

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
ABOGADOS
AGENTES DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Carrera 8 No. 93-09
Bogotá-Colombia

49

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01110779 00000002 Folios: 43
Fecha (AMD): 2002-03-18 14:14:46
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 01.110.779

Solicitud de Patente de Invención para:

**"COMBINACION FARMACEUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO TISULAR
DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUINEA ARTERIAL"**

Solicitante: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

PRESENTACION DE DOCUMENTOS

Yo, MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al plé de mi firma, en atención a su auto No. 09160 Notificado por Estado el 7 de Marzo de 2002, atentamente me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera :

1. Presentación de los documentos faltantes:

De acuerdo con la solicitud del examinador de la Patente de Invención citada en la referencia, atentamente me permito presentar los siguientes documentos:

- La copia certificada del documento de prioridad cubano No. 2001/0005 del 3 de Enero de 2001.**

- Copia auténtica del documento de Cesión de los Inventores, debidamente legalizado hasta por el Cónsul de Colombia.

2. Respuesta a las observaciones del funcionario examinador.

- En cuanto a los formatos establecidos en la circular única, nos permitimos manifestar a usted que actualizaremos los formatos, para futuras solicitudes de Patente de Invención.
- Le confirmamos que el lugar de constitución de la sociedad solicitante de esta Patente de Invención es La REPUBLICA DE CUBA, tal y como consta en la fotocopia auténtica del poder que anexe a la solicitud. Adjunto copia simple del poder.

Cumplido así con lo dispuesto, atentamente solicito a Ud. se continúe con el trámite correspondiente a esta solicitud de Patente de Modelo de Utilidad.

Del Señor Jefe,

Margarita Castellanos
Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.854 de Usaquén
T.P.A. No. 70819 del C. Sup. de la Judicatura
Carrera 9 No. 93 - 09 - Santa Fe de Bogotá
Teléfonos: 610 74 80 y 610 74 60

Bogotá, D.C.,
MCA/gcb/4834

18 MAR. 2002



REPÚBLICA DE CUBA



Ing. María de los Ángeles Sánchez Torres, Directora General de la OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número cinco del año dos mil uno del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO TISULAR DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL**, con fecha tres de enero de dos mil uno, a las cuatro horas y catorce minutos pasado meridiano, por Olga Lidia Moreno Samper, Agente Oficial, ciudadana cubana, a nombre y en representación de **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**, cuya invención fue creada por Jorge Berlanga Acosta; Gerardo E. Guillén Nieto; Diana García del Barco Herrera; Julio Raúl Fernández Masso; Mario Pablo Estrada García; Isabel Guillén Pérez; José Suárez Alba y Rebeca Martínez Rodríguez.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva y las Reivindicaciones que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Omar López Ocajo, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veintiocho días del mes de enero de dos mil dos.


Ing. María de los Ángeles Sánchez Torres
Directora General

RESUMEN

**COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO
TISULAR DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL.**

5

10

La presente invención se relaciona con la medicina humana y en particular con una combinación farmacéutica de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y un péptido mimético del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GHRP), la cual es útil en la prevención y/o restauración del daño tisular que se provoca por falta de irrigación sanguínea a un órgano determinado debido a diferentes condiciones patológicas.

15

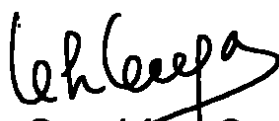
La mencionada combinación puede ser empleada dentro de una misma composición farmacéutica o aplicarse a un mismo individuo por separado como parte de un único tratamiento que favorece la vitalidad celular en órganos cuando estos son sometidos a privación parcial o totalmente del suministro de sangre oxigenada durante un período tiempo. Esta combinación también atenúa la formación de especies y metabolitos tóxicos en dichos órganos, por lo que es particularmente útil en tejidos sometidos a prolongados períodos de isquemia.

20

La combinación farmacéutica puede ser aplicada además con carácter profiláctico en sujetos con entidades que pueden conducir a la disfunción o daño múltiple de órganos de diverso origen como quemados, politraumatizados, síndrome de distress respiratorio, neonatos hipóxicos, shock hipovolémico, enterocolitis necrotizante, así como a sujetos sometidos a grandes intervenciones quirúrgicas.

25

30


Lic. Omar López Ocejo
Representante Legal, CIGB



A

MEMORIA DESCRIPTIVA

COMBINACIÓN FARMACEUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO TISULAR DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL.

5

La presente invención se relaciona con la medicina humana y en particular con una combinación farmacéutica de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y un péptido mimético del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GHRP), la cual es útil en la prevención y/o restauración del daño tisular que se provoca por falta de irrigación sanguínea a un órgano determinado debido a diferentes condiciones patológicas.

10

Todos los órganos y tejidos animales y humanos son susceptibles a daños letales irreversibles como consecuencia de la privación parcial o total del suministro de sangre arterial o del fracaso del drenaje venoso. En tales casos, se desencadena una cascada de eventos fisiopatológicos cuya expresión final es frecuentemente la muerte celular, que irrevocablemente compromete la función del órgano o la vida del sujeto.

15

La formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) es un constituyente fisiopatológico de numerosos procesos que cursan con estados de hipoperfusión hística, isquemia-reperfusión, o inflamación (peritonitis, pancreatitis, etc), así como grandes traumas, quemaduras, hipovolemia aguda y en procedimientos quirúrgicos de revascularización y trasplante de órganos. En el proceso isquemia-reperfusión se manifiesta la importancia de las EROs y la peroxidación de los lípidos de las membranas en dichos procesos patológicos. (T. D. Lucas y I. L. Szweda. Cardiac reperfusion injury: ageing, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95 (2): 510-514)

20

25

La consecuencia inmediata más importante de la isquemia es la depleción del ATP celular (Burns TA, Davies RD, McLaren JA, Cerundolo L, Morris JP, Fuggle VS. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. Transplantation. 1998, 66 (7): 872-876).

30

Durante el proceso isquémico las reservas de ATP son degradadas a hipoxantina y luego a xantinas, que constituyen sustratos de la xantina oxidasa (XO). La abrupta entrada de abundante cantidad de oxígeno durante la reperfusión, provoca la oxidación de las purinas generadas durante la isquemia en una reacción catalizada por la XO, proceso mayoritariamente responsable de la generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en la fase de reperfusión (Paller MS, Hoidal JR, Ferris JE. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. J Clin Invest 1994, 74: 1156-1164).

Otros dos eventos básicos contribuyen a la formación de las EROs y a complicar la hemodinámica de la microvasculatura; estos son: la activación de las células endoteliales, y el reclutamiento / adhesión intravascular de neutrófilos circulantes (Redl H, Gasser H, Hallstrom S, Schlag G. Radical related cell injury. In Pathobiology of shock, sepsis and organ failure. G. Schlag, H. Redl, editors. Springer-Verlag, Heidelberg. Germany 1993, 92-110).

Las células endoteliales de la microvasculatura sobre-expresan marcadores pro-inflamatorios que incluyen a las citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, factores pro-coagulantes y agentes vasoactivos (Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule 1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells: essential roles of a variant NF-kB site and p65 homodimers. J Biol Chem 1995, 270: 933-943).

Las EROs son responsables de la activación del NF-kB en las células inflamatorias infiltrantes (Conner EM, Brand SJ, Davis JM, Kang DY, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators, and modulators of gene expression. Inflamm Bowel Dis 1996, 2: 133-147), en tanto que la infiltración de los tejidos hipóxicos por neutrófilos activa el sistema de la enzima mieloperoxidasa (MPO), lo cual incrementa de modo significativo el daño celular (Kurose I, Argenbright LW, Wolf R, Lianxi L, Granger DN. Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. Am J Physiol 1997, 272: H2976-H2982). En este ambiente hostil la pared endotelial

X

65

resulta lesionada, se activan los mecanismos trombogénicos locales y fracasa la microcirculación, lo que resulta en el agravamiento del proceso de base por la cascada de amplificación de los daños que se producen.

La consecuencia biológica más importante de la hipoxia o anoxia por isquemia, es la inviabilidad parcial o total de un tejido u órgano. La muerte celular en este evento ocurre por necrosis y/o apoptosis. Estas formas de muerte celular pueden coexistir en un mismo tejido, y en la misma ubicación topográfica (Tredger MJ. Ischaemia-reperfusion injury of the liver: treatment in theory and practice. *Biofactors* 1998, 8 (1-2): 161-164). La viabilidad de los tejidos depende también de factores relacionados con la integridad del endotelio (Collard DC, Agah A, Stahl LG. Complement activation following reoxygenation of hypoxic human endothelial cells: role of intracellular reactive oxygen species, NF-kappaB and new protein synthesis. *Immunopharmacology* 1998, 39 (1): 39-50). Los fenómenos relacionados con la hiperreactividad del endotelio y las células inflamatorias, y la consecuente liberación de óxido nítrico, citoquinas y agentes pro-inflamatorios, así como de sustancias modificadoras del tono vascular y la hemodinámica, constituyen componentes etiopatogénicos del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y de la disfunción múltiple de órganos (Kowal-Vern A, McGill V, Gamelli RL. Ischemic necrotic bowel disease in thermal injury. *Archives of Surgery* 1997, 132 (4): 440-443).

La enfermedad por quemadura, el shock hipovolémico, los politraumas, son entidades frecuentes en urgencias médicas y el reto más grande en cuanto al cuidado intensivo e intervención multidisciplinaria que se demanda para salvar la víctima. En el quemado por ejemplo, el evento de isquemia-reperfusión del intestino delgado, parece ser el responsable de la instauración del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Wang P, Ba ZF, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Is gut the "motor" for producing hepatocellular dysfunction after trauma and hemorrhagic shock?. *Journal of Surgical Research* 1998, 74: 141-148). El fracaso de la función intestinal de barrera tiene especial significado clínico por ser este órgano la frontera entre un lumen séptico / tóxico y el medio interno (Sheridan RL, Ryan CM, Yin LM, Hurley J, Tompkins RG. Death in the burn unit. Sterile multiple organ failure.

7

Burns 1998, 24 (4): 307-311). Hallazgos clínicos y experimentales, han demostrado la importancia que tiene la preservación de una adecuada perfusión y del trofismo de la mucosa intestinal para la conservación de su integridad (Tabata T, de Serres S, Meyer AA. Differences in IgM synthesis to gut bacterial peptidoglycan polysaccharide after burn injury and gut ischemia. Journal of Burn Care and Rehabilitation 1996, 17 (3): 231-236). Evidencias recientes consideran al intestino como un órgano generador de citoquinas, y al parecer la respuesta inflamatoria local o sistémica puede ser desencadenada incluso en ausencia de bacterias en la circulación.

