(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 983 696**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/616 (2015.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2017 PCT/KR2017/014957**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18117572**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2017 E 17885034 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3556373**

(54) Título: **Composición que comprende extracto de pepino de mar como ingrediente eficaz para prevenir y tratar la enfermedad relacionada con la disfunción de la membrana de Bruch**

(30) Prioridad:

19.12.2016 KR 20160173715

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

(73) Titular/es:

ALTREGEN CO., LTD. (100.0%)
(Heungdeok IT Valley Yeongdeok-dong) A-2112
13 Heungdeok 1-ro, Giheung-gu
Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, KR

(72) Inventor/es:

LEE, YUNHEE;
HUSSAIN, ALI y
KIM, DAE BONG

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende extracto de pepino de mar como ingrediente eficaz para prevenir y tratar la enfermedad relacionada con la disfunción de la membrana de Bruch

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición para usar en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch a seleccionar de la lista de la reivindicación 1, que comprende un extracto o una fracción de un extracto de pepino de mar que comprende frondósido A como principio activo, en donde el pepino de mar es un invertebrado marino que pertenece a la clase Holothuroidea y el filo Echinodermata. La invención también se refiere a una composición para usar en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch a seleccionar de la lista de la reivindicación 10, que comprende frondósido A como principio activo. El principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch.

[Antecedentes de la técnica]

Pepino de mar es un término genérico para los pepinos de mar que son equinodermos de la clase Holothuroidea, y el mejor alimento saludable llamado ginseng marino, ya que contiene una gran cantidad de saponinas como principio activo, al igual que el ginseng. El pepino de mar es un medicamento para compensar los líquidos corporales que se usa desde la antigüedad en Oriente, incluida China, y ha sido conocido como fármaco que tiene excelentes efectos sobre la diabetes y el asma, y puede usarse para recuperar energía cuando una persona pierde energía y colapsa debido a mucha sudoración provocada por el aumento de temperatura durante el verano. Además, cuando se corta una parte del cuerpo del pepino de mar, el sitio de corte vuelve a su estado original en un plazo de tres meses, e incluso cuando se extraen los órganos, hay una resiliencia asombrosa en el sentido de que se genera un nuevo órgano en un mes y, por lo tanto, en la medicina oriental y popular, se sabe que el pepino de mar mejora la capacidad fagocítica de las células mononucleares y macrófagos humanos, de modo que presenta una función inmunitaria completa y es eficaz en el tratamiento de heridas.

Los pepinos de mar se utilizan como alimento que estimula el desarrollo infantil, como alimento tónico para personas mayores, como alimento de restablecimiento, como alimento que previene la anemia para mujeres embarazadas o como alimento para estimular las deposiciones y han recibido atención como alimento dietético, ya que contienen menos grasa y azúcar. Sin embargo, no existe ningún estudio sobre el efecto del extracto de pepino de mar sobre la mejora de la función ocular.

Las células fotorreceptoras son células detectoras de luz presentes en la retina y transportan información al cerebro para reconocer un objeto en el proceso visual. Las células fotorreceptoras son las células metabólicamente más activas del cuerpo y, por lo tanto, requieren un suministro eficiente de nutrientes y la eliminación de productos de desecho. Dado que estas células funcionan en un ambiente rico en ácidos grasos esenciales, luz y una alta concentración de oxígeno, las células sufren un daño considerable inducido por los radicales libres. En este caso, las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) se utilizan para regenerar continuamente los segmentos externos de las células fotorreceptoras dañadas.

Las células fotorreceptoras y las células del EPR reciben nutrientes a través de la circulación sanguínea coroidea. Cuando los nutrientes proporcionados por la sangre son secretados por los capilares coroideos, antes de llegar a las células del EPR y a las células fotorreceptoras, en primer lugar deben pasar a través de una matriz extracelular denominada membrana de Bruch. Los nutrientes de pequeño tamaño, tales como la glucosa, el oxígeno, los aminoácidos, etc., pasan a través de la membrana de Bruch por simple difusión pasiva, y las vitaminas, los oligoelementos metálicos y los lípidos se unen a proteínas transportadoras y luego se separan de las células del EPR a través de la membrana de Bruch. En cambio, los desechos generados por las células fotorreceptoras y las células del EPR se eliminan de la coroides a través de la membrana de Bruch. Dado que los desechos son generalmente tóxicos, pueden dañar la membrana de Bruch e iniciar la inflamación.

Por consiguiente, una capacidad de transporte eficaz de material de la membrana de Bruch es crucial para el mantenimiento de la visión normal y la supervivencia de las células fotorreceptoras (figura 1).

Debido al envejecimiento, el espesor de la membrana de Bruch aumenta de dos a tres veces y, por tanto, se reducen los gradientes de difusión para el intercambio de nutrientes y desechos, dificultando la difusión de materiales en la membrana de Bruch.

