas en tubos de vidrio de fondo plano de color ámbar en cantidades que no excedían los 2 ml para un ciclo de liofilización de 24 horas. Antes de la liofilización, los extractos refinados se congelaron a -80 °C durante 30 minutos. Después de las liofilizaciones, los extractos refinados se mantuvieron a -80 °C en los tubos de vidrio de fondo plano color ámbar cerrados.

60

65 Ejemplo 2. Caracterización química del extracto de saliva de sanguijuela.

Este ejemplo proporciona una caracterización química del extracto de saliva refinado de sanguijuela (LSE).

Se usaron los procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica para producir espectros UV del LSE. Los espectros se obtuvieron escaneando y midiendo la  $\lambda_{max}$ , mostrando un espectro de proteínas óptimo con valores de  $2 \lambda_{max}$  a 199 nm y 207 nm.

5 La figura 3 ilustra un espectro UV del extracto de saliva de sanguijuela refinado, de acuerdo con algunas realizaciones. Los espectros del extracto de saliva de las sanguijuelas se determinaron utilizando un espectrofotómetro UV en las siguientes etapas: a) la lámpara UV se calentó durante aproximadamente 15 minutos, b) el instrumento se ajustó al modo de espectro, c) las longitudes de onda se ajustaron a  $\lambda_{min} = 190$  nm, y una  $\lambda_{max} = 800$  nm, d) se usó un blanco (la solución fagoestimulante) para calibrar a cero.

15 Se usaron procedimientos estándar conocidos por los expertos para producir un ensayo cuantitativo de proteo colorimétrico, en el que se usó un kit de reactivos con seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar. Bradford, M.M. Anal. Biochem. 72: 248-254(1976). Se usó una solución fagoestimulante con arginina 0,001 M en NaCl 0,15 M como blanco, y se preparó una serie de concentraciones conocidas de BSA (10  $\mu\text{g/ml}$  a 250  $\mu\text{g/ml}$ ) en la solución fagoestimulante. Se prepararon tres diluciones de LSE en la solución fagoestimulante y volúmenes de 100  $\mu\text{l}$  de BSA, se introdujeron alícuotas de LSE y blanco en tubos EPPENDROF con un volumen igual de reactivo de Bradford y se mezclaron bien. La absorbancia a 595 nm ( $A_{595}$ ) se midió utilizando un lector de microplacas. Los valores  $A_{595}$  del blanco se restaron de los valores de BSA y LSE, y se preparó una curva estándar de las concentraciones conocidas de BSA contra sus valores de  $A_{595}$  para determinar la concentración de proteína total del extracto de saliva de sanguijuela del gráfico.

25 La figura 4 ilustra una curva estándar para un ensayo de proteína de Bradford colorimétrico, de acuerdo con algunas realizaciones. La curva estándar fue  $Y = 0,001X - 0,011$ , en la que: X = concentración de BSA ( $\mu\text{g/ml}$ ) e Y = absorbancia a 595 nm,  $R^2 = 0,993$ . Se descubrió que la concentración de proteína total del LSE incoloro recolectado de las sanguijuelas sin alimento durante 16 semanas fue de  $119,691 \pm 8,690$   $\mu\text{g/ml}$ , mientras que las sanguijuelas sin alimento durante 22 semanas produjeron LSE con una concentración de proteína total de  $62,682 \pm 2,459$   $\mu\text{g/ml}$ . La Tabla 2 describe los resultados de la concentración de proteína total de LSE recolectada de las sanguijuelas sin alimento durante 16 y 22 semanas como la media de los triplicados., expresado como la media  $\pm$  desviación estándar SD (n = 3).

Tabla 2.

		Absorbancia $A_{595}$			
Conc. de BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )		Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	$A_{595}$
12,5		0,007	0,006	<b>0,000</b>	0,004 $\pm$ 0,004
25		0,017	0,024	0,021	0,021 $\pm$ 0,003
50		0,074	0,067	0,069	0,070 $\pm$ 0,003
100		0,120	0,123	0,127	0,124 $\pm$ 0,003
125		0,170	0,172	0,173	0,171 $\pm$ 0,002
150		0,194	0,205	0,204	0,201 $\pm$ 0,006
<b>Arg/NaCl en blanco (<math>\mu\text{l}</math>)</b>					
100		0,287	0,285	0,277	0,283 $\pm$ 0,005
<b>Volumen de LSE (<math>\mu\text{l}</math>)</b>					
<b>Período de inanición 16 semanas</b>	80	0,080	0,087	0,099	0,088 $\pm$ 0,010
	90	0,095	0,112	0,098	0,102 $\pm$ 0,009
	100	0,098	0,099	0,099	0,099 $\pm$ 0,000
<b>Período de inanición 22 semanas</b>	80	0,037	0,045	0,040	0,041 $\pm$ 0,004
	90	0,044	0,042	0,043	0,043 $\pm$ 0,001
	100	0,053	0,056	0,048	0,052 $\pm$ 0,004
<b>Concentración de proteína total en LSE (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>					
<b>Período de inanición 16 semanas (noviembre)</b>		124,333	125,074	109,667	<b>119,691 <math>\pm</math> 8,690</b>
<b>Periodo de inanición 22 semanas (diciembre)</b>		64,750	59,963	63,333	<b>62,682<math>\pm</math>2,459</b>

Se usaron procedimientos de electroforesis en gel estándar conocidos por los expertos en la materia para producir distribuciones de peso molecular del LSE. La separación de las moléculas dentro de un gel está determinada por el tamaño relativo de los poros formados dentro del gel. El tamaño de los poros de un gel está determinado por dos factores, la cantidad total de acrilamida presente (designada como % T) y la cantidad de reticulante (% C). A medida que aumenta la cantidad total de acrilamida, el tamaño de los poros disminuye.

Electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE de LSE

El procedimiento de electroforesis en gel SDS-PAGE de Laemmli se usa habitualmente y es conocido por los expertos en la técnica. El procedimiento es ampliamente utilizado para separar proteínas basadas en la movilidad electroforética.

SOLUCIONES MADRE Y TAMPONES: Se prepararon soluciones madre y tampones para la electroforesis en gel de Laemmli SDS-PAGE (gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) de la siguiente manera: En la preparación de soluciones madre, se preparó una acrilamida/bisacrilamida (30 % de T, 2,67 % de C) (AB 30), calculando el % de C y el % de T según (Hjerten, 1962):

$$\%T = \frac{g \text{ de acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}}{100 \text{ ml de solución}};$$

y

$$\%C = \left( \frac{g \text{ de acrilamida}}{g \text{ de acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}} \right) \times 100;$$

de modo que se disolvieron 29,2 g de acrilamida, 29,2 g y 0,8 g de bisacrilamida en agua destilada y el volumen se llevó a 100 ml en un matraz volumétrico. La solución se filtró utilizando papel de filtro WHATMAN de grado 1 al vacío. La solución se mantuvo en un recipiente oscuro a 4 °C. Se preparó un SDS al 10 % (p/v) disolviendo 10 g de SDS en 90 ml de agua con agitación suave y el volumen se llevó a 100 ml con agua destilada en un matraz volumétrico. La solución se mantuvo a temperatura ambiente.

En la preparación del 10 % de APS (persulfato de amonio; preparado y usado fresco a diario) solución madre como iniciador de la polimerización, se disolvieron 100 mg de APS en 1 ml de agua destilada y se usó inmediatamente.

En la preparación de un tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 se disolvieron 18,15 g de base Tris (tris (hidroximetil)aminometano) en 80 ml de agua destilada y el pH se ajustó a 8,8 con HCl 6N. El volumen total se llevó a 100 ml con agua destilada y se almacenó a 4 °C.

En la preparación de un tampón tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, se disolvieron 6 g de base Tris en 60 ml de agua destilada. El pH se ajustó a 6,8 con HCl 6N. El volumen total se llevó a 100 ml con agua destilada y se almacenó a 4 °C.

En la preparación de un tampón reductor de SDS (tampón de muestra), se mezclaron 1,25 ml de tris-HCl 0,5 M con 2,5 ml de glicerol, 2 ml de SDS al 10 % y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,5 % (p/v). El volumen total se llevó a 10 ml con agua destilada en un matraz volumétrico. El tampón se almacenó a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de β-mercaptoetanol a 950 µl de tampón de muestra en el momento de su uso.

En la preparación de un tampón de electrodo 10x (de carrera), pH 8,3, se disolvieron 30,3 g de la base Tris, 144,0 g de glicina y 10,0 g de SDS en agua destilada con agitación suave y el último volumen se llevó a 1 litro con agua destilada. El tampón se mantuvo a temperatura ambiente. Cuando se pasó el gel, se tomaron 100 ml de este tampón y el volumen se llevó a 1 litro.

PREPARACIÓN DEL GEL: El procedimiento de electroforesis en gel se llevó a cabo utilizando un instrumento BIO RAD de mini proteína tetra celular. El gel (6X8 cm X1 mm) se preparó usando placas de vidrio, un vertedor de gel, un gel de resolución y un gel de apilamiento de la siguiente manera:

En la preparación de un gel de resolución al 15 %, se mezclaron 5 ml de la solución madre de acrilamida/bisacrilamida, 2,4 ml de agua destilada, 2,5 ml del tampón tris a pH 8,8 y 0,1 ml de la solución madre de SDS y se desgasificaron durante aproximadamente 15 minutos, y se añadieron 50 µl de la solución madre de APS y 5 µl de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina).

En la preparación del gel de apilamiento, se mezclaron 1,7 ml de la solución madre de acrilamida/bisacrilamida, 5,7 ml de agua destilada, 2,5 ml del tampón tris a pH 6,8 y 0,1 ml de SDS y se desgasificaron durante aproximadamente 15 minutos. Se añadieron 50 µl de la solución madre de APS y 10 µl de TEMED.

El gel de resolución se vertió en las placas de gel utilizando una jeringa de plástico y 1,5 cm sobre el gel de separación se dejó vacío para el gel de apilamiento. Se colocaron 100 µl de isopropanol sobre la superficie del gel

para suavizar y evitar la deshidratación, y se dejó que el gel polimerizara durante aproximadamente 45 minutos. El isopropanol se eliminó después de la polimerización del gel de resolución y el gel de apilamiento se añadió después de lavar la superficie del gel de resolución con un tampón de gel de separación. Se añadió un peine para formar células y el gel de apilamiento se dejó polimerizar durante aproximadamente 30 minutos y el peine se retiró del gel.

5 Las células se lavaron con el tampón de electroforesis, la placa de gel se colocó en el tanque de electroforesis y el tanque se llenó con el tampón de electroforesis.

PREPARACIÓN DE LSE: el LSE se liofilizó como se describe en el presente documento y el polvo de LSE se disolvió en un tampón de muestra y se calentó a 95 °C durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió SDS al tampón de muestra para ayudar en la desnaturalización de las proteínas, enmascarar la superficie de proteínas con cargas negativas para equilibrar la relación carga/tamaño para todas las proteínas, de tal manera que la separación se basará solo en el tamaño de la proteína. El calentamiento de las muestras de proteínas antes de cargarlas ayuda a desnaturalizar completamente todas las proteínas, aumenta la solubilidad y la reducción de la reducción de disulfuro sin degradación de las proteínas (Voerman, 1998).

CARRERA DEL GEL: la muestra se aplicó a las células utilizando una micropipeta y se aplicó un marcador peptídico a una célula. La tapa de la electroforesis se colocó con cuidado, los electrodos se conectaron a una fuente de energía y la electroforesis se pasó durante 35 minutos a 200V.

El colorante azul brillante de Coomassie se utilizó para visualizar proteínas y determinar los pesos moleculares de los geles de poliacrilamida. Se preparó una solución colorante madre de 1 l disolviendo 1 g de azul brillante Coomassie R-250 en 450 ml de metanol y 100 ml de ácido acético glacial. Se añadió agua destilada para aumentar el volumen total a 1 l. La solución de colorante madre se filtró utilizando papel de filtro WHATMAN de grado 1 y se mantuvo a temperatura ambiente. Se preparó una solución decolorante de 1 l mezclando 100 ml de metanol con 100 ml de ácido acético glacial y añadiendo agua destilada para aumentar el volumen total a 1 l.

Tras la electroforesis, El gel se transfirió a un recipiente de plástico que contenía solución de colorante madre y se dejó allí durante 30 minutos. La solución de tinción se descartó y el gel se incubó en la solución decolorante durante 30 minutos con agitación. Esta etapa se repitió de tres a cuatro veces con una solución decolorante nueva y el gel se incubó en una solución decolorante durante la noche. Se tomó una imagen y se documentó el gel utilizando un generador de imágenes de gel BIO RAD.

#### Electroforesis en gel de SDS-PAGE sin urea de LSE para péptidos

Esta parte del análisis de electroforesis en gel se realizó de acuerdo con el procedimiento de Okajima, que se considera que da mejores resultados para los péptidos. (Okajima, et al., 1993). El procedimiento generalmente utiliza las mismas soluciones madre y tampones como el procedimiento Laemmli SDS-PAGE, siendo una excepción el tampón de gel de separación.

TAMPÓN DE GEL DE SEPARACIÓN/APILACIÓN: Se preparó un tampón tris-HCl 3M, pH 8,45 disolviendo 36,3 g de la base Tris en agua destilada, el pH se ajustó a 8,45 con HCl 6N y el volumen total se llevó a 100 ml con agua destilada.

PREPARACIÓN DEL GEL: En la preparación del gel de resolución (separación) al 19,2 %, se mezclaron 10 ml de la solución madre de AB 30 con 3,75 ml del tampón de separación, 0,15 ml de SDS y 1 ml de agua. La mezcla se desgasificó durante 15 minutos utilizando el sonicador y se añadieron 50 µl de la solución madre de APS y 10 µl de la solución madre TEMED. La mezcla se vertió en las placas de gel utilizando una jeringa de plástico y se dejó polimerizar durante 45 minutos. En la preparación del gel de apilamiento al 4%, se mezclaron 1,3 ml de la solución madre de AB 30 con 2,5 ml de tampón de gel de apilamiento, 0,1 ml de SDS y 6 ml de agua. La mezcla se desgasificó durante 15 minutos antes de añadir 50 µl de APS y 10 µl de TEMED. El tampón de muestra utilizado para el procedimiento de Laemmli anterior se usó para este procedimiento.

PREPARACIÓN DE LSE Y CARRERA DEL GEL: el LSE se liofilizó como se describe en el presente documento y el polvo de LSE se disolvió en un tampón de muestra y se calentó a 95 °C durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió SDS al tampón de muestra para ayudar en la desnaturalización de las proteínas, enmascarar la superficie de proteínas con cargas negativas para equilibrar la relación carga/tamaño para todas las proteínas, de tal manera que la separación se basará solo en el tamaño de la proteína. Se aplicaron 20 µl de la muestra para el gel. El gel se pasó durante 100 minutos a 100V. Se usó tinción con azul de Coomassie para teñir el gel.

#### Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE del LSE para péptidos en el intervalo de 1-100 kDa

Esta parte del análisis de electroforesis en gel se realizó de acuerdo con un procedimiento de tricina SDS-PAGE usado habitualmente para separar proteínas en el intervalo de peso molecular más pequeño de 1-100 kDa y preferentemente se usó para resolver proteínas menores de 30 kDa. El uso de tricina en lugar de glicina como agente de reducción proporciona una mejor separación de los péptidos que tienen tales pesos moleculares bajos.

SOLUCIONES MADRE Y TAMPONES: La solución madre AB 30, 10 % (p/v) de SDS, 10 % (p/v) de APS y el tampón de muestra (tampón reductor de SDS) es la misma que se utilizó en el procedimiento de Laemmli SDS-PAGE descrito en el presente documento; y, se utiliza el tampón de gel de separación (apilamiento) del procedimiento Okajima. De otro modo, este procedimiento generalmente utiliza las mismas soluciones madre y

5 tampones que el procedimiento Laemmli SDS-PAGE.  
Se preparó un tampón de cátodo 10x disolviendo 12,1 g de base Tris, tricina y 1 g de SDS en agua destilada. El volumen total se llevó a 100 ml y la solución se mantuvo a temperatura ambiente. El tampón se diluyó 10 veces antes de su uso. Además, se preparó un tampón de ánodo 10x disolviendo 12,1 g de base Tris en agua y ajustando el pH a 8,9 con HCl 6 N. El volumen total se llevó a 100 ml y la solución se mantuvo a temperatura ambiente. El

10 tampón se diluyó 10 veces antes de su uso.  
Se preparó una solución de fijación de glutaraldehído al 5 % añadiendo 10 ml de glutaraldehído al 50 % a agua destilada y llevando el volumen total a 100 ml. La solución se filtró utilizando papel de filtro WHATMAN de grado 1 bajo una campana de extracción y se usó fresco.

15 PREPARACIÓN DEL GEL: Los geles se prepararon de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. (Schägger & von Jagow, 1987). En la preparación del gel de resolución (separación) al 16 %, se mezclaron 5 ml de AB 30 con 5 ml del tampón de separación, 1,5 ml de glicerol y 1,5 ml de agua destilada. La mezcla se desgasificó durante 15 minutos y se añadieron 50 µl de la solución madre de APS y 5 µl de la solución madre de TEMED. El gel

20 se vertió en la placa de gel sin demora. La superficie del gel se cubrió con 100 µl de isopropanol y se dejó polimerizar durante 45 minutos. En la preparación del gel de apilamiento al 4%, Se mezcló 1 ml de AB 30 con 3 ml de tampón de gel y 11 ml de agua destilada. La mezcla se desgasificó durante 15 minutos y se añadieron 100 µl de la solución madre de APS y 10 µl de la solución madre de TEMED. Sin demora, el gel se vertió sobre la placa de gel. El peine se colocó y el gel se dejó polimerizar durante 30 minutos.  
25 PREPARACIÓN DE LSE Y CARRERA DEL GEL: el LSE se liofilizó como se describe en el presente documento y el polvo de LSE se disolvió en un tampón de muestra y se calentó a 95 °C durante 5 minutos en un baño de agua. Se añadió SDS al tampón de muestra para ayudar en la desnaturalización de las proteínas, enmascarar la superficie de

#### Los resultados de la electroforesis en gel

40 La figura 5 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, Hirudinaria manillensis, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, de acuerdo con algunas realizaciones. El carril 1 es el marcador peptídico y los carriles 1-4 representan el número de la semana en que se extrajo la saliva por duplicado; en la que, los carriles 1-T son la semana 2, los carriles 2-2 son la semana 3, los carriles 3-3' son la semana 4, y los carriles 4-4' son la semana 0. Tal como se puede observar, el procedimiento

45 funciona bien, como los resultados mostraron buena resolución con bandas altamente aisladas.  
La figura 6 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, Hirudinaria manillensis, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, en la que el LSE se concentró usando precipitación con acetona, de acuerdo con algunas realizaciones. Este procedimiento mostró una

50 alta resolución y bandas claras, con una distribución de peso molecular de proteínas que va desde 10812 Da hasta 88210 Da. Los carriles 1 y 2 son LSE, y el carril 4 es el marcador peptídico.  
La figura 7 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, Hirudinaria manillensis, utilizando la electroforesis en gel Laemmli SDS-PAGE al 15 %, en el que el LSE se

55 precipitó de la solución utilizando una precipitación con ácido tricloroacético (TCA), de acuerdo con algunas realizaciones. Los resultados muestran bandas claras con una alta resolución, aunque la precipitación con acetona dio mejor resolución para las bandas de proteínas. Los carriles 2 y 3 son LSE, y el carril 1 es el marcador peptídico.  
La figura 8 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de Malasia, Hirudinaria manillensis, utilizando la electroforesis en gel SDS-PAGE sin urea de Okajima, de acuerdo con algunas realizaciones. Se mostró que los péptidos y proteínas de peso molecular más pequeño tenían buena resolución con bandas claras. El intervalo de peso molecular es más amplio en comparación con el procedimiento clásico Laemmli SDS-PAGE, dado que se detectaron proteínas tan pequeñas como de 6,5 kDa. Los carriles 2 y 3 son LSE, y el carril 1 es el marcador peptídico.

60  
65 La figura 9 muestra los resultados de la distribución del peso molecular de la proteína de LSE de una sanguijuela de

Malasia, *Hirudinaria manillensis*, utilizando el procedimiento de electroforesis en gel Tricina SDS-PAGE, de acuerdo con algunas realizaciones. Los resultados mostraron más de 20 proteínas y péptidos con un peso molecular de 4276 Da a 44386 Da. Los carriles 2 y 3 son LSE, y el carril 1 es el marcador peptídico.

- 5 Los datos se compararon bien con los valores bibliográficos conocidos de especies de *Hirudinaria*, tal como bufridina (7 kDa), manilasa (58 kDa), hirulina P18 (6,8 kDa) y gelina (8,2 kDa). Los datos sugieren que otras proteínas pueden ser compartidas con otras especies, tal como Calin (65 kDa), lisozima de Destabilase (12 kDa), lefaxina (30 kDa), Hirudina (7 kDa) y hialuronidasa (28,5 kDa).

#### 10 HPLC de fase inversa de LSE

Este ejemplo muestra cómo usar la cromatografía analítica (Tampón (A), 0,1 % de TFA en agua y tampón (B), 0,1 % de TFA en acetonitrilo) del extracto de saliva en bruto para identificar más de 30 picos con alta resolución en el LSE. En particular, puede usarse HPLC de fase inversa (RP-HPLC).