La disfunción múltiple de órganos, constituye la primera causa de muerte en pacientes sometidos a cuidados intensivos y es la mayor complicación del quemado, provocando hasta un 70% de mortalidad en unidades especializadas.

Con el objetivo de reducir la muerte celular en procesos de isquemia-reperfusión de algunos órganos, una amplia gama de compuestos naturales o sintéticos, purificados o recombinantes se han ensayado a nivel preclínico y en algunos casos se ha llegado hasta fases clínicas. Para el caso particular de la isquemia intestinal se han ensayado experimentalmente inhibidores de la angiotensina II (Tadros T, Taber DL, Heggors JP, Hemdon DN. Angiotensin II inhibitor DuP753 attenuates burn and endotoxin-induced gut ischemia, lipid peroxidation, mucosal permeability and bacterial translocation. Ann Surg 2000; 231: 566-576), antagonistas del factor activador de plaquetas (Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A, Andersson R Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats.. Dig Surg 2000; 17: 57-65), estimulantes de la producción de óxido nítrico (Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue DT. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. J Surg Res 2000; 89: 13-19), así como agentes antioxidantes como el alopurinol, y en combinación con las vitaminas C y E (Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of allopurinol plus antioxidant combination. Can

✓

J Surg 1999; 42: 427-431). Sin embargo, las estrategias orientadas a estimular los mecanismos naturales de autoprotección celular son escasas (Pialli SB, Hinmn CE, Luquette MH, Nowicki PT, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor protects rat intestine from ischemia / reperfusion injury. J Surg Res1999; 87: 225-231).

El severo deterioro morfofuncional que experimenta el riñón ante la isquemia, ha motivado la evaluación del efecto nefroprotector de algunos agentes sintéticos como los denominados lazaroides, que en general parecen mitigar los daños y la disfunción renal post-reperfusión (De Vecchi E, Lubatti L, Beretta C, Ferrero S, Rinaldi P, Galli K M, Trazzi R, Paroni R. Protection from renal ischemia-reperfusion injury by the 2-methylaminochroman U83836. Kidney Int 1998, 54: 857-863). Otros han estudiado el potencial efecto nefroprotector de la administración de teofilina como agente antagonista de los receptores de adenosina (Jenik AG, Ceriani JM, Gorenstein A, ramirez JA, vain N, Armadans M, Ferraris JR. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effect of theophylline on renal function in term neonates with perinatal asphyxia. Pediatrics 2000; 105: E45).

La administración del péptido natriurético atrial (Auriculin) no redujo la mortalidad en pacientes aquejados de fallo renal agudo de origen isquémico, como tampoco se redujo el número de complicaciones en órganos distantes (Weisberg LS, Allgren RL, Genter FC, Kumik BR. Cause of acute tubular necrosis affects its prognosis. The Auriculin Anaritide Acute Renal Failure Study Group. Arch Intern Med 1997; 157: 1833-1839). Un efecto nefroprotector debido a su actividad biológica intrínseca ha sido descrito al administrar una elevada dosis de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en pacientes receptores de aloinjertos renales (Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Messmer K, land W. The impact of free-radical mediated reperfusión injury on acute and chronic rejection events following cadaveric renal transplantation. Clin Transpl 1993; 219-232).

Un efecto beneficioso de la administración sistémica del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento transformante tipo alfa (TGF- α)

en el tratamiento del fallo renal agudo de origen isquémico y tóxico, ha sido ilustrado en el documento de patente US 5,360,790.

Aunque la administración parenteral de factores de crecimiento con efecto nefroprotector ha sido frecuentemente exitosa en modelos experimentales de
5 daño renal isquémico, no se han obtenido resultados alentadores en el orden clínico. En un ensayo multicéntrico encaminado a evaluar la eficacia de la administración del factor de crecimiento tipo insulínico-I (IGF-I) en pacientes con fallo renal agudo, incluido el de etiología isquémica, no se demostró
10 eficacia con relación al grupo tratado con el placebo (Hirschberg R, Kopple J, Lipsett P, Benjamin E, Minei J, Albertson T, Munger M, Meztler M, Zaloga G, Murray M, Lowry S, et al. Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. *Kidney Int* 1999;55:2423-2432). En otro ensayo clínico independiente para la misma condición renal empleando IGF-I nuevamente, el tratamiento no mostró la
15 eficacia esperada y el estudio fue detenido antes de su conclusión (Kopple JD, Hirschberg R, Guler HP, Pike M, and Chiron Study Group: lack of effect of recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in patients with acute renal failure (ARF). *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1375).

Las limitadas posibilidades técnicas alcanzadas hasta el presente para la
20 adecuada conservación de los órganos y tejidos, constituyen la primera limitante de disponibilidad y acceso a nuevos órganos. Otra complicación reside en el hecho que algunos agentes empleados para la conservación ex-vivo de los órganos han mostrado efectos contradictorios (Schlumpf-R; Candinas-D; Weber-M; Rothlin-M; Largiader-F. Preservation of kidney
25 transplants with a modified UW solution initial clinical results. *Swiss-Surg.* 1995(4): 175-80; discussion 180-1); y aún el deterioro del órgano al ser implantado en el receptor, constituye la primera causa del fracaso del trasplante luego del tratamiento con inmunosupresores (Barber E, Menéndez S, León OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, and Bocci V.
30 Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. *Mediators of Inflammation* 1999; 8: 37-41). Otra contrapartida a los métodos actuales para la conservación de órganos reside en su interferencia con los mecanismos de agregación plaquetaria, lo que se

asocia a sangramientos profusos (Salat A, Mueller MR, Boehm D, Stangl P, Pulaki S, Laengle F . Influence of UW solution on in vitro platelet aggregability Transpl-Int. 1996; 9 Suppl 1: S429-431). Una limitante hasta el presente en el trasplante de algunos órganos, es el vasoespasmo y la trombosis en el

5 órgano post-reperfundido (Jeng-LB; Lin-PJ; Yao-PC; Chen-MF; Tsai-KT; Chang-CH. Impaired endothelium-dependent relaxation of human hepatic arteries after preservation with the University of Wisconsin solution. Arch-Surg. 1997 Jan; 132(1): 7-12). En resumen, aún no se dispone de métodos o formulaciones para garantizar una efectiva protección celular ante la

10 isquemia, siendo muchos de estos agentes altamente costosos y poco eficaces (Rentsch M, Post S, Palma P, Gonzalez AP, Menger MD, Messmer K. Intravital studies on beneficial effects of warm Ringer's lactate rinse in liver transplantation. Transpl-Int. 1996; 9(5): 461-7). El fracaso de estos ensayos clínicos con IGF-1 en la nefroprotección isquémica ha alimentado la hipótesis

15 de que la administración de un único factor de crecimiento es incapaz de prevenir o atenuar los daños consecuentes del evento isquémico; en tanto que se ha enfatizado en la necesidad de formulaciones combinadas de diferentes péptidos con efecto protector (Playford RJ. Peptides and gastrointestinal mucosa integrity. Gut 1995, 37: 595-597).

20 La prevención ejercida por la administración sistémica del factor de crecimiento epidérmico (EGF) contra los daños tisulares siguientes al episodio isquémico ha sido descrita previamente en la patente europea número EP 0 357 240 B1. No obstante dicho efecto de neuroprotección ejercido por de dicha molécula sólo se logra con dosis tan elevadas como 1 mg/kg. Una dosis

25 inferior (de 0.1 mg/kg) aún resulta alta, y su efecto terapéutico de protección es considerado modesto por los inventores. Ello impone varias limitantes a dicha invención, la primera por el elevado costo del tratamiento, teniendo en cuenta que el efecto se logra con inyecciones repetidas (entre 4 y 5 administraciones en diferentes períodos en un modelo animal). Esto significa

30 que un humano adulto con un peso promedio de 70 kg consumiría 70 mg del agente activo en una sola instilación, la que no sería clínicamente efectiva. La segunda limitante de la invención es de tipo farmacológico. Los ejemplos mostrados (se limitan sólo a neuroprotección central) evidencian una estrecha

ventana terapéutica del EGF para el efecto neuroprotector deseado, es decir no se llega a establecer una dosis efectiva media (ED_{50}), en tanto que el margen terapéutico es tan estrecho que no le permite al inventor establecer una curva dosis-respuesta. Una tercera limitante se relaciona con el riesgo de toxicidad a que se expone el paciente con la dosis de 1 mg/kg, entre otros riesgos, es conocido que elevadas dosis de EGF deprimen el ritmo cardíaco, alteran la hemodinámica central (Keiser JA, Ryan NJ. Hemodynamic effect of EGF in conscious rats and monkeys. PNAS USA 1996; 93(10): 4957-4961), y pueden inhibir el ciclo celular (Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. Am J Surg 1993, 165:728-737). Finalmente la eficacia de la invención es cuestionable debido a la incapacidad del EGF y otros factores de crecimiento polipeptídicos para atravesar la barrera hemato-encefálica. El potencial efecto protector de una intervención profiláctica pre-isquémica con EGF en episodios de isquemia parcial o total, seguida por reperfusión en intestino delgado e hígado parece no haber sido establecido.

Estudios precedentes han demostrado que la administración parenteral de EGF, ejerce un efecto protector en diferentes tejidos y órganos internos contra el daño producido por la interrupción abrupta del riego sanguíneo arterial. Similarmente se demostró cierto efecto de protección en algunos órganos internos de animales expuestos a sustancias químicas cuyo mecanismo de acción involucra la interrupción de la síntesis de ATP y la formación de EROs. Estos hallazgos permitieron adjudicar al EGF un efecto antioxidante. La administración reiterada de EGF luego de establecido el daño tisular provocado por isquemia local o por agentes tóxicos, favorece la regeneración morfológica y en ocasiones funcional en algunos tejidos de forma parcial. No obstante, tanto el efecto de protección profiláctica como de regeneración sólo se observan cuando el factor es administrado en dosis elevadas, y aún con un reducido margen terapéutico. Para algunos órganos más sensibles a la isquemia como el riñón, los efectos protectores de tales dosis son modestos. El efecto de protección descrito para el EGF se observa sólo si el tiempo de isquemia es menor que 60 minutos. En períodos de isquemia más prolongados, no se detecta efecto de protección. Esta constituye una

situación limitante para el uso del EGF por sí sólo como agente protector en el episodio de isquemia-reperfusión, en tanto que en la práctica médica esta ventana de eficacia temporal es poco útil. En otro orden, la estimulación de los eventos regenerativos en algunos órganos, sólo es posible si se emplean esquemas de administración parenteral reiterada de dosis relativamente elevadas de EGF. Los resultados sobre este efecto regenerador no siempre han sido alentadores, lo que refuerza el concepto de la necesidad de terapias combinadas o multivalentes para lograr una apropiada restitución morfofuncional del órgano luego del daño isquémico. La ineffectividad del EGF en este enfoque terapéutico puede relacionarse con su rápido aclaramiento y eliminación a los pocos minutos luego de su inoculación.