Por consiguiente, los lípidos, los complejos proteolipídicos y los desechos desechados de las células del EPR se depositan sobre la membrana, aumenta la reticulación del colágeno y aumenta la cantidad de colágeno desnaturalizado. Además, no sólo aumentan las cantidades de productos de la glucación de proteínas y lípidos inducidos por glucosilación (AGE, "advanced protein glycation end-products", productos finales de glicación de proteínas avanzados; ALE, "advanced lipid glycation end-products", productos finales de glicación de lípidos

avanzados) (Handa *et al.* 1999), sino que también aumenta el depósito de complejos de proteínas dañados o polimerizados, que acaban interfiriendo con la capacidad de transporte de una membrana (Holz *et al.* 1994) y afectando negativamente al suministro de nutrientes y la eliminación de desechos (figura 2).

En el caso de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), para la cual el envejecimiento es un factor de riesgo importante, los cambios relacionados con la edad se vuelven mucho más graves, la reducida capacidad de transporte de la membrana de Bruch conduce a la muerte de las células del EPR y de las células fotorreceptoras y, por tanto, a la ceguera (figura 3).

Desde el punto de vista clínico, en el envejecimiento de la membrana de Bruch en los ancianos, se ha notificado una disminución de los umbrales escotópicos causada por una regeneración ineficiente de la vitamina A (Steinmetz *et al.*, 1993; Owsley *et al.*, 2001). En la actualidad, en algunos países se prescribe la administración de vitamina A con metales y antioxidantes, pero hay dos problemas en esta estrategia. En primer lugar, sólo se añaden nutrientes específicos, por lo que otros nutrientes esenciales siguen siendo deficientes y, en segundo lugar, cuando se agrega un metal a la membrana de Bruch, la función de transporte disminuye, la concentración del metal en la membrana de Bruch aumenta y posteriormente se deposita en la membrana, lo que aumenta aún más el daño. Además, según el estudio sobre enfermedades oculares relacionadas con la edad (AREDS, "Age-Related Eye Disease Study"), que es una prueba clínica de degeneración macular llevada a cabo en EE. UU. en curso desde hace más de 10 años, los efectos de las composiciones que consisten en vitaminas y aditivos minerales aún no se han demostrado (Kassof *et al.*, 2001).

Una solución ideal es facilitar la capacidad de transporte de la membrana de Bruch, lo cual permite aportar todos los nutrientes que están presentes en el plasma.

Como resultado de intensos esfuerzos para desarrollar un método de tratamiento capaz de abordar la razón fundamental de la disfunción ocular relacionada con la edad, incluida la DMAE, los inventores de esta solicitud descubrieron efectos de un extracto de pepino de mar que mejoran la capacidad de transporte de la membrana de Bruch y la regeneración de la membrana de Bruch por medio de un extracto de pepino de mar, y confirmaron que el extracto de pepino de mar puede usarse como una composición para prevenir y tratar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch.

Bibliografía de la técnica anterior

[1] Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkendal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A. (1993), Matrix metalloproteinases: a review, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 4:197-250.

[2] Handa J.T., Verzijl N., Matsunaga H., Aotaki-Keen A., Lutty G.A., te Koppele J.M., Miyata T. y Hjelmeland L.M., Increase in the advanced glycation end-product pentosidine in Bruch's membrane with age, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1999, 40:775-779.

[3] Holz F.G., Sheraidah G.S., Pauleikhoff D. y Bird A.C., Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane, Arch. Ophthalmol., 1994, 112: 402-406.

[4] Hussain A.A., Lee Y., Zhang J.J., Marshall J. (2011), Disturbed matrix metalloproteinase activity of Bruch's membrane in age-related macular degeneration (AMD), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 52:4459-4466.

[5] Hussain A.A., Starita C., Hodgetts A., Marshall J. (2010), Macromolecular characteristics of ageing human Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration (AMD), Exp. Eye Res., 90:703-710.

[6] Hussain A.A., Lee Y., Marshall J. (2010), High molecular weight gelatinase species of human Bruch's membrane: compositional analyses and age-related changes, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 51:2363-2371.

[7] Hussain A.A., Starita C. y Marshall J. (2004), Chapter IV. Transport characteristics of ageing human Bruch's membrane: Implications for AMD, en: Focus on Macular Degeneration Research (editor O. R. Ioseliani), páginas 59-113, Nova Science Publishers, Inc. Nueva York.

[8] Hussain A.A., Rowe L., Marshall J. (2002), Age-related alterations in the diffusional transport of amino acids across the human Bruch's-choroid complex, Journal of the Optical Society of America, A, Optics, Image Science, & Vision, 19(1): 166-172.

[9] Karwatowski W.S.S., Jefferies T.E., Duance V.C., Albon J., Bailey A.J. y Easty D.L., Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens (1995), Brit. J. Ophthalmol., 79: 944-952.

[10] Kassof A., Kassoff J., Buehler J., *et al.*, A randomized, placebo-controlled clinical trial of high dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: Informe AREDS

n.° 8, Arch. Ophthalmol., 2001, 119:1417-1436.

[11] Kumar A., El-Osta A., Hussain A.A., Marshall J. (2010), Increased sequestration of matrix metalloproteinases in ageing human Bruch's membrane: implications for ECM turnover, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 51:2664-2670.

[12] Moore D.J. y Clover G.M., The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2001, 42:2970-2975.

[13] Moore D.J., Hussain A.A., Marshall J. (1995), Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36(7): 1290-1297.

[14] Owsley C., Jackson G.R., White M., Feist R. y Edwards D., Delays in rod mediated dark adaptation in early age-related maculopathy, Ophthalmol., 2001, 108: 1196-1202.

