

**COMPOSICIÓN PARA PREVENIR O TRATAR ENFERMEDADES PULMONARES
QUE COMPRENDE PROTEÍNA 1 DE UNIÓN DE HIALURONANO Y
PROTEOGLUCANO**

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a una proteína 1 de
unión de hialuronano y proteoglicano (HAPLN1, *HyAluronan and*
Proteoglycan LiNk protein 1) recombinante, y a una
composición para prevenir o tratar enfermedades pulmonares,
comprendiendo la composición al menos uno seleccionado del
10 grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión
de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la
proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la
expresión o activar las funciones de la proteína o el gen
HAPLN1 como principio activo.

15 **Antecedentes de la técnica**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (a
continuación en el presente documento, "EPOC") es la cuarta
causa de muerte en el mundo, y aproximadamente 251 millones
de personas (4.8 % de la población total del mundo)
20 padecieron EPOC en 2016. Se informó que aproximadamente 3.17
millones de personas murieron por EPOC en 2015. La EPOC
también es más común en los varones que en las mujeres, y el
número de pacientes con EPOC aumenta cada año.

La EPOC es una enfermedad respiratoria crónica que se
25 produce con mayor frecuencia que el cáncer de pulmón. Se
caracteriza por la obstrucción irreversible del flujo de
aire y la progresión continua de síntomas respiratorios,

tales como tos, esputo y disnea. Es ampliamente conocido que las principales causas de la EPOC son el tabaquismo, la exposición ocupacional y la contaminación del aire, tal como de partículas, etc. Debido a estas diferentes causas, la
5 limitación del flujo de aire está provocada por una combinación de la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas y la destrucción del parénquima, lo que conduce a diferentes síntomas clínicos.

De acuerdo con estudios recientes, el propio
10 envejecimiento puede ser una causa importante de EPOC, y se ha revelado como un factor de riesgo. En particular, la EPOC aumenta rápidamente a partir de los 50 años y luego aumenta con la edad, y su tasa de incidencia en las personas de 60 años o más es dos o tres veces mayor que la de las personas
15 más jóvenes. La EPOC tiene un profundo efecto en los pulmones, y durante este proceso, se produce daño en los alvéolos, y no se produce correctamente el intercambio de gases debido al daño alveolar. La razón por la que las enfermedades no se producen en los fumadores jóvenes se explica por la
20 recuperación y regeneración activas al mismo tiempo que el daño.

Con la tendencia mundial al envejecimiento, la senescencia celular, el acortamiento de los telómeros y la disminución de algunas moléculas antienviejecimiento provocan
25 una inflamación crónica en los pulmones, que puede ser una causa directa de enfisema, que se sabe que es provocado por el estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas y la

alteración de la elastina en el tejido pulmonar. La patogenia y los cambios bioquímicos de este enfisema senil son muy similares a los del enfisema común. Dado que el enfisema no es reversible como el asma o la bronquitis, sino irreversible, es muy difícil de tratar, y no existen medicamentos terapéuticos o profilácticos capaces de tratar eficazmente el enfisema.

En particular, la proteína elastina, que es un componente de la matriz extracelular (MEC), es una proteína muy importante que proporciona la elasticidad y el retroceso elástico necesarios para la función de intercambio de gases de los alvéolos. Cuando la pared alveolar se destruye o daña debido a reducciones en la producción de elastina o la potenciación de la degradación de elastina, la pared alveolar se vuelve irrecuperable, por lo que se genera un problema de dilatación-constricción alveolar, es decir, respiración, que finalmente conduce a la EPOC.

Dado que la EPOC se está convirtiendo en un problema global importante con la tendencia al envejecimiento, existe la duda de si es realmente posible tratar y prevenir la EPOC provocada por el envejecimiento. Hasta hace muy poco, se ha reconocido que la EPOC tiene menos probabilidades de ser tratada o prevenida, porque los pulmones han sido conocidos como órganos que no se pueden recuperar ni regenerar. Sin embargo, como se demuestra en el estudio de Butler *et al.*, en 2012, ya que se ha demostrado que los tejidos pulmonares adultos son órganos que pueden volverse a regenerar, varios

estudios muy recientes han revelado, a través de evidencias y mecanismos biológicos celulares, que un grupo de células epiteliales pulmonares tienen la capacidad de autodiferenciarse y proliferar, y así los alvéolos dañados o degenerados pueden restablecerse o regenerarse. Por consiguiente, se espera que, en el futuro, se estudien más activamente los medicamentos terapéuticos y profilácticos, junto con el desarrollo de tecnologías para la regeneración y recuperación de los alvéolos degenerados.

10 Como se ha descrito anteriormente, la EPOC es una enfermedad pulmonar caracterizada por una limitación irreversible del flujo de aire, que se produce y se desarrolla debido a la destrucción de las vías respiratorias y del parénquima provocada por la inflamación crónica. Sin embargo, la EPOC es conocida como una enfermedad prevenible y tratable, como se ha descrito anteriormente. Actualmente, los medicamentos para la EPOC más utilizados en todo el mundo incluyen los CorticoSteroides Inhalados (CSI) y los Antagonistas Muscarínicos de Acción Prolongada (AMAP), que son medicamentos para el asma, y los agonistas β de acción prolongada (ABAP), que son medicamentos para la bronquitis crónica y el enfisema. Sin embargo, estos medicamentos no tratan completamente la EPOC. En particular, dado que los CSI se administran directamente en las vías respiratorias, ejercen un fuerte efecto antiinflamatorio local. Sin embargo, las reacciones adversas sistémicas pueden aumentar cuando los esteroides administrados en las vías respiratorias se

transportan por todo el organismo desde los alvéolos hasta la sangre. Las reacciones adversas de estos medicamentos existentes pueden hacer que los pacientes se sientan nerviosos y, en casos graves, hacer que rechacen la administración y, por consiguiente, hay una gran demanda en el mercado del desarrollo de medicamentos con menos reacciones adversas.

Divulgación de la invención

Problema técnico

10 Para resolver los problemas anteriores, la presente divulgación proporciona una proteína recombinante y una composición superior para prevenir o tratar enfermedades pulmonares, comprendiendo la composición al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína HAPLN1
15 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la proteína o el gen HAPLN1 como principio activo.

20 Los aspectos adicionales se expondrán en parte en la siguiente descripción y, en parte, serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender poniendo en práctica las realizaciones presentadas de la divulgación.

Solución al problema

25 Una proteína recombinante de acuerdo con la presente divulgación puede ser una proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano (HAPLN1) recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades pulmonares de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la proteína o el gen HAPLN1 como principio activo.

Una composición alimenticia funcional para la salud para prevenir o mejorar las enfermedades pulmonares de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la proteína o del gen HAPLN1 como principio activo.

Efectos ventajosos de la invención

La composición tiene pocas reacciones adversas, en comparación con los agentes terapéuticos existentes para las enfermedades pulmonares y, por tanto, puede prevenir o tratar de forma segura y eficaz las enfermedades pulmonares que aumentan cada año, junto con la tendencia mundial al envejecimiento.