Aunque se ha enfatizado en la necesidad de establecer combinaciones farmacológicamente aditivas o sinérgicas para incrementar las posibilidades terapéuticas de los factores de crecimiento, cuyo efecto clínico individual es limitado, aún no se conoce de ninguna formulación de uso parenteral con estas características para ninguna indicación médica.

La novedad de la presente composición farmacéutica se basa en la aditividad farmacológica que se establece entre el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un péptido mimético del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GHRP). Dicha combinación de principios activos favorece la vitalidad celular en órganos cuando estos resultan deprivados parcial o totalmente del suministro de sangre oxigenada por períodos de minutos hasta horas. Esta combinación también atenúa la formación de especies y metabolitos tóxicos en tejidos u órganos hipóxicos o anóxicos, lo que permite la sobrevivencia tisular ante prolongados períodos de isquemia. La combinación de estos agentes también muestra una potente aditividad de readaptación fisiológica sobre varios tejidos cuando su administración es con fines terapéuticos.

La mencionada combinación puede ser empleada dentro una misma composición farmacéutica o aplicarse a un mismo individuo por separado como parte de un único tratamiento.

Mediante la presente invención se logra, de forma simultánea, incrementar la capacidad autodefensiva de las células mediante preconditionamiento

profiláctico, y prevenir la cascada de eventos moleculares lipoperoxidativos, proinflamatorios y citotóxicos que pueden conducir a la muerte celular (por apoptosis o necrosis), que ocurre en órganos y tejidos sometidos a la isquemia-reperfusión, shock hipovolémico, hipoperfusión hística, fallo hemodinámico de la macro y la microvasculatura y la sepsis.

La combinación permite mantener la viabilidad y el funcionamiento total del órgano (s) o tejido (s) en cuestión, así como el rápido restablecimiento regenerativo o adaptativo de los tejidos cuando han experimentado deterioro morfológico y funcional como consecuencia de los estados mórbidos antes mencionados, o cuando no han sido profilácticamente tratados.

Adicionalmente se ha comprobado que la combinación de a invención acelera la adaptación intestinal luego de extensas enterectomías.

La combinación farmacéutica puede ser aplicada con carácter profiláctico en todos aquellos sujetos con entidades que pueden conducir a la disfunción o daño múltiple de órganos de diverso origen como quemados, politraumatizados, síndrome de distress respiratorio, neonatos hipóxicos, shock hipovolémico, enterocolitis necrotizante, etc. También puede ser aplicada a sujetos sometidos a grandes intervenciones quirúrgicas de urgencia o no y de alto riesgo. Se aplica también en la cirugía de trasplante y revascularizadora, en la que necesariamente la oxigenación de uno o varios órganos se compromete por isquemia total o parcial y luego se realiza la reperfusión. Resulta aplicable también en el control y prevención de las consecuencias de los fenómenos trombo-embólicos.

En su vertiente terapéutica, como combinación trófico regeneradora, puede aplicarse a pacientes con síndrome de intestino corto, y en todos aquellos procesos ya mencionados en los que por alguna razón no se realizó una intervención profiláctica. Puede ser empleada para estimular la restauración morfofuncional del hígado sometido a hepatectomía parcial y en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda de origen isquémico.

En una realización preferida de la presente invención la misma comprende una formulación farmacéutica inyectable que combina como principios activos los agentes peptídicos factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un péptido mimético del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GHRP), los

cuales presentan capacidad citoprotectora de forma aditiva, en la que uno de ellos ha mostrado de forma directa, atenuar la formación de metabolitos citotóxicos en un contexto celular donde ha ocurrido hipoxia o anoxia por fallo en el suministro de sangre o por agentes tóxicos que bloquean la respiración celular.

5

La combinación ejerce de este modo un efecto de protección mediado por mecanismos múltiples sobre los tejidos, involucrando la interrupción de la cascada fisiopatológica de daño en varios puntos. Una administración única y profiláctica, de la composición de la invención en las dosis requeridas, es suficiente para poner en marcha mecanismos de citoprotección y estimular la sobrevida celular.

10

La combinación puede ser empleada de forma terapéutica además mediante inyecciones reiteradas, o sistemas de instilación continua para restaurar la arquitectura y función tisular cuando ya ha ocurrido el daño.

15

En la mencionada combinación entre el EGF y un péptido secretagogo de la hormona de crecimiento (GHRP-6), el efecto protector descrito para el EGF es sustancialmente optimizado y amplificado, haciendo innecesario su empleo a altas dosis. De este modo, con una dosificación de la presente formulación, se logra poner en marcha diferentes mecanismos biológicos protectores los cuales logran establecer un prolongado efecto sinérgico citoprotector:

20

La versatilidad de los mecanismos de acción protectora de esta composición farmacéutica, justifica su administración a una amplia gama de pacientes que han sufrido episodios isquémicos como consecuencia de trombosis, embolismos, o ambos, edemas, hemorragias, shock hipovolémicos, etc. En estas condiciones, el tratamiento debe ser aplicado tan pronto como sea posible con vistas a reducir el área de necrosis del órgano o tejido.

25

En otro escenario, el tratamiento puede aplicarse a receptores de injertos para permitir un apropiado pre-acondicionamiento del organismo del hospedero. el cual se establece tras la administración profiláctica de un bolo en dosis única ocurriendo entre los 5 y 10 minutos siguientes

30

El efecto protector conferido a los tejidos isquémicos mediante la presente composición, permite hacer opcional la administración concomitante de

cualquier agente antioxidante natural o sintético, de compuestos quelantes de hierro, así como de enzimas involucradas en la defensa anti-oxidante. La presente combinación puede ser administrada de forma concomitante con agentes trombolíticos o fibrinolíticos referidos como activadores del plasminógeno, y en el evento de la reperfusión inducida por métodos mecánicos, incluidos los angioplásticos.

Igualmente la composición de la invención acelera la restauración morfológica y funcional de los tejidos luego de establecida la muerte tisular y favorece el proceso de readaptación celular en el intestino.

De forma más particularizada la invención proporciona una formulación farmacéutica inyectable que combina las propiedades biológicas del EGF y un péptido secretagogo de la hormona de crecimiento, ambos en concentraciones efectivas. El EGF referido comprende al polipéptido obtenido por vía natural, por síntesis química, o mediante la tecnología del ADN recombinante. El péptido secretagogo referido es el *Growth Hormone Releasing Peptide* (GHRP-6), obtenido por síntesis química y cuya secuencia aminoacídica es la siguiente: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂.

Igualmente incluye el uso terapéutico de ambos principios activos en las mencionadas patologías, ya no formando parte de una única composición farmacéutica, sino aplicados ambos sobre un individuo como parte de un único método de tratamiento.

La presente invención es aplicable con fines profilácticos o terapéuticos. En cuanto a su uso profiláctico, el rango de concentraciones de EGF a emplear en la combinación puede variar entre 0.5 y 50 µg/ml cuando se prepara como solución, o como sal liofilizada y resuspendible en un vehículo apropiado. La concentración del GHRP-6 puede abarcar desde 2 hasta 100 µg/ml en el mismo vehículo. Se recomiendan dosis entre 0.5 y 1 µg/kg de cada sustancia con fines profilácticos. Las rutas de administración pueden ser endovenosa profunda o periférica, intraarterial o intraperitoneal. Los vehículos a emplear pueden ser solución salina fisiológica 0.9%, solución de Ringer lactado, plasma, albúmina, y dextrosa isotónicos, o mezclas de ellos. La administración al paciente debe de ser en forma de bolo por las rutas indicadas. Se recomienda la administración del bolo tan urgente como sea

posible ante el episodio isquémico, cuando este ha sido ya diagnosticado. Por otro lado, el tratamiento debe de ser administrado a pacientes en shock, politraumatizados, con síndrome de aplastamiento muscular, quemados, y traumas quirúrgicos mayores de forma urgente, aunque no se disponga de hallazgos clínicos de compromiso isquémico en órganos internos, y cuando se presuma de riesgo de hipoperfusión tisular central o periférica. Estos órganos son principalmente el estómago, el intestino, el hígado, cerebro-cerebelo, músculos esqueléticos, y el riñón.

Estas especificaciones son aplicables también a pacientes con pancreatitis aguda para prevenir o reducir complicaciones ulteriores. Se incluye además su aplicación a pacientes con riesgo de distress respiratorio del adulto.

La frecuencia de administración con fines profilácticos puede variar de acuerdo con la magnitud del cuadro y el proceso patológico en cuestión, lo que dependerá del criterio de facultativos. La administración del bolo puede repetirse cada 3 horas y hasta 4 veces en 24 horas. Los principios activos también pueden ser administrados en formulaciones de acción sostenida. No obstante, se prefiere que la formulación a administrar deba ser preparada inmediatamente antes de su empleo mediante la resuspensión de los liofilizados de ambos principios activos en una de las soluciones recomendadas de forma estéril y apirogénica.

Con relación a su uso terapéutico la preparación de la combinación farmacéutica se realiza como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, se establecen diferencias en cuanto a la finalidad, estrategia de dosificación, de administración y dosis efectivas. El empleo de esta composición con fines terapéuticos se indica para restaurar todos aquellos tejidos que han sufrido daño isquémico y en los que se ha producido muerte celular focal (infarto) o difusa. También se recomienda para restaurar rápidamente la función celular cuando los tejidos han sido expuestos a períodos breves de isquemia y los daños tisulares no han sido letales lo que permite interrumpir la cascada de complicaciones. Se incluye además el uso de la formulación para favorecer la regeneración de órganos o tejidos que por traumas o cirugía resulten comprometidos. Se recomienda su empleo durante los primeros días de practicada la cirugía del trasplante para atenuar el efecto de la isquemia

caliente o fría sobre el órgano injertado y favorecer sus funciones fisiológicas y tróficas.