[15] Owsley C., McGwin G., Jackson G.R., Heinburger D.C., Piyathilake C.J., Klein R., White M.F., Kallies K., Effect of short term, high-dose retinol on dark adaptation in age and age-related maculopathy, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2006. 47(4): 1310-1318.

[16] Ramratten R.S., van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., Mulder P.G.H. y de Jong P.T.V.M., Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in ageing, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1994, 35:2857-2864.

[17] Starita C., Hussain A.A., Pagliarini S., Marshall J. (1996), Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease, Exp. Eye Res., 62(5): 565-172.

[18] Steinmetz R.L., Haimovici R., Jubb C., Fitzke F.W,, Bird A., Symptomatic abnormalities of dark adaptation in patients with age-related Bruch's membrane change, Br. J. Ophthalmol., 1993, 77:549-554.

[19] Hussain A.A., Lee Y. (2016), datos no publicados.

[20] Lee Y., Hussain A.A., Seok J., Kim S., Marshall J. (2015), Modulating the Transport Characteristics of Bruch's Membrane With Steroidal Glycosides and its Relevance to Age-Related Macular Degeneration (AMD), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56(13): 8403-8418.

El documento US 9 517 598 se refiere a un método para fabricar un material a base de colágeno de autoensamblaje para el reemplazo corneal. El documento CN103156168 se refiere a un método de preparación de bebida de níspero y pepino de mar. El documento CN 104397 111 se refiere a un vino de arroz y a unas galletas de níspero. Aminin *et al.* (Journal of medicinal food, 11.3 (2008), 443-453) se refiere a las propiedades inmunomoduladoras del frondósido A, un importante glucósido triterpénico del pepino de mar recolectado con fines comerciales en el Atlántico norte, *Cucumaria frondosa.*

[Sumario de la invención]

La presente invención proporciona una composición para usar en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que comprende un extracto o una fracción del extracto de pepino de mar, en donde: la enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente: degeneración macular asociada a la edad (DMAE), distrofia del fondo de ojo de Sorsby, malattia levintanese (ML), enfermedad de Stargardt, distrofia retiniana viteliforme de Best o distrofia retiniana en panal de Doyne ("Doyne's honeycomb retinal dystrophy", DHRD); el pepino de mar es un invertebrado marino perteneciente a la clase Holothuroidea y al filo Echinodermata; y el extracto o la fracción del extracto de pepino de mar comprende frondósido A como principio activo, y el principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch.

La invención también proporciona una composición para usar en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que comprende frondósido A como principio activo, en donde: la enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente: degeneración macular asociada a la edad (DMAE), distrofia del fondo de ojo de Sorsby, malattia levintanese (ML), enfermedad de Stargardt, distrofia retiniana viteliforme de Best o distrofia retiniana en panal de Doyne ("Doyne's honeycomb retinal dystrophy", DHRD); y el principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch.

La invención se define en las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes se definen otros aspectos y realizaciones preferidas. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona únicamente con fines ilustrativos.

[Descripción técnica]

La expresión "pepino de mar" utilizada en el presente documento se refiere a un invertebrado marino que pertenece a la clase Holothuroidea y al filo Echinodermata, e incluye *Psolus squamatus, Lipotrapeza japonica, Sclerodactyla multipes, Cucumaria, Plesiocolochirus inornatus,* etc., que pertenecen al orden *Dendrochirotacea, Apostichopus japonicus, Holothuria monacaria, Holothuria argus, Holothuria manacaria,* etc., que pertenecen al orden *Aspidochirotida, Synaptidae*, *Polycheira rufescens,* etc., que pertenecen al orden *Apodida, Paracaudina chilensis, Molpadia oolitica,* etc., que pertenecen al orden *Molpadida,* pero la presente divulgación no se limita a los mismos. El pepino de mar se recomienda para su uso como tónico para estimular la fuerza, como medicamento para una mujer embarazada y una mujer enferma, como alimento saludable para la hipertensión, la arterioesclerosis, para pacientes diabéticos y pacientes obesos, pero no se ha conocido ningún efecto sobre las enfermedades oculares relacionadas con la edad.

El término "extracto" utilizado en el presente documento incluye un extracto obtenido extrayendo el pepino de mar, un producto desecado obtenido secando el pepino de mar, un diluyente o un concentrado del extracto, un producto desecado obtenido secando el extracto, un componente parcialmente purificado o un componente purificado del extracto, o una mezcla de los mismos, un extracto líquido y todas las formas de extractos que pueden formarse utilizando el propio extracto líquido. El extracto o la fracción descritos en el presente documento se pueden utilizar preferentemente en forma de líquido después de la extracción.

En el extracto de pepino de mar descrito en el presente documento, el método de extracción del pepino de mar no presenta limitaciones concretas y, por tanto, se puede utilizar un método de extracción utilizado convencionalmente en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de los métodos de extracción pueden incluir extracción con agua caliente, extracción ultrasónica, filtración, extracción por reflujo, que pueden utilizarse solos o en una combinación de dos o más de los mismos.