- 15 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS: Una columna Agilent C<sub>18</sub> RP, tampón (A) TFA al 0,1 % en agua, tampón (B) TFA al 0,1 % en acetonitrilo, un caudal de 1 ml/min y un gradiente del 5 %: 5 % (B) durante 5 minutos, 5-90 % (B) durante 40 minutos de longitud de onda 214 nm, Una saliva liofilizada, B saliva fresca. El extracto de saliva liofilizado después de la reconstitución en destilado se aplicó a la columna C<sub>18</sub> RP a un caudal de 1 ml/min y un gradiente de 5 % de (B) durante 5 minutos, seguido de 5 %-90 % (B) durante 40 minutos y luego 90 % de (B) en 5 minutos y finalmente 90 % -5 % de (B) durante 5 minutos. El detector de UV se ajustó a 214 nm y se inyectó un volumen de 100 µl en el bucle. Se ejecutó un blanco (solución salina 0,15 M + arginina 0,001 M) antes de cada análisis.

- 25 Las figuras 10A y 10B muestran los resultados de RP-HPLC en el análisis de LSE, de acuerdo con algunas realizaciones. Tal como se muestra, los resultados fueron los mismos, o al menos sustancialmente similares, para extractos de saliva liofilizados (Figura 10A) y frescos (Figura 10B).

- 30 La figura 11 muestra el aislamiento de proteínas del LSE usando RP-HPLC, de acuerdo con algunas realizaciones. Tal como se puede observar, se aislaron 30 picos del LSE. Los ejemplos de dos proteínas aisladas del LSE se indican mediante flechas.

- 35 La figura 12 muestra los pesos moleculares de las dos proteínas aisladas utilizando electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE, de acuerdo con algunas realizaciones. El carril 1 es el marcador peptídico, el carril 2 es la proteína 2 y el carril 3 es la proteína 1. Los pesos moleculares de las dos proteínas aisladas, proteína 1 y proteína 2, fueron 6289,799 Da y 14244,58 Da, respectivamente.

#### Actividad anticoagulante de LSE (no parte de la invención)

- 40 Este ejemplo muestra que (i) el LSE liofilizado retiene la actividad anticoagulante y (ii) los componentes activos del LSE se pueden identificar utilizando procedimientos conocidos. El LSE se congeló a -40 °C, se liofilizó, se disolvió en 60 µl de agua destilada y se usó para evaluar la actividad anticoagulante de porciones aisladas de LSE. Las proteínas aisladas se identificaron y evaluaron para determinar la actividad anticoagulante y los resultados revelaron dos proteínas activas que prolongan el tiempo de trombina. Les dieron los nombres, "proteína 1" y "proteína 2" y tiempo de trombina prolongado en 26,23 % y 31,65 %, respectivamente. Las proteínas aisladas también se evaluaron para determinar la inhibición de la actividad amidolítica de la trombina, y los resultados muestran que inhibieron la actividad amidolítica de la trombina en un 30,61 % y en un 41,22 % para la proteína 1 y la proteína 2, respectivamente, confirmando los resultados obtenidos respecto al tiempo de trombina.

- 50 La determinación de la actividad amidolítica del LSE se basó en su efecto inhibitorio sobre la liberación de p-nitroanilida inducida por la trombina del sustrato sintético de la trombina S-2238 utilizando procedimientos conocidos. Mao et al., 1987; Schmied, Hoeffken, Hornberger, y Bernard, 1995).

#### MATERIALES Y MÉTODOS

- 55 1. Preparación del tampón de reacción: Todos los reactivos utilizados para este experimento se prepararon en solución salina tamponada con fosfato y seroalbúmina bovina (PBS-BSA, pH 7,4) que contiene NaCl 0,12 M, fosfato de sodio 0,01M, 0,01 % de NaN<sub>3</sub> y 0,1 % de seroalbúmina bovina.
- 60 2. Reactivo de trombina y sustrato de trombina S-2238: se prepararon en PBS-BSA a una concentración final de trombina 0,6 NIHU/ml y 100 µM, respectivamente. La solución de sustrato de trombina se conservó a -20 °C para su uso en un mes según las condiciones de almacenamiento proporcionadas por el fabricante.
- 65 3. Procedimientos de ensayos amidolíticos: Se mezclaron volúmenes de 50 µl de reactivo de trombina con volúmenes iguales de diferentes diluciones de LSE en la placa de 96 pocillos. La placa se agitó suavemente y se incubó durante 10 minutos a 25 °C en el lector de microplacas. Posteriormente, Se pipetearon 100 µl del sustrato y se agitó la mezcla. La absorbancia a 405 nm (A<sub>405</sub>) se controló durante ocho horas a intervalos de 5 minutos. Se realizaron los mismos procedimientos utilizando la solución fagoestimulante (PhS) como control negativo. El tampón de reacción PBS-BSA se consideró como un control.

4. Cálculos: Todas las mediciones se repitieron por triplicado y se consideraron los medios. El porcentaje de inhibición (% de inhibición) se calculó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{\text{Absorbancia de control} - \text{Absorbancia de LSE}}{\text{Absorbancia del control}} \right) \times 100$$

La figura 13 ilustra la CI50 del LSE con respecto a la actividad antitrombina, de acuerdo con algunas realizaciones. El LSE inhibió eficazmente la liberación mediada por trombina de la p-nitroanilida del sustrato sintético (S-2238). La concentración de proteína que inhibe el 50 % de la actividad de la trombina (CI<sub>50</sub>) se determinó representando el % de inhibición contra la concentración de proteína total en el LSE, y se encontró que era 49,391 ± 2,219 µg/ml. La curva de respuesta a la dosis de la actividad amidolítica del extracto de saliva de sanguijuela. Y = 2,28X + 38,26, en la que: Y = % de inhibición y X = concentración de proteína (µg/ml), R<sup>2</sup>=0,878.

La actividad antitrombina se determinó utilizando un ensayo de tiempo de trombina (TT) *in vitro*. Los siguientes protocolos estándar se usaron según lo provisto con el reactivo THROMBOCLOTINA y un COAGULÓMETRO SYSMIX CA 50:

1. Preparación de plasma citrado: preparado a partir de sangre humana fresca tomada por venopunción inmediatamente antes del experimento. Se mezcló sangre humana fresca (4,5 ml) con citrato de sodio en un tubo de citrato que contiene 0,5 ml de 0,11 mol/l de citrato de sodio (9 partes de sangre: 1 parte de citrato de sodio). La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos a 3000 rpm. El plasma citrado del sobrenadante se mantuvo a temperatura ambiente (+ 25 °C) para su uso dentro de las cuatro horas de preparación.

2. Preparación del reactivo de trombina: Cada vial de TROMBOCLOTINA se reconstituyó con 10,0 ml de agua destilada. La solución resultante contiene 2,5NIHU de trombina/ml y fue estable durante una semana cuando se almacenó entre 2 °C y 8 °C.

3. Preparación del plasma control: se usó una prueba de plasma control antes de cada experimento para evaluar la precisión y la exactitud de los reactivos utilizados y el coagulómetro. Se disolvió un vial de CONTROL N (un plasma de control utilizado para probar el instrumento) en 1,0 ml de agua destilada, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma de control reconstituido se mantuvo a -20 °C durante un período máximo de cuatro semanas.

4. Ensayo de tiempo de trombina: Una parte alícuota de 100 µl del plasma citrado preparado se pipeteó en el tubo de coagulación precalentado provisto con el coagulómetro y posteriormente se incubó a 37 °C en el pocillo del analizador de coagulación durante 3 minutos. Se añadieron 100 µl del reactivo de trombina reconstituido (trombina 2,5NIHU/ml) y el tiempo hasta que comenzó la coagulación se midió con el coagulómetro. Se mezclaron diferentes diluciones del LSE fresco con el plasma citrado recién preparado para producir un volumen final de 100 µl y se midieron los valores de TT de las mezclas. La solución fagoestimulante se utilizó como control negativo.

5. Cálculos: Todas las mediciones se repitieron por triplicado y se consideraron los medios. El incremento en porcentaje del tiempo de trombina (%TT) se calculó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ TT} = \left( \frac{\text{TT de la muestra} - \text{TT del plasma citrado}}{\text{TT del plasma citrado}} \right) \times 100$$

El LSE fresco recolectado de sanguijuelas sometidas a inanición durante 16 semanas prolongó el tiempo de trombina (TT) del plasma citrado de manera dependiente de la dosis. La concentración de proteína de la saliva de sanguijuela que puede aumentar el TT dos veces (CI<sub>100</sub>) se estimó trazando el % de los valores de TT frente a las concentraciones de proteína de LA saliva que se mezclaron con el plasma citrado.

La figura 14 muestra la relación entre el tiempo de trombina y la concentración de proteína LSE, de acuerdo con algunas realizaciones. La concentración de proteína DEL LSE que aumentó el TT dos veces (CI<sub>100</sub>) se estimó a partir de la curva de concentración de proteína de la saliva (µg/ml de plasma) frente al aumento porcentual de TT (% de TT). Por consiguiente, se descubrió que la CI<sub>100</sub> fue 22,558 µg/ml de plasma. Los resultados muestran que la actividad antitrombótica del LSE era una función lineal con la concentración de proteínas en plasma, Y = 4,953X - 11,73, en la que: Y = % de TT y X = concentración de proteína (µg/ml), R<sup>2</sup>= 0,984.

### Ejemplo 3. Un procedimiento para crear un extracto de saliva completa liofilizada estable de sanguijuela.

Este ejemplo muestra el efecto sustancial de las condiciones de liofilización y las condiciones de almacenamiento sobre la actividad y la estabilidad del LSE. La actividad antitrombina se usó como una medida de la actividad y la estabilidad del LSE en las diferentes condiciones. Condiciones de liofilización tales como el tipo de vaso, la temperatura de pre-congelación, el tiempo de liofilización y las condiciones de almacenamiento variaron para determinar sus efectos sobre la actividad del LSE.

El LSE se dividió en alícuotas en tubos separados de vidrio y polipropileno que contenían cada uno 1 ml. Las muestras se congelaron después a -20 °C o -40 °C, y las muestras congeladas se liofilizaron durante 12, 24, 48 o 72 horas. La actividad antitrombina (% de TT) de cada muestra liofilizada se determinó y comparó con la del LSE

fresco. Además, los tubos de vidrio o polipropileno, cada uno con 1 ml de LSE liofilizado o no liofilizado se almacenaron a temperatura ambiente, 4 °C, y -20 °C. Algunos tubos a temperatura ambiente se protegieron de la luz envolviéndolos con papel de aluminio. La actividad antitrombina (% de TT) de cada muestra se controló durante un período de seis meses y se comparó con la del LSE fresco.

5 La figura 15 muestra los efectos de las condiciones de liofilización y las condiciones de almacenamiento sobre la actividad y la estabilidad del LSE, de acuerdo con algunas realizaciones. Los resultados son la media de los triplicados  $\pm$  el error estándar de la media SEM (n = 3), analizados utilizando ANOVA de una vía y la prueba post hoc HSD de Tukey; la p <0,05 se consideró estadísticamente significativo. La congelación a -40 °C antes de la liofilización disminuyó significativamente (p <0,05) la actividad antitrombótica del LSE en un 31-34 % en comparación con la actividad del LSE fresco. La congelación a -20 °C antes de la liofilización proporcionó una actividad antitrombina (% de TT = 60-65 %) similar a la del LSE fresco (% de TT = 62 %), independientemente del tipo de vaso. El recipiente no tuvo un efecto significativo sobre la actividad del LSE durante la liofilización.

15 La figura 16 muestra el efecto del tiempo de liofilización sobre la actividad antitrombina del LSE, de acuerdo con algunas realizaciones. Todas las muestras se liofilizaron durante 24 horas en un tubo de vidrio. <sup>α</sup> p <0,001 en comparación con el LSE fresco. Los resultados son la media de los triplicados  $\pm$  el error estándar de la media SEM (n = 3), analizados utilizando ANOVA de una vía y la prueba post hoc HSD de Tukey; la p <0,05 se consideró estadísticamente significativo. La liofilización durante más de 24 horas condujo a una disminución espectacular del 67-80 % (p <0,001) en la actividad antitrombina. La liofilización durante 12-24 horas, por otro lado, retuvo aproximadamente el 95 % de su actividad original.

#### Almacenamiento a temperatura ambiente

25 Después de un día de almacenamiento, todas las muestras (liofilizadas o no liofilizadas) almacenadas a temperatura ambiente con el tiempo perdieron actividad en comparación con la actividad inicial del LSE fresco.

30 Las muestras recién preparadas almacenadas en tubos de vidrio expuestos a la luz perdieron más del 90 % de actividad después de un día. El LSE no liofilizado mantenido en tubos de vidrio protegidos de la luz perdió un 62,2 % de actividad después de un día de almacenamiento, y más del 90 % después de 3 días de almacenamiento. Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de polipropileno mostraron más del 90 % de pérdida de actividad después de un período de almacenamiento de un día, independientemente de la protección frente a la luz. El LSE liofilizado se mantuvo en tubos de vidrio protegidos de la luz durante uno, tres y siete días perdieron aproximadamente el 26,5 %, 75 % y 95 % de actividad, respectivamente. El LSE liofilizado expuesto a la luz durante un día perdió aproximadamente el 48 % de actividad y aproximadamente el 90 % después de 3-7 días. El LSE liofilizado mantenido en tubos de polipropileno en la oscuridad durante un día perdió un 57 % de actividad y más de un 90 % de actividad después de 3 días. El LSE liofilizado mantenido en tubos de polipropileno y expuesto a la luz perdió el 80 %-99 % de actividad durante 7 días.

40 La luz afectó significativamente a la actividad del LSE a temperatura ambiente. El LSE liofilizado mantenido en tubos de vidrio protegidos de la luz perdió un 26,5 % de actividad en un día, en comparación con una pérdida de actividad del 48 % (p <0,05) para muestras expuestas a la luz. Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de polipropileno protegidos de la luz perdieron un 62,2 % de actividad después de un día y perdieron aproximadamente el 92 % (p <0,001) de su actividad cuando se expusieron a la luz.

45 El tipo de recipiente afectó a la actividad del LSE cuando se almacenó a temperatura ambiente. Las muestras liofilizadas almacenadas en tubos de vidrio perdieron un 26,5 % -47,8 % de actividad, mientras que las almacenadas en tubos de polipropileno perdieron un 57,1 % -84,5 % (p <0,05) de actividad. Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de vidrio protegidos de la luz perdieron un 62 % de actividad, mientras que las muestras almacenadas en tubos de polipropileno perdieron un 92 % (p <0,001) de actividad en un día protegidas de la luz.

50 La liofilización proporcionó estabilidad al LSE a temperatura ambiente. Las muestras no liofilizadas muestran una pérdida sustancial de actividad en comparación con las muestras liofilizadas cuando se almacenaron en las mismas condiciones. El LSE no liofilizado almacenado en tubos de vidrio protegidos de la luz perdió un 62,2 % de actividad después de un día, mientras que el LSE liofilizado perdió un 26,5 % de actividad después de un día (p <0,001). Después de 3-7 días de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas entre las muestras porque las muestras perdieron una gran parte de su actividad biológica (75-95 %).

60 La figura 17 muestra el efecto de la luz y el recipiente sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE (liofilizadas y no liofilizadas) almacenadas a temperatura ambiente hasta durante 7 días, de acuerdo con algunas realizaciones. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media SEM (n = 3) y se analizan mediante el modelo lineal general (GLM), medida repetida ANOVA, utilizando el software SPSS 18.0, y la p <0,05 se consideró estadísticamente significativa.  $\alpha$  es significativo cuando se comparó con LSE fresco (control de referencia);  $\beta$  es significativo en comparación con el LSE liofilizado almacenado en tubos de vidrio y protegidos de la luz; de la luz; y  $\epsilon$  es significativo en comparación con el LSE liofilizado almacenado en tubos de polipropileno y protegidos de la luz;  $\delta$  es significativo en comparación con el LSE no liofilizado almacenado en tubos de vidrio y protegido de la luz; y  $\delta$  es

significativo cuando se comparó con el LSE liofilizado en tubos de vidrio con luz.

#### Almacenamiento a 4 °C

5 A una temperatura reducida de 4 °C, no hubo pérdida significativa de actividad en siete días, independientemente del tipo de muestra o las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, todas las muestras mostraron una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en la actividad después de 15 días en comparación con la actividad inicial de saliva fresca (referencia de control).

10 Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de vidrio retuvieron una actividad del 100 %-97 % durante los siete días. Una fuerte disminución (45 %) en la actividad se produjo después de 15 días y los tiempos de almacenamiento más prolongados mostraron más de un 90 % de pérdida de actividad. Las muestras liofilizadas mantenidas en tubos de vidrio retuvieron aproximadamente el 100 % de la actividad después de siete días, perdió aproximadamente el 27 % de la actividad después de 15 días, y perdió aproximadamente el 80-90 % de la actividad después de 30 días.

15 Las muestras no liofilizadas mantenidas en recipientes de polipropileno retuvieron el 100-95 % de actividad durante los siete días, perdieron aproximadamente el 47 % de actividad después de 15 días y más del 90 % de actividad después de 30 días. Las muestras de saliva liofilizada mantenidas en recipientes de polipropileno perdieron aproximadamente el 0-9 % de actividad después de 3 días, aproximadamente el 13 % después de 7 días, aproximadamente el 32 % después de 15 días y aproximadamente el 85-95 % después de 30 días.

25 La figura 18 muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento, la luz y el recipiente sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE (liofilizadas y no liofilizadas) durante hasta 180 días a 4 °C, de acuerdo con algunas realizaciones. Después de 30 días-180 días, todas las muestras perdieron el 81-98 % de su actividad. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media SEM ( $n = 3$ ) y se analizan mediante el modelo lineal general (GLM), medida repetida ANOVA, utilizando el software SPSS 18.0, y la  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo,  $\alpha$  es significativo cuando se comparó con el LSE fresco (control de referencia);  $\beta$  es significativo en comparación con el LSE liofilizado almacenado en tubos de vidrio; y es significativo en comparación con el LSE liofilizado almacenado en tubos de polipropileno. El tipo de recipiente solo tuvo un efecto menor, mientras que la liofilización tuvo un efecto significativo sobre la actividad después de 15 días de almacenamiento. Las muestras no liofilizadas mostraron mucha más pérdida de actividad que las muestras liofilizadas. Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de vidrio perdieron un 45 % de actividad, mientras que los homólogos liofilizados perdieron el 27 % después de 15 días de almacenamiento ( $p < 0,05-0,001$ ). Las muestras no liofilizadas mantenidas en tubos de polipropileno perdieron un 47 % en comparación con una pérdida del 32 % en muestras liofilizadas ( $p < 0,05$ ) durante el mismo período de 15 días.

#### Almacenamiento a -20 °C

40 A la temperatura de almacenamiento de -20 °C, el tipo de recipiente y el estado del extracto no fueron estadísticamente significativos. El LSE no liofilizado almacenado en tubos de vidrio perdió debido a una actividad del 0-6 % (estadísticamente no significativo) en 15 días a -20 °C. Después de 30 días, se perdió aproximadamente el 10% de actividad. Después de 90-180 días, se observó una pérdida significativa de aproximadamente 12-15 % ( $p < 0,05$ ) de actividad. El LSE no liofilizado mantenido en tubos de polipropileno perdió una actividad del 0-5 % (estadísticamente no significativo) en 15 días, y aproximadamente el 13-16 % ( $p < 0,05$ ) después de 30-180 días. El LSE liofilizado almacenado en tubos de vidrio perdió solo un 0-5 % de actividad en 180 días (estadísticamente no significativo). Las muestras liofilizadas almacenadas en tubos de polipropileno perdieron aproximadamente el 3-6 % de actividad en 15 días y aproximadamente el 13 % -20 % (estadísticamente significativo) después de 30-180 días.

50 La figura 19 muestra el efecto del recipiente y la liofilización sobre la actividad antitrombina de muestras de LSE durante hasta 180 días a -20 °C, de acuerdo con algunas realizaciones. Los resultados son la media  $\pm$  error estándar de la media SEM ( $n = 3$ ) y se analizan mediante el modelo lineal general (GLM), medida repetida ANOVA, utilizando el software SPSS 18.0, y la  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

#### Ejemplo 4. Un procedimiento para tratar un tumor sólido. (No forma parte de la invención)

55 Este ejemplo muestra la actividad citotóxica del LSE preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 en el tratamiento de un tumor sólido.

60 REACTIVOS: todos los reactivos preparados según lo deseado en condiciones estériles estrictas según el Gabinete de Seguridad Biológica de Clase II de ESCO; Medio L-15 de Leibovitz (de Sigma-Aldrich); solución salina tamponada con fosfato (PBS), Solución estéril 1X (de Amresco); L-glutamina (L-Glu, líquido, 200 mM), penicilina/estreptomicina (pen/estrep, 100X), suero bovino fetal FBS mycoplex y ACCUTASE (una combinación de proteasa y colágeno en PBS con EDTA 0,5 mM) (de The Cell Culture Company PAA); colorante azul tripán (de Merck); y el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CELLTITER-GLO (de Promega); seroalbúmina bovina y clorhidrato de arginina (de Sigma-Aldrich); cloruro de sodio (de Merck); kit de reactivos de Bradford (de Amresco); carboplatino (cis-diamina [1,1-ciclobutanodicarboxilato]platino II) (de Calbiochem); clorhidrato de irinotecán (estándar de referencia USP de

Rockville, MD).

5 EQUIPO: una centrífuga refrigerada Jouan CR22 (Jouan, Francia); una incubadora Memmert tipo BE-400 (Mettler, Alemania); un microscopio invertido (de Olympus modelo CK30); un luminómetro de microplacas TECAN (TECAN, EE. UU.); un lector de microplacas multi detección Infinite M200, NanoQuant TECAN (de TECAN (EE.UU)); y un modelo de liofilizador Christ Alpha 1-4LD (Alemania).