La preparación se recomienda para combatir y corregir el síndrome del intestino corto, y por tanto para acelerar el proceso de readaptación y reorganización del epitelio intestinal. Para estas indicaciones se recomienda el empleo de infusiones continuas y no de bolos únicos como en el esquema profiláctico. Las infusiones deben ser administradas en forma de venoclisis en los vehículos antes descritos, con una duración de 3-4 horas, administrándose dos infusiones cada día con un período de aclaramiento de al menos 8 horas entre ellas. Las dosis recomendadas para estas indicaciones oscilan entre 0.01 µg/kg/h hasta 5 µg/kg/h.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Demostración del efecto citoprotector de la administración sistémica del hexapéptido secretagogo GHRP-6 sobre la mucosa gástrica en un modelo de estrés agudo.

Ratones machos de la línea OF-1 (20-23 g de peso corporal) fueron seleccionados aleatoriamente para una administración única intraperitoneal del GHRP-6 (0.1 µg/animal) o a recibir solución salina fisiológica 0.9% por la misma ruta. La alimentación fue retirada 14 horas antes de iniciar el experimento. Diez minutos más tarde los animales fueron sometidos a natación forzosa en agua fría (2-4°C) en constante agitación por espacio de 30 minutos. Los animales fueron insensibilizados con éter y sacrificados. Se realizó estudio histológico fijando las muestras en formalina neutra al 10 % y empleando las coloraciones de H&E y PAS/azul alciano. La evaluación *in situ* de la mucosa se realizó empleando una cámara de video acoplada al estereomicroscopio. La imagen del estómago fue transferida a la computadora para su posterior análisis morfológico mediante el sistema DIGIPAT. Los criterios de erosión, hemorragia parietal y úlcera oxíntica fueron establecidos de acuerdo a la literatura internacional (Playford RJ. Peptides and gastrointestinal mucosa integrity. Gut 1995, 37: 595-597). Las úlceras se identificaron por su aspecto definido, circunscrito, y de fondo hemorrágico. Al estudio microscópico se consideraron aquellas que interesaron más allá del

tercio superior de la zona glandular. La determinación de hemoglobina luminal se realizó por el método de cianometahemoglobina (Reactivos Spinreact, Barcelona) y se expresó en g/dL. Las evaluaciones se realizaron a ciegas empleando una identificación artificial. La intervención profiláctica con el GHRP-6 redujo significativamente la intensidad del daño a la mucosa así como el número de úlceras en la mucosa oxíntica (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto protector sobre la mucosa gástrica del GHRP-6

Tipo de Daño	Controles (SSF 0.9%)	GHRP-6
Erosión epitelial	20 (100%)	6 (30%)*
Hemorragia mucosa	16 (80%)	0 (0%)*
Hemorragia luminal	12 (60%)	0 (0%)*
Hemoglobina luminal	4.3	0 *
Total de úlceras	68	3 *

Se utilizaron 20 animales en cada grupo. * $p<0.01$ establecido por la prueba de t-de student de dos colas. Nivel de significación establecido de $p<0.05$. Este experimento demostró el efecto citoprotector del hexapéptido GHRP-6 en un modelo de daño gástrico agudo, inducido por estrés, en cuya fisiopatología el evento de isquemia-reperfusión a la mucosa del órgano juega un importante papel.

Ejemplo 2. Efecto protector de la administración profiláctica de la combinación entre el EGF y el hexapéptido secretagogo GHRP-6 en un modelo de isquemia-reperfusión renal.

Diseño experimental:

Se exploró el efecto nefroprotector de cada uno de los péptidos así como de su combinación en el modelo de isquemia-reperfusión renal bilateral caliente. En una primera fase se estableció un período de isquemia de una hora, seguido por una fase de perfusión de 3 horas. Ratas Wistar hembra (200-220 g) fueron aleatoriamente asignadas a los siguientes grupos

experimentales (N=10) en la primera fase. Todos los tratamientos se aplicaron por vía intraperitoneal y 30 minutos antes de iniciar la isquemia.

Grupo I: Simuladores isquémicos.

Grupo II: Isquemia tratada con solución salina fisiológica 0.9%.

5 Grupo III: Isquemia tratada con EGF a una dosis de 20 µg / rata.

Grupo IV: Isquemia tratada con GHRP-6 a una dosis de 50 µg / rata.

Grupo V: Combinación entre EGF (5 µg) y GHRP-6 (10 µg).

Modelo de Isquemia:

10 Se realizó bajo profunda anestesia, comprimiendo el pedículo de ambos riñones con micropinzas vasculares atraumáticas por 60 minutos. Transcurridas 3 horas de reperusión los animales fueron evolucionados hasta los 30 minutos siguientes.

Evaluación de la función renal:

15 Se determinó la intensidad de filtrado glomerular (IFG) y de flujo plasmático renal (FPR) mediante la saturación plasmática con los marcadores inulina y ácido p-amino hipúrico durante la fase de reperusión. El coeficiente de aclaramiento (C) de cada marcador fue determinado mediante la siguiente formula:

$$C = U_v(m) \times [PM]_u / [PM]_p$$

20 Donde $U_v(m)$ representa el volumen de orina excretado por minuto.

[PM]_u y [PM]_p representan las concentraciones plasmáticas y urinarias de cada uno de los marcadores. Los datos se expresaron en ml/min/g de peso.

Determinación del volumen de diuresis:

25 Se insertó un catéter vesical luego de ocluir la uretra. El extremo libre del catéter se conectó a un tubo graduado, y se determinó el volumen de orina excretado durante 10 minutos.

Determinaciones bioquímicas:

30 Muestras de tejido renal fueron maceradas en solución tampón de KCl/histidina (pH7.3) y el sobrenadante empleado para la determinación de la actividad de las enzimas fosfolipasa A2, catalasa, así como del metabolito malondialdehído (MDA).

Determinaciones histológicas:

Muestras de tejido renal fueron fijadas en formalina neutra 10% y procesadas en parafina para su coloración. Las evaluaciones se efectuaron por patólogos ajenos al ensayo y considerando los siguientes parámetros: número de glomérulos colapsados, hemorragia cortical, hemorragia medular, daño tubular severo y daño intersticial severo. Como se muestra en la Tabla 2, el evento de isquemia-reperfusión provocó un marcado deterioro en la capacidad renal de formar y excretar orina. La intervención con EGF mostró atenuar el proceso oligúrico aunque de forma no significativa con respecto a los controles tratados con salina 0.9%. Por su parte la administración de GHRP-6 elevó cuatro veces la producción de orina con respecto al grupo tratado con solución salina 0.9%, evidenciándose una significativa protección del tejido renal. La administración de la combinación de ambos péptidos demostró prevenir completamente el fracaso de la función renal, de modo que se obtuvieron valores de diuresis semejantes a los del grupo de referencia no isquémico.

Estos resultados evidencian el efecto sinérgico de ambos péptidos como nefroprotectores ante un período de isquemia relativamente breve.

Tabla 2: Producción de orina luego de la perfusión.

Simuladores	Isquemia/salina 0.9%	Isquemia/EGF (20µg)	Isquemia/GHRP (50µg)	Combinación
311 ± 14**	51 ± 40	114 ± 51	208 ± 47*	382 ± 19**

Datos expresados como valor medio y desviación estándar.

**Significa diferencia de $p<0.01$ con relación al grupo control isquémico tratado con solución salina 0.9%.

*Significa diferencia de $p<0.05$ con relación al grupo control tratado con solución salina 0.9%. Prueba de U Mann Whitney.

El estudio histológico del tejido renal demostró que el episodio isquémico dañó a todas las estructuras renales, particularmente en el grupo control tratado con solución salina. De forma general, la intervención con EGF y con el hexapéptido GHRP-6 mostraron un modesto efecto de atenuación. Sin embargo, la comparación cualitativa de ambos grupos indica un efecto

nefroprotector del GHRP-6 superior al del EGF. Como se ilustra en la tabla 3, la combinación de ambos agentes ejerce un potente efecto protector al prevenir de forma dramática los daños a todas las estructuras del tejido renal.

Tabla 3: Porciento de animales por grupo con daño histopatológico renal.

Grupos experimentales	Glomerulos lesionados	Hemorragia cortical	Hemorragia medular	Daño tubular	Daño intersticial
Simuladores	0	0	0	0	0
Isquemia/salina	100	97	100	100	98
Isquemia/EGF	59♣	68♣	63♣	53♣	75♣
Isquemia/GHRP-6	49♣	17♣	25♣	25♣	22♣
Combinación	5**♣	0**♣	2**♣	0**♣	0**

5

** Significa diferencia $p<0.01$ con respecto al grupo isquémico tratado con solución salina fisiológica.

♣ Significa diferencia $p<0.05$ con respecto al grupo isquémico tratado con solución salina fisiológica.

10

♣ Significa diferencia $p<0.01$ entre los grupos tratados con EGF y GHRP-6 con relación al grupo que recibió la combinación de ambos péptidos.

Comparaciones efectuadas por ANOVA de una vía y la prueba de rangos múltiples de Duncan.

15

Las pruebas de funcionabilidad renal, dadas en la capacidad de filtración glomerular y de flujo plasmático renal efectivo confirman los hallazgos histopatológicos obtenidos. Se reitera que ambos péptidos administrados de forma independientes atenúan de forma parcial el deterioro funcional del órgano, en tanto que su combinación confiere total protección. Nuevamente se observa que la administración del hexapéptido GHRP-6, confiere mayor protección que el EGF. Estos datos se ilustran en la Tabla 4.

20

Tabla 4. Función renal.

Grupos experimentales	Flujo Plasmático Renal (ml/min/100g)	Indice de Filtración Glomerular (ml/min/100g)
Simuladores	2.53 ± 0.4	0.71 ± 0.12
Isquemia/salina	0.66 ± 0.2	0.22 ± 0.11
Isquemia/EGF	1.2 ± 0.61	0.3 ± 0.15
Isquemia/GHRP-6	1.88 ± 0.8#	0.46 ± 0.23 #
Combinación	2.67 ± 0.66 * ♣	0.73 ± 0.1 *

5 (*) Significa diferencia entre el grupo tratado con la combinación de péptidos y el grupo que recibió solución salina fisiológica (p<0.01).

(♣) Significa diferencia entre el grupo tratado con la combinación y aquellos que recibieron cada péptido de forma independiente (p<0.05).

(#) Significa diferencia (p<0.05) entre el grupo tratado con GHRP-6 y el grupo control isquémico que recibió solución salina.