En la presente divulgación, el tipo de disolvente de extracción utilizado para extraer el pepino de mar no presenta limitaciones concretas y, por tanto, se puede utilizar cualquier disolvente conocido en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de los disolventes de extracción pueden incluir agua, un alcohol y una mezcla de disolventes de los mismos y, como disolvente, puede utilizarse, preferentemente, un alcohol C1 a C4, más preferentemente, un alcohol inferior C1 a C2, e incluso más preferentemente, una solución acuosa de etanol al 80 %. El extracto de pepino de mar descrito en el presente documento es preferentemente agua o un extracto de etanol.

En la presente divulgación, cuando la extracción del pepino de mar se realiza mediante extracción con agua caliente, el pepino de mar se extrae preferentemente de 1 a 5 veces, y más preferentemente 3 veces. El disolvente de extracción se puede añadir de 0,1 a 100 veces, y preferentemente de 0,3 a 5 veces el peso del pepino de mar seco. La temperatura de extracción es preferentemente de 20 a 130 °C. Además, el tiempo de reacción es preferentemente de 30 minutos a 48 horas.

En un método para preparar el extracto de pepino de mar, preferentemente, la evaporación al vacío se realiza utilizando un concentrador de vacío o un evaporador de vacío rotatorio. Además, el secado se realiza mediante secado por descompresión, secado al vacío, secado por ebullición, secado por pulverización o liofilización.

Aunque un método para preparar el producto desecado de pepino de mar puede ser el secado natural, el secado por aire caliente o la liofilización, se utiliza sin limitación cualquier método conocido en la técnica para eliminar la humedad del pepino de mar.

En el método de extracción o secado de pepino de mar, la capa exterior y los órganos internos del pepino de mar pueden extraerse o secarse en su totalidad o por separado, y el extracto o producto desecado de la capa exterior o de los órganos internos puede usarse individualmente o combinados entre sí.

Se puede obtener un extracto preparando polvo de pepino de mar moliendo pepino de mar desecado, añadiendo etanol al 70 % como disolvente de extracción al polvo de pepino de mar para realizar la extracción durante aproximadamente 3 a 6 horas, y retirando el etanol en condiciones de vacío.

El término "fracción" utilizado en el presente documento se refiere a un producto obtenido realizando un fraccionamiento para aislar un componente específico o un grupo de componentes específico de una mezcla que incluye diferentes componentes.

El método de fraccionamiento para obtener la fracción no presenta limitaciones concretas y, por tanto, se puede utilizar un método utilizado convencionalmente en la técnica. Un ejemplo no limitante del método de fraccionamiento puede incluir un método para obtener una fracción del extracto tratando un extracto obtenido al extraer pepino de mar con un disolvente predeterminado.

El tipo de disolvente de fraccionamiento utilizado para obtener la fracción no presenta limitaciones concretas y, por tanto, se puede utilizar cualquier disolvente conocido en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de disolventes de

fraccionamiento pueden incluir disolventes polares, tales como el agua, un alcohol, etc.; y disolventes no polares, tales como hexano, acetato de etilo, cloroformo y diclorometano, etc. Éstos pueden utilizarse solos o en una combinación de dos o más de los mismos. Entre los disolventes de fraccionamiento, preferentemente se utiliza un alcohol C1 a C4.

Dado que un principio activo descrito en el presente documento mejora la función de transporte de la membrana de Bruch, es eficaz para prevenir la aparición de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, para retrasar la progresión de la enfermedad o para tratar la enfermedad.

El principio activo descrito en el presente documento puede mejorar la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch, mejorar la función de difusión de material de la membrana de Bruch, o eliminar proteínas o lípidos unidos o atrapados en la membrana de Bruch, mejorando así la función de transporte.

El principio activo descrito en el presente documento es eficaz para prevenir la aparición de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, retrasar la progresión de las enfermedades o tratar la enfermedad regenerando la membrana de Bruch y mejorando las funciones de la membrana de Bruch.

El principio activo descrito en el presente documento puede regenerar la membrana de Bruch y mejorar sus funciones eliminando un complejo de alto peso molecular ("high molecular weight", HMW) o un componente lipídico, que está unido o depositado sobre la membrana de Bruch.

Además, el principio activo descrito en el presente documento puede regenerar la membrana de Bruch y mejorar sus funciones mediante la secreción de pro-MMP2, pro-MMP9, MMP2 activa y MMP9 activa desde la matriz de la membrana de Bruch.

Además, el principio activo descrito en el presente documento puede regenerar la membrana de Bruch y mejorar sus funciones activando la secreción de MMP activas desde las células del EPR.

Como se ha descrito anteriormente, la composición de extracto de pepino de mar descrita en el presente documento ayuda a descomponer materiales que se polimerizan en la membrana de Bruch, envejeciendo así la membrana de Bruch y permitiendo que se pierdan sus funciones y que suministre nutrientes a los ojos y elimine desechos mediante la secreción de nutrientes, tales como proteínas o lípidos atrapados o unidos a la matriz de la membrana de Bruch y los desechos. Además, puesto que la composición de extracto de pepino de mar descrita en el presente documento permite la recuperación de la función de una enzima mediante la secreción de MMP de la membrana de Bruch, participa en la regeneración de las funciones de la membrana de Bruch y aumenta la conductividad hidráulica y la difusión de materiales de los ojos, dando como resultado la prevención del envejecimiento de la retina y un efecto de prevención, retraso y tratamiento de la pérdida de funciones de la retina relacionada con la edad mediante la regeneración de las funciones de la retina.