Debe entenderse que las realizaciones descritas en el presente documento deben considerarse solo en un sentido descriptivo y no con fines de limitación. Las descripciones de características o aspectos dentro de cada realización

normalmente se deben considerar como disponibles para otras características o aspectos similares en otras realizaciones. Si bien se han descrito una o más realizaciones con referencia a las figuras, los expertos en la materia
 5 entenderán que se pueden realizar diferentes cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu ni del alcance de la divulgación tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

10 Los anteriores y otros aspectos, características y ventajas de determinadas realizaciones de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

las FIGS. 1A, 1B y 1C muestran resultados experimentales
 15 de alvéolos de ratones de edad avanzada de acuerdo con un ejemplo experimental de la presente divulgación, en donde la FIG. 1A muestra imágenes microscópicas de tejidos alveolares después de la tinción, y las FIGS. 1B y 1C muestran gráficos que muestran la cuantificación de la densidad de los alvéolos,
 20 en las FIGS. 1A, 1B y 1C, "Jóvenes-solución salina" representa un grupo preparado mediante la administración de solución salina tamponada con fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) a un grupo de control normal (grupo de jóvenes), "Edad avanzada-solución salina" representa un
 25 grupo preparado mediante la administración de PBS a un grupo de control de edad avanzada (grupo de edad avanzada), y "Edad avanzada-rhHAPLN1" representa un grupo preparado mediante la

administración de rhHAPLN1 diluida en PBS a un grupo de edad avanzada tratado con rhHAPLN1 (Grupo de edad avanzada + rhHAPLN1);

La FIG. 2 muestra una ilustración esquemática de la aerosolización de acuerdo con un ejemplo experimental de la presente divulgación;

las FIGS. 3A, 3B y 3C muestran resultados experimentales de grupos de inhalación de aerosol (grupos de AH) de acuerdo con un ejemplo experimental de la presente divulgación, en donde la FIG. 3A muestra imágenes microscópicas de tejidos alveolares de cada grupo después de la tinción, y las FIGS. 3B y 3C muestran gráficos que muestran los resultados de medir las intersecciones lineales medias (ILM) de las mismas;

y las FIGS. 4A, 4B y 4C muestran resultados experimentales de grupos de instilación intratraqueal (grupos de IT) de acuerdo con un ejemplo experimental de la presente divulgación, en donde la FIG. 4A muestra imágenes microscópicas de tejidos alveolares de cada grupo después de la tinción, y las FIGS. 4B y 4C muestran gráficos que muestran los resultados de medir las ILM de las mismas.

Modo para la invención

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos, en donde los números de referencia similares se refieren a elementos similares. En este sentido, las presentes realizaciones pueden tener diferentes formas, y no deben interpretarse

como limitadas a las descripciones expuestas en el presente documento. Por consiguiente, las realizaciones se describen simplemente a continuación, haciendo referencia a las figuras, para explicar aspectos de la presente descripción.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "y/o" incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. Las expresiones tales como "al menos uno de", cuando preceden a una lista de elementos, modifican toda la lista de elementos y no
10 modifican los elementos individuales de la lista.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá en detalle la presente divulgación.

Los presentes inventores han producido una proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano (HAPLN1)
15 recombinante, y han demostrado su efecto de mejorar el daño alveolar y su efecto terapéutico en un modelo animal de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, completando de este modo la presente divulgación.

Como se utiliza en el presente documento, el término
20 "prevenir" se refiere a todas las acciones mediante las cuales se frena o retarda la aparición de enfermedades pulmonares, o de uno o más síntomas de las mismas, mediante la administración de la composición farmacéutica o la composición alimenticia funcional para la salud de acuerdo
25 con la presente divulgación. Además, incluye el tratamiento de un sujeto con regresión de la enfermedad para prevenir o evitar la recurrencia.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" se refiere a todas las acciones mediante las que las enfermedades pulmonares, o uno o más síntomas de las mismas, han mejorado o se han modificado favorablemente, tales como su alivio, reducción y extinción, mediante la administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación.

Como se utiliza en el presente documento, el término "mejorar" se refiere a todas las acciones mediante las que las enfermedades pulmonares, o uno o más síntomas de las mismas, han mejorado o se han modificado favorablemente, tales como su alivio, reducción y extinción, al ingerir la composición alimenticia funcional para la salud de acuerdo con la presente divulgación.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición administrada con un fin específico, y con respecto a los objetos de la presente divulgación, la composición farmacéutica se refiere a una composición administrada para prevenir o tratar enfermedades pulmonares, o uno o más síntomas de las mismas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "producto funcional para la salud" se refiere a un alimento producido o procesado mediante materias primas o ingredientes funcionales que son beneficiosos para el cuerpo humano de conformidad con la Ley de ALIMENTOS FUNCIONALES PARA LA SALUD N.º 6727, y se refiere a un alimento que tiene

altos efectos médicos y medicinales, que se procesa para presentar de manera eficaz funciones biorreguladoras tales como la prevención o mejora de enfermedades pulmonares, defensa biológica, inmunidad y recuperación, con respecto a
5 los objetos de la presente divulgación, además de aportar nutrientes.

La presente divulgación proporciona una proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano recombinante (HAPLN1) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10 La "HAPLN1" es una proteína que estabiliza el ácido hialurónico uniendo el ácido hialurónico a los proteoglicanos, y es una proteína constituyente de la matriz extracelular, que se descubrió por primera vez en las articulaciones de los vertebrados.

15 La "HAPLN1 recombinante" de acuerdo con la presente divulgación es una proteína recombinante preparada mediante HAPLN1.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades pulmonares,
20 que comprende: al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la proteína o el gen HAPLN1 como
25 principio activo.

En determinadas realizaciones, la proteína HAPLN1 proporcionada en el presente documento puede comprender una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En algunas de estas realizaciones, la proteína HAPLN1 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos el 95 %, al menos el 5 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. Asimismo, el polipéptido divulgado en la memoria descriptiva puede incluir un péptido de SEQ ID NO: 1, un fragmento del mismo 10 y un péptido en el que al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos están modificados.

Como se utiliza en el presente documento, el término "identidad", es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, según sea el caso, determinada por 15 comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas, según sea el caso, según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La "identidad" puede calcularse fácilmente 20 mediante métodos conocidos, tales como, por ejemplo, mediante el *software* BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica del Centro Nacional de Información Biológica (NCBI)) versión 2.2.1 con parámetros predeterminados.

25 En determinadas realizaciones, algunos aminoácidos de un péptido que cambia las características fisicoquímicas del polipéptido de SEQ ID NO: 1 pueden modificarse dentro del

alcance de la presente invención. Por ejemplo, los aminoácidos pueden modificarse para permitir que el péptido tenga una potenciación de la estabilidad enzimática, química o térmica, una variación de la especificidad del sustrato y un desplazamiento del pH óptimo.