10 Las comparaciones fueron realizadas por ANOVA de una vía y posterior prueba de Duncan.

Se realizó un estudio posterior en una segunda fase en la que se estableció un período de isquemia más prolongado, lo que ofreció la oportunidad de evaluar la eficacia de la combinación en un modelo de daño más robusto y cercano a la práctica médica. La metodología experimental fue la misma que la empleada en la primera fase. En el presente estudio se estableció un tiempo de isquemia de tres horas con igual período de perfusión. Como aparece en la Tabla 5, luego de tres horas de isquemia el fracaso de la función renal es absoluto. El volumen de orina colectado en los grupos control salino y medicado con EGF es despreciable, además de mostrar aspecto hematúrico. Se observó parcial nefroprotección en el grupo tratado con GHRP-6, en tanto que la diuresis fue significativamente superior a la detectada en los dos grupos anteriores. Sin embargo, esta resultó ser

15

20

significativamente inferior a los valores de referencia. El empleo de la combinación permitió una apropiada nefroprotección, con valores de diuresis comparables con aquellos obtenidos del grupo simulador no isquémico.

Tabla 5: Producción de orina luego de la reperusión.

Simuladores	Isquemia/salina 0.9%	Isquemia/EGF (20µg)	Isquemia/GHRP (50µg)	Combinación
395 ± 43	28 ± 10	83 ± 21	168 ± 33*	282 ± 32♣#

5 Datos expresados como media y desviación estándar.

(*) Significa diferencia (p<0.05) entre el grupo tratado con GHRP-6 y el grupo control sometido a isquemia y tratado con solución salina.

(♣) Significa diferencia entre el grupo que recibió la combinación peptídica, el control isquémico y el tratado con EGF (p<0.01).

10 (#) Significa diferencia entre el grupo de tratamiento combinado con relación al tratado con GHRP-6. Prueba de ANOVA de una vía y posterior prueba de Duncan. Nivel de significación establecido de p<0.05.

15 Los hallazgos histológicos sustentan los resultados del nivel de diuresis detectado. El compromiso al tejido renal fue severo y masivo en los animales del grupo tratado con EGF. Una modesta atenuación de los daños se observó en el tejido renal de animales que recibieron el GHRP-6. La administración combinada de los péptidos surtió un favorable efecto de protección morfológica. Los datos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Porciento de animales por grupo con daño histopatológico renal.

Grupos experimentales	Glomerulos lesionados	Hemorragia cortical	Hemorragia medular	Daño tubular	Daño intersticial
Simuladores	0	0	0	0	0
Isquemia/salina	100	100	100	100	90
Isquemia/EGF	80	70	80	90	80
Isquemia/GHRP -6	60♣	40♣	80	50♣	30♣
Combinación	10♣	0	10	10♣	0♣

(♦) Significa diferencia entre el grupo que recibió GHRP-6 y el grupo control isquémico que recibió solución salina 0.9% ($p<0.05$).

(♣) Significa diferencia entre el grupo que recibió la combinación de péptidos contra el resto de los grupos sometidos a isquemia ($p<0.05$ / $p<0.01$). Nivel de significación establecido de $p<0.05$. Prueba de ANOVA de una vía y posterior análisis de Duncan.

5

Nuevamente el análisis del funcionamiento renal, basado en la capacidad de filtración glomerular y en la intensidad de flujo plasmático demostró la superioridad de la intervención profiláctica con la combinación de ambos péptidos. Los índices de aclaramiento de ambos marcadores se encontraron en rangos comparables con los detectados en el grupo de simuladores no isquémicos (Tabla 7).

10

Tabla 7. Función renal.

Grupos experimentales	Flujo Plasmático Renal (ml/min/100g)	Indice de Filtración Glomerular (ml/min/100g)
Simuladores	2.75 ± 0.7	0.82 ± 0.1
Isquemia/salina	0.02 ± 0.01	0
Isquemia/EGF	0.6 ± 0.05	0.24 ± 0.15
Isquemia/GHRP-6	1.07± 0.8♣	0.38 ± 0.2♣
Combinación	2.15 ± 0.36 *	0.78 ± 0.01 *

15

(*) Significa diferencia entre el grupo que recibió la combinación de péptidos y el resto de los grupos isquémicos ($p<0.01$).

(♣) Significa diferencia entre el grupo que recibió GHRP-6 y el grupo control isquémico tratado con solución salina 0.9% ($p<0.05$). Prueba de ANOVA de una vía y post Duncan. Nivel de significación establecido de $p<0.05$.

20

Con este estudio se demuestra que una administración única y profiláctica de ambos péptidos confiere un limitado nivel de protección al riñón sometido a isquemia. Se reitera una relativa superioridad del GHRP-6 con relación al

EGF. Se ha demostrado la eficaz nefroprotección conferida por la combinación de ambos agentes en un esquema de dosificación única y profiláctica.

Ejemplo 3. Efecto protector de la combinación entre EGF y GHRP-6 en un modelo de isquemia-reperfusión intestinal.

Se emplearon ratas macho Sprague Dawley (220-250 g) que fueron aleatoriamente asignadas a los siguientes grupos de tratamiento.

I: isquemia-reperfusión y tratado con solución salina 0.9%.

II: isquemia-reperfusión y tratado con EGF 500 µg/rata.

III: isquemia-reperfusión y tratado con GHRP-6 100 µg/rata.

IV: isquemia-reperfusión y tratado con la combinación de EGF (5 µg) / GHRP-6 (2 µg) por rata.

Todos los tratamientos se efectuaron por vía intraperitoneal y 30 minutos antes de iniciada la isquemia.

Modelo experimental y determinaciones:

Bajo estado anestésico, empleando manta termoregurable y condiciones de asepsia, se practicó una laparotomía hasta exponer cuidadosamente el tronco de primer orden de la arteria mesentérica superior, el que fue ocluido con micropinzas vasculares para producir isquemia de la porción correspondiente al yeyuno e íleon por espacio de dos horas. Se estableció un período de perfusión de tres horas. A su término, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia y sometidos a estudio de necropsia, con énfasis en el intestino delgado, hígado, riñones y pulmones. Al resear el intestino delgado se registró la longitud de daño hemorrágico mucosal y/o luminal. Se practicó su disección y se expuso la cara luminal, colectándose cuidadosamente el contenido para posterior determinación del contenido de hemoglobina. La mucosa fue lavada extensamente en PBS frío pH 7.2, pesada y seccionada para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry. Otras muestras se emplearon para la cuantificación de ADN total y procesamiento histológico. El tejido fue fijado en formalina neutra 10% para ser procesado en parafina y coloreado con H&E. El análisis del nivel de daño mucosal se realizó a ciegas empleando la escala de Chiu y colaboradores. En esta se establece un índice de daño creciente a la mucosa entre los grados 0

85

(intacta) hasta 5 (denudación total). Otros fragmentos fueron procesados mediante microdissección estereomicroscópica y coloreados con el reactivo de Schiff, cuantificándose el número de imágenes apoptóticas en 200 criptas. Para confirmar definitivamente el efecto de protección conferido por los tratamientos, en un ensayo independiente se estudió la sobrevida de los animales hasta las 96 horas de iniciada la reperfusión.

Un tiempo de isquemia de dos horas sobre el territorio del yeyuno e íleon provocó una lesión de la mucosa de carácter transmural, severo edema y abundante sangramiento luminal en el grupo de animales que recibieron solución salina 0.9%. Como se muestra en la Tabla 8, todos los segmentos estudiados histológicamente en este grupo, mostraron un patrón de daño clasificable como de grado 5, caracterizado por denudación total hasta las criptas. El tratamiento con la elevada dosis de EGF ensayada, mostró un mínimo efecto de protección que en el orden clínico no resulta significativo. La administración del hexapéptido GHRP-6 mostró prevenir de forma parcial el deterioro del órgano. El patrón de daño a la mucosa resultó ser menos extenso y más superficial. Nuevamente, la combinación de ambos péptidos previno de forma dramática los daños a la mucosa intestinal (Tabla 8). Todos los indicadores estudiados confirman el significativo nivel de protección ejercido por la combinación de ambos péptidos.

Tabla 8. Parámetros intestinales estudiados.

Grupos Experimentales	% de daño intestinal	Peso de la mucosa (g)	Contenido de proteínas (mg/cm)	Hemoglobina luminal (g/dL)	Contenido de ADN (µg/cm)	Indice de Daño (0-5)
Control / salina	96.3 ± 1.1	8.53 ± 2.18	0.72 ± 0.4	6.44 ± 1.37	0.25 ± 0.13	5
EGF- 500µg	78.7 ± 2.8	10.7 ± 4.5	1.08 ± 0.6	3.5 ± 1.02	0.4 ± 0.11	4.2
GHRP-6-100µg	63 ± 14.5♣	11.3 ± 1.6♣	1.88 ± 0.75♣	1.23 ± 0.82♣	0.58 ± 0.24	3.88♣
Combinación EGF+GHRP-6	11.5 ± 6.4*	14.5 ± 1.2*	2.85 ± 0.66*	0*	0.79 ± 0.03*	1.27*

27

Datos expresados como valor medio y desviación estándar.

(*) Significa diferencia entre el grupo que recibió la combinación de péptidos y el grupo control isquémico tratado con solución salina fisiológica ($p<0.01$).

5 (♣) Significa diferencia entre el grupo que recibió el hexapéptido GHRP-6 y el grupo control tratado con solución salina ($p<0.05$). ANOVA de una vía y posterior prueba de Duncan. Nivel de significación de $p<0.05$.

10 El estudio histológico de los principales órganos parenquimatosos evidenció correspondencia entre el nivel de daño intestinal y el compromiso en cada uno de ellos. Los principales daños atenuados por la combinación de péptidos fueron: (I) prevención o reducción del infiltrado neutrofílico en el pulmón, (II) atenuación de cambios necróticos e hidrópicos agudos en los hepatocitos, y (III) prevención del colapso glomerular y daño al epitelio tubular. Estos cambios sin embargo, se observaron de forma más severa en los grupos tratados de forma independiente con cada péptido.