El término "prevención" o "retraso" utilizado en el presente documento se refiere a todas las acciones implicadas en inhibir o retrasar la aparición de una enfermedad que se produce debido a la disfunción de la membrana de Bruch mediante la administración de la composición descrita en el presente documento a un sujeto.

El término "tratamiento" utilizado en el presente documento se refiere a todas las acciones implicadas en aliviar o cambiar beneficiosamente los síntomas de una enfermedad que se produce por la disfunción de la membrana de Bruch mediante la administración de la composición descrita en el presente documento a un sujeto.

El término "mejora" utilizado en el presente documento se refiere a todas las acciones implicadas en al menos reducir los parámetros relacionados con las afecciones que se están tratando, por ejemplo, la gravedad de los síntomas.

En la composición farmacéutica descritas en el presente documento, el extracto de pepino de mar o una fracción del mismo está contenido preferentemente entre el 0,1 y el 99,99 % en peso, más preferentemente, entre el 10 y el 99,99 % en peso, e incluso más preferentemente, entre el 50 y el 99,99 % en peso sobre el peso total de la composición farmacéutica. Dentro del intervalo anterior, existe la ventaja de ser más adecuado para lograr los objetivos descritos en el presente documento, debido a los efectos suficientes del extracto de pepino de mar o una fracción del mismo sobre la mejora de la función de transporte de la membrana de Bruch, la regeneración de la membrana de Bruch y la mejora de las funciones de la membrana de Bruch.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede contener el extracto de pepino de mar o una fracción del mismo como principio activo, y contener además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Farmacéuticamente aceptable" significa que se usa convencionalmente en el campo farmacéutico sin irritar a un organismo cuando se le administra la composición ni inhibir la actividad biológica y las características del compuesto administrado.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse con el vehículo y, por tanto, usarse en alimentos, medicinas, suplementos alimentarios, suplementos de agua potable, etc. En la presente divulgación, el

tipo de vehículo no presenta limitaciones concretas y se puede utilizar cualquier vehículo utilizado habitualmente en la técnica. Algunos ejemplos no limitantes de vehículos pueden incluirse solución salina, agua destilada, solución salina tamponada con solución de Ringer, una solución para inyección de albúmina, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, maltodextrina, glicerol, etanol, etc. Estos vehículos se pueden usar en solitario o en una combinación de dos o más de los mismos.

Además, la composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede utilizar añadiendo un aditivo farmacéuticamente aceptable, tal como un excipiente, un diluyente, un antioxidante, un tampón o un agente bacteriostático, si es necesario, y añadiendo además una carga, un agente espesante, un agente humectante, un disgregante, un dispersante, un tensioactivo, un aglutinante o un lubricante.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse en diversas formas adecuadas para administración oral o parenteral. Algunos ejemplos no limitantes de tales preparaciones para la administración oral incluyen trociscos, pastillas para chupar, comprimidos, suspensiones hidrosolubles, suspensiones solubles en aceite, polvo de formulación, emulsiones de gránulos, cápsulas duras, cápsulas blandas, jarabes o elixires.

Para formular la composición farmacéutica descrita en el presente documento para la administración oral, la composición puede incluir un aglutinante, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, almidón, amilopectina, celulosa o gelatina; un excipiente, tal como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz o almidón de batata; o un lubricante, tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearilfumarato de sodio y ceras de polietilenglicol, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente de jarabe, etc.

Además, también pueden añadirse otros materiales distintos de los materiales descritos anteriormente, tales como un agente encapsulante, un vehículo líquido, tal como aceite graso.

Algunos ejemplos no limitantes de las preparaciones parenterales incluyen inyecciones, supositorios, polvos para la inhalación respiratoria, un aerosol para pulverizar, una pomada, un polvo aplicable, aceite, una crema, etc.

Para formular la composición farmacéutica descrita en el presente documento para la administración parenteral, puede utilizarse una solución acuosa esterilizada, un disolvente no acuoso, un agente de suspensión, una emulsión, una preparación liofilizada o una preparación externa y, como disolvente no acuoso o agente de suspensión, puede utilizarse propilenglicol, polietilenglicol, un aceite vegetal, tal como aceite de oliva, o un éster inyectable, tal como oleato de etilo.

Además, de manera más específica, cuando la composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula en forma de un líquido para inyección, la composición descrita en el presente documento se puede mezclar con un estabilizante o tampón en agua, preparando así una solución o suspensión, y la solución o suspensión se puede formular en una forma farmacéutica unitaria, tal como una ampolla o vial. Además, cuando la composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula en forma de un aerosol, se puede mezclar con aditivos, tales como un propulsor, etc., para dispersar un concentrado difundido en agua o un polvo húmedo.

Además, cuando la composición farmacéutica descrita en el presente documento se formula en forma de pomada o crema, puede utilizarse un aceite animal, un aceite vegetal, parafina de cera, almidón, tragacanto, un derivado de celulosa, polietilenglicol, bentonita, silicona, sílice, talco u óxido de zinc como vehículo.