## MÉTODOS

10 Se obtuvo un cáncer de pulmón microcítico humano (línea celular SW1271) de la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC. Según los protocolos estándar de la ATCC, la línea celular dependiente de anclaje se cultivó a una concentración celular de inóculo inicial de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> en 15 ml de medio de crecimiento completo (CGM) que consiste en medio L-15 de Leibovitz suplementado con FBS al 10 % (v/v), 0,3 g/l de L-Glu y 1 % (v/v) de pen/estrep. en un matraz de cultivo de células de cuello inclinado CORNING de 75 cm<sup>2</sup>. Las células cultivadas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada libre de CO<sub>2</sub>. El CGM se almacenó a +4 °C y se calentó (37 °C) durante 15 minutos en un baño de agua antes de su uso (ATCC, 2007). Los matraces que contenían las células cultivadas se comprobaron a intervalos de 24 horas para determinar la viabilidad celular, adherencia, morfología y estado de confluencia utilizando el microscopio invertido. Los cultivos se examinaron para detectar cualquier evidencia macroscópica de contaminación microbiana con el microscopio invertido. Los medios se cambiaron según sea necesario cuando el color del medio se vuelve amarillo, ya que el medio L-15 de Leibovitz contiene rojo fenol que se vuelve amarillo a niveles de pH bajos y rojo brillante a pH 7,4 que es adecuado para el cultivo de células (ATCC, 2007).

25 Cuando la monocapa de la línea celular dependiente de anclaje SW1271 está cerca del 90 % de confluencia, se subcultivaron según los protocolos proporcionados por la ATCC. Después de aspirar el CGM de los matraces, las células adherentes se disociaron de las paredes del matraz de cultivo celular pipeteando 3 ml de ACCUTASE. Después de un período de incubación de 15 minutos con ACCUTASE a 37 °C, las células se examinaron bajo el microscopio invertido para asegurarse de que la mayoría (95 %) de las células se separaban y dispersaban en una suspensión de una sola célula (ATCC, 2007).

30 El recuento de las células viables se realizó utilizando la exclusión del colorante azul tripán, que depende del recuento de las células no teñidas que no han captado el colorante que aparece redondeado con halos siguiendo el protocolo que se describe a continuación (NSF, 2006):

- 35 1. La solución de azul de tripán se preparó en BPS estéril hasta una concentración final del 0,4 % (p/v).
2. La suspensión celular se diluyó con BPS estéril hasta un volumen total de 4 ml para que las células no se superpusieran entre sí, lo que haría que el recuento fuera difícil e impreciso.
3. Tanto el hemocitómetro como el cubreobjetos se limpiaron, se secaron y se montaron.
- 40 4. La suspensión celular y el azul tripán se mezclaron completamente en una proporción de 1:1 (creando un factor de dilución de 2). Por consiguiente, se pipetearon 10 µl de la mezcla en la cámara de recuento del hemocitómetro. Es suficiente tocar las puntas con el borde del cubreobjetos para llenar la cámara debido a la acción capilar.
5. Se contó el número de células en el cuadrado en cada esquina y se consideró el promedio.
6. El número total de células se estimó utilizando la siguiente ecuación:

45 
$$\text{Número total de células} = \text{recuento promedio por cuadrado} \times \text{factor de dilución } 10^4 \times \text{el volumen total de la suspensión celular diluida}$$

50 La suspensión celular se homogeneizó mediante pipeteo suave y a continuación se dispensó a una densidad final de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> en nuevos matraces de cultivo celular que contenían 15 ml de CGM. Los matraces se monitorizaron regularmente para verificar la viabilidad celular y la contaminación microbiana (ATCC, 2007).

55 Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 90 % de confluencia, se cosecharon como se ha descrito anteriormente utilizando ACCUTASE como agente disociador. ACCUTASE se eliminó mediante centrifugación suave (10 min, a +4 °C y 125xg) con la centrífuga refrigerada, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de CGM. Las células se contaron utilizando exclusión con colorante azul tripán y se sembraron  $10^4$  células en una microplaca de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos CORNING COSTAR que contenía 200 µl de CGM utilizando una micropipeta EPPENDORF de 8 canales. Las microplacas se incubaron a 37 °C en un ambiente humidificado sin CO<sub>2</sub> durante 24 horas (ATCC, 2007).

60 Después de la incubación durante 24 horas, se desechó el medio y se reemplazó por 180 µl de CGM nuevo. Se preparó una serie de diluciones dobles del extracto concentrado liofilizado de saliva de sanguiuela (10xLSE). El LSE se filtró 10 veces a través de papel de filtro estéril SARTORIUS de 0,2 µm y se añadieron alícuotas de 20 µl a las primeras tres filas de la microplaca con la mayor concentración en la primera fila y así sucesivamente, de modo que se obtuvo un volumen total de 200 µl (180 µl de CGM + 20 µl de 10xLSE). A las siguientes tres filas, se añadieron volúmenes de 20 µl de otra serie de doble dilución de una solución fagoestimulante concentrada diez veces. Se

preparó otra placa de control negativo que contenía células no tratadas ( $10^4$  células/pocillo) cultivadas en 200  $\mu$ l de CGM.

Se prepararon otras placas siguiendo los mismos protocolos reemplazando 10xLSE por carboplatino e irinotecán como controles positivos con una dilución doble en serie de ambos a partir de 100  $\mu$ M en la primera columna. Se prepararon dos placas utilizando volúmenes de 20  $\mu$ l de una serie de mezclas de dilución doble que consiste en:

1. 10  $\mu$ l de 10xLSE mezclados con 10  $\mu$ l de carboplatino 100  $\mu$ M.
2. 10  $\mu$ l de 10xLSE mezclados con 10  $\mu$ l de irinotecán 100  $\mu$ M.

Todas las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada sin CO<sub>2</sub> durante 5 días. El efecto antiproliferativo o citotóxico del extracto de saliva de sanguijuela se determinó utilizando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CELLTITER-GLO basado en la medición de la señal de luminiscencia de la reacción entre la luciferasa recombinante ULTRA-GLO y las moléculas de ATP producidas por las células viables metabólicamente en presencia de Mg<sup>+2</sup> y oxígeno molecular (de Promega, 2009). Se realizó un ensayo CELLTITER-GLO de acuerdo con los protocolos estándar:

1. El reactivo CELLTITER-GLO se preparó mezclando tampón CELLTITER-GLO y el sustrato que se equilibró previamente a temperatura ambiente.
2. Las placas de 96 pocillos incubadas durante 5 días que contenían las células experimentales se dejaron equilibrar a temperatura ambiente antes del ensayo. El medio se aspiró de todos los pocillos y se reemplazó por 100  $\mu$ l de CGM nuevo.
3. Se pipeteó un volumen igual del reactivo CELLTITER-GLO preparado (100  $\mu$ l) en el pocillo y a continuación se mezcló durante 2 minutos usando el agitador de placas orbitales y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente.
4. El medio de reacción (reactivo CGM + CELLTITER-GLO) se transfirió a una nueva placa blanca de 96 pocillos adecuada para el luminómetro utilizado.
5. El luminómetro registró la luminiscencia.
6. La inhibición celular se calculó a partir de la ecuación (Xu, Guo, Li, Wei, & Zhao, 2008):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Señal de control} - \text{señal de muestra}}{\text{Señal de control}} \times 100$$

7. La concentración de la muestra de prueba (LSE o el control negativo) que inhibe el 50 % del crecimiento celular (CI<sub>50</sub>) se promedió a partir de tres repeticiones y se estimó a partir del trazado del porcentaje de inhibición del crecimiento celular frente a la concentración de la muestra de prueba. (Hsu et al., 2011). Los trazados se llevaron a cabo utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software Sigma Plot 11.0.

Después de un período de incubación de 5 días a 37 °C en un ambiente humidificado sin CO<sub>2</sub>, las células alcanzaron casi el 90 % de confluencia. Las células se cosecharon desprendiéndolas de las paredes del matraz de cultivo celular con ACCUTASE y se centrifugaron a 4 °C y 125 xg durante 10 minutos. El recuento de células con un procedimiento de azul tripán reveló que un matraz contenía aproximadamente 5,550-5,740 x10<sup>6</sup> células viables a casi un 90 % de confluencia.

La figura 20 muestra que el LSE mostró una notable actividad antiproliferativa contra el cáncer de pulmón microcítico (línea celular SW1271), de acuerdo con algunas realizaciones. La concentración de proteína LSE total que inhibe el crecimiento del 50 % de las células después de 5 días de incubación (CI<sub>50</sub>) fue de 119,844  $\mu$ g/ml, estimada mediante la representación del porcentaje de inhibición frente a la concentración de proteínas totales. La solución fagoestimulante por sí sola no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular.

Las figuras 21 y 22 muestran el efecto citotóxico de mezclas de LSE con irinotecán o carboplatino, de acuerdo con algunas realizaciones. La CI<sub>50</sub> de irinotecán y carboplatino fue de 5,813  $\mu$ g/ml y 18,754  $\mu$ g/ml, respectivamente. Todas las mediciones se repitieron por triplicado y se consideró la media  $\pm$  el error estándar de la media SEM (n = 3). Los gráficos se generaron utilizando la ecuación logística de cuatro parámetros con el software Sigma Plot 11.0.

Una combinación de LSE e irinotecán mostró una CI<sub>50comb</sub> de 51,463  $\mu$ g/ml, que es aproximadamente un 57,1 % menos que la CI<sub>50</sub> de LSE utilizado solo. Una combinación de LSE y carboplatino muestra una CI<sub>50comb</sub> de 114,261  $\mu$ g/ml, una reducción del 4,6 % de la CI<sub>50</sub>. El carboplatino mostró una disminución espectacular del valor de CI<sub>50</sub> en un 65 %, de tal manera que la CI<sub>50comb</sub> de carboplatino y LSE fue 6,449  $\mu$ g/ml.

Los resultados sugieren que el LSE, solo o en combinación con otros agentes, de modo que irinotecán o carboplatino podría ser útil para tratar otras formas de cáncer, tal como de próstata, de mama y cánceres líquidos, tal como leucemias y linfomas. La leucemia mieloide aguda es de particular interés.

Ejemplo 5. Un procedimiento para tratar la diabetes.

Este ejemplo muestra la efectividad del LSE en el tratamiento de la diabetes. El aislamiento de LSE y la medición de las proteínas totales se realizaron de acuerdo con los procedimientos que se enseñan en el presente documento.

#### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

5 Cloruro de sodio, clorhidrato de arginina, etanol absoluto y formaldehído al 37 % (de Merck); kit de reactivo de Bradford (Amresco Inc.); membrana de parafilm (de American Can Company); glucosa anhidra (de Fisher Scientific); monohidrato de aloxano usado para inducir diabetes (de Sigma Aldrich); seroalbúmina bovina (de Sigma Aldrich);  
10 insulina del páncreas bovino ( $\geq 27$  unidades/mg) (de Sigma Aldrich); el procedimiento de preparación de la solución de aloxano en solución salina normal enfriada con hielo inmediatamente antes de la inyección (de Lenzen, 2008);.

15 La centrifugación se realizó utilizando la centrífuga Universal 32R (de Hettich ZenTrifugen, Alemania); lector de microplacas modelo INFINITE M200, NANOQUANT TECAN (de TECAN USA); la liofilización se realizó utilizando un liofilizador CHRIST modelo Alpha 1-4LD (Alemania); un glucómetro y tiras reactivas ONE TOUCH ULTRA para la determinación de la concentración de glucosa en sangre (de LifeScan Inc., EE.UU.); y, un microscopio NIKON ECLIPSE 80i.

20 Las ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD) (de Mikro Makmur Enterprise, Kuantan, Pahang Darul Makmur, Malasia) se agruparon al azar y se guardaron en un laboratorio de posgrado de animales en Kulliyah of Pharmacy, Universidad Islámica Internacional de Malasia (MUM), mantenidas con un sistema de aire acondicionado y extractores. Las ratas se mantuvieron con un ciclo de luz y oscuridad de 12 h/12 h a temperatura ambiente (25 °C). Se aclimataron a estas condiciones durante una semana antes del experimento y se alojaron en jaulas de polipropileno forradas con corteza de madera de pino que se cambiaba cada dos días. Las ratas tuvieron acceso  
25 libre a agua corriente y una dieta comercial de gránulos secos, Gold Coin. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con Principios y Guía para el uso ético de animales de laboratorio aprobada por el Ministerio de Salud de Malasia (Sinniah y Hussein, 2000). Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Reunión del Comité de Ética (No. 1/2011 el 22 de abril de 2011) de Kulliyah of Medicine, IIUM (n.º de ref. IIUM/305/20/4/10).

30 Las ratas se mantuvieron en ayunas durante la noche y se indujo una diabetes de tipo 1 mediante administración intraperitoneal (i.p) de una sola dosis de una solución de aloxano recién preparada 160 mg/kg de peso corporal (p.c.) (Rajakopal y Sasikala, 2008). Con el fin de prevenir la hipoglucemia fatal inducida por aloxano, se administró a las ratas una solución de glucosa al 20 % por vía intraperitoneal, seguida de una solución de glucosa al 5 % por vía oral durante las siguientes 12 horas (Lenzen, 2008). A continuación, se alimentó a las ratas con una dieta de gránulos comercial *ad libitum* y se les dio acceso libre al agua del grifo. A todos los animales experimentales se les inyectó  
35 aloxano tres veces a intervalos de 24 horas.

40 Después de 24 hora de aloxanización, la concentración de glucosa en sangre en ayunas (FBG) se midió cada mañana para verificar el estado diabético de las ratas inyectadas. Todos los valores de FBG se obtuvieron de sangre capilar fresca de una punción en la vena de la cola, y las mediciones se tomaron con un glucómetro ONE TOUCH ULTRA. Después de tres días de inyección de aloxano, las ratas mostraron niveles de FBG de más de 11.1 mmol/l, un nivel considerado diabético para el estudio (Abeeleh et al., 2009).

45 Se dividió al azar a cuarenta ratas macho en ocho grupos, comprendiendo cada uno cinco ratas como se detalla a continuación:

- Grupo I: ratas normales de control, en este grupo no se inyectó ni aloxano ni LSE.
- Grupo II: ratas de control con diabetes inducida a las que solo se inyectó solución de aloxano i.p.
- Grupo III: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó por vía subcutánea (s.c) 500  $\mu$ g/kg de p.c. de LSE, que corresponde a la cantidad/dosis de proteína administrada por una sanguijuela.
- 50 • Grupo IV: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó s.c 1.000  $\mu$ g/kg de p.c. de LSE, que corresponde a la cantidad/dosis de proteína administrada por dos sanguijuelas.
- Grupo V: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó s.c una solución fagoestimulante PhS1 (arginina 0,001 M en solución salina normal) en una dosis de 20 ml/kg p.c. que contiene la cantidad de arginina y cloruro de sodio que se supone que acompaña a la dosis más alta de LSE inyectada en el grupo IV.
- 55 • Grupo VI: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó s.c 20 unidades/kg de p.c. de una suspensión de insulina de páncreas bovino en agua destilada (Booth y Brookover, 1968).
- Grupo VII: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó s.c 10 unidades/kg de p.c. de una suspensión de insulina de páncreas bovino en agua destilada (Booth y Brookover, 1968).
- 60 • Grupo VIII: ratas con diabetes inducida a las que se inyectó s.c 250  $\mu$ g/kg de p.c. LSE + 10 unidades/kg de p.c. de insulina de páncreas bovina.

65 La actividad antihiper glucémica del LSE se evaluó mediante la disminución de los valores de FBG en ocho horas. La glucosa en sangre en ayunas (FBG) a intervalos de dos horas se registró durante el período experimental para todos los animales experimentales. El porcentaje de disminución de la concentración de glucosa en sangre en ayunas se calculó a partir de la siguiente ecuación (Madubunyi, Onoja, y Asuzu, 2010):

$$\text{Porcentaje de disminución de FBG} = \left[ \frac{\text{FBG antes del tratamiento (0 h)} - \text{FBG después del tratamiento (x h)}}{\text{FBG antes del tratamiento (0 h)}} \times 100 \right]$$

Se dividió a treinta ratas macho al azar en seis grupos, comprendiendo cada uno cinco ratas como se detalla a continuación:

- 5 • Grupo A-I: ratas a las que se inyectó i.p una dosis única de aloxano (160 mg/kg de p.c.).
- Grupo A-II: ratas a las que se inyectaron i.p dos dosis de aloxano (160 mg/kg de p.c.) con un intervalo de 24 horas.
- 10 • Grupo A-III: ratas a las que se inyectaron i.p tres dosis de aloxano (160 mg/kg de p.c.) con un intervalo de 24 horas.
- Grupo A-IV: ratas a las que se inyectó s.c. una única dosis de LSE (250 µg/kg de p.c.), seguido tras una hora por una única dosis i.p. de aloxano (160 mg/kg de p.c.).
- Grupo A-V: ratas a las que se inyectó s.c dos dosis de LSE (250 µg/kg de p.c.) seguidas después de una hora por dos dosis i.p. de aloxano (160 mg/kg de p.c.) a intervalos de 24 horas.
- 15 • Grupo A-VI: las ratas a las que se inyectaron s.c tres dosis de LSE (250 µg/kg de p.c.) seguidas después de una hora por tres dosis i.p. de aloxano (160 mg/kg de p.c.) a intervalos de 24 horas.

La actividad profiláctica del LSE se evaluó midiendo la FBG después de 24 horas de cada inyección. Las ratas que mostraron valores de FBG entre 8.3 y 13.9 mmol/l se consideraron diabéticas leves y aquellas con FBG de más de 13,9 mmol/l se consideraron diabéticas graves (Gupta et al., 2009).

Las figuras 23 y 24 muestran el efecto de diferentes dosis de LSE e insulina sobre la glucemia en ayunas (mmol/l) en ratas normales y diabéticas a diversos intervalos de tiempo (h), de acuerdo con algunas realizaciones. Después de tres días de inyección intraperitoneal de aloxano (160 mg/kg de p.c.), la FBG aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) en la FBG en las ratas diabéticas de control en comparación con las de control normales. Los niveles de FBG se redujeron significativamente después de inyectar a las ratas LSE por vía subcutánea a ambas dosis de 1.000 y 500 µg/kg de p.c. EL LSE a una dosis de 1.000 µg/kg de p.c. produjo una disminución significativa mayor ( $p < 0,001$ ) en FBG que la de la dosis 500 µg/kg ( $p < 0,05$ ). Además, se produjo una reducción significativa de FBG ( $p < 0,05$ ) después de dos horas de inyección de LSE, y se observó una mayor disminución significativa después de cuatro, seis y ocho horas ( $p < 0,001$ ).

Todas las ratas a las que se inyectó insulina experimentaron una fuerte disminución significativa ( $p < 0,001$ ) de la FBG después de dos horas de inyección. Las ratas a las que se inyectó la dosis más baja de insulina (10 unidades/kg de p.c.) volvieron al estado diabético con valores de FBG en rápido aumento después de 8 horas de tratamiento. Las ratas que recibieron insulina (10 unidades/kg) y LSE (250 µg/kg) mostraron una disminución significativa de FBG durante todo el período de estudio de 8 horas. Las ratas diabéticas a las que se inyectó la solución fagoestimulante no mostraron una reducción significativa de la FBG en comparación con el grupo de control diabético. No se observaron diferencias significativas entre las ratas normales y las ratas diabéticas tratadas con LSE o insulina a cualquiera de las dosis.

No se observó mortalidad ni cambio de comportamiento en los animales a los que se inyectó saliva hasta el final del estudio. Todos estos animales exhibieron locomoción típica y actividad física, tal como ausencia de signos de debilidad o agresividad. No se observó reacción de toxicidad, por ejemplo, no se observaron anorexia, ataxia, piloerección, pérdida de peso, diarrea, micción, dificultad respiratoria y respiración ruidosa. La administración simultánea de LSE (250 µg/ml p.c.) e insulina (10 unidades/kg de p.c.) indujo hipoglucemia sin mortalidad. No se observaron signos de toxicidad aguda en ratas a las que se inyectó por vía subcutánea LSE a ambas dosis de 1000 y 500 µg/kg de p.c., Por otro lado, la inyección de insulina a una dosis de 20 unidades/kg de p.c. dio como resultado una afección hipoglucémica en todas las ratas que llevó a la muerte de una rata. Las otras ratas que se mantuvieron vivas mostraron menos actividad física, especialmente durante las dos primeras horas de inyección.

La figura 25 muestra que el LSE tiene un efecto profiláctico sobre el inicio de la diabetes, de acuerdo con algunas realizaciones. Por ejemplo, sin uso de LSE como profiláctico, una dosis de aloxano (160 mg/kg de p.c.) no fue suficiente para inducir diabetes en las ratas, dos dosis hicieron que todas las ratas fueran levemente diabéticas ( $10,1 \pm 2,0$  mmol/l) y tres dosis indujeron diabetes grave ( $27,3 \pm 2,1$  mmol/l). Ninguna de las ratas a las que se inyectó una dosis de LSE (250 µg/kg de p.c.) antes de la aloxanización se volvió diabética. Dos dosis de LSE pudieron prevenir la inducción diabética en todas las ratas cuando se les inyectó una hora antes de la inyección de aloxano. Solo las ratas que recibieron tres dosis de aloxano después de tres dosis de LSE se volvieron diabéticas leves ( $11,5 \pm 0,6$  mmol/l). Los resultados son la media de los triplicados  $\pm$  el error estándar de la media SEM ( $n = 5$ ), analizados utilizando ANOVA de una vía y la prueba post hoc HSD de Tukey; la  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.  $P < 0,05$  cuando se comparó con ratas a las que se inyectaron dos dosis de aloxano y LSE.  $p < 0,001$  cuando se comparó con ratas a las que se inyectaron tres dosis de aloxano y LSE.

Ejemplo 6. Un procedimiento para tratar una enfermedad viral. (No forma parte de la invención)

Este ejemplo se utilizará para mostrar la efectividad del LSE en el tratamiento de una enfermedad viral. El

aislamiento de LSE y la medición de la proteína total se realizarán de acuerdo con los procedimientos que se enseñan en el presente documento.

5 Un cultivo de tejidos, generalmente un embrión de pollo de 3 a 6 días de edad, se infectará en el lado de la membrana del embrión por una dosis de virus vivos (hepatitis C, VIH, dengue, virus del Nilo occidental y gripe H1N1, H5N1) si es necesario, se utilizarán múltiples infecciones hasta que se produzca la infección.