La HAPLN1 recombinante puede tener el efecto de mejorar el daño alveolar provocado por el envejecimiento o la reducción de elastina, y por lo tanto, se puede utilizar como composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades pulmonares. Además, de acuerdo con un ejemplo experimental de la presente divulgación, se confirmó que la HAPLN1 recombinante presenta efectos terapéuticos significativos en un modelo animal de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "agente" se refiere a cualquier sustancia, incluyendo, pero sin limitación, un compuesto químico, una molécula pequeña, un anticuerpo, un peptidomimético, un péptido o una proteína.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "un agente eficaz" se refiere a un agente potenciador de la expresión de HAPLN1 que potencia la expresión de la proteína o del gen HAPLN1; o agente activador de HAPLN1 que activa las funciones de la proteína o del gen HAPLN1. El agente eficaz, como se utiliza en el presente documento, incluye una variedad de compuestos, proteínas o péptidos, secuencias de bases y similares que son capaces de potenciar la expresión del gen HAPLN1; o de la proteína HAPLN1 y/o un

fragmento de la misma, o de activar las funciones de la proteína o del gen HAPLN1. El agente activador también incluye una variedad de metabolitos, precursores o equivalentes farmacéuticos de los compuestos, proteínas o péptidos, o secuencias de bases.

En la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación, la enfermedad pulmonar puede ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en bronquitis crónica, asma, enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), pero sin limitarse a las mismas, y la enfermedad pulmonar puede incluir diferentes enfermedades provocadas por un daño pulmonar.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede preparar de acuerdo con un método común en el campo farmacéutico. Además del principio activo, la composición farmacéutica se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado dependiendo de la formulación, y además puede incluir excipientes, diluyentes, dispersantes, emulsionantes, tampones, estabilizantes, aglutinantes, disgregantes, disolventes, etc., si es necesario. Los vehículos apropiados son aquellos que no obstaculizan la actividad ni la propiedad de la HAPLN1 recombinante de acuerdo con la presente divulgación, y pueden seleccionarse de manera diferente según la forma farmacéutica y la formulación.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede aplicar en cualquier forma farmacéutica,

y más específicamente, se puede formular en formas farmacéuticas orales o formas farmacéuticas parenterales tales como preparaciones externas, supositorios y soluciones inyectables estériles de acuerdo con un método común.

5 Entre las formas farmacéuticas orales, la forma farmacéutica sólida puede estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, granulados, cápsulas, etc., y puede prepararse mediante la mezcla con al menos uno de los excipientes, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio,
10 sacarosa, lactosa, sorbitol, manitol, celulosa, gelatina, etc. Además de los excipientes simples, también se pueden incluir lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, etc. Adicionalmente, la forma farmacéutica en cápsulas puede incluir además un vehículo líquido tal como un aceite graso,
15 además de las sustancias mencionadas anteriormente.

 Entre las formas farmacéuticas orales, las formas farmacéuticas líquidas corresponden a suspensiones, soluciones líquidas para uso interno, emulsiones, jarabes, etc. Además de agua y parafina líquida, que son diluyentes
20 simples de uso común, pueden incluirse diferentes excipientes tales como agentes humectantes, agentes edulcorantes, fragancias, conservantes, etc.

 Las formas farmacéuticas parenterales pueden incluir una solución acuosa estéril, un disolvente no acuoso, una
25 suspensión, una emulsión, una formulación liofilizada y un supositorio. Como disolvente no acuoso y suspensión, se pueden utilizar propilenglicol, polietilenglicol, aceites

vegetales tales como aceite de oliva, ésteres inyectables tales como oleato de etilo, etc. Como base para supositorios, se pueden utilizar witepsol, macrogol, Tween 61, manteca de cacao, mantequilla de laurina, glicerogelatina, etc. La
5 presente divulgación no se limita a la misma, y se puede utilizar cualquier formulación apropiada conocida en la técnica.

A la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación, además, se puede añadir calcio o vitamina D₃
10 para potenciar la eficacia terapéutica.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión
15 "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para aplicar para el tratamiento de enfermedades con una proporción de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico y que no provoca efectos adversos.

20 El nivel posológico eficaz de la composición farmacéutica se puede determinar, en función de algunos factores, que incluyen el fin del uso, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y el estado de salud, el tipo y la gravedad de la enfermedad, la actividad del fármaco, la
25 sensibilidad al fármaco, el método de administración, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento, los fármacos

utilizados en combinación o utilizados concurrentemente, y otros factores conocidos en el campo médico. Por ejemplo, aunque no de manera constante, la composición farmacéutica puede administrarse generalmente en una cantidad de 5 0.001 mg/kg a 100 mg/kg, preferentemente, de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg de una a varias veces al día. La dosis de administración no limita el alcance de la presente divulgación en ningún aspecto.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente 10 divulgación se puede administrar a cualquier animal que pueda desarrollar enfermedades pulmonares, y el animal puede incluir, por ejemplo, seres humanos y primates, así como ganado, tal como ganado bovino, cerdos, caballos, perros, etc.

15 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a través de una vía de administración adecuada de acuerdo con el tipo de formulación, y se puede administrar a través de varias vías, ya sea vía oral o parenteral, siempre y cuando pueda llegar a un tejido 20 diana. El método de administración no se limita a uno en particular, sino que la administración puede realizarse mediante un método común, por ejemplo, por vía oral, por vía rectal, vía intravenosa, vía intramuscular o aplicación local, vía subcutánea, inhalación respiratoria, inyección 25 endometrial o intracerebroventricular.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede utilizar sola o se puede utilizar junto

con cirugía u otro tratamiento químico para prevenir o tratar enfermedades pulmonares.

Además, la presente divulgación proporciona una composición alimenticia funcional para la salud para
5 prevenir o mejorar las enfermedades pulmonares, comprendiendo la composición alimenticia funcional para la salud al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un
10 agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la proteína o el gen HAPLN1 como principio activo.

En determinadas realizaciones, la proteína HAPLN1 proporcionada en el presente documento puede comprender una
15 secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En algunas de estas realizaciones, la proteína HAPLN1 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %
20 o al menos 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. Asimismo, el polipéptido divulgado en la memoria descriptiva puede incluir un péptido de SEQ ID NO: 1, un fragmento del mismo y un péptido en el que al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco,
25 seis o siete aminoácidos están modificados.

La HAPLN1 recombinante puede tener el efecto de mejorar el daño alveolar provocado por el envejecimiento o la

reducción de elastina, y por lo tanto, se puede utilizar como una composición alimenticia funcional para la salud para prevenir o mejorar enfermedades pulmonares.

En la composición alimenticia funcional para la salud
5 de acuerdo con la presente divulgación, la enfermedad pulmonar puede ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en bronquitis crónica, asma, enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), pero sin limitarse a las mismas, y la enfermedad pulmonar puede incluir diferentes
10 enfermedades provocadas por un daño pulmonar.