Una cantidad farmacéuticamente eficaz o una dosis eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede variar en función del método de formulación, del método de administración, del momento de la administración y/o de la vía de administración de la composición farmacéutica y, específicamente, puede variar en función de diversos factores y factores similares bien conocidos en el campo médico, tales como el tipo y grado de reacción que se va a lograr mediante la administración de la composición farmacéutica, el tipo, la edad, el peso corporal y el estado de salud general de un sujeto para la administración, de los síntomas o la gravedad de una enfermedad, el sexo, la dieta, la excreción, los componentes de un fármaco u otras composiciones utilizadas en el sujeto al mismo tiempo o en un momento diferente, etc. Los expertos en la técnica pueden determinar y recetar con facilidad una cantidad o dosis eficaz para el tratamiento deseado.

La dosis de la composición farmacéutica descrita en el presente documento para un efecto más preferible es preferentemente de 0,01 a 1000 mg/kg, y más preferentemente, de 1 a 500 mg/kg por día. La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse una vez al día o dividirse en varias dosis. Por consiguiente, la dosis no limita el alcance de la presente divulgación de ninguna manera.

La vía de administración y el método de la composición farmacéutica descrita en el presente documento pueden ser independientes entre sí. El método no presenta limitaciones concretas y, por lo tanto, se puede usar cualquier vía y método de administración, siempre que la composición farmacéutica pueda alcanzar un sitio pertinente deseado. La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral.

Como administración parenteral, puede utilizarse, por ejemplo, la administración intravenosa, la administración

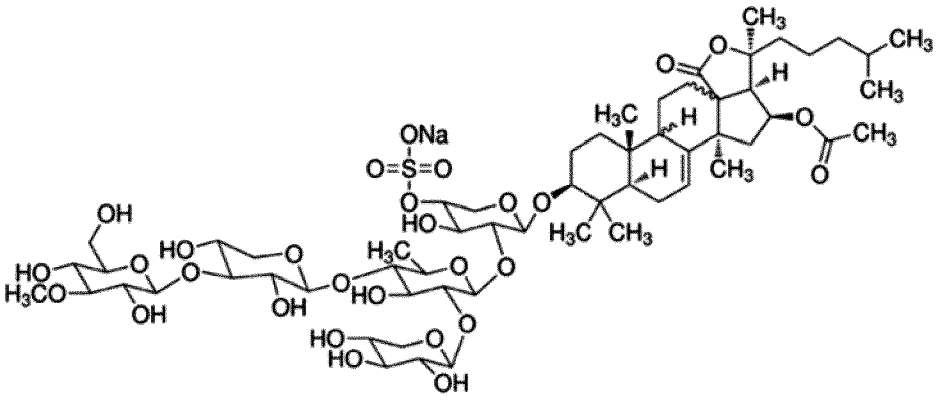
intraperitoneal, la administración intravenosa, la administración transdérmica o l administración subcutánea, la aplicación o pulverización de la composición sobre un sitio enfermo o la inhalación.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra preferentemente por vía oral o inyectada.

La composición descrita en el presente documento puede incluir además frondósido A para prevenir y retrasar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch y aumentar el efecto terapéutico de la misma.

El "frondósido A" utilizado en el presente documento es un compuesto de saponina representado por la siguiente fórmula, y se sabe que está incluido en el pepino de mar descrito en el presente documento. Su número CAS es 127367-76-4 (anhidro) y su fórmula química es $C_{60}H_{96}O_{29}SNa$. En la presente divulgación, se confirma que el frondósido A interviene en la mejora de la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch, en la mejora de la función de transporte de la membrana de Bruch a través de la secreción de MMP y de lípidos, en la regeneración de la membrana de Bruch, y en la mejora de las funciones de la misma, y a través de esto, se identificó un uso novedoso del frondósido A para prevenir, retrasar, tratar y mejorar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch.

[Fórmula química]



La composición descrita en el presente documento puede incluir además una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste en aminoácidos, materiales antioxidantes, minerales, materiales metálicos, luteína, astaxantina y zeaxantina para prevenir y retrasar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch y aumentar el efecto terapéutico de la misma.

La enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch puede ser DMAE, distrofia del fondo de ojo de Sorsby, malattia levintanese (ML), enfermedad de Stargardt, distrofia retiniana viteliforme de Best o distrofia retiniana en panal de Doyne (DHRD).

También se describe en el presente documento una composición de alimento funcional saludable para prevenir, retrasar y tratar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que contiene el extracto de pepino de mar como principio activo.

En la composición de alimento funcional saludable descrita en el presente documento, el extracto de pepino de mar o una fracción del mismo y su eficacia es la misma que la descrita anteriormente en relación con la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

Cuando la composición de alimento funcional saludable descrita en el presente documento se utiliza como aditivo alimentario, se puede utilizar adecuadamente tal cual o en combinación con un alimento o componente alimentario diferente de acuerdo con un método convencional.

El tipo de alimento no presenta limitaciones concretas e incluye todos los tipos de alimentos en un sentido general. Algunos ejemplos no limitantes de alimentos a los que se añade el material pueden incluir carne, embutido, pan, chocolate, caramelos, tentempiés, productos de confitería, pizza, ramen, otros fideos, goma, productos lácteos, incluidos helados, diversas sopas, bebidas, bebidas de té, bebidas alcohólicas y complejos vitamínicos.