10 Después de un período de incubación, el crecimiento del embrión y los cambios en sus tejidos se monitorizarán de acuerdo con los procedimientos establecidos. Este cultivo tisular infectado servirá como control. Se prepararán otros tres tejidos cultivados mediante el mismo procedimiento. En el primero, se inyectarán cuatro dosis de LSE (100/250/500/1000 ug/de p.c.) antes de la infección viral. En el segundo cultivo tisular, se inyectarán cuatro dosis de LSE (100/250/500/1000 ug/de p.c.) 1,2,3,4 horas después de la infección viral. En un tercer tejido, se inyectarán cuatro dosis de LSE inactivado (100/250/500/1000 ug/de p.c.) antes y después de la infección. El objetivo en el tercer experimento es analizar cualquier cambio en las vías de señal y se realizará una comparación con el LSE activo para tener una indicación del mecanismo de acción. Los tres tejidos cultivados: se trataron después y antes y con LSE inactivado se monitorizarán y compararán con el tejido control.

20 El efecto del LSE sobre la infección viral se deducirá a continuación de acuerdo con los procedimientos establecidos y se comparará con los medicamentos convencionales como el interferón.

#### Ejemplo 7. Un procedimiento para tratar una enfermedad parasitaria. (No forma parte de la invención)

25 Este ejemplo se utilizará para mostrar la efectividad del LSE en el tratamiento de una enfermedad parasitaria. El aislamiento de LSE y la medición de la proteína total se realizarán de acuerdo con los procedimientos que se enseñan en el presente documento.

30 En el caso del paludismo, un modelo animal, por lo general un modelo de ratón, se inyectará una dosis de un parásito del paludismo (la dosis se determinará de acuerdo con la virulencia del parásito Spp) hasta que los animales desarrollen los síntomas deseados de paludismo. Se inyectará a los animales enfermos (s.c., i.v.) en dos dosis (500/1.000 ug/K de p.c. de LSE). Tras el tratamiento, se extraerán dos gotas de sangre de la cola de los ratones en portaobjetos de vidrio para examinarlas bajo el microscopio o para la prueba ELIZA.

Los inventores utilizaron ocho grupos de diez ratones cada uno de la siguiente manera:

- 35
1. Grupo A - control infeccioso positivo
  2. Grupo B: infectados y tratados con LSE (500 ug/kg de p.c.) después de 1,2,3,4 horas
  3. Grupo C: infectados y tratados con LSE (1.000 ug/kg de p.c.) después de 1,2,3,4 horas
  4. Grupo D - 1/2 hora antes de la infección con el parásito, los inventores les inyectaron LSE (500 ug/kg de p.c.) como medidas profilácticas.
  - 40 5. Grupo E - 1/2 hora antes de la infección con el parásito, los inventores les inyectaron LSE (1.000 ug/kg de p.c.) como medidas profilácticas.
  6. Grupo F y G - ratones infectados a los que se ha inyectado 500 y 1.000 ug/kg de p.c. de solución fagoestimulante.

45 Se tomaron frotis de sangre de la cola de los ratones diariamente y se examinaron bajo un microscopio óptico durante siete días para monitorizar la actividad del LSE. El último grupo infectado (H) se trató con un medicamento antipalúdico estándar para controlar la actividad relativa y la potencia de LSE en el parásito.

#### Ejemplo 8. Un procedimiento para administrar una terapia antioxidante. (No forma parte de la invención)

50 Este ejemplo muestra la actividad antioxidante del LSE. El aislamiento de LSE y la medición de las proteínas totales se realizaron de acuerdo con los procedimientos que se enseñan en el presente documento.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

55 Metanol (MeOH) (de Fischer Scientific); Ácido L-ascórbico (de Calbiochem); clorhidrato de arginina, seroalbúmina bovina (BSA) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (de Sigma Aldrich); cloruro de sodio (NaCl) (de Merck).

60 Un lector de microplacas multi detección Infinite M200, NanoQuant TECAN (de TECAN (EE.UU)); una centrífuga Hettich ZenTrifugen Universal 32R (Alemania); un liofilizador CHRIST modelo Alpha 1-4LD (Alemania).

La actividad antioxidante se determinó utilizando procedimientos conocidos (Blois, 1958) para medir la capacidad de secuestro de radicales utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Althunibat et al., 2009; Blois, 1958; Sanja, Sheth, Patel, Patel, y Patel, 2009):

- 65
1. Preparación de solución de DPPH: se preparó una solución de DPPH (0,002 M) disolviendo 4,3 mg de DPPH

en 3,3 ml de MeOH. La solución resultante se protegió de la luz cubriendo el recipiente con una lámina de aluminio.

2. Preparación de la muestra de ensayo: El LSE liofilizado se disolvió en la cantidad mínima de agua destilada (2 ml). El volumen se llevó a un volumen final de 6,6 ml mediante MeOH produciendo un LSE concentrado 3 veces y la solución de metanol resultante se denominó 3xmLSE. Se pipetearon volúmenes de 100 µl de diluciones dobles en serie del 3xmLSE en una placa de 96 pocillos. Todos los volúmenes se llevaron a un volumen final de 300 µl mediante MeOH.

3. Preparación de la solución estándar: Se preparó una solución madre de ácido ascórbico (50 µg/ml) disolviendo 500 µg de ácido ascórbico en 10 ml de MeOH con agitación enérgica. Se prepararon diluciones en serie escalonadas en la placa de 96 pocillos tomando diferentes volúmenes de la solución madre y diluyéndolos con MeOH hasta 300 µl, correspondientes a las concentraciones finales de 50, 40, 30, 20, 10, 5 y 2,5 µg/ml.

4. Protocolos experimentales: Se añadió un volumen de 15 µl de solución de DPPH (0,002 M) a 300 µl de MeOH. Inmediatamente, la absorbancia a 516 nm (A<sub>516</sub>) se midió como una lectura de control. Se añadieron 15 µl de solución de DPPH a las muestras de prueba y las soluciones estándar. La A<sub>516</sub> de las muestras de prueba se tomó después de 15 minutos y se utilizaron los mismos procedimientos con PhS1 como control negativo.

5. Cálculos: La actividad de secuestro de radicales libres (% de actividad antirradicales) se estimó a partir de la ecuación:

$$\% \text{ de actividad antirradicales} = \frac{\text{Control de absorbancia} - \text{Muestra de absorbancia}}{\text{Control de absorbancia}} \times 100$$

Las figuras 26 y 27 compara la actividad de secuestro de radicales libres de LSE al ácido L-ascórbico (vitamina C), de acuerdo con algunas realizaciones. Todas las mediciones se repitieron por triplicado y se consideró la media ± SEM. Se estimó la concentración de ácido ascórbico y las proteínas del LSE (µg/ml) requeridas para secuestrar el 50 % de DPPH (CI<sub>50</sub>) a partir de la curva resultante de la representación del % de actividad antirradicales frente a las concentraciones (µg/ml). Los trazados se llevaron cabo utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software Sigma Plot 11.0.

Se demostró una actividad de secuestro de radicales libres dependiente de la dosis mediante el LSE que tiene una CI<sub>50</sub> de 7,282 µg/ml. De forma análoga, se descubrió que el ácido L-ascórbico es un secuestrante de radicales libres con una CI<sub>50</sub> de 5,803 µg/ml.

Ejemplo 10. Un procedimiento para administrar una terapia antibacteriana. (No forma parte de la invención)

Este ejemplo muestra la efectividad del LSE como antibacteriano.

## PROCEDIMIENTOS Y MATERIALES

Agar Mueller-Hinton (MHA) y caldo Mueller-Hinton (MHB) (de Oxoid Ltd.); agar de dextrosa de patata (PDA) y caldo de dextrosa de patata (PDB) (de Liofilchem); discos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana que contenían 5 µg/disco de ciprofloxacino y 100 unidades/disco de nistatina (de Oxoid Ltd); seroalbúmina bovina y clorhidrato de arginina (de Sigma-Aldrich); cloruro de sodio (NaCl) (de Merck); kit de reactivo Bradford (de Amresco).

una campana de flujo laminar Jouan (Jouan SA, Francia); una incubadora Memmert/INB 400 y un baño de agua Memmert/WNB 22 (de Memmert GmbH, Alemania); una autoclave HIRAYAMA/HV-85 (HIRAYAMA Corporation, Japón); un espectrofotómetro HITACHI U-1900 (de HITACHI High-Tech (Japón)); placas estériles de 96 pocillos (de Greiner Bio-One Corporation); una centrífuga Hettich ZenTrifugen Universal 32R (Alemania).

Se usaron cepas de referencia de patógenos humanos, incluyendo especies de bacterias grampositivas (*Bacillus cereus* ATCC25923 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923), cepas bacterianas gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC35218 y *Salmonella typhi* del Instituto de Investigación Médica, Ministerio de Salud IMR) y dos cepas de hongos (*Candida albicans* ATCC10231 y *Cryptococcus neoformans* ATCC90112).

Todos los medios utilizados durante los procedimientos experimentales se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como lo siguiente:

1. Agar de Muller-Hinton (MHA): se preparó suspendiendo 38 g de MHA en 1 l de agua destilada con ebullición y agitación enérgica frecuente hasta que se disolvió completamente. Después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2. Caldo de Muller-Hinton (MHB): se preparó suspendiendo 21 g de MHB en 1 l de agua destilada con ebullición y agitación enérgica frecuente hasta que se disolvió completamente. Después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El caldo madre estéril resultante se mantuvo en una botella bien cerrada de 1.000 ml con tapón de rosca, se envolvió con membrana de parafilm en la tapa y se almacenó a +4 °C para su uso posterior. Antes de su uso, se calentó el MHB (37 °C) en la incubadora durante 15 minutos.

3. Agar de dextrosa de patata (PDA): se preparó suspendiendo 39 g de PDA en 1 l de agua destilada con ebullición y agitación enérgica frecuente hasta que se disolvió completamente. Después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

4. Caldo de dextrosa de Patata (PDB): se preparó suspendiendo 26,5 g en PDB 1 l de agua destilada con ebullición y agitación enérgica frecuente hasta que se disolvió completamente. Después, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El caldo madre estéril resultante se mantuvo en una botella bien cerrada de 1.000 ml con tapón de rosca, se envolvió con membrana de parafilm en la tapa y se almacenó a +4 °C para su uso posterior. Antes de su uso, El PDB se calentó (37 °C) en la incubadora durante 15 minutos.

Antes de verter el agar, el medio de agar esterilizado recién preparado MHA/PDA para cepas bacterianas/fúngicas, se dejó enfriar en un baño de agua ajustado a 50 °C durante 15-30 minutos para evitar la formación de gotas de humedad por el fenómeno de condensación. Posteriormente, se vertió un volumen de aproximadamente 20-25 ml en placas Petri estériles de fondo plano desechables (irradiadas con rayos gamma) hasta una altura de 4 mm evitando que se queden atrapadas burbujas de aire. Las placas con tapas a medio abrir se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos bajo el flujo laminar para eliminar el exceso de humedad y temperatura de la superficie. Por último, se cubrieron las placas, se invirtieron hacia abajo y hacia arriba y se almacenaron en el refrigerador (+4 °C) para su uso en un período máximo de una semana. Antes de la inoculación de las placas que contenían agar, se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora para minimizar la condensación (Coyle, 2005; Goldman & Green, 2009; Lalitha, 2004).

Se llevó a cabo un ensayo de turbidez métrica para estandarizar el número de microorganismos utilizados para la inoculación. El procedimiento de suspensión directa de colonias se utilizó para preparar la suspensión de inoculación (Coyle, 2005; Goldman & Green, 2009; Lalitha, 2004; Rex, Pfaller, Rinaldi, Polak, y Galgiani, 1993). Los procedimientos experimentales incluyen las etapas siguientes:

1. Preparación de suspensión estándar de sulfato de bario (0,5 McFarland): Se preparó mediante la adición de 0,5 partes de BaCl<sub>2</sub> 0,048M a 99,5 partes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.18M y se agitó enérgicamente hasta obtener una suspensión homogénea. La turbidez de la suspensión se verificó midiendo la densidad óptica a 625 nm (DO<sub>625</sub>) mediante el espectrofotómetro. Se realizaron diluciones apropiadas para obtener un valor de absorbancia de 0,008-0,10 que corresponde a 0,5 estándares de McFarland. La suspensión estándar preparada se dividió en alícuotas en pequeñas botellas de vidrio con tapones de rosca, se almacenó a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Antes de la utilización, las botellas se agitaron bien con vortex para mantener una suspensión uniforme.

2. Procedimiento de suspensión directas de colonias:

a) En condiciones asépticas, se suspendieron cinco colonias aisladas mediante un asa de inoculación esterilizada por ignición de placas de agar cultivadas 18-24 horas de cada microbio por separado en 20 ml de medio de caldo precalentado (37 °C) (MHB para cepas bacterianas o PDB para tinciones de hongos) mantenido en botellas con tapón de rosca e incubadas a 37 °C.

b) Durante el período de incubación, se tomaron partes alícuotas de 1 ml del cultivo a intervalos de una hora y se midió la densidad óptica (DO<sub>625</sub> para la suspensión bacteriana y DO<sub>530</sub> para la suspensión fúngica) utilizando el espectrofotómetro.

c) Se realizaron diluciones adecuadas con MHB/PDB para ajustar la suspensión de microorganismos para que coincidan con los patrones de turbidez 0,5 de McFarland. La suspensión del caldo y el patrón de sulfato de bario 0,5 de McFarland se compararon a simple vista con una tarjeta con un fondo blanco y líneas negras. Por último, las suspensiones de caldo resultantes contenían 10<sup>7</sup> UFC/ml para las bacterias spp. y 10<sup>4</sup> UFC/ml para especies de hongos, que se utilizaron para todos los experimentos realizados.

d) Las suspensiones siempre se agitaron completamente antes de la medición de la DO y la inoculación.

El procedimiento de difusión en disco de Kirby-Bauer se utilizó para determinar la actividad antimicrobiana del LSE:

1. Inoculación de placas de ensayo: un hisopo de algodón estéril se sumergió y se giró muchas veces en la suspensión de microorganismos ajustada. El hisopo sumergido se apretó fuertemente hasta que se eliminó todo el exceso de líquidos. El hisopo se pasó sobre la superficie de agar estéril desecado de placas que contenían MHA para cepas bacterianas o placas que contenían PDA para cepas fúngicas. Estas etapas se repitieron tres veces extendiendo la suspensión de caldo utilizando una varilla de vidrio para obtener placas inoculadas de manera uniforme. Las placas se dejaron abiertas bajo la campana de flujo laminar durante 5 minutos para permitir que la superficie absorbiera la humedad adicional.

2. Preparación de discos de papel de filtro seco: Se utilizó papel de filtro WHATMAN N.º 1 para preparar discos

de aproximadamente 6 mm de diámetro. Estos discos se sumergieron en solución de prueba (LSE o PhS1, esterilizados por filtración a través de papel de filtro SARTORIUS estéril de 0,2 µm). Posteriormente, se dejaron secar durante 5 minutos en la incubadora (37 °C) antes de la aplicación en las placas de Petri. Los discos se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos antes de colocarlos en las placas de agar Petri inoculadas.

3. Colocación de discos en las placas petri de agar petri inoculadas: Los discos de filtro cargados con la solución de prueba (LSE/PhS1) y los discos que contienen los antibióticos de referencia (5 µg/disco de ciprofloxacino o 100 unidades/disco de nistatina) se colocaron en las placas de agar inoculadas utilizando pinzas estériles con un prensado suave para asegurar una buena adherencia a la superficie del agar. Los discos se distribuyeron a una distancia de al menos 15 mm desde el borde de la placa y no más cerca de 24 mm de centro a centro. Finalmente, las placas se invirtieron y se incubaron a 37 °C durante 24 horas y 48 horas para especies de bacterias y hongos, respectivamente.

Después del período de incubación, la zona de inhibición (mm) alrededor de cada disco se midió utilizando una regla y se comparó con los antibióticos de referencia utilizados.

Se utilizó microdilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la concentración mínima de contenido de proteína de LSE que puede inhibir el crecimiento del organismo de prueba. Se llevaron a cabo diluciones en serie de LSE de doble pliegue en una placa estéril de 96 pocillos. Se pipetearon 100 µl de caldo de Mueller-Hinton estéril en los pocillos de las primeras cinco columnas de la placa. Se mezclaron 100 µl de LSE con el caldo en los primeros tres pocillos de la primera fila de la placa. Las diluciones se realizaron transfiriendo alícuotas de 100 µl de la mezcla de los primeros tres pocillos a los siguientes verticalmente, y así sucesivamente. Se pipetearon 10 µl del caldo de suspensión del organismo de prueba que contenía (10<sup>7</sup>UFC/ml) en cada pocillo de las primeras cuatro columnas, pero no se añadió inóculo a la quinta columna. La cuarta y quinta columnas se consideraron positivas (caldo con inóculo) y control negativo (solo caldo), respectivamente. Se tapó la placa, se envolvió con láminas de parafilm alrededor de los bordes para evitar la deshidratación, y se incubó durante 24 horas a 37 °C. Después del período de incubación, el punto final de la CIM se determinó por la falta de turbidez en el pocillo.

Las actividades antibacterianas y antifúngicas del LSE fresco y las muestras liofilizadas se muestran en la Tabla 3 con ciproflaxino y nistatina, en la que se muestra que el LSE tiene actividad deseada.

Tabla 3.

Muestra	Período de inanición (semanas)	Bacterias spp.					Hongos spp.	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Sal. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformance</i>
		Zona de inhibición (mm)						
LSE fresco	16	-	0	22	25	0	-	-
	22	0	0	0	0	0	-	-
	26	0	0	0	0	0	-	-
Liofil. LSE	22 <sup>a</sup>	11	0	10	0	0	0	0
	26 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0
Arginina +NaCl <sup>c</sup>	-	-	0	0	0	0	0	0
Cipro (5 µg) <sup>d</sup>	-	24	24	35	26	28	-	-
Nistatina (100 unidades) e	-	-	-	-	-	-	10	9

<sup>a</sup> concentración multiplicada por cinco, <sup>b</sup> concentración multiplicada por diez, <sup>c</sup> la solución fagoestimulante como control negativo, <sup>d,e</sup> antibióticos de referencia, 0: sin inhibición no determinado

Ejemplo 11. Un procedimiento para probar, tipos de células tumorales sólidas y líquidas. (No forma parte de la invención)

## ES 2 710 126 T3

Este ejemplo analiza una evaluación *in vitro* de la actividad de LSE aplicada a líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

Con el fin de probar el LSE para determinar su eficacia contra el cáncer, se puede aplicar a líneas celulares adicionales que incluyen, por ejemplo, MCF-7 (mama), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), MeWo (melanoma de piel), Mia PaCa-2 (carcinoma pancreático), A549 (cáncer de pulmón), U87MG (tumor cerebral, glioblastoma), MCF10A (células epiteliales normales), HT-29 (carcinoma de colon), CaCo-2 (células epiteliales intestinales normales), HEP 3B (cáncer de hígado hepatoma humano), ES-2 (carcinoma ovárico), HBEpC (células epiteliales humanas normales), CCRF-CEM (leucemia), HL-60 (TB) (leucemia), MOLT-4 (leucemia), RPMI-8226 (leucemia), SR (leucemia), EKVX (pulmón no microcítico), HOP-62 (pulmón no microcítico), HOP-92 (pulmón no microcítico), NCI-H226 (pulmón no microcítico), NCI-H23 (pulmón no microcítico), NCI-H322M (pulmón no microcítico), NCI-H460 (pulmón no microcítico), NCI-H522 (pulmón no microcítico), COLO 205 (colon), HCC-2998 (colon), HCT-116 (colon), HCT-15 (colon), KM12 (colon), SW-620 (colon), SF-268 (SNC), SF-295 (SNC), SF-539 (SNC), SNB-19 (SNC), SNB-75 (SNC), U251 (SNC), LOX IMVI (melanoma), MALME-3M (melanoma), M14 (melanoma), SK-MEL-2 (melanoma), SK-MEL-28 (melanoma), SK-MEL-5 (melanoma), UACC-257 (melanoma), UACC-62 (melanoma), IGR-OVI (ovario), OVCAR-3 (ovario), OVCAR-4 (ovario), OVCAR-5 (ovario), OVCAR-8 (ovario), SK-OV-3 (ovario), 786-0 (renal), A498 (renal), ACHN (renal), CAKI-1 (renal), RXF-393 (renal), SN12C (renal), TK-10 (renal), UO-31 (renal), DU-145 (próstata), NCI/ADR-RES (mama), MDA-MB-231/ATCC (mama), HS 578T (mama), MDA-MB-435 (mama), MDA-MB-468 (mama), BT-549 (mama), T-47D (mama), Saos-2 (cáncer de hueso).

### MATERIALES Y MÉTODOS

una placa de fondo plano de 96 pocillos; MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio) (Sigma n.º cat. M2128); reservorios de reactivos; una pipeta multicanal; una pipeta repetidora multicanal; un conjunto de pipetas individuales, 10 µl, 200 µl, 1000 µl; y varias puntas de pipeta.

Medios de crecimiento, reactivos y suero, incluidos los medios Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), rico en glucosa; RPMI-1640; De Iscove; solución salina tamponada de Hank; L-glutamina; suero bovino fetal; y tripsina/EDTA.

Para realizar el ensayo de citotoxicidad MTT, producir una solución madre de 5 mg de MTT/ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato); usar un filtro estéril con un filtro de jeringa de 0,22 µM; y almacenar a 4 °C en oscuridad. Producir una solución de trabajo de 1 mg/ml de solución madre de MTT diluida con 1:4 (v/v) en medio de cultivo precalentado.