15 En un segundo ensayo, cuyo objetivo central fue determinar la protección intestinal expresada en la sobrevida de los animales, se siguió la misma metodología experimental con la diferencia que se practicó sutura de la incisión. Luego de la sutura todos los animales recibieron una administración intraperitoneal de 5 ml de solución Ringer lactado. Los animales fueron
20 monitoreados hasta concluir 96 horas de establecida la reperfusión. Se confirmó la protección conferida por la combinación de ambos péptidos en tanto que el 100% de los animales tratados sobrevivieron (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de supervivencia en cada grupo

Grupos Experimentales (N=10)	% de Supervivencia
Control / salina	0
EGF (500µg)	20
GHRP-6 (100µg)	40
EGF (5 µg) + GHRP-6 (2 µg)	100

Un importante hallazgo de estos resultados se relaciona con la protección conferida por la combinación farmacéutica a los principales órganos blanco asociados al daño intestinal por isquemia/reperfusión: pulmones y riñones.

5 Para el caso de los pulmones, se constató una dramática reducción en la intensidad de la infiltración neutrofílica, en el daño alveolar así como endotelial. Estos marcadores son típicos del pulmón de distres y resultan comúnmente incompatibles con la vida. Similaramente en los riñones se apreció reducción de las zonas hemorrágicas, del daño tubular y glomerular.

10 Este estudio demuestra la utilidad de la intervención profiláctica con la combinación de ambos péptidos para prevenir los daños intestinales derivados del episodio de isquemia-reperfusión. La protección conferida por el método referido es de carácter sistémico, en tanto que se demuestra la prevención de cambios histopatológicos en varios órganos distantes que no fueron sometidos directamente a isquemia, pero sobre los que la generación
15 de EROs y mediadores pro-inflamatorios tienen repercusión negativa. La absoluta prevención de la letalidad en el grupo tratado con la combinación peptídica, confirma su potente efecto de protección multiorgánica.

**Ejemplo 4. Efecto de la administración terapéutica de la combinación
20 entre EGF y el hexapéptido GHRP-6 en un modelo experimental de quemadura severa.**

La región dorsal de ratones machos de la línea Balb/c (22-25 g) fue depilada y sometida a escaldadura hipodérmica, que comprendió un 25 % de la superficie corporal, mediante inmersión en agua estabilizada a 95-97°C por
25 espacio de 5 segundos. El procedimiento se realizó empleando la combinación de diazepam/ketamina y breve exposición a máscara de éter. Inmediatamente después cada animal recibió una administración intraperitoneal de 1.5 ml de solución salina fisiológica 0.9% para prevenir el colapso circulatorio. Este modelo animal reproduce de manera estable
30 extensas lesiones necróticas en la mucosa intestinal que pueden llegar a tener carácter transmural, así como hemorragia luminal; por lo que resultó útil para estudiar el efecto de cada uno de los péptidos y de su combinación en el

proceso de maduración intestinal. Transcurridas 24 horas, los animales sobrevivientes fueron aleatorizados a los siguientes grupos de tratamiento.

I: Referencia. Simuladores no quemados (N=5) y tratados con solución salina fisiológica 0.9%.

5 II: Quemados, tratados con solución salina fisiológica 0.9%. (N=7 ratones)

III: Quemados, tratados con EGF (N=10 ratones; 0.1 µg/animal).

IV: Quemados, tratados con GHRP-6 (N=9 ratones; 0.1 µg/animal).

V: Quemados, tratados con la combinación peptídica (N=10 ratones) entre EGF (0.01 µg) y GHRP-6 (0.01 µg).

10 Las administraciones se realizaron dos veces al día por vía intraperitoneal y hasta el décimo día post-quemadura. Al finalizar el esquema de tratamiento todos los animales fueron nuevamente pesados. Seis horas antes de ser sacrificados y sometidos a estudio de necropsia, cada animal recibió una
15 inyección intraperitoneal de sulfato de vincristina (1 mg/kg) para arrestar las células en metafase. El intestino fue resecado, pesado individualmente, y algunos fragmentos colectados para determinar su contenido total de proteínas y ADN. Otros fragmentos fueron obtenidos de diferentes porciones y fijados en formalina neutra 10% para procesamiento histológico de rutina y para realizar la microdiscección estereoscópica de las criptas. Los
20 especímenes histológicos fueron utilizados para estudios morfométricos empleando el paquete tecnológico Digipat. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

Peso final.

Peso del intestino y contenido total de proteínas y ADN.

25 Número de metafases por cripta.

Número de criptas en fisión.

Altura de las vellosidades intestinales.

Profundidad de las criptas.

30 Todos los animales asignados a tratamiento con los péptidos individualmente administrados o en combinación, mostraron un incremento significativo del

5 peso corporal al finalizar el esquema de administración. Esta diferencia es particularmente relevante en el grupo que recibió la combinación peptídica (Tabla 10). Este hallazgo sugiere el impacto del método en la restitución de la mucosa intestinal y en el restablecimiento de su función de absorción, mediado por la acción sinérgica y/o aditividad de sus componentes.

Tabla 10. Comportamiento del peso corporal.

Grupos	Peso Inicial	Peso Final	% Incremento
Control-salina 0.9%	23.8 ± 1.2	25.3 ± 3.6	6
EGF (0.01µg)	22.1 ± 2.2	28.2 ± 3.3*	27
GHRP (0.01µg)	23.3 ± 1.6	28.4 ± 1.8*	23
Combinación EGF + GHRP-6	23.5 ± 1.7	31.7 ± 4.0*#	34

10 Peso final registrado al décimo día de provocada la quemadura y luego de 20 administraciones. Datos expresados como media y desviación estándar.

(*) Significa diferencia entre peso inicial vs. peso fina $p<0.05$.

(#) Significa diferencia entre el grupo tratado con la combinación y el resto de los grupos. ANOVA y prueba de Duncan.

15 Los datos referidos en la Tabla 11 demuestran el favorable efecto restaurador sobre la mucosa intestinal de cada uno de los péptidos con relación al grupo tratado con solución salina. No obstante, el efecto más dramático se detecta nuevamente en el grupo que recibe el tratamiento combinado de ambos péptidos.

Tabla 11. Respuesta regenerativa del intestino.

Grupos	Peso Intestinal (g)	Proteína total (mg/cm)	ADN total (µg/cm)
Referencia	1.53 ± 0.25	2.6 ± 0.81	0.66 ± 0.05
Control-salina 0.9%	0.84 ± 0.16	1.04 ± 0.62	0.41 ± 0.11
EGF (0.01µg)	1.49 ± 0.21♣	2.22 ± 0.48♣	0.61 ± 0.08
GHRP (0.01µg)	1.33 ± 0.15♣	2.05 ± 0.33♣	0.59 ± 0.01
Combinación EGF + GHRP-6	1.96 ± 0.1*	3.04 ± 0.2*	0.88 ± 0.03*

Datos expresados como valor medio y desviación estándar.

(*) Significa diferencia entre el grupo que recibió la combinación de péptidos y el grupo que recibió solución salina (p<0.01).

(♣) Significa diferencia entre los grupos que recibieron cada péptido y el control (p<0.05). ANOVA y posterior prueba de Duncan.

El resultado más importante desde el punto de vista terapéutico en este estudio se refiere a la capacidad del método de la combinación peptídica para acelerar el proceso de restauración y adaptación intestinal, expresado en la estimulación del proceso de fisión de las criptas intestinales como mecanismo del restablecimiento funcional de las células de la mucosa del órgano. Si bien se aprecia que la administración de EGF estimula la proliferación celular expresada en el incremento del número de metafases, éste evento es diferente al proceso de fisión de la cripta como unidad funcional del intestino delgado. El hecho de que la actividad del hexapéptido GHRP-6 sobre los procesos de fisión de criptas y de proliferación celular no haya sido significativa, excluye la posibilidad de efecto anabólico mediado por el GHRP-6 de forma directa o indirecta (Tabla 12). Este no mostró ejercer un efecto significativo sobre ninguno de los parámetros estudiados. Se evidencia que la combinación del GHRP-6 con el EGF parece potenciar su efecto trófico /

regenerador sobre la mucosa intestinal. Si el GHRP-6 sensibiliza las células al efecto del EGF, es motivo de investigación en el presente.

5 Conjuntamente, en la Tabla 12 se muestran los datos que ilustran el potente efecto de la combinación en la reconstitución morfológica del intestino. El incremento de la talla de las criptas y las vellosidades se corresponde con la extensión de la superficie de absorción intestinal, y por tanto de asimilación de nutrientes.

Tabla 12. Restauración de la mucosa del intestino.

Grupos	No. de metafases por cripta (x 200)	No. de criptas en fisión (x 200)	Altura de las vellosidades (µm)	Profundidad de las criptas (µm)
Control-salina 0.9%	41 ± 16	12 ± 10	96.3 ± 26	33.6 ± 7
EGF (0.01µg)	101 ± 35♥	25 ± 8	118.7 ± 19♥	48 ± 9
GHRP (0.01µg)	59 ± 12	19 ± 6	99.2 ± 10	40.8 ± 13
Combinación EGF + GHRP-6	168 ± 22*	77 ± 18*	215 ± 21*	67.5 ± 7*

Datos expresados como media y desviación estándar.

10 (*) Significa diferencia significativa entre el grupo que recibió la combinación peptídica y el resto de los grupo (p<0.05).

(♥) Significa diferencia entre el grupo tratado con EGF y el control que recibió solución salina 0.9% (p<0.05). ANOVA de una vía y prueba de Duncan.

15 La presente invención ofrece las siguientes ventajas:

1. La presente combinación puede surtir efectos profilácticos o terapéuticos lo que está en dependencia de las características del proceso a tratar. Las soluciones análogas anteriores no muestran esta facultad. Estos efectos pueden ser modulados por un profesional con conocimiento del arte.

2. El principio del método se basa en la estimulación de mecanismos de respuesta endógenos u orgánicos, en tanto que la mayoría de las soluciones anteriores basan su efecto en el del producto administrado por sí mismo, generalmente un xenobiotico.
- 5 3. Lo anterior permite el uso de dosis pequeñas para obtener la respuesta deseada. Por tanto con este método no existe riesgo tóxico alguno. Las soluciones anteriores requieren el uso de altas dosis para lograr en ocasiones efectos modestos, las que además tienen riesgo tóxico.
- 10 4. La respuesta está mediada por la unión de los péptidos a receptores que se activan en diferentes tejidos, de modo que no es necesario un prolongado tiempo de circulación ni de residencia de los componentes en los tejidos. Ello incrementa la seguridad en el uso de la combinación.
- 15 5. No existe contraindicación alguna en el uso del presente método de manera que puede emplearse en una amplia gama de sujetos y condiciones patológicas. No se presentan interacciones indeseables con otros medicamentos. Numerosas soluciones análogas anteriores tienen un campo de aplicación más restringido y exigen precauciones para su indicación.
- 20 6. El método puede ser empleado en pacientes con cualquier enfermedad de base o incluso en estados de comorbilidad. Estos aspectos son limitantes en numerosas soluciones análogas anteriores.
7. El método está indicado para una amplia gama de estados y condiciones, incluyendo a pacientes sometidos a cirugía de trasplante.
- 25 8. La presente invención muestra una amplia ventana de protección anti-isquémica, en tanto que se obtiene protección en el contexto de prolongados períodos de isquemia, en los que otras soluciones análogas no surten efecto, como la cirugía de trasplante, revascularizaciones, algunos procedimientos de diagnostico y manejo.
- 30 9. Tiene una acción farmacológica polivalente capaz de contrarrestar de forma simultánea varios puntos de la cascada de daño. Esto no se observa en ninguna de las soluciones análogas anteriores.