Cuando la composición de alimento funcional saludable descrita en el presente documento es una composición de bebida, tal como una bebida general, se pueden introducir diferentes sabores o carbohidratos naturales como componentes adicionales. Algunos ejemplos no limitantes de carbohidratos naturales pueden incluir monosacáridos,

tales como glucosa, fructosa, etc.; disacáridos, tales como maltosa, sacarosa, etc.; agentes edulcorantes naturales, tales como dextrina, ciclodextrina, etc.; y edulcorantes sintéticos, tales como sacarina y aspartamo. La proporción del componente adicional añadido puede ser determinada adecuadamente por un experto en la técnica.

Aparte de estos, la composición de alimento funcional saludable descrita en el presente documento puede contener una diversidad de nutrientes, vitaminas, electrólitos, agentes aromatizantes, agentes colorantes, ácido péctico y una sal del mismo, ácido algínico y una sal del mismo, un ácido orgánico, un agente espesante coloidal protectore, un ajustador del pH, un estabilizante, un conservante, glicerina, un alcohol o un agente carbonatante utilizado en bebidas carbonatadas. Aparte de estos, la composición de alimento funcional saludable descrita en el presente documento puede contener pulpa de fruta para preparar zumos de fruta naturales, bebidas de frutas o bebidas vegetales. Estos componentes se pueden usar en solitario o en una combinación de dos o más de los mismos. Las proporciones de estos aditivos también pueden ser seleccionadas adecuadamente por un experto en la técnica.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir, retrasar y tratar/mejorar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch que incluye frondósido A, un isómero del mismo, un hidrato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo.

También se describe en el presente documento una composición de alimento funcional saludable para prevenir, retrasar y tratar una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que incluye frondósido A, un isómero del mismo, un hidrato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo.

[Efectos ventajosos]

Una composición según la presente divulgación es eficaz para mejorar la función de transporte de la membrana de Bruch y retrasar o restaurar el envejecimiento de los ojos estimulando la regeneración de la membrana de Bruch, y también puede tener una eficacia excelente para prevenir y tratar una enfermedad, tal como DMAE, que se produce debido a una disfunción de la membrana de Bruch relacionada con la edad, distrofia del fondo de ojo de Sorsby, ML, enfermedad de Stargardt, Distrofia retiniana viteliforme de Best o DHRD.

[Descripción de los dibujos]

La figura 1 es una imagen en sección transversal de una retina humana y un diagrama que ilustra los componentes de la fototransducción.

La figura 2 es un conjunto de gráficos que muestran cambios estructurales de la membrana de Bruch relacionados con la edad, en la cual, a medida que avanza el envejecimiento, (A) el espesor de la membrana de Bruch aumenta de 2 a 3 veces, (B) aumenta la cantidad acumulada de colágeno dañado o desnaturalizado, (C) un material lipídico importante, tal como un éster de colesterol, aumenta exponencialmente, y (D) se produce agregación de proteínas debido a la reducción de los grupos tiol libres.

La figura 3 es un diagrama que ilustra un cambio de la membrana de Bruch relacionado con la edad y un cambio drástico en un paciente con degeneración macular.

La figura 4 muestra el mecanismo de acción de las MMP implicadas en el envejecimiento y la regeneración de la membrana de Bruch y un mecanismo de acción anómalo de las MMP en un paciente con degeneración macular.

La figura 5 muestra los resultados de los cambios en la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch humana relacionada con la edad en una persona normal y un paciente con degeneración macular.

La figura 6 muestra los resultados de los cambios en la difusión relacionados con la edad de la membrana de Bruch humana en una persona normal y en un paciente con degeneración macular.

La figura 7 muestra el efecto de un extracto de pepino de mar descrito en el presente documento sobre la mejora de la función de transporte de la membrana de Bruch.

La figura 8 es una curva de dosis-respuesta que muestra el efecto de un extracto de pepino de mar descrito en el presente documento sobre la secreción de un lípido desde la membrana de Bruch.

La figura 9 muestra el resultado de eliminar una enzima MMP libre de la membrana de Bruch humana.

La figura 10 muestra el efecto de un extracto de pepino de mar descrito en el presente documento sobre la eliminación de una enzima MMP unida a la membrana de Bruch humana.

La figura 11 muestra el efecto de un extracto de pepino de mar descrito en el presente documento sobre la eliminación de HMW2 unido a la membrana de Bruch humana.

La figura 12 muestra un resultado de TLC que confirma la saponina de una fracción obtenida aislando una solución de concentrado de pepino de mar a través de una columna de gel de sílice.

La figura 13 muestra un resultado de TLC para las fracciones de la figura 12 después de dividirse en cinco grupos de fracciones que constan de componentes similares (Patrón, pepino de mar entero en polvo; F1-F5, fracciones de pepino de mar en polvo).

La figura 14 muestra el efecto de mejora de la conductividad hidráulica de las cinco fracciones de la figura 13.