Día 1, células de la placa; Día 2, añadir fármacos; Días 3-5, Leer las placas.

Un ejemplo de un diseño de matriz de placa es el siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
C	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
D	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
E	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
F	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
G	X	medios	control	1433	717	358	179	90	45	22	11	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

X: H<sub>2</sub>O; volumen final todos los pocillos: 200 µl

#### Día 1: Siembra de células

Se pueden sembrar dos líneas celulares en una placa de 96 pocillos, de manera que las pruebas se completen por

triplicado para cada una (K562 no es adherente, por ejemplo, por lo que debe estar en una placa separada). Las líneas celulares adherentes deben sembrarse en placas un día antes de añadir medicamentos para permitir que las células se adhieran a la placa, mientras que las células no adherentes (células en suspensión) se pueden sembrar en placas el mismo día (día 2) antes de añadir medicamentos.

5 Las células se cuentan primero en el hemocitómetro para observar la viabilidad de las células, que debe ser mayor o igual al 90 %. Si este no es el caso, las células vivas deben separarse de las células muertas utilizando Ficoll-Paque (3 ml por 4 ml de células, centrifugar durante 25 minutos a 1500 rpm, lavar las células una vez con medio de cultivo 5 min a 1500 rpm). El número de células a sembrar por pocillo varía con la tasa de crecimiento de la línea celular. La densidad óptica ideal (DO) de las células de control debe estar entre 1,00 y 2,00 al final del tiempo de incubación. Debido al aumento de la tasa de evaporación a lo largo del borde de los pocillos de la placa, no se usa para el ensayo, pero se llena con 200 µl de agua estéril.

10 La columna B2-G2 se usa como el blanco y se llena con 200 µl de medio. La columna B3-G3 es la columna de control con 100 µl de células solamente. El fármaco se añade a las células por triplicado, por lo tanto las columnas B4-D4, B5-D5, B6-D6, etc. a B11-D11 permite que se analicen 8 concentraciones diferentes de fármaco. Esto se aplica a la mitad inferior de la placa también.

15 Cuando se añadan las células a la placa para asegurarse de que las células estén bien suspendidas, se añadirá la misma cantidad de células a cada pocillo. Deje la placa en una incubadora durante la noche para que las líneas celulares adherentes se asienten en la placa.

#### Día 2: Adición de fármacos

25 Si hay células adherentes, aspirar el medio usado y añadir 100 µl de medio fresco. Añadir 100 µl de medicamento de la concentración deseada en cada pocillo. Dado que el volumen total del medio por pocillo es de 200 µl, diluir el medicamento en consecuencia. Si desea que la concentración final del medicamento sea de 10 µM en el pocillo, por ejemplo, tendrá que hacer una solución de 20 µM (100 µl de esto más 100 µl de su medio le darán una solución de 10 µmol en un total de 200 µl). Añadir 100 µl de medio a los pocillos en la columna de control (B3-G3). Devolver la placa a la incubadora 72 horas.

#### Lectura de la placa

35 Al final del periodo de incubación, añadir 50 µl por pocillo de la solución de trabajo MTT a todos los pocillos. Devolver la placa a la incubadora durante 3-4 horas y mantener constantes los tiempos de incubación para repetir los experimentos. Configurar su molde de ensayo en el lector de placas. Después de 3-4 horas, retirar las placas de la incubadora. Si las células no son adherentes, deben ponerse boca abajo durante 10 minutos a 1800 rpm. Inclinar la placa de 96 pocillos en un ángulo de 45 ° hacia usted. Usar una punta de pipeta de 10-100 µl unida al vacío, aspirar el sobrenadante de cada pocillo. Añadir 150 µl de DMSO por pocillo.

40 Resuspender las células colocando la placa en el agitador de placas (5-10 minutos debe ser suficientemente). En caso necesario, resuspender las células resistentes a mano usando la pipeta multicanal, teniendo cuidado de no crear burbujas. La mejor manera de deshacerse de cualquier burbuja en una placa de 96 pocillos es dirigir una suave corriente de aire hacia la placa. Colocar la placa en el espectrofotómetro y leerla a 570 nm.

#### Recogida da datos

45 Se recopilarán los siguientes registros: optimización de células en crecimiento para cada línea celular; citotoxicidad del LSE; y gráficos de viabilidad celular.

50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación para su uso en el tratamiento de la hiperglucemia diabética, comprendiendo la formulación un extracto de saliva completa de una sanguijuela y un vehículo farmacéuticamente eficaz, en donde el extracto es un extracto de saliva completa liofilizado.
2. Una formulación para su uso en el tratamiento de la hiperglucemia diabética según la reivindicación 1, en donde la formulación se prepara mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas de:
- 10     alimentar un agente fagoestimulante a una sanguijuela;  
inducir una regurgitación en la sanguijuela, incluyendo la inducción colocar la sanguijuela en un ambiente con una temperatura inferior a 0 °C;  
recoger una saliva completa sin refinar en la regurgitación de la sanguijuela enfriada;
- 15     retirar componentes sólidos de la saliva completa sin refinar para crear una saliva completa refinada; y,  
liofilizar volúmenes separados del extracto de saliva completa, sin que los volúmenes superen los 2 ml cada uno.
3. Una formulación para su uso en el tratamiento según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la sanguijuela es *Hirudinaria manillensis*.
- 20 4. Una formulación para su uso en el tratamiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el extracto de saliva completa es un extracto de saliva completa liofilizado, refinado y estable que se refina mediante la extracción de componentes sólidos de una saliva completa sin refinar; y en donde el extracto tiene una actividad estable cuando se almacena para su uso a una temperatura por debajo de -20 °C, manteniendo los extractos al menos el 70 % de la actividad durante al menos seis meses.
- 25