10. La presente combinación tiene efectos tróficos y regenerativos para numerosos órganos epiteliales como el intestino, el hígado, el páncreas y los riñones.

5 11. La invención es aplicable para acelerar el proceso de adaptación del intestino ante el síndrome del intestino corto. Hasta el presente no existe solución para esta entidad.

10

15


Lic. Omar López Ocejo
Representante Legal, CIGB



REIVINDICACIONES

COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO TISULAR DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL.

- 5 1. Combinación farmacéutica caracterizada porque comprende la administración de un péptido con actividad tipo factor de crecimiento epidérmico conjuntamente con el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento GHRP-6, para la profilaxis y el tratamiento del daño tisular debido a falta de irrigación sanguínea arterial y sus secuelas en tejidos animales y
- 10 humanos.
2. Combinación farmacéutica según la reivindicación 1 caracterizada porque el péptido con actividad tipo factor de crecimiento epidérmico puede ser el propio factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante tipo alpha ($TGF-\alpha$) o el factor de crecimiento tipo factor de
- 15 crecimiento epidérmico que une Heparina (HB-EGF).
3. Combinación farmacéutica según la reivindicación 1 caracterizada porque el péptido con actividad tipo factor de crecimiento epidérmico y el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento GHRP-6 se encuentran formando parte de una misma composición farmacéutica, la cual comprende además un
- 20 excipiente apropiado.
4. Combinación farmacéutica según la reivindicación 1 caracterizada porque el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento GHRP-6 sólo o combinado con el péptido con actividad tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) se aplican por separado en un individuo como parte de un mismo
- 25 tratamiento profiláctico o terapéutico.
5. Combinación farmacéutica según las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizada porque el péptido con actividad tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) se encuentra en un rango entre 0.5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ cuando se prepara en forma de solución o como sal liofilizada.
- 30 6. Combinación farmacéutica según las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizada porque el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento

GHRP-6 se encuentra en un rango entre 2 y 100 µg/ml cuando se prepara en forma de solución o como sal liofilizada.

- 5 7. Combinación farmacéutica según las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizada porque para su uso profiláctico se administra por vía parenteral o sistémica en forma de bolo y a dosis entre 0.5 y 1 µg de cada principio activo por Kg de peso del paciente.
- 10 8. Combinación farmacéutica según las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizada porque para su uso terapéutico se administra en forma de infusiones continuas a dosis entre 0.01 y 5 µg de cada principio activo por Kg de peso del paciente por hora.
- 15 9. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento GHRP-6 y un excipiente apropiado, para la profilaxis del daño isquémico y para la profilaxis del daño tisular debido a falta de irrigación sanguínea arterial en tejidos animales y humanos.
- 20 10. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para prevenir daños tisulares, letales o no, en tejidos con riesgo o que ya hayan sufrido isquemia o isquemia-reperfusión.
11. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para la prevención y tratamiento del síndrome de distress respiratorio del adulto.
- 25 12. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para la prevención y tratamiento de la disfunción múltiple de órganos y procesos afines y/o concomitantes que demandan terapia intensiva.
13. Uso de la combinación farmacéutica según reivindicación 12 para el tratamiento de quemados, politraumatizados, pacientes sometidos a cirugía extensa, invasiva, de trasplante, o revascularizadora, así como de pacientes que han sufrido trombosis, emoblismo, déficit hidrosalino, síndrome de aplastamiento, e hipovolemia de cualquier origen.
- 30 14. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 como adyuvante del tratamiento de base en hemorragias extensas de cualquier causa o del shock hipovolémico.

15. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 como agente profiláctico y preconditionante en la cirugía de trasplante o revascularizadora; en las que habitualmente se presentan prolongados periodos de isquemia. Aplicable también a cualquier otro proceso que lleve aparejada isquemia del
5 circuito esplácnico, en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y en el síndrome de disfunción múltiple de órganos.

16. Uso de la combinación de la reivindicación 15 para preservar la homeostasia de los tejidos endógenos en la cirugía revascularizadora y para estimular la sobrevida del injerto luego del trasplante de órganos como
10 riñones, hígado, y páncreas-intestino delgado, pulmón, corazón y colgajos cutáneos.

17. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para prevenir cualquier daño celular luego de ocurrido un estrés que limite o atenúe la perfusión de uno o varios tejidos con sangre oxigenada por cualquier causa.

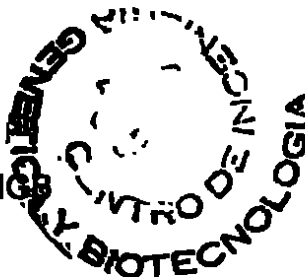
18. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para acelerar la restauración morfofuncional de tejidos que han experimentado daño
15 isquémico como consecuencia de eventos trombo-embólicos o de otro origen así como de tejidos que han experimentado necrosis y/o apoptosis, y/o atrofia.

19. Uso de la combinación de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para acelerar
20 el proceso de adaptación o fallo intestinal luego de enterectomía y/o síndrome de intestino corto asociado o no a alimentación parenteral total.

25


Lic. Omar López Ocejo

Representante Legal, CIGB





4824
97

P A T E N T S

CESION

El (los) suscrito (s) BERLANGA ACOSTA, Jorge; GUILLÉN NIETO, Gerardo Enrique; GARCÍA DEL BARCO HERRERA, Diana; FERNÁNDEZ MASSO, Julio Raúl; ESTRADA GARCÍA, Mario Pablo; GUILLÉN PÉREZ, Isabel; SUAREZ ALBA, José y MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, Rebeca en consideración al pago de la suma de (....US\$1....), que he (mos) recibido, por el presente documento cedo (cedemos) a Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

una compañía constituida de conformidad con las leyes de La República de Cuba

con oficinas en Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, 10600, Ciudad de La Habana, Cuba todos los derechos y títulos sobre la invención denominada COMBINACIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO TISULAR DEBIDO A FALTA DE IRRIGACIÓN SANGUÍNEA ARTERIAL

EL CESIONARIO firma también el presente y declara que acepta dicha cesión

Dado y firmado hoy 10 de Enero del 2002 en Ciudad de La Habana

ASSIGNMENT

The undersigned

In consideration of the sum of (.....), the receipt of which is hereby acknowledged, by these presents do sell, assign and transfer unto

a corporation organized under the laws of

having a place of business at

all rights and title to the invention related to

THE ASSIGNEE signs these presents and declares that accepts the aforesaid assignment

Given and signed this in

BERLANGA A. Jorge; *J. Berlanga*
GARCÍA DEL BARCO H. Diana; *D. García*
ESTRADA G. Mario P; *M. Estrada*
SUAREZ A. José; *J. Suarez*

HERRERA MARTÍNEZ, Luis S.

Inventors

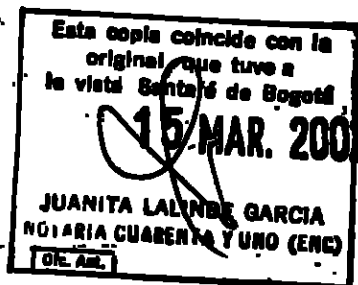
GUILLÉN N. Gerardo E; *Gerardo*
FERNÁNDEZ M. Julio R; *J. R. Fernández*
GUILLÉN P. Isabel; *I. Guillén*
MARTÍNEZ R. Rebeca *R. Martínez*

Assignee

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.

ABOGADOS COLOMBIA

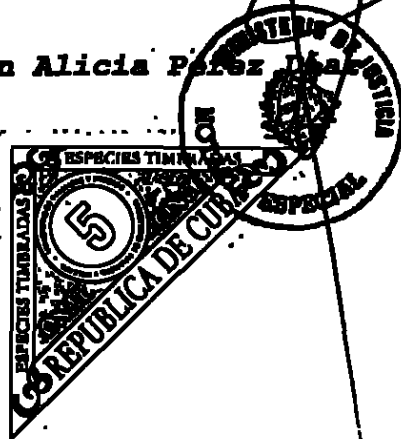
Carrera 9 No. 93-99 - P.O. Box 8348 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 810 74 20 / 80 / 80 - Fax: (571) 810 87 88 - e-mail: amcastellanos@ispod.net.co



LICENCIADA CARMEN ALICIA PÉREZ DÍAZ, Notaria con competencia nacional y sede en la Notaría Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana.

DOY FE: Que las firmas estampadas en este documento de los señores Jorge Amador Berlanga Acosta, Isabel Alicia Guillén Pérez, Gerardo Enrique Guillén Nieto, José Suárez Alba, Diana García del Barco Herrera, Rebeca Martínez Rodríguez, Julio Raúl Fernández Masso, y Mario Pablo Estrada García, son al parecer auténticas de estos inventores por la semejanza que guardan con la que acostumbran a usar en todos y cada uno de sus actos. Asimismo doy fe de que solo se legalizan las firmas no el contenido del documento. Ciudad de La Habana, a uno de febrero de 2002.

Licenciada Carmen Alicia Pérez Díaz,
Notaria.



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION DE ASUNTOS CONSULARES Y DE
CUBANOS RESIDENTES EN EL EXTERIOR.

- JOSE R. CABAÑAS RODRIGUEZ
- EDUARDO VALIDO GARCIA
- EUGENIO MARTINEZ ENRIQUEZ
- M.^a SILVIA FERNANDEZ VILLAR
- ONEIDA BARO ESTRADA

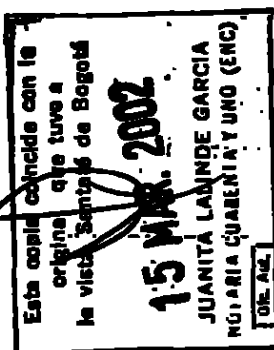
Funcionarios autorizados para certificar Autenticaciones de firma en Documentos expedidos para surtir efectos en el extranjero.