En la composición alimenticia funcional para la salud de acuerdo con la presente divulgación, el alimento funcional para la salud puede prepararse en polvo, granulados, comprimidos, cápsulas, jarabes, bebidas, etc. para prevenir
15 o mejorar enfermedades pulmonares, y no hay limitación en la forma del alimento, y puede incluir todos los alimentos de significado habitual. Por ejemplo, el alimento puede incluir refrescos y diferentes bebidas, frutas y sus alimentos procesados (frutas enlatadas, confituras, etc.), pescado,
20 carnes y alimentos procesados de las mismas (jamón, tocino, etc.), panes y fideos, galletas y tentempiés, productos lácteos (mantequillas, quesos, etc.), etc., y puede incluir todos los alimentos funcionales de significado habitual. Además, el alimento puede incluir un alimento utilizado como
25 alimento para animales.

La composición alimenticia funcional para la salud de acuerdo con la presente divulgación se puede preparar

incluyendo además un aditivo alimenticio aceptable para su uso en alimentos y otros ingredientes auxiliares adecuados, que se utilizan comúnmente en la técnica.

La idoneidad de los aditivos alimenticios está
5 determinada por la especificación y la norma del artículo en cuestión de acuerdo con las normas generales y la prueba general del código de aditivos alimenticios de Corea autorizado por el ministerio de seguridad alimentaria y de medicamentos de Corea, a menos que se indique de otro modo.
10 Los elementos enumerados en el "Código de aditivos alimenticios" anterior son, por ejemplo, aditivos sintéticos tales como cetonas, glicina, citrato potásico, ácido nicotínico, ácido cinámico, etc.; aditivos naturales tales como color caquí, extracto de regaliz, celulosa
15 microcristalina, color licor de sorgo, goma guar, etc.; y mezcla de aditivos tales como L-glutamato de sodio, aditivos alcalinos para fideos, conservantes, colores de alquitrán, etc.

Otros ingredientes auxiliares pueden incluir además,
20 por ejemplo, aromas, hidratos de carbono naturales, edulcorantes, vitaminas, electrolitos, colorantes, ácidos pécticos, ácidos algínicos, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, ajustadores del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes, agentes de carbonatación,
25 etc. En particular, como hidrato de carbono natural, se pueden utilizar monosacáridos tales como glucosa y fructosa, disacáridos tales como maltosa y sacarosa, polisacáridos

tales como dextrina y ciclodextrina, alcohol de azúcar tal como xilitol, sorbitol, eritritol, etc. Los ejemplos de edulcorantes pueden incluir edulcorantes naturales tales como la taumatina y el extracto de estevia, o edulcorantes
5 sintéticos tales como la sacarina y el aspartamo, etc.

La dosis eficaz de HAPLN1 recombinante incluida en el alimento funcional para la salud de acuerdo con la presente divulgación puede ajustarse adecuadamente de acuerdo con el fin del uso, tal como prevención o mejora de enfermedades
10 pulmonares. Dado que la composición incluye un alimento como materia prima, tiene la ventaja de estar exento de las reacciones adversas que pueden producirse cuando se toman fármacos generales durante un largo período de tiempo. La composición también es excelente en portabilidad y, por lo
15 tanto, se puede tomar como agente complementario para prevenir o mejorar las enfermedades pulmonares.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá en detalle con referencia a realizaciones ilustrativas para una mejor comprensión. Sin
20 embargo, las siguientes realizaciones ilustrativas son solo para ilustrar la presente divulgación, y el alcance de la presente divulgación no se limita a las siguientes realizaciones ilustrativas. Las realizaciones ilustrativas de la presente divulgación se proporcionan para explicar de
25 manera más completa la presente divulgación a un experto habitual en la materia.

Además, la presente divulgación puede proporcionar un

método para prevenir o tratar enfermedades pulmonares en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación.

5 El sujeto es preferentemente un mamífero, incluidos los seres humanos, y pueden ser pacientes que necesiten tratamiento para enfermedades pulmonares. El paciente puede incluir pacientes sometidos al tratamiento de una enfermedad pulmonar, pacientes que han sido sometidos al tratamiento de
10 una enfermedad pulmonar, y pacientes que necesitan el tratamiento de una enfermedad pulmonar, y también pacientes que han sido sometidos a operaciones quirúrgicas para tratar una enfermedad pulmonar. La administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación a un
15 individuo puede permitir aliviar o tratar la enfermedad pulmonar.

Como se utiliza en el presente documento, el término "alivio" se refiere a cualquier acción en la que la enfermedad pulmonar se reduce o se beneficia de la
20 administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

Como se utiliza en el presente documento, el término
25 "administración" se refiere a la introducción de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto usando cualquier método adecuado.

Las vías de administración pueden incluir, pero sin limitación, instilación intratraqueal o intrabronquial o por inhalación, o cualquier tipo de inyecciones, o cualquier tipo de medicación oral, o cualquier tipo de medicación transdérmica. Como uno de los ejemplos, la composición farmacéutica se puede administrar en forma de aerosol o se puede administrar por instilación.

La administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede realizar mediante aerosol, que puede ser generado por un nebulizador o por instilación. La composición farmacéutica se puede administrar sola o con un vehículo tal como una solución salina, DMSO, un alcohol o agua. También se puede utilizar como vehículo para la administración intratraqueal de diferentes agentes, tales como aquellos que previenen la degradación de las fibras elásticas o favorecen su resíntesis. La cantidad diaria eficaz de la composición es de aproximadamente 0.001 mg/kg a 100 mg/kg, preferentemente, de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. La dosis de administración no limita el alcance de la presente divulgación en ningún aspecto. Por ejemplo, la cantidad de composición farmacéutica administrada diariamente por vía intratraqueal a un ser humano puede variar de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la cantidad diaria es de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del ser humano tratado (diariamente).

Además, el tiempo durante el que se administra la composición farmacéutica puede variar, como es bien sabido en la técnica, para lograrse los resultados deseados. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar
5 como un aerosol de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 1 hora por pauta de tratamiento, de 1 a 5 veces al día, o hasta que se administre por completo la dosis diaria deseada.

Adicionalmente, la composición farmacéutica para
10 prevenir o tratar enfermedades pulmonares, que comprende: al menos uno seleccionado del grupo que consiste en proteína HAPLN1 (proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglicano), un gen que codifica la proteína HAPLN1 y un agente eficaz para potenciar la expresión o activar las funciones de la
15 proteína o del gen HAPLN1 como principio activo de acuerdo con la presente divulgación puede administrarse simultánea/secuencialmente junto con otros fármacos existentes para el tratamiento de enfermedades pulmonares o con métodos de tratamiento existentes de las mismas. Dicha
20 administración puede ser una administración única o múltiple. Es importante administrar una cantidad que logre el máximo efecto con una cantidad mínima sin reacciones adversas teniendo en cuenta todos los factores. Los expertos en la materia pueden determinar dicha cantidad con facilidad.