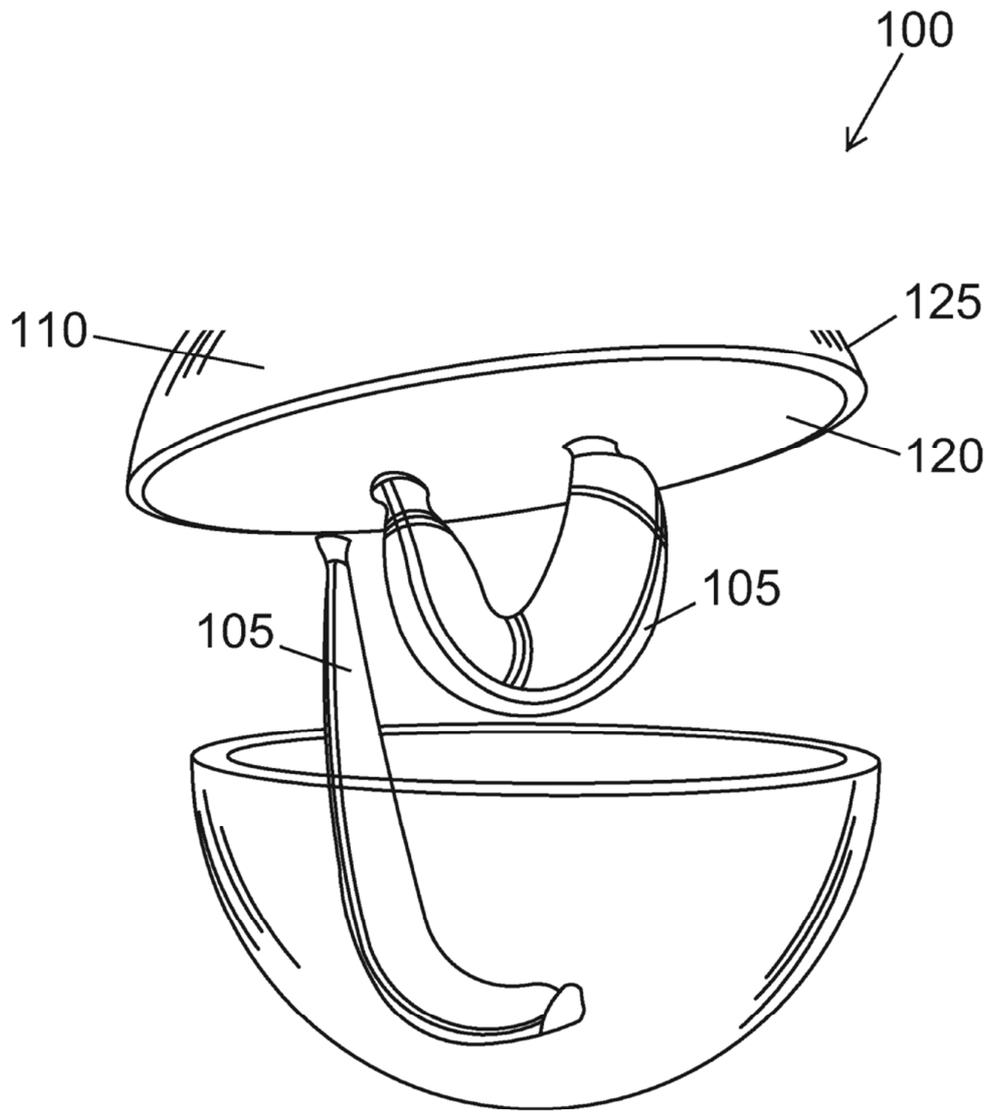


FIG. 1

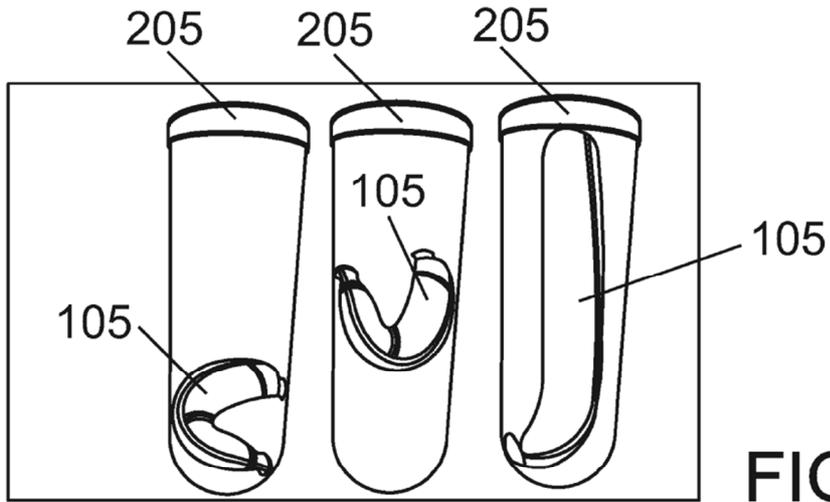


FIG. 2A

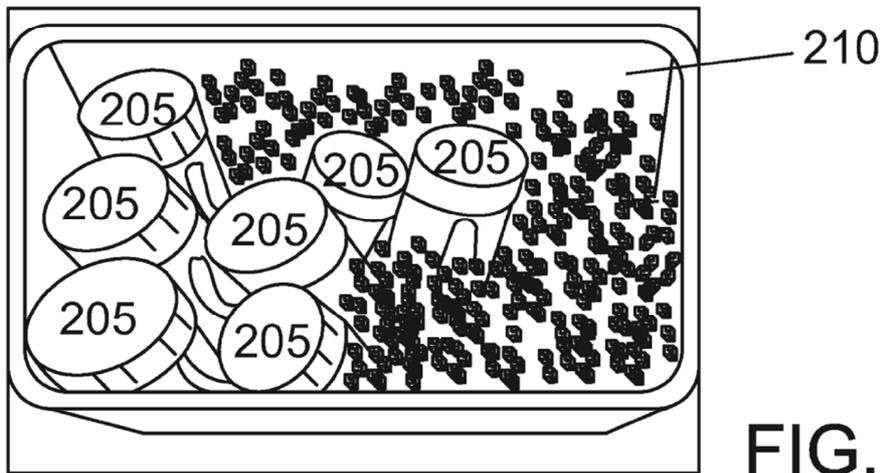


FIG. 2B

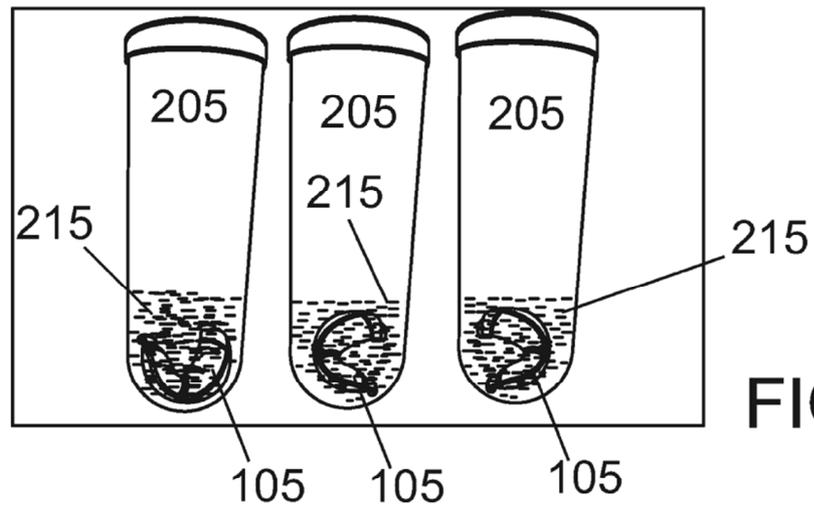


FIG. 2C

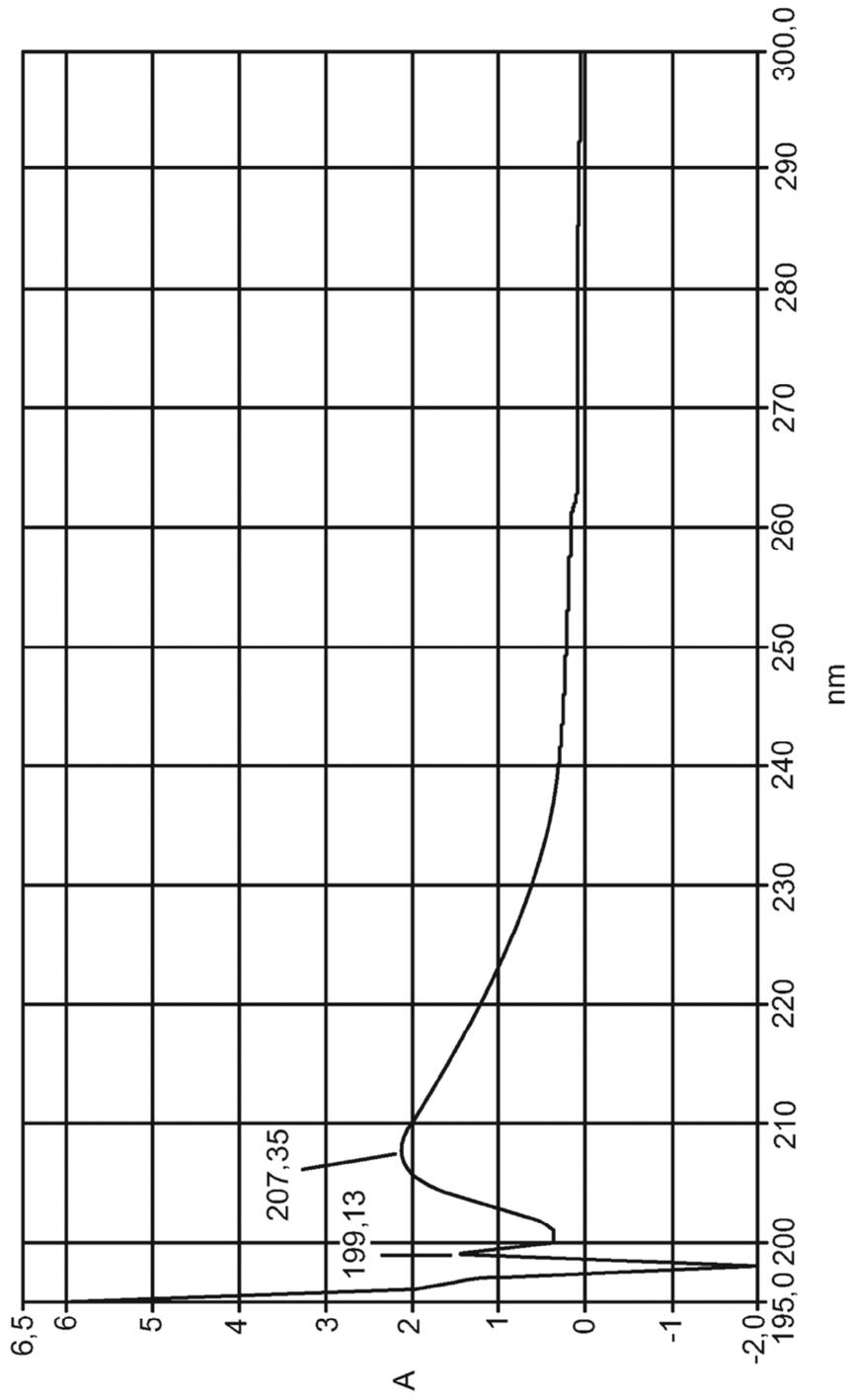


FIG. 3

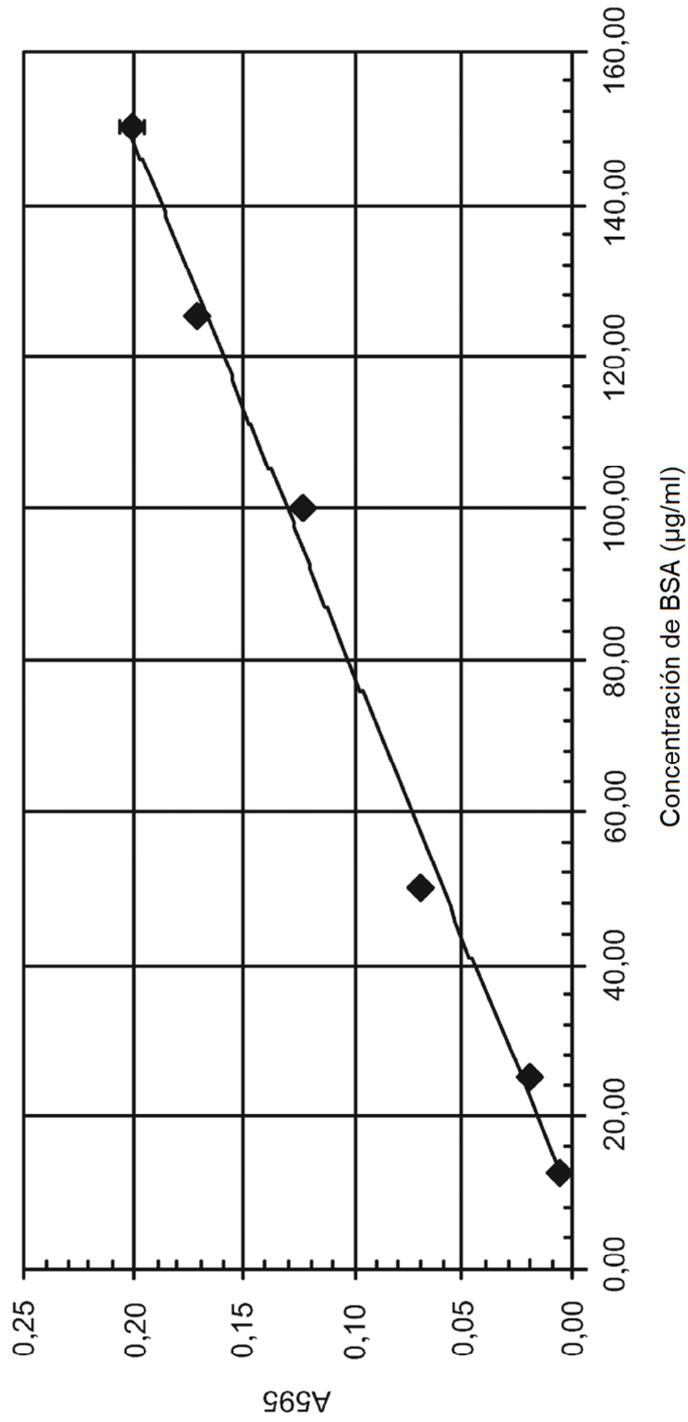


FIG. 4

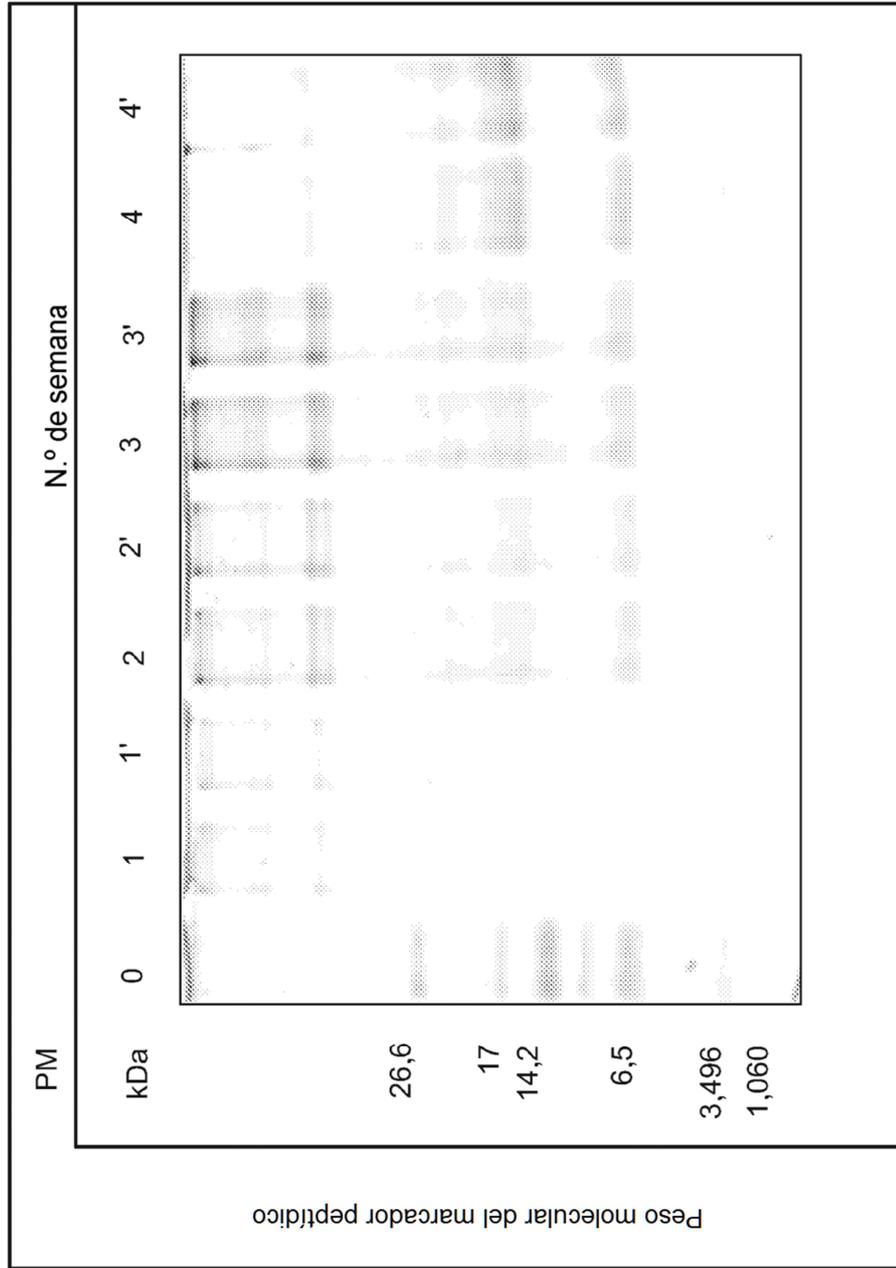
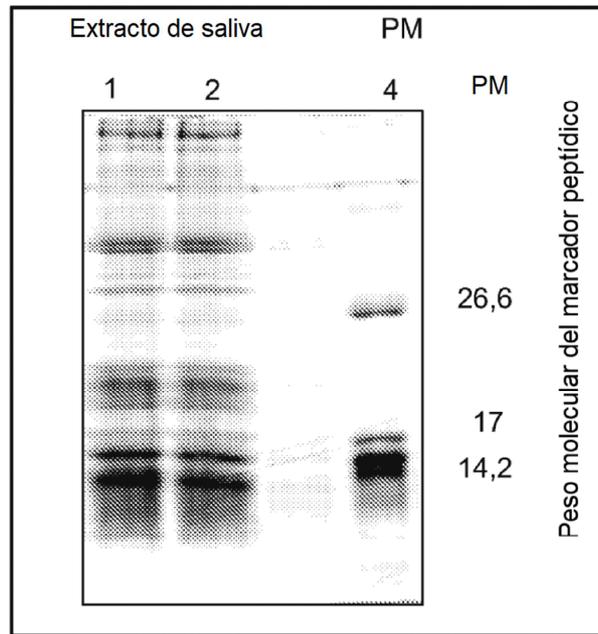
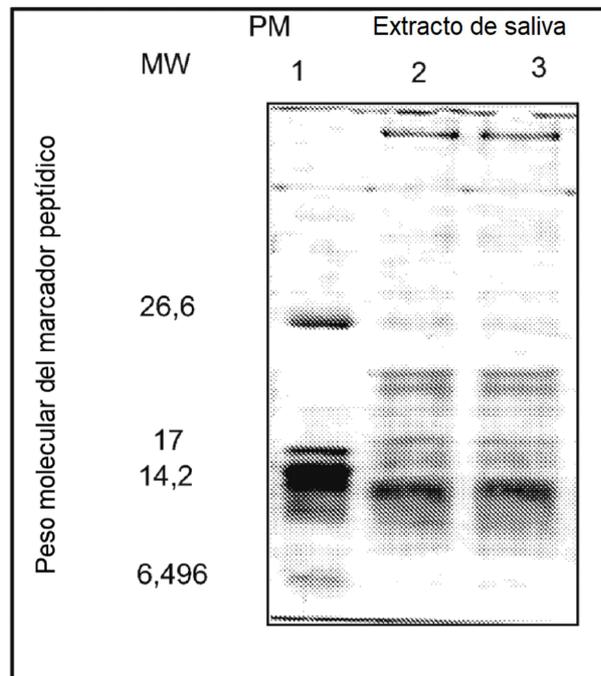


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

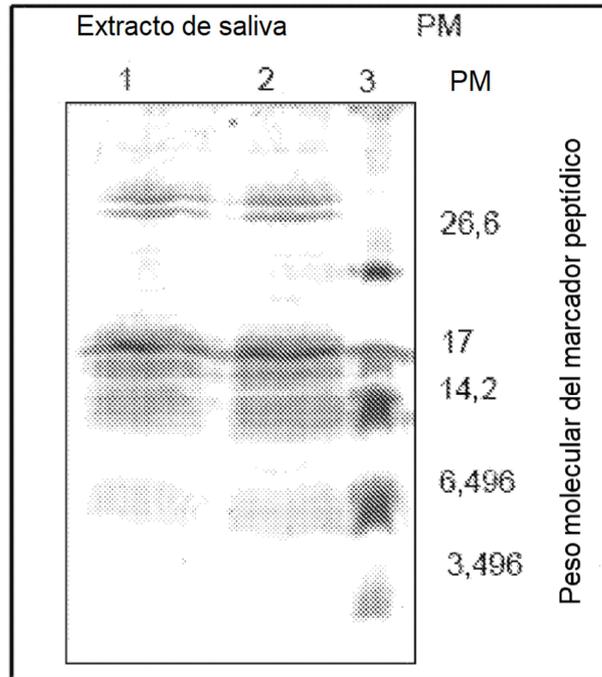


FIG. 8

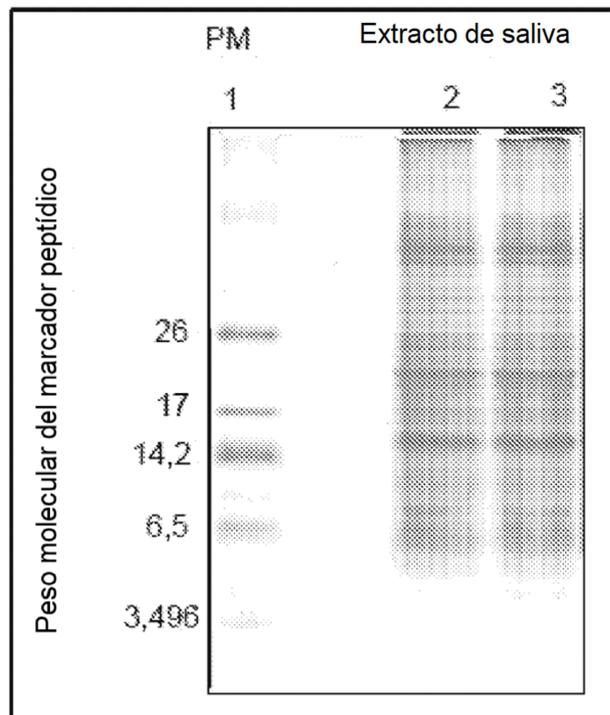
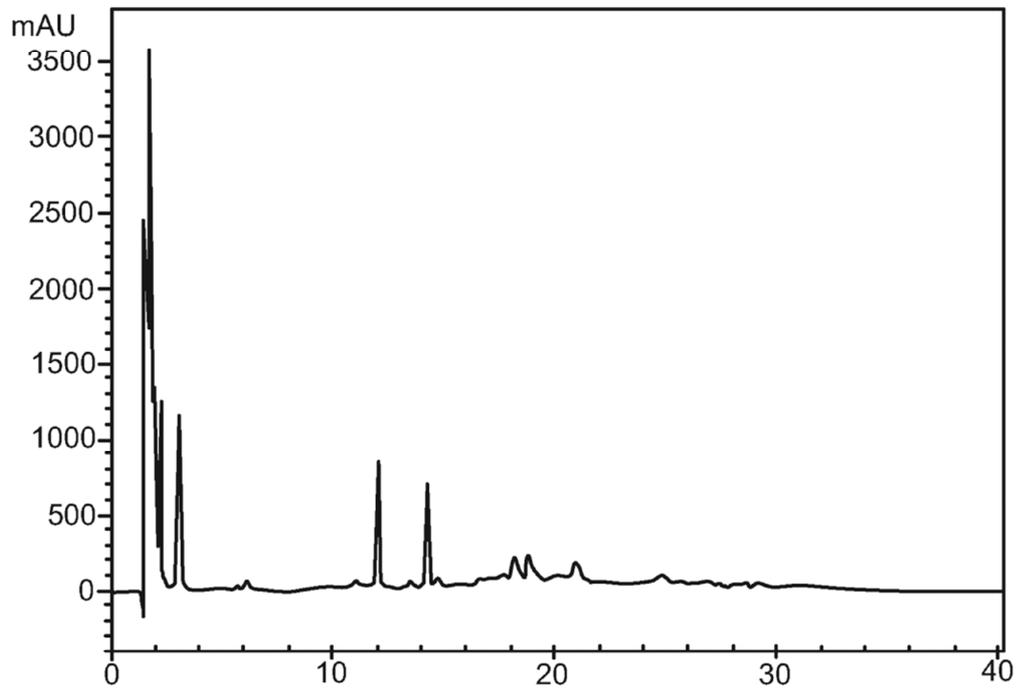
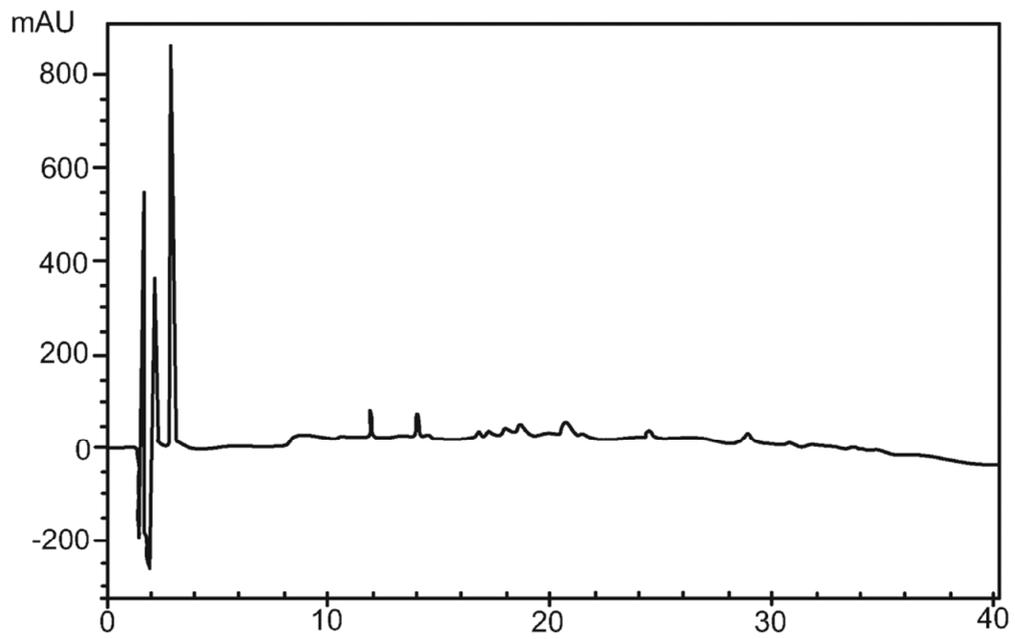