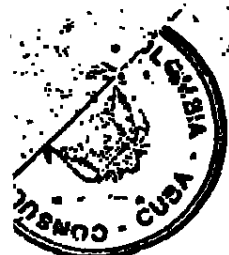
CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTENTICA DEL FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO, LA FIRMA QUE ANTECEDE. POR LA SEMEJANZA QUE GUARDA CON LA QUE OBRA REGISTRADA EN ESTE CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA

18 FEB. 2002





Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 202/02

La Habana, 20 FEB 2002

El suscrito Segundo Secretario, Encargado de Funciones Consulares, **CERTIFICA:**

que la Señora *María Silvia Fernández Villar*, quien autoriza el presente documento, ejercía legalmente, en la fecha allí expresada, funciones en la *Dirección de Asuntos Consulares y de Cubanos Residentes en el Exterior del Ministerio de Relaciones Exteriores* y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este Consulado.

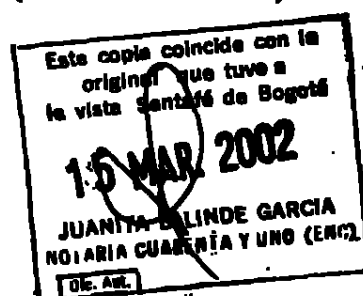
El Segundo Secretario, Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Leon Ricardo Perez Valderrama
LEON RICARDO PEREZ VALDERRAMA
 Segundo Secretario
 Encargado de Funciones Consulares

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL	US\$ 8.00 (ocho dólares)
DERECHOS FONDO ROTATORIO	US\$ 15.00 (quince dólares)
TOTAL PAGADO	US\$ 23.00 (veintitres dólares)



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

214014
R. Pérez

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002. MAR 11 P 12: 06

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con la
original que tuvo a
la vista. **15 MAR. 2002**

JUANITA LALINDE GARCIA
L. MARIA CUARENTA Y UNO (ENC)

UNE. ME.

101-101-101-101
mr

PODER

POWER OF ATTORNEY

El(los) suscrito(s) Dr. Manuel Limonta Vidal, Director General del Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia, domiciliado(s) en Ave. 31. A/ 158. y 190. Cubanacan. Playa. Ciudad de la Habana. Cuba. nombra por el presente a Ximena Castellanos A. y/o Margarita Castellanos A. abogados, con oficinas en Carrera 9 No. 93-09 Bogotá, Colombia para ..solicitud de patente.....

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas; depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de su traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba determinados sustituir este mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 29 de marzo de 1993 en Ciudad de la Habana, Cuba.

I (we) the undersigned hereby grant(s) Ximena Castellanos A. y/o Margarita Castellanos A. attorneys residing at Cra. 9#93-09 Bogotá, COLOMBIA to and to obtain the protection of my (our) industrial property, for wich purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, specially those, administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, service, collective and defensive marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licences of use of the above rights; b) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licences; and in general the civil, penal an administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys- infact in or out of Court.

attorneys residing at Cra. 9#93-09 Bogotá, COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for wich purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, specially those, administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, service, collective and defensive marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licences of use of the above rights; b) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licences; and in general the civil, penal an administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys- infact in or out of Court.

Given and signed this in

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

By: 

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy, ... de de 19.....
compareció(eron) personalmente
Dr. Manuel Limonta Vidal

On this day of 19.....
personally appeared
whom I know to be the person(s) who signed
this documents as representative(s) of the
Corporation/Company named

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de
la Sociedad/Compañía denominada

I Certify:

Centro de Ingeniería Genética
y Biotecnología

a) That
B. is a Corporation/Company legally constituted
and in existence in accordance with the laws
of
b) That the domicile of said Corporation/Com-
pany is

a) Que Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
es una sociedad/Compañía legalmente constitu-
tuida y existente de acuerdo con las leyes de
la República de Cuba

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Com-
pañía es Ave. 31, Cubanacán, Playa
Ciudad de La Habana, Cuba

c) That the purpose or purposes for which the
present Power of Attorney is granted are con-
prised within the object set forth in the char-
ter of the mentioned Corporation/Company.

c) Que el objeto u objetos para los cuales se
otorga el presente poder están comprendidos
dentro del objeto social de la mencionada So-
ciedad/Compañía.

d) Que el Sr. Dr. Manuel Limonta Vidal

d) That Mr.
is (are) authorized to grant the present Power
of Attorney. The aforementioned was duly
proven through the following documents and
I duly certify having seen them: *

está autorizado para otorgar el presente Po-
der. Lo anterior está probado por medio de
los siguientes documentos, que certifico he
visto:

(Ciudad)
(Estado)

(City)
(State)
this day of 19.....
(Notary Public)

Hoy: de 19.....

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

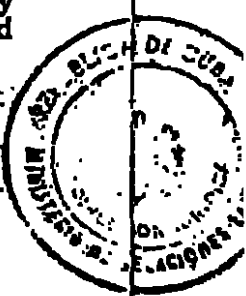
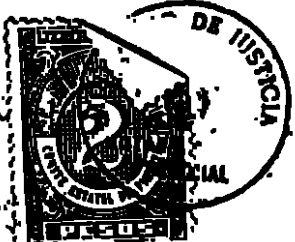
* Documents must be identified with date and origin.

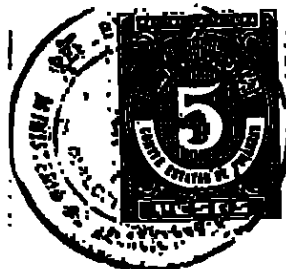
LIC. *Quirica J. González Bravo*
Notario de la Notaría Especial a cargo
de la Dirección de Registros y Notarías
del Minist. de Justicia de la República
de Cuba.

POY P.F. Que la(s) firma(s) que
antecede(n) es/son auténticas por la
 semejanza que guardan con la misma
que acostumbran a usar en todos sus
actos.

La Habana, a los 6 días del mes
de mayo de 1993

[Handwritten signature]





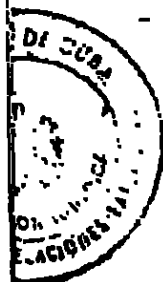
REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN JURÍDICA

Olga Miranda Breva, /o Victor Kautzen Torres,
/o María Silvia Fernández Villar, /o Clara Rivaró-
Valdés, /o Orlando Acosta Fdz. Funcionarios auto-
rizados para certificar autenticación de firma
en Documentos.

CERTIFICO: QUE AL PARECER DE LA OFICINA DEL
FUNCIÓNARIO AUTORIZADO DE ESTE MINISTERIO,
LA FIRMA QUE ANTES DE, POR LA SEMEJANZA QUE
GUARDA CON LA DEL 1984 REMITIDA EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMABA A
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZA PRESENTE CON SU
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA 07.5.95





Consulado General de Colombia
La Habana - Cuba



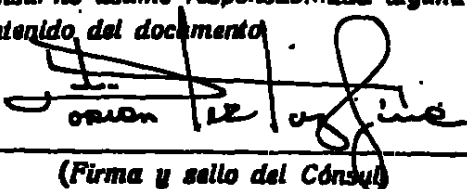
**CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
CUBA**

No. 308/93
La Habana, Mayo 07 de 1993
(Lugar y fecha)

El suscrito Cónsul de Colombia CERTIFICA:
que el señor, Orlando Acosta Faj

quien autoriza el presente documento, ejercía legalmente, en la fecha allí expedida, las funciones de Dirección Jurídica del MINREX y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y se respalda en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este Consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.


(Firma y sello del Cónsul)

(sello)

Pagado Impuesto de Timbre: us\$ 16.00 (dieciséis dólares)
(en números y letras)

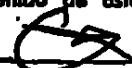
No. 453837

**MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA DE NEGOCIOS GENERALES**

HACE CONSTAR

Que el señor (a) DORAL PEZUA
Cuya firma aparece al pie del presente documento, desempeñaba en esa fecha las funciones allí indicadas.
Santafé de Bogotá, D. C.,
06 JUL 1993

El suscrito Jefe de Legalizaciones no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.


**NELSON SANCHEZ TORRES
JEFE LEGALIZACIONES**





2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 102

Radicación no 02-110779

Concepto Técnico no 38

Clasificación Internacional de Patentes: A61K38/18

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI [x] NO [] Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).

SI [x] NO [] Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).

SI [x] NO [] Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).

SI [] NO [] NO ES APLICABLE [x] Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)

SI [x] NO [] Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).

SI [] NO [] NO ES APLICABLE [x] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).

SI [] NO [] NO ES APLICABLE [x] Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afro americanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).

SI [] NO [x] La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-j).

SI [x] NO [] NO ES APLICABLE [] La prioridad coincide con la materia reivindicada.

SI [x] NO [] CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [] NO [x] ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202061

Bogotá D. C., enero 22 de 2004.



Folio 106

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	02-110779
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	61
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

29 ENE. 2004


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202061

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No 01-110779

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No 538, DE
FECHA 31 DE MARZO DE 2004, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY
EXPIRA EL 01 DE JULIO DE 2004.

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI

NO **X**

Bogotá D.C., OCTUBRE de 2004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

105

RADICACIÓN: 1-110779

EDICTO No. 14777

LA SECRETARÍA GENERAL AD-HOC
HACE SABER:

Que esta Superintendencia profirió Resolución No. 27246 de 29-OCT-2004. Que el contenido de la parte resolutive es como sigue:
Superintendente de Industria y Comercio Ad-Hoc.

RESUELVE

ARTICULO PRIMERO: Declarar abandonada la solicitud de privilegio de patente de invención contenida en el expediente de la referencia.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución a la doctora Margarita Castellanos Abondano, o a quien haga sus veces, en su calidad de apoderada del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología., entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición interpuesto ante el Superintendente de Industria y Comercio, al momento de la notificación o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá, D.C., a los 29 OCT. 2004

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO (E).

JORGE JAECKEL K.

Para notificar a los interesados, se fija el presente EDICTO en lugar visible al público en la SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, por el término de (10) diez días hábiles contados a partir de las 8:30 a.m. de hoy.

Secretaría General Ad-Hoc 01-DIC-2004

Este edicto se desfija hoy 15-DIC-2004 a las cinco (5:00 p.m.)

Secretaría General Ad-Hoc

EDICTO No. 14777