25 <Ejemplo 1> Producción de HAPLN1 humana recombinante

(rhHAPLN1)

1. Secuencia de aminoácidos de HAPLN1 humana recombinante

Una secuencia de aminoácidos que constituye una HAPLN1 recombinante es la siguiente:

5 **DHLSDNYTLDHDRAIHQAENGPHLLVEAEQAKVFSHRGGNVTLPCKFYRDP**
TAFGSGIHKIRIKWTKLTSDYLKEVDVFVSMGYHKKTYGGYQGRVFLKGGSD
SDASLVITDLTLEDYGRYKCEVIEGLEDDTVVVALDLQGVVFPYFPRLGRYNL
NFHEAQQACLDQDAVIASFDQLYDAWRGGLDWCNAGWLSDGSVQYPITKPR
EPCGGQNTVPGVRNYGFWDKDKSRYDVFCFTSNFNGRFYLIHPTKLTYDEA
VQACLNDGAQIAKVGQIFAAWKILGYDRCDAGWLADGSVRYPISRPRRRCSP
TEAAVRVFGFPDKKHKLYGVYCFRAYN (SEQ ID NO: 1)

10 2. Expresión, purificación y conservación de la proteína HAPLN1 humana recombinante (rhHAPLN1)

Para preparar la proteína rhHAPLN1 (número de gen 2678736), se transfectó un vector de ADN que codificaba la secuencia de aminoácidos de rhHAPLN1 en célula Expi 15 293 (ThermoFisher Scientific Co., Waltham, MA, EE. UU.) como célula hospedadora. Para la purificación, se insertaron un péptido señal secretor, 10 histidinas (H, His) y el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV en el extremo amino, y se expresaron. 3 días después de la transfección del vector, se 20 recogió el medio de cultivo y se purificó a través de una columna HisTrap (GE Healthcare, IL, EE. UU.), y a continuación, se escindió el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV con la proteasa TEV, y las moléculas, incluida la histidina, se eliminaron mediante DynaBeads (Thermo 25 Fisher Scientific). La solución así obtenida se sometió a diálisis mediante Tris-HCl 40 mM y NaCl 1 M a pH 8.0 durante 16 h. La concentración de proteína del producto de

purificación final fue de 0.11 mg/ml, y se dividió en alícuotas en una sola dosis mediante Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M a pH 8.0, glicerol al 50 % como disolvente y, a continuación, se almacenó en nevera a -20 °C antes de su uso.

5 <Ejemplo experimental 1> Examen del efecto de mejora de la arquitectura alveolar en ratones de edad avanzada mediante la administración intraperitoneal repetida de rhHAPLN1

1. Preparación y crianza de los animales de experimentación

En cuanto a los animales de experimentación, los ratones
10 C57BL/6J macho de 2 meses (Young Bio Co., Ltd., Corea) se determinaron como ratones jóvenes, y los ratones C57BL/6J macho de 20 meses se determinaron como ratones de edad avanzada. Se permitió a los animales el libre acceso al agua y a la comida, y la sala de cría se mantuvo a una temperatura
15 de 21 °C a 24 °C, humedad del 40 % al 60 % y ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

Se asignaron cinco ratones jóvenes a un grupo de control normal (Grupo joven), y cada cinco ratones de edad avanzada se asignó a un grupo de control de edad avanzada (Grupo de
20 edad avanzada) y a un grupo tratado con rhHAPLN1 de edad avanzada (Grupo de edad avanzada + rhHAPLN1). Se inyectó por vía intraperitoneal rhHAPLN1 diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) al grupo de edad avanzada tratado con rhHAPLN1 (Grupo de edad avanzada + rhHAPLN1) (inyección
25 i.p.) a una dosis de 0.1 mg/kg con un volumen de 80 µl una vez, que se realizó 3 veces por semana durante un total de 3 semanas. A los otros dos grupos de control se les

administró la misma cantidad de PBS de la misma manera.

2. Tinción y observación microscópica del tejido alveolar

Al final del experimento, se realizó una perfusión cardíaca, y luego se dividió el pulmón izquierdo en partes superior e inferior, y se fijó con formalina al 10 %
5 tamponada neutra (NBF, *Neutral Buffered Formalin*), y se prepararon secciones de tejido en parafina para que la sección transversal de la parte superior fuera visible. Las secciones de tejido se tiñeron con un método de hematoxilina y eosina (H y E) y se fotografiaron usando un microscopio
10 Ni-U (Nikon) y una cámara digital DS-R11 (Nikon), y los resultados se muestran en la FIG. 1(A) (Barra de escala = 100 μm).

Adicionalmente, con respecto a las secciones de tejido
15 teñidas de cada individuo, se calcularon las intersecciones lineales medias (ILM) utilizando el programa Image J para cuantificar la densidad alveolar. El valor de ILM más alto indica el área superficial más baja de los alvéolos, y se utiliza como un índice que indica la gravedad del enfisema o de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La
20 ecuación es $L_m (\mu\text{m}) = \text{número de intersecciones} / (\text{longitud de cuadrícula } (\mu\text{m}) \times \text{número de líneas})$. Después de medir el valor promedio de tres áreas aleatorias por animal, se realizó un análisis estadístico para los valores de cinco
25 animales mediante Sigma plot 12.0 y Graph Pad Prism 8. Los resultados se muestran en la FIG. 1(B).

Como se muestra en las FIGS. 1(A) y 1(B), los valores

de ILM de los alvéolos (μm) de ratones de edad avanzada aumentaron en aproximadamente un 141 %, en comparación con los de los ratones jóvenes ($p<0.001$). Por otra parte, se encontró que este aumento a causa del propio envejecimiento se redujo en aproximadamente un 56 % con el tratamiento con rhHAPLN1 ($p<0.0435$).

<Ejemplo experimental 2> Eficacia de rhHAPLN1 en modelo de EPOC inducida por elastasa pancreática porcina (PPE, *Porcine Pancreatic Elastase*)

10 1. Preparación y crianza de los animales de experimentación

En cuanto a los animales de experimentación, Se utilizaron ratones C57BL6/N hembra de 6 a 10 semanas (Young Bio, República de Corea) que pesaban de 20 g a 25 g, y los ratones se dividieron en cinco ratones por grupo. Se permitió a los animales el libre acceso al agua y a la comida, y la sala de cría se mantuvo a una temperatura de 21 °C a 24 °C, humedad del 40 % al 60 % y ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

2. Inducción de la EPOC

20 Se preparó un modelo de ratón con inducción de la EPOC con referencia a Suki et al., (2017, *Methods Mol. Biol.* 1639:67-75) y Wright et al., (2008, *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 295: L1-L15).

Para inhalar elastasa en los pulmones, primero se adquirió elastasa pancreática porcina (EC134; PPE) en Elastin Products Company Inc. (Owensville, Missouri, EE. UU.), y se administraron 6 UI/30 μl de la misma una vez por

animal al día antes del tratamiento farmacológico. La administración se realizó dividiendo a los animales en dos grupos de acuerdo con el método de inhalación.