FIG. 9



**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

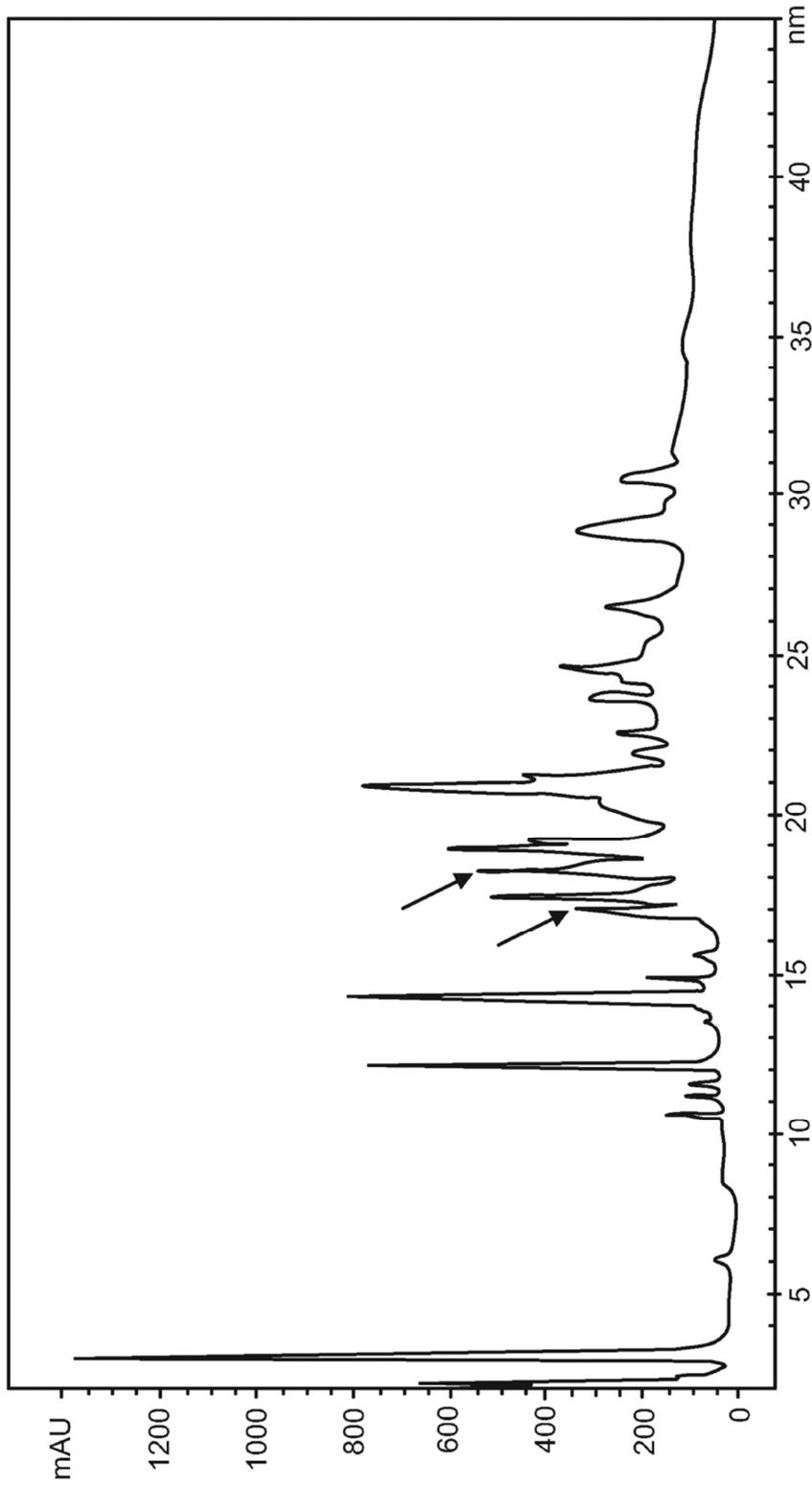


FIG. 11

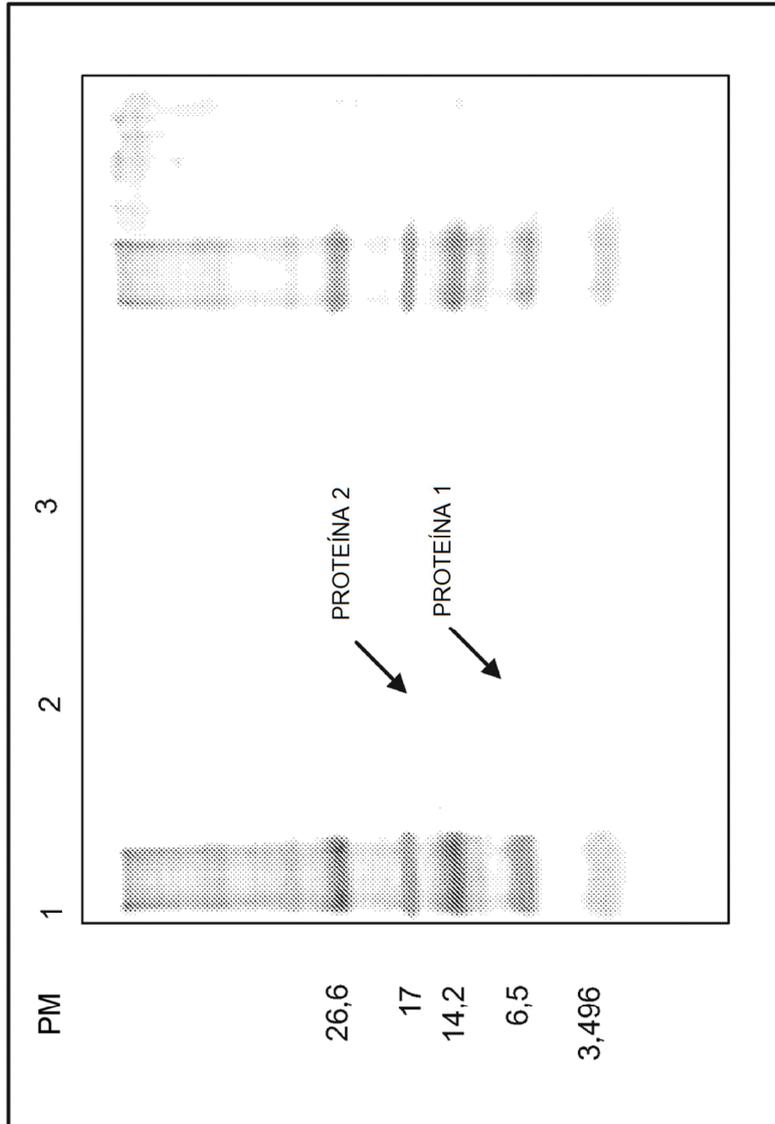


FIG. 12

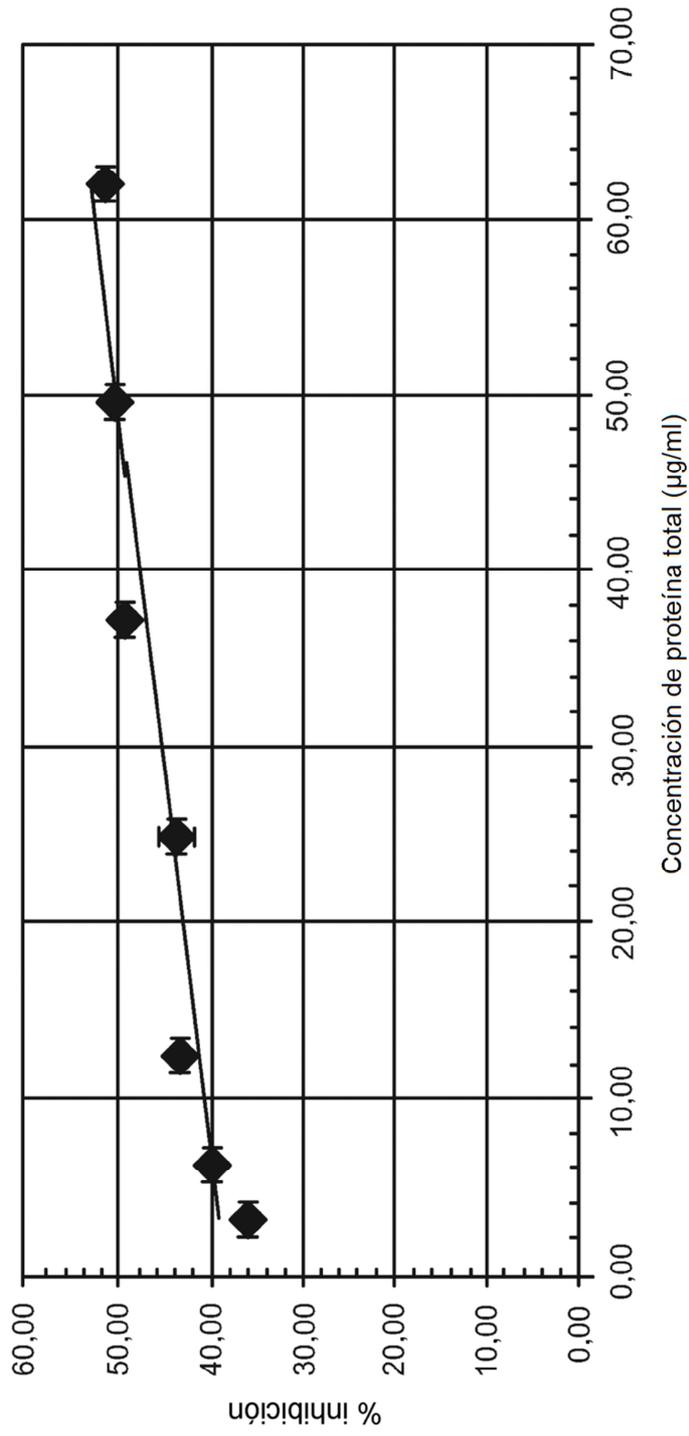


FIG. 13

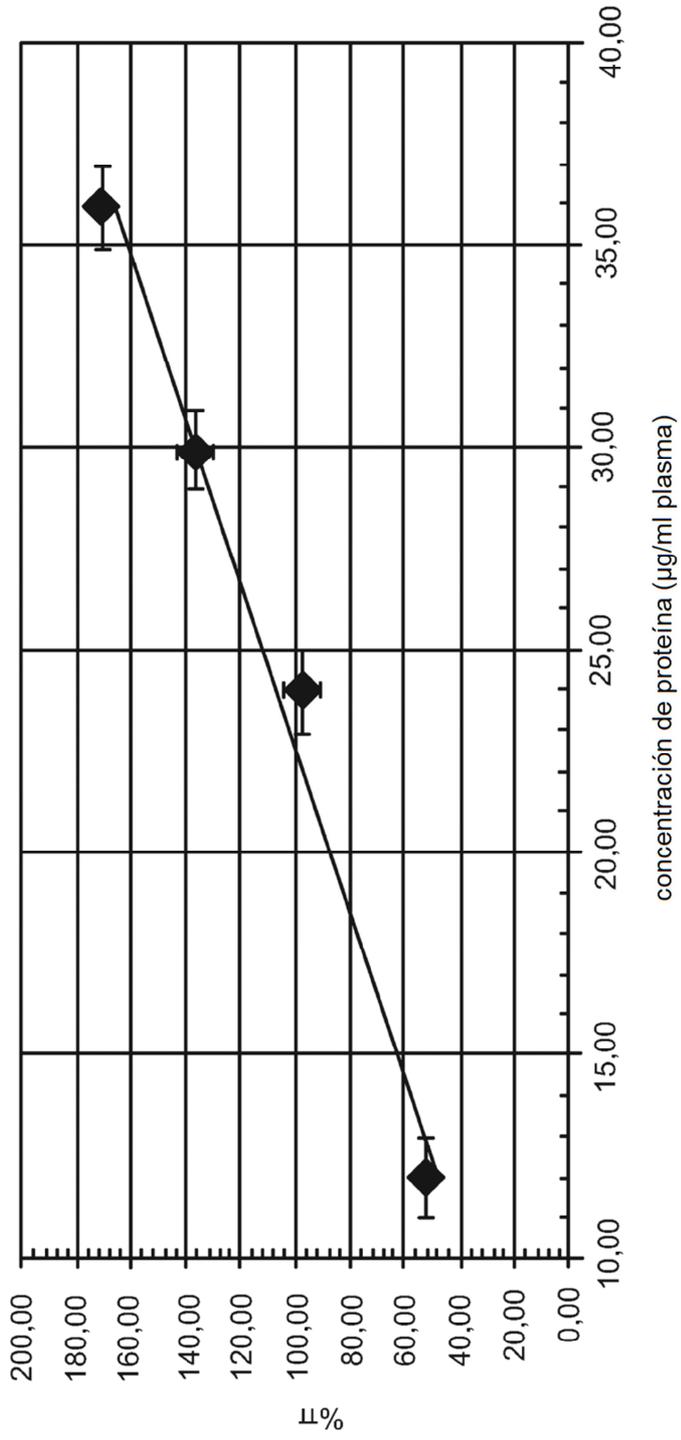


FIG. 14

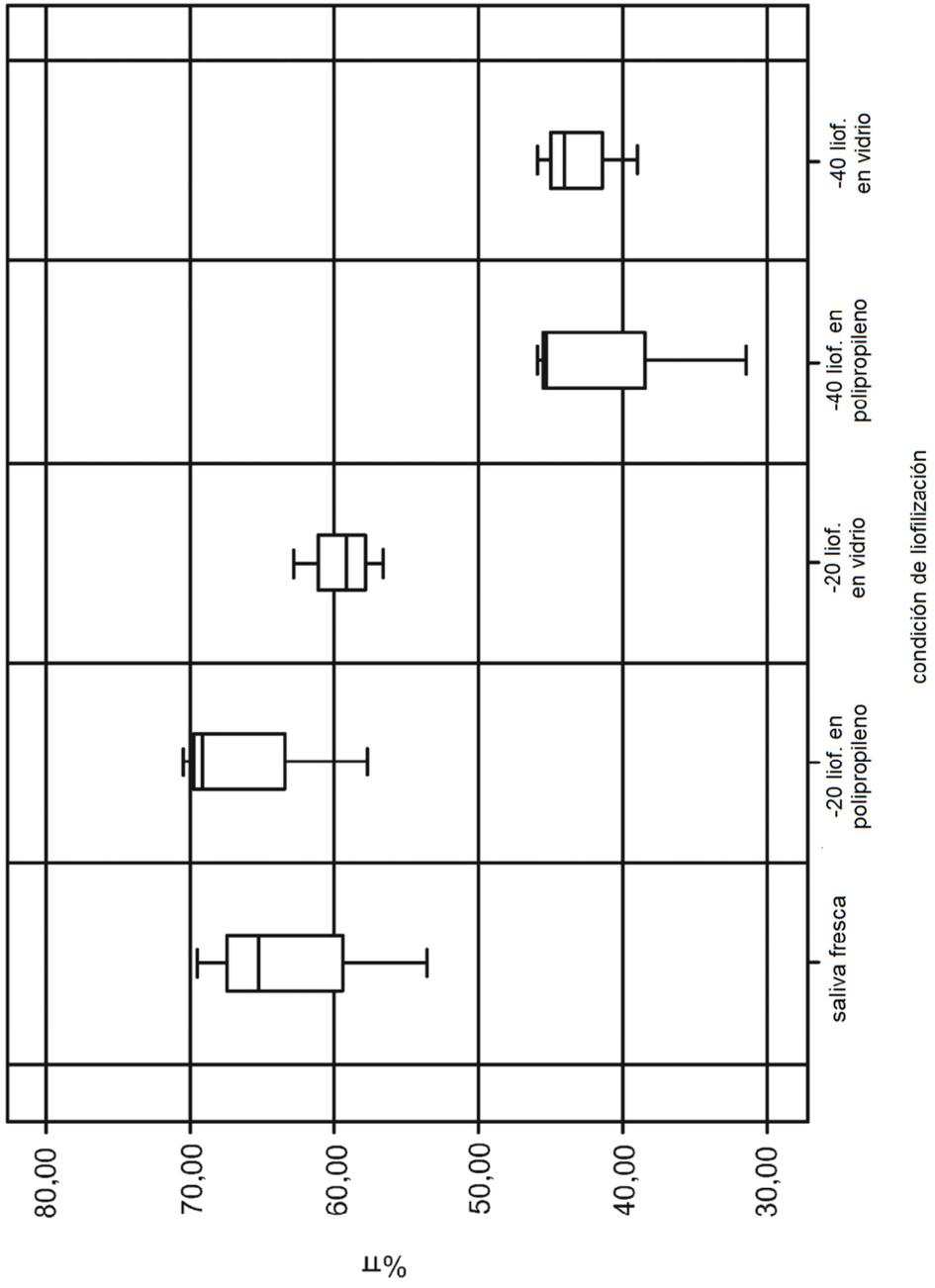


FIG. 15

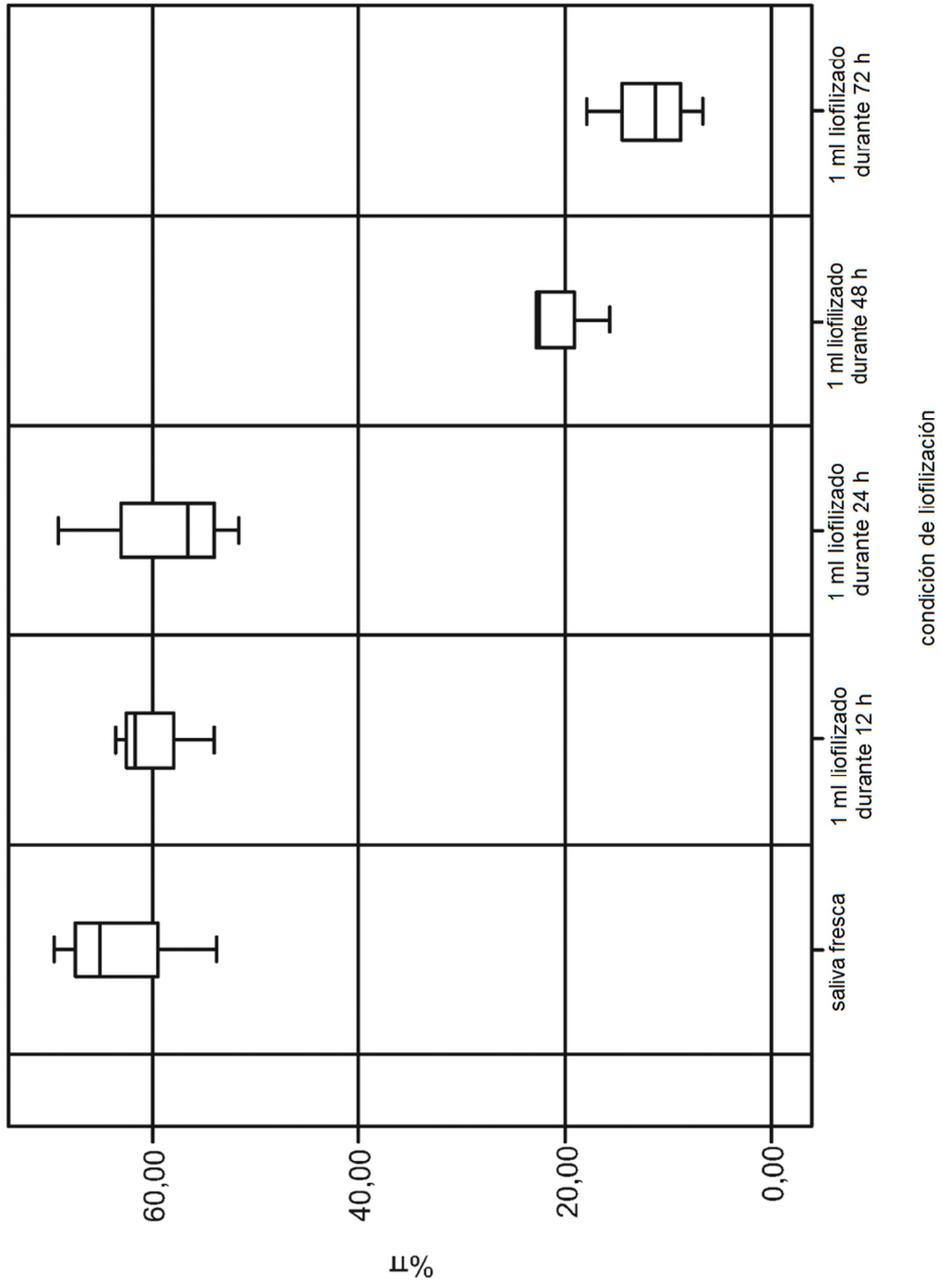


FIG. 16

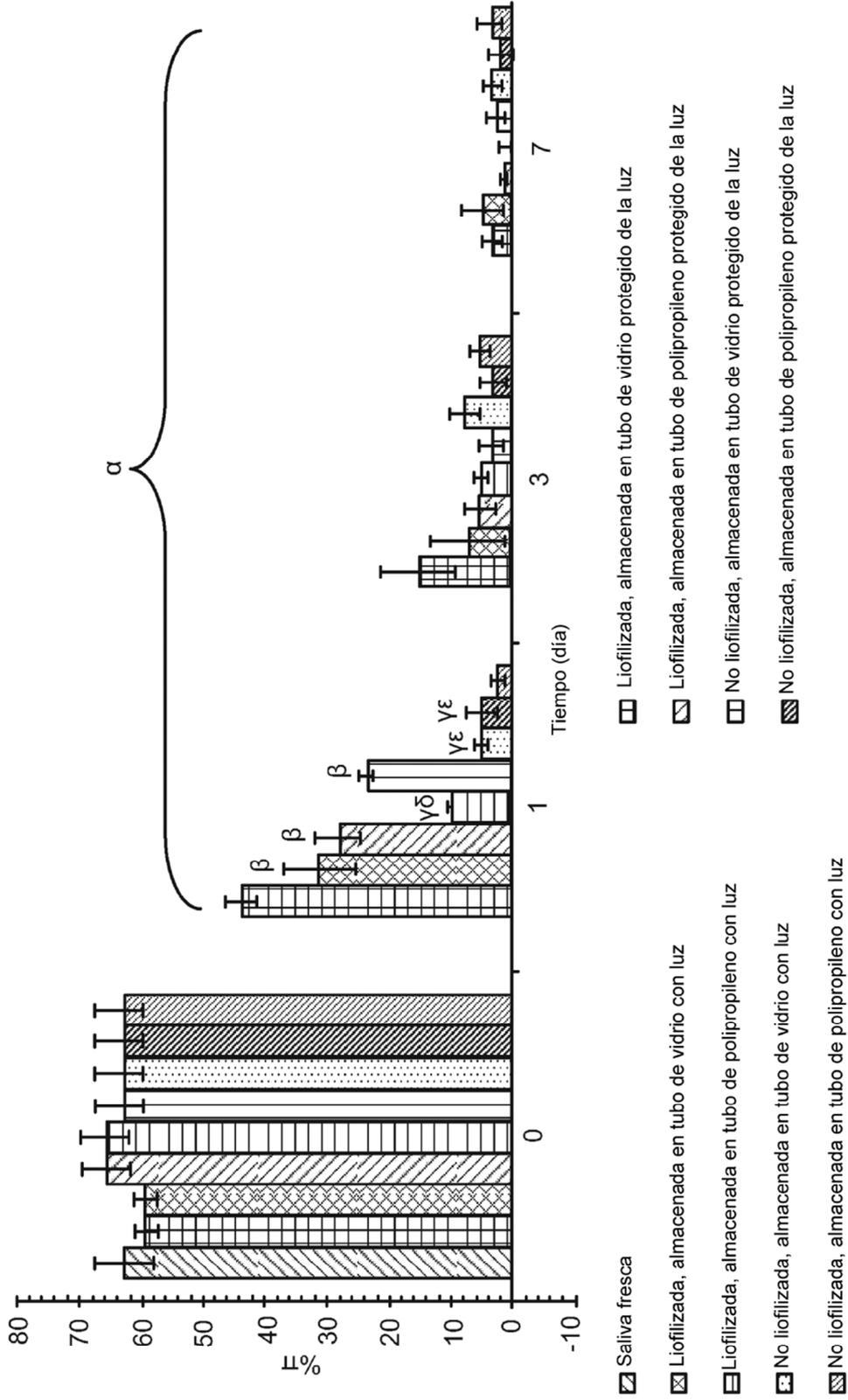


FIG. 17

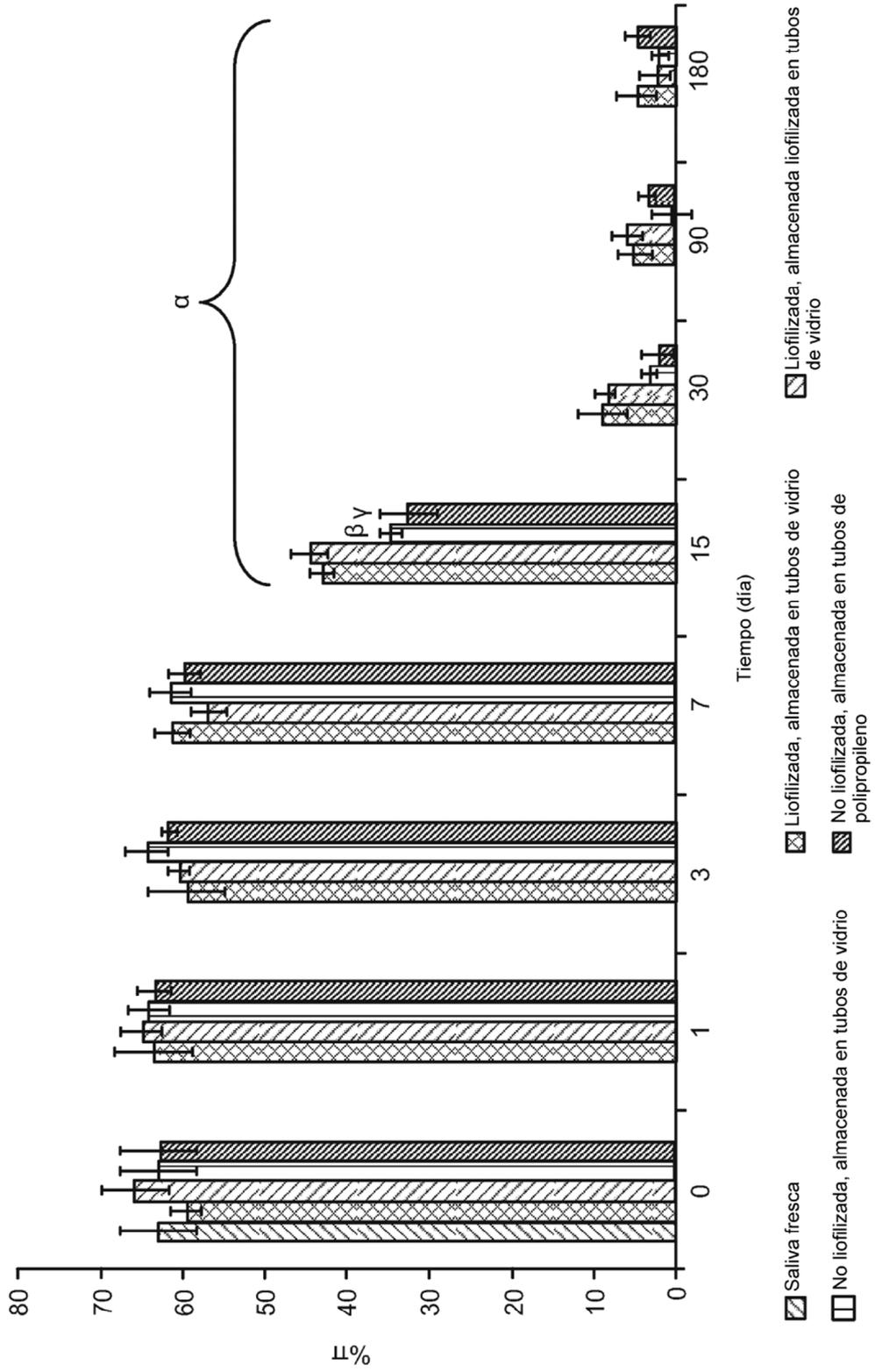