Con detalle, un grupo de inhalación de aerosol (AH) recibió la administración por vía oral con una aguja oral zonde de 20G (0.9 x 50 mm). La administración se realizó abriendo cuidadosamente la boca, tirando de la lengua, dejando caer la solución de elastasa en la parte posterior de la misma, es decir, sobre la orofaringe distal, y al mismo tiempo, bloqueando ambas fosas nasales para inducir la inhalación. Por otra parte, en un grupo de instilación intratraqueal (IT) la administración se realizó induciendo la inhalación espontánea de los ratones instilando en la cavidad nasal mediante una pipeta Eppendorf. Los ratones se pesaron dos veces por semana, y cada grupo se dividió en cuatro subgrupos para la administración de la composición farmacológica.

3. Eficacia de la composición farmacológica

El grupo de AH se subdividió en AH-1: grupo (normal) de tratamiento sin PPE, AH-2: grupo de PPE + solución salina, AH-3: grupo de PPE + rhHAPLN1, y AH-4: grupo de PPE + ácido hialurónico (HA), y el grupo de IT se subdividió en IT-1: grupo (normal) de tratamiento sin PPE, IT-2: grupo de PPE + solución salina, IT-3: grupo de PPE + rhHAPLN1, e IT-4: grupo de PPE + HA. En este caso, HA representa ácido hialurónico, que se utilizó como control positivo, porque se sabe que es eficaz contra la EPOC. La administración y la concentración

de HA se determinaron con referencia a Cantor *et al.*, (2005, "Experimental Lung Research", 31:417-430), y por consiguiente, se adquirió una sal sódica del ácido hialurónico derivada de *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich; 5 St. Louis, MO, EE. UU., Cat. 73641-10MG) y se utilizó.

Cada muestra de composición farmacéutica se administró cinco veces por semana mediante un sistema de dosificación en masa, de manera específica, una cámara de aerosol (Data Science International) para la aerosolización a partir de 10 1 día después de la administración de la elastasa (medidor de flujo de bola 3, aerosol 1 hora, utilización del 30 %). En la FIG. 2, se muestra una ilustración esquemática de la aerosolización.

Cada muestra se aerosolizó con un aerosolizador a una 15 concentración del 0.33 % (p/v) de rhHAPLN1 y del 5.71 % (p/v) de HA ajustando su volumen a 6.8 ml por administración única utilizando solución salina fisiológica como disolvente, y 1 día después de la última aerosolización, el 21.^{er} día, se realizó la perfusión cardíaca bajo anestesia. A continuación, 20 se seccionó horizontalmente el pulmón izquierdo y se tomó la parte inferior y se fijó con formalina al 10 % tamponada neutra (NBF), y se preparó una sección de tejido en parafina de modo que la sección transversal de la parte superior fuera visible. Las secciones de tejido se tiñeron con un método de 25 hematoxilina y eosina (H y E) y se fotografiaron con un microscopio Ni-U (Nikon) y una cámara digital DS-Ri1 (Nikon) con un aumento de 200x para obtener datos de imagen del

tejido alveolar (barra de escala = 100 μm), y se midió la ILM de los alvéolos. El valor de ILM más alto indica el área superficial más baja de los alvéolos, y se utiliza como un índice que indica la gravedad del enfisema o de la EPOC. La ecuación es $Lm (\mu\text{m}) = \text{número de intersecciones} / (\text{longitud de cuadrícula } (\mu\text{m}) \times \text{número de líneas})$. Después de medir el valor promedio de tres áreas aleatorias por animal, se realizó un análisis estadístico para los valores de cinco animales mediante Sigma plot 12.0 y Graph Pad Prism 8.

Los resultados experimentales de los grupos de AH se muestran en la FIG. 3, y los resultados experimentales de los grupos de IT se muestran en la FIG. 4.

La FIG. 3 muestra los resultados de los grupos de AH, y con referencia a las FIGS. 3A a 3C, el grupo tratado con PPE (AH-2) de 21.2 μm mostró un aumento de aproximadamente 1.5 veces, en comparación con el grupo normal no tratado (AH-1) de 13.8 μm ($p < 0.001$). El grupo tratado con rhHAPLN1 (AH-3) de 14.5 μm mostró una reducción de aproximadamente un 95 %, en comparación con el grupo tratado con PPE de 21.2 μm ($p < 0.00002$), lo que indica casi una recuperación a un estado normal.

A diferencia de ello, desde el punto de vista de la concentración, el grupo tratado con HA (AH-4) del 5.71 % (p/v), que fue aproximadamente 17 veces mayor que el de 0.33 % (p/v), mostró una reducción de aproximadamente el 73 % ($p < 0.002$), lo que indica que el control positivo del tratamiento con HA mostró una eficacia ligeramente menor que

el tratamiento con rhHAPLN1, que mostró una reducción de aproximadamente un 95 %.

La FIG. 4 muestra los resultados de los grupos de IT, y con referencia a las FIGS. 4A a 4C, el grupo tratado con PPE (IT-2) de 22.1 μm mostró un aumento de aproximadamente 1.6 veces, en comparación con el grupo normal no tratado (IT-1) de 13.8 μm ($p < 0.001$). El grupo tratado con rhHAPLN1 (IT-3) de 16.1 μm mostró una reducción de aproximadamente un 72 %, en comparación con el grupo tratado con PPE (TL2) de 22.1 μm ($p < 0.0009$).

A diferencia de ello, desde el punto de vista de la concentración, el grupo tratado con HA (IT-4) del 5.71 % (p/v), que fue aproximadamente 17 veces mayor que el de 0.33 % (p/v), mostró una reducción de aproximadamente el 64 % ($p < 0.00123$), lo que indica que el control positivo del tratamiento con HA también mostró una eficacia ligeramente menor que el tratamiento con rhHAPLN1, que mostró una reducción de aproximadamente un 72 %.

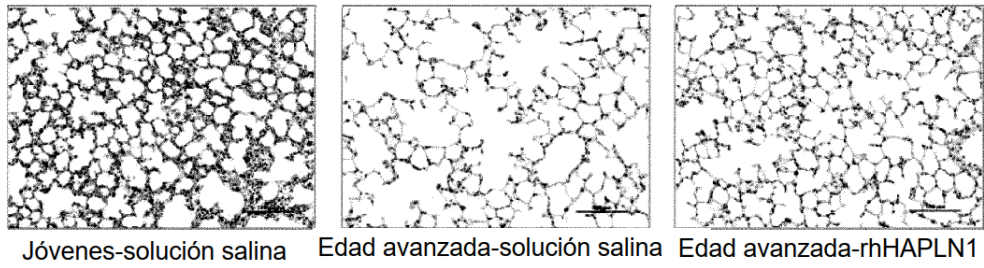
Una HAPLN1 recombinante de acuerdo con la presente divulgación puede tener efectos superiores de mejora del daño alveolar provocado por el envejecimiento o la reducción de elastina y, por tanto, se puede utilizar como una composición farmacéutica o una composición alimenticia funcional para la salud para prevenir o tratar enfermedades pulmonares, tales como bronquitis crónica, asma, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, etc., que están provocadas por el envejecimiento o la reducción de elastina.