FIG. 18

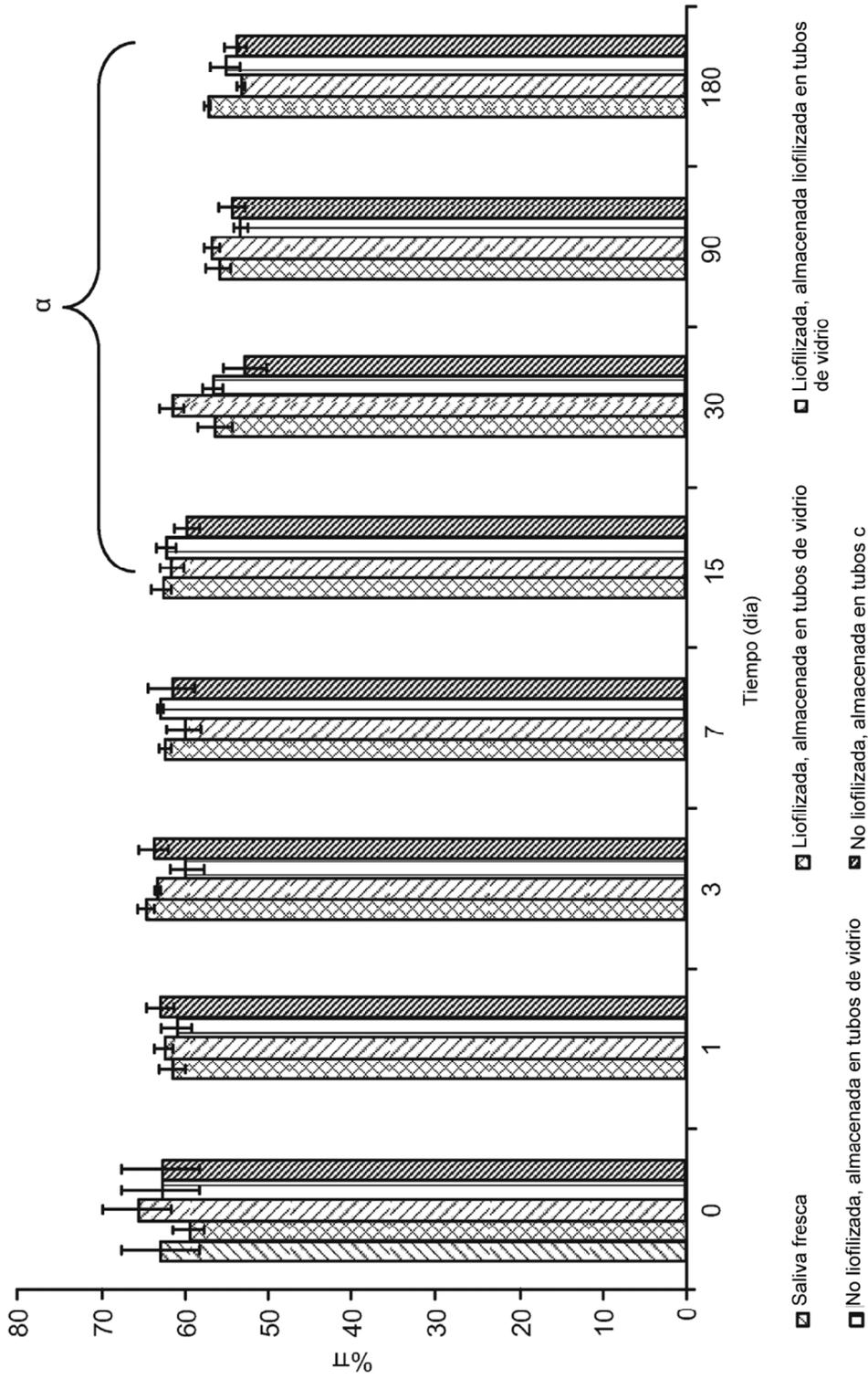


FIG. 19

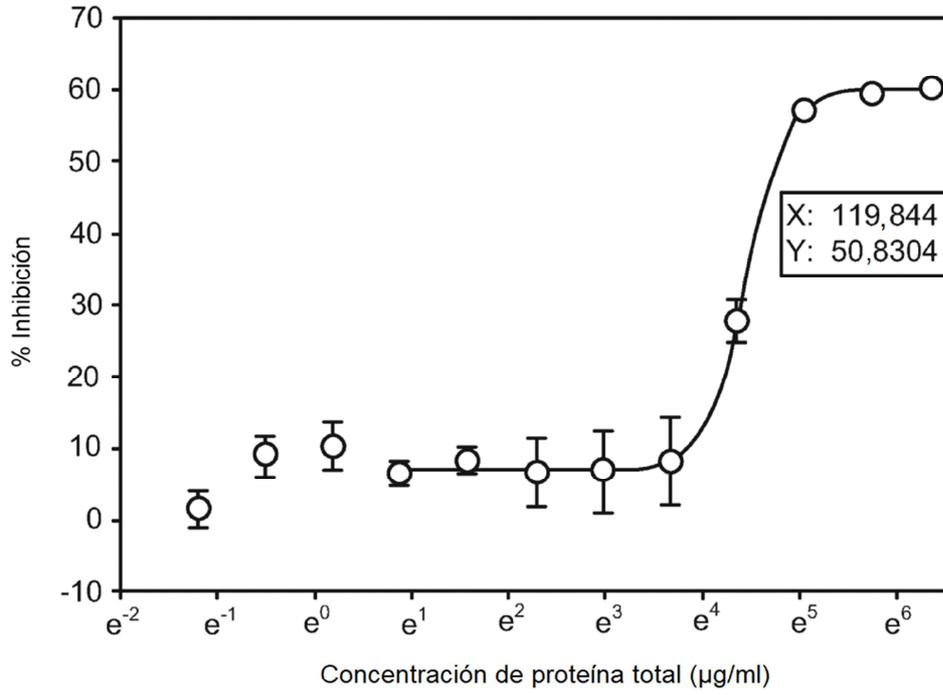


FIG. 20

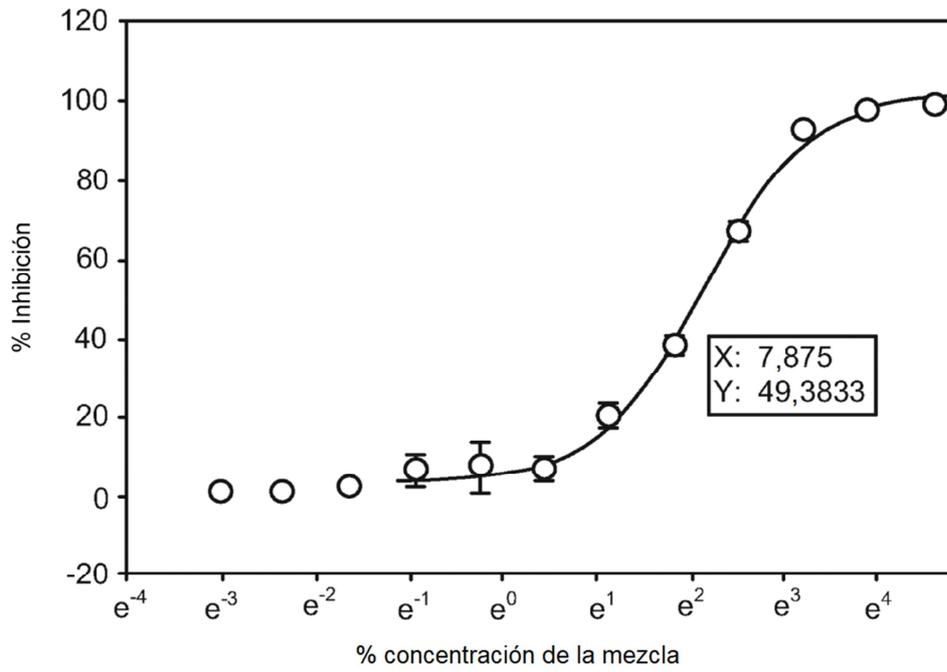


FIG. 21

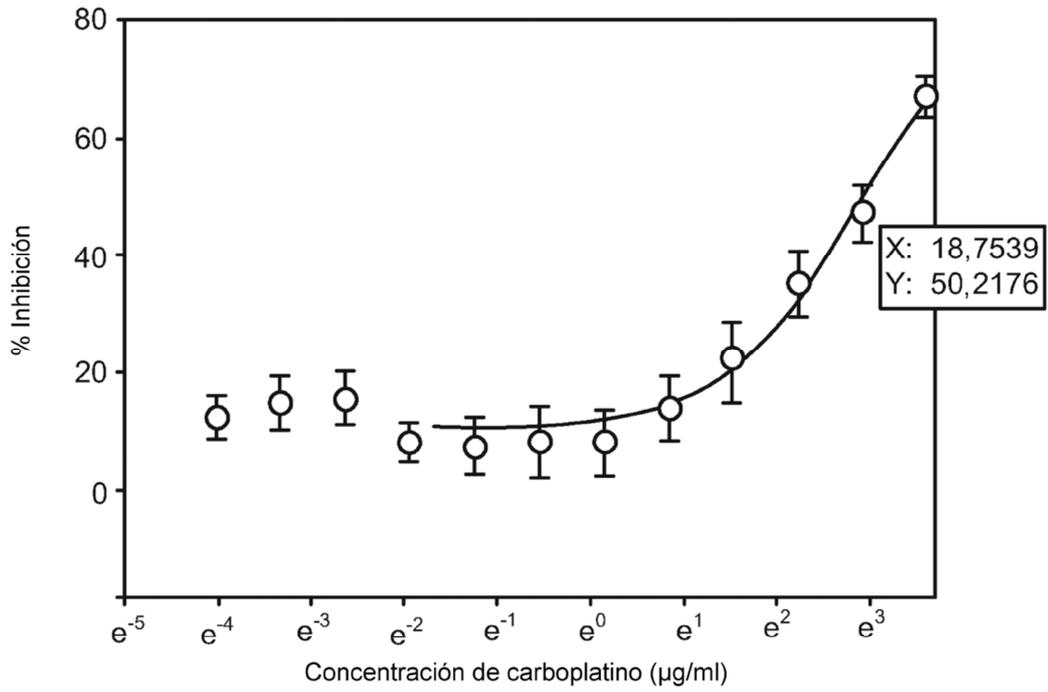


FIG. 22

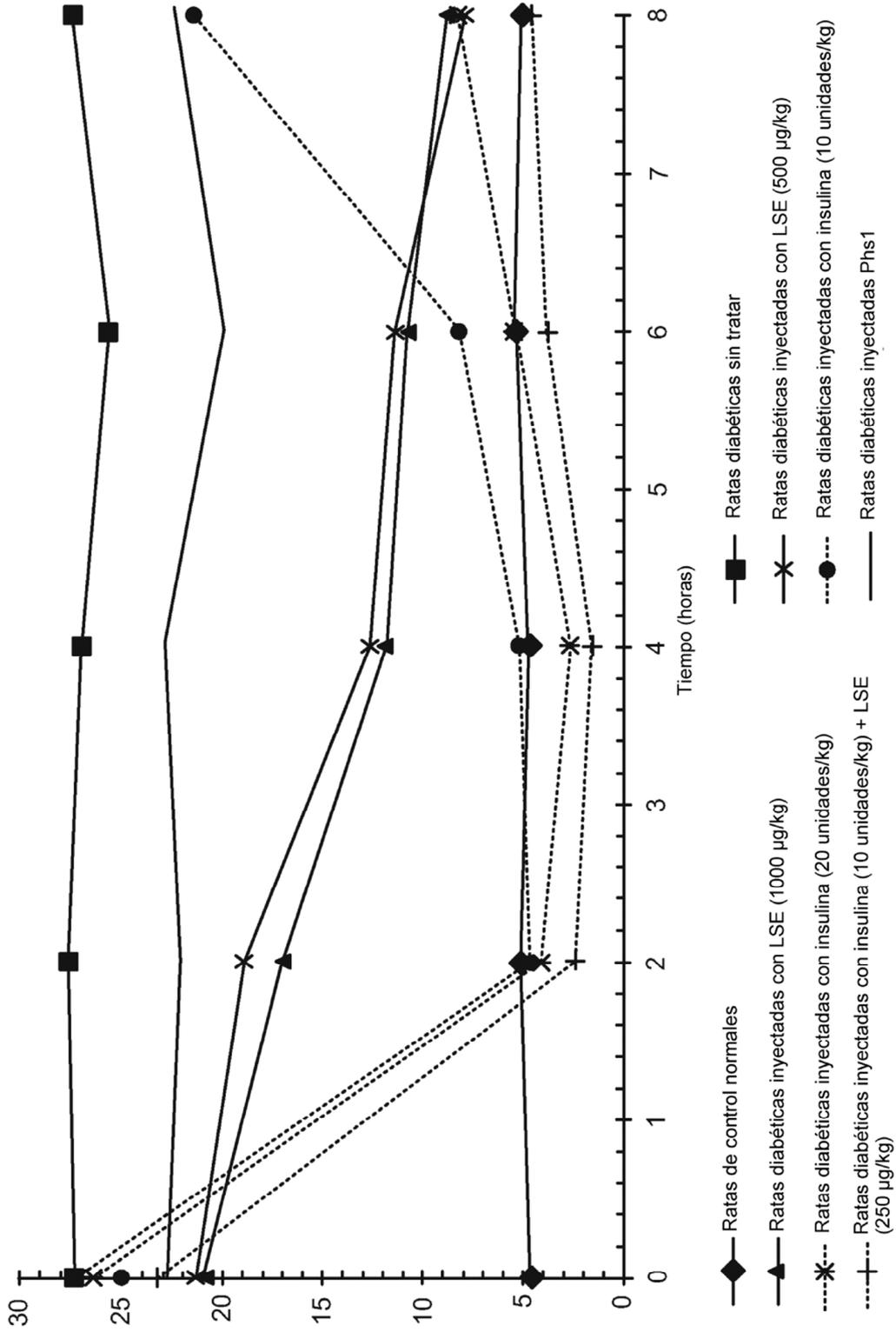


FIG. 23

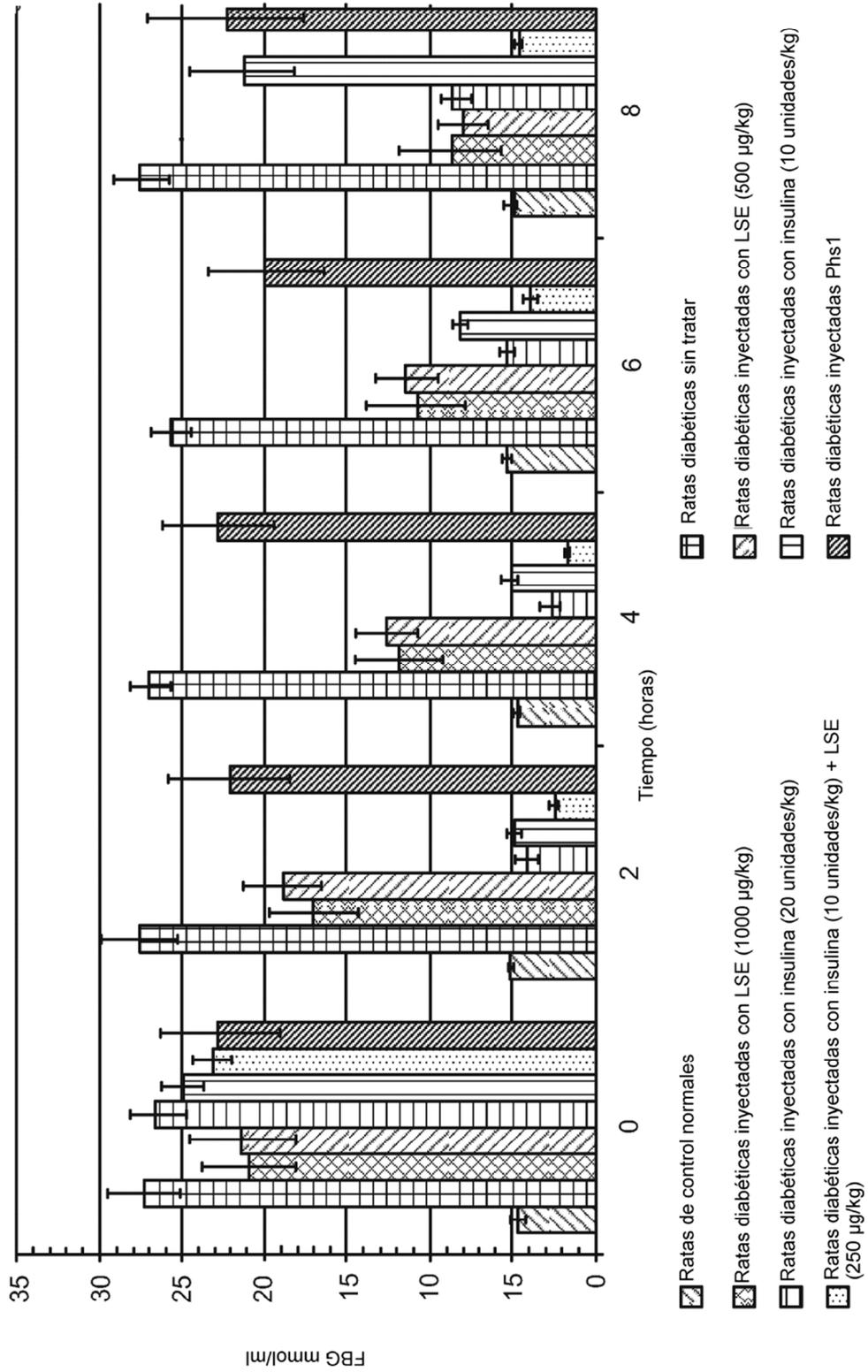


FIG. 24

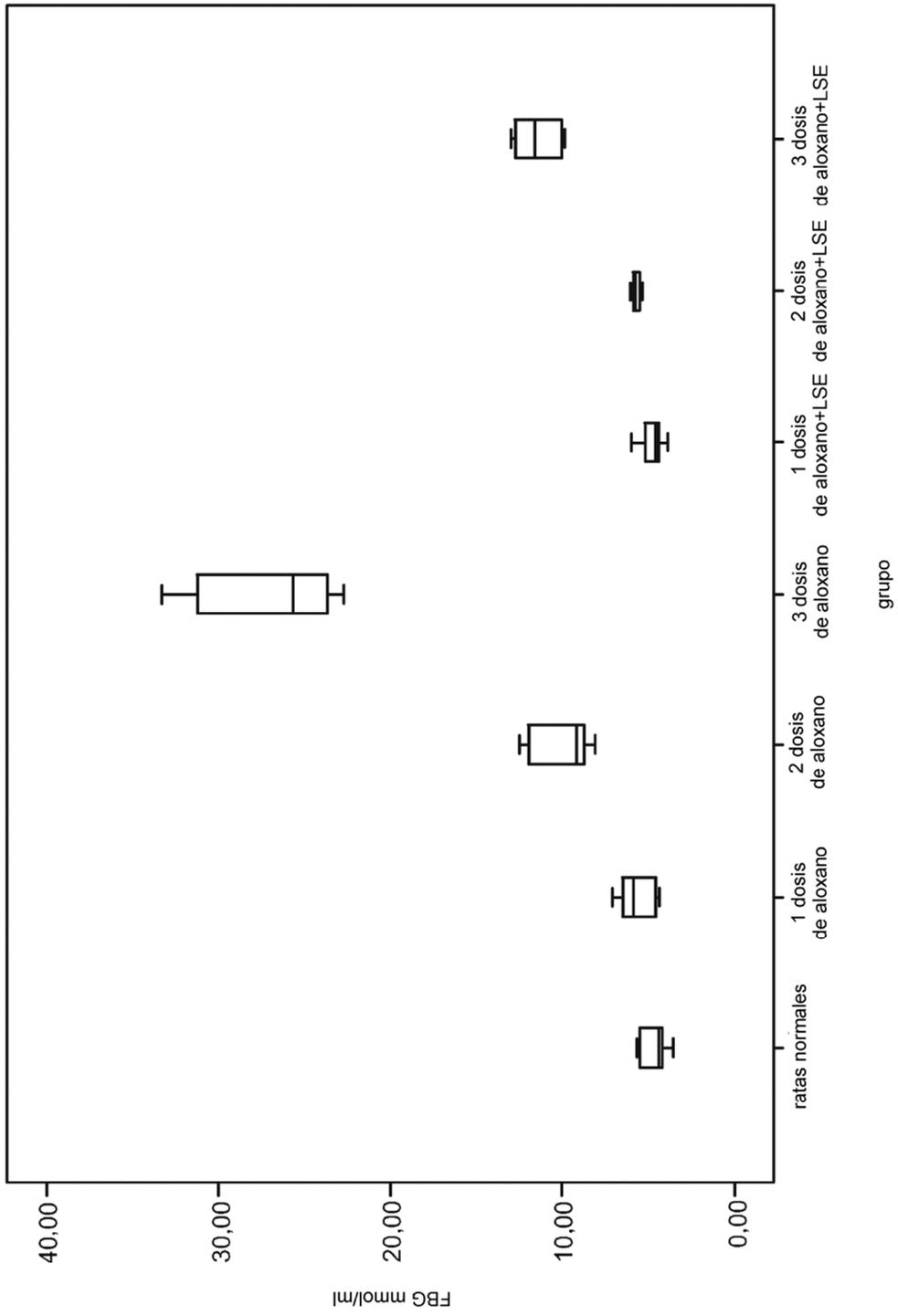
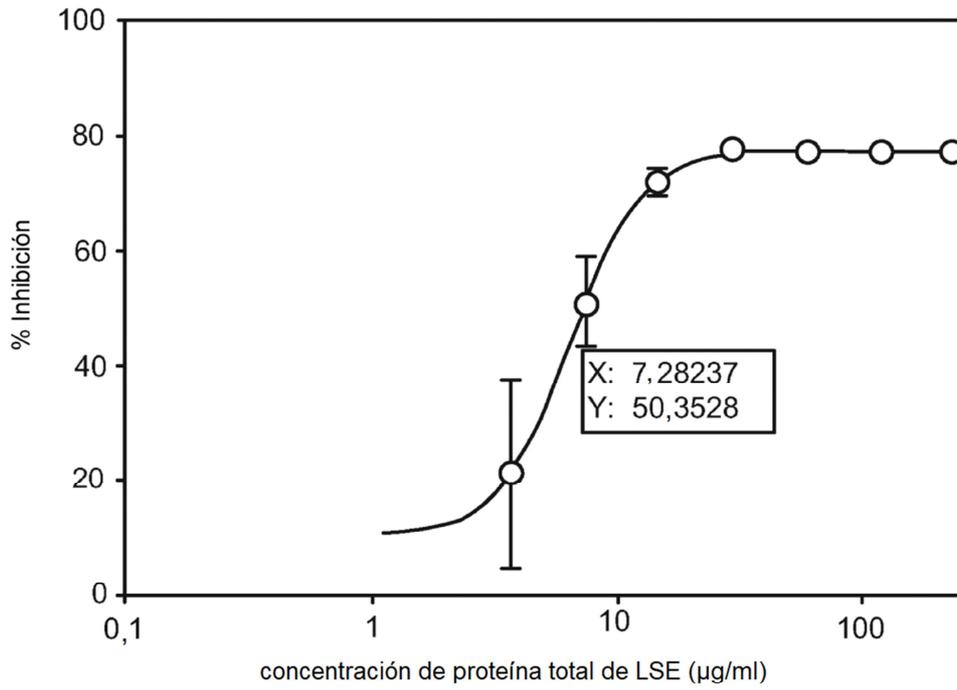
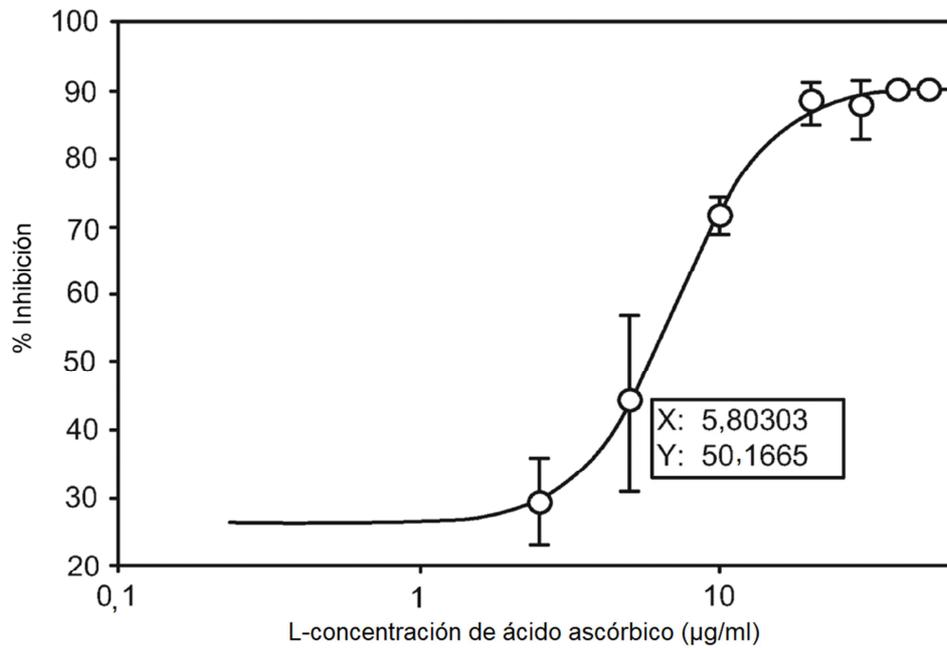


FIG. 25



**FIG. 26**



**FIG. 27**