La composición tiene pocas reacciones adversas, en comparación con los agentes terapéuticos existentes para las enfermedades pulmonares y, por tanto, puede prevenir o tratar de forma segura y eficaz las enfermedades pulmonares que
5 aumentan cada año, junto con la tendencia mundial al envejecimiento.

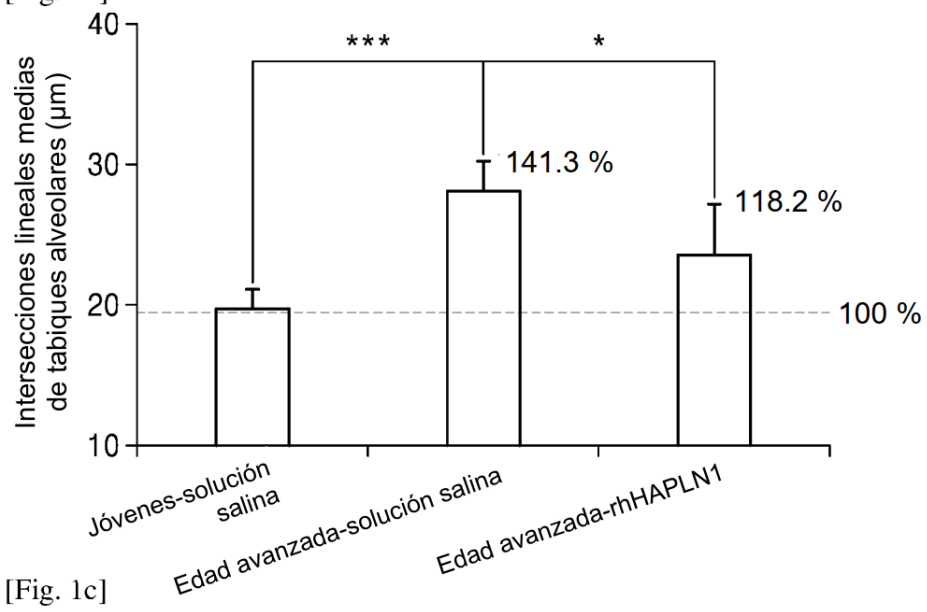
Debe entenderse que las realizaciones descritas en el presente documento deben considerarse solo en un sentido descriptivo y no con fines de limitación. Las descripciones
10 de características o aspectos dentro de cada realización normalmente se deben considerar como disponibles para otras características o aspectos similares en otras realizaciones. Si bien se han descrito una o más realizaciones con referencia a las figuras, los expertos en la materia
15 entenderán que se pueden realizar diferentes cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu ni del alcance de la divulgación tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
20 método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

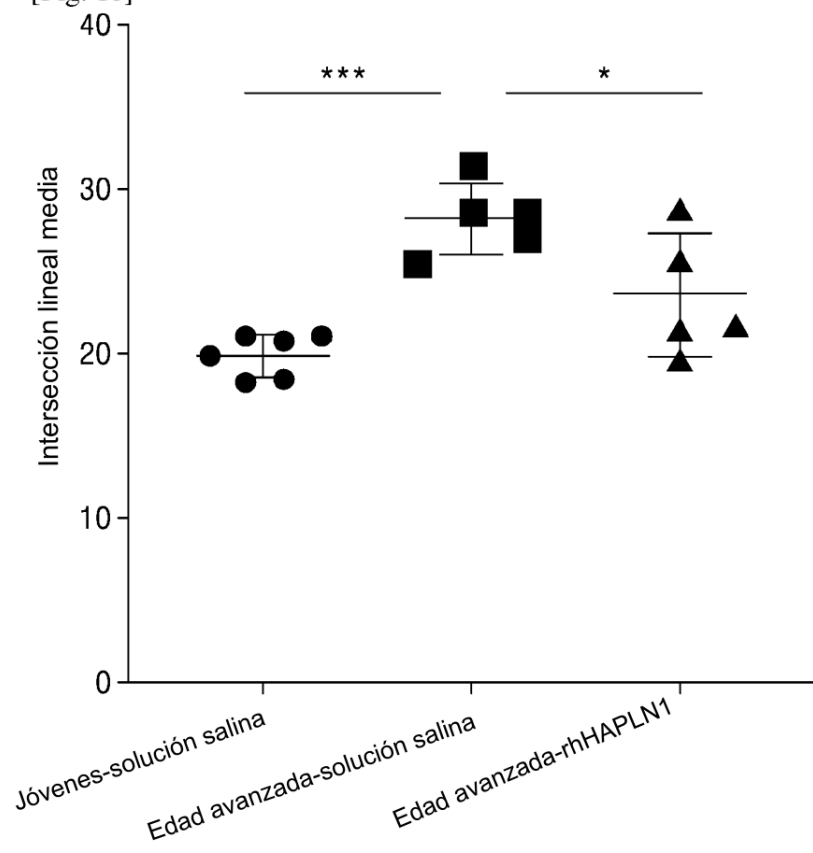
[Fig. 1a]



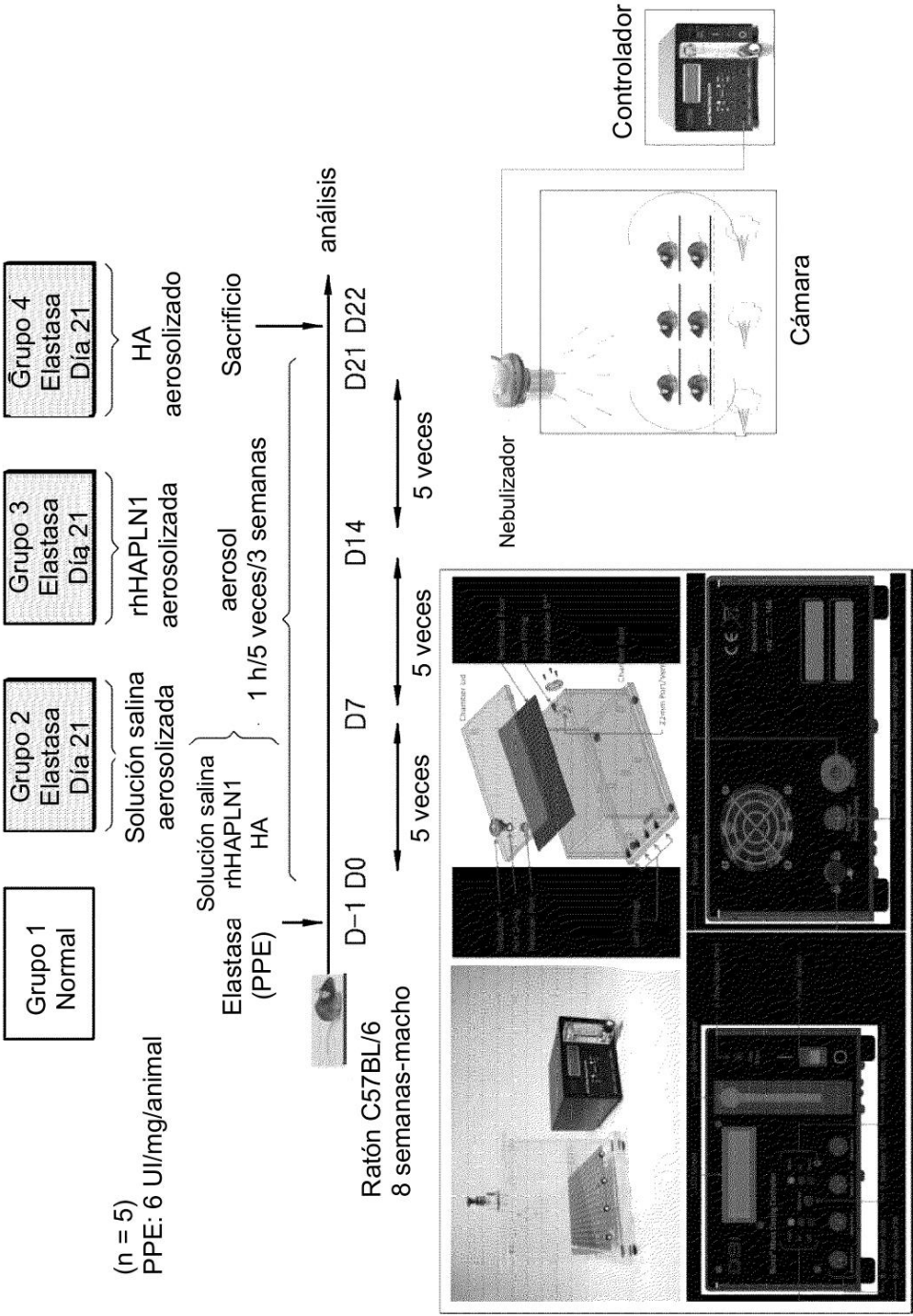
[Fig. 1b]



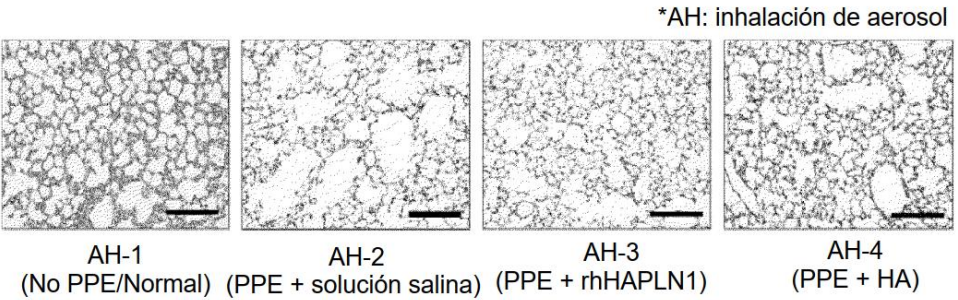
[Fig. 1c]



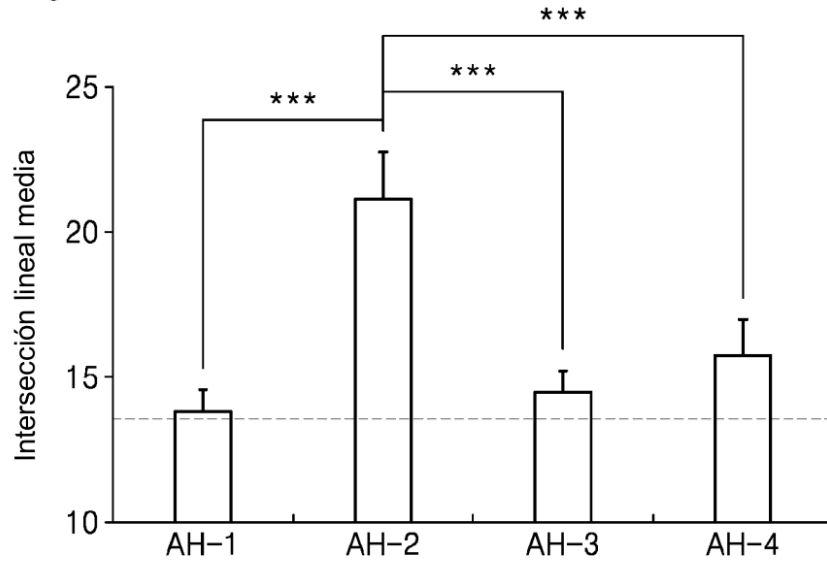
[Fig. 2]



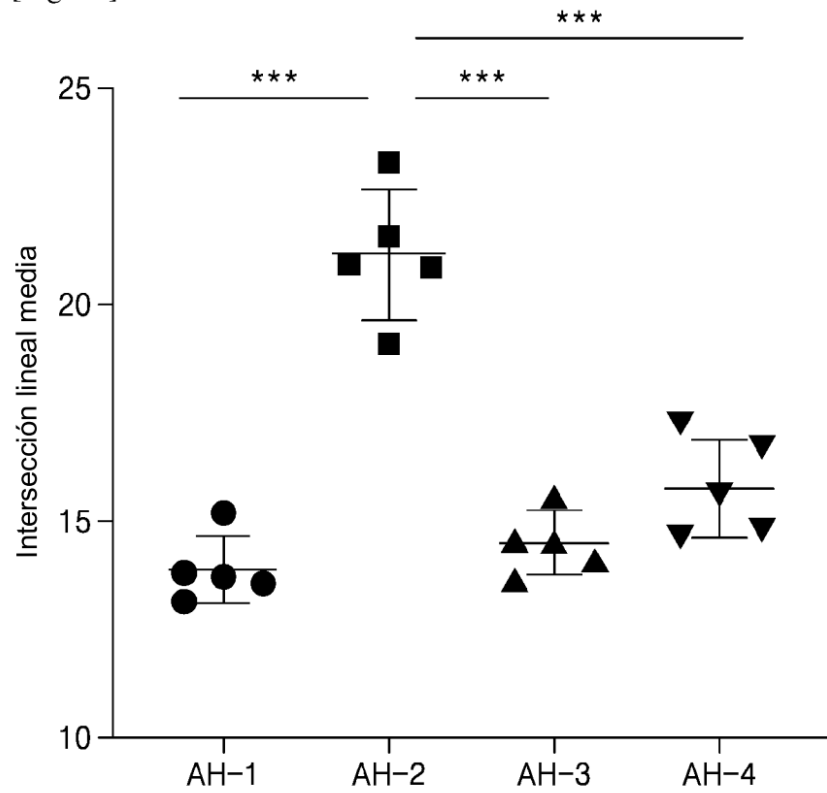
[Fig. 3a]



[Fig. 3b]



[Fig. 3c]



[Fig. 4a]

*IT: Instilación intratecal