La figura 15 muestra el resultado de comparar los tipos de saponinas incluidos en las respectivas fracciones. (A) es el resultado de identificar un tipo de saponina presente en cada fracción de pepino de mar, y (B) es el resultado de comparar el frondósido A y las saponinas presentes en el extracto completo de pepino de mar (PM, pepino de mar completo; FA, frondósido A; F1-F5, fracciones de pepino de mar).

La figura 16 es el resultado de confirmar la secreción de una enzima MMP desde la membrana de Bruch después de cultivar una membrana de Bruch humana con una fracción de pepino de mar (F1-F5) (FCS, suero de ternera fetal; C, control; F1-F5, membrana de Bruch incubada con cada fracción; cada una n = 3)

La figura 17 es el resultado de analizar un cambio de un lípido secretado después de cultivar con una fracción de pepino de mar (ChE, éster de colesterol; TG, triglicérido; Ch, colesterol; PC, fosfatidilcolina).

La figura 18 es el resultado de confirmar el efecto del frondósido A en la mejora de la conductividad hidráulica.

La figura 19 es el resultado de confirmar el efecto del frondósido A en la eliminación de MMP de la membrana de Bruch.

La figura 20 es el resultado de confirmar el efecto del frondósido A en la eliminación de un lípido de la membrana de Bruch.

[Modos de la invención]

La presente invención se describirá en más detalle de la siguiente manera.

Los cambios degenerativos relacionados con la edad en la función de transporte de la membrana de Bruch provocan problemas de visión en los ancianos y, en casos graves, causan DMAE que conduce a la ceguera.

Numerosos estudios han demostrado que el envejecimiento tiene un efecto gravemente adverso sobre la capacidad de transporte de material de la membrana de Bruch y el proceso de eliminación de desechos (Hussain *et al.*, 2002; 2004; 2010; Starita *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1995; Moore y Clover, 2001), y se sabe que los desechos acumulados en la membrana de Bruch aumentan de espesor debido al envejecimiento y consisten en lípidos y proteínas desnaturalizadas. Además, se sabe que la razón fundamental de la acumulación de desechos presentes en la membrana de Bruch es el papel insuficiente de las proteasas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMP) en la regeneración de la membrana de Bruch.

Una MMP es una proteasa, que se secreta hacia la membrana de Bruch desde el EPR en forma de proforma, que es un estado inactivado. A medida que se elimina un pequeño péptido de esta proforma, las MMP se transforman en formas activadas, que son MMP2 activa y MMP9 activa. Tras la activación, las enzimas MMP2 y MMP9 activadas son capaces de descomponer la mayoría de los materiales que constituyen la matriz extracelular, eliminan un componente dañado y lo reemplazan con un material nuevo. Según el mecanismo de regeneración de la membrana de Bruch, la estructura y funciones de la membrana de Bruch pueden mantenerse en condiciones saludables. Sin embargo, se sabe que, debido al envejecimiento de la membrana de Bruch, se reducen las cantidades de las formas activadas de MMP2 y MMP9, y en la membrana de Bruch de un paciente con degeneración macular, las cantidades de MMP2 y MMP9 activadas se reducen en aproximadamente un 60 %, en comparación con el promedio en un grupo de edad similar (Hussain *et al.*, 2011).

Específicamente, el mecanismo de acción de las MMP relacionado con la edad se muestra en la figura 4. La pro-MMP2 y la pro-MMP9, que son proformas, forman compuestos poliméricos llamados HMW1 y HMW2 (complejos HMW) en la membrana de Bruch. Además, estos materiales se combinan con diferentes moléculas pro-MMP2 y pro-MMP9 para formar materiales de alto peso molecular aún más grandes, llamados grandes complejos macromoleculares ("large macromolecular complexes", LMMC) (Kumar *et al.*, Hussain *et al.,* 2010). Cuando la síntesis de dichos materiales de alto peso molecular aumenta debido al envejecimiento, los compuestos poliméricos quedan atrapados o unidos a la matriz, la pro-MMP y la MMP activa también quedan atrapadas en la membrana y no se pueden utilizar. Por consiguiente, dado que se reduce la cantidad de MMP libres necesarias para la regeneración de la membrana de Bruch, la descomposición y regeneración de la membrana no se realizan de la forma normal, dando como resultado la acumulación de una cantidad considerable de desechos y la reducción de la capacidad de transporte de la membrana.

Para identificar un cambio relacionado con la edad en la función de transporte de la membrana de Bruch, las regiones maculares implicadas en la visión central y las regiones periféricas se separan de los ojos de 56 personas normales y 11 pacientes con degeneración macular con edades comprendidas entre 1 y 96 años, y se evalúa el efecto del cambio de la función de transporte en estas regiones.

En primer lugar, para confirmar la capacidad de transporte de desechos, se midió la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch aislada de un ojo donado. La membrana de Bruch aislada se montó en una cámara Ussing de tipo abierto para medir un cambio cuantitativo en el líquido bajo presión hidrostática y calcular un cambio en la conductividad hidráulica (figuras 5B y 5C). Como resultado, se puede observar que la capacidad de transporte de líquidos de la región macular disminuye exponencialmente a medida que avanza el envejecimiento y la capacidad de transporte se reduce a la mitad cada 16 años (figura 5D). Los datos de la figura 5D se expresan utilizando un gráfico semilogarítmico con la escala logarítmica en el eje de ordenadas para convertir la caída exponencial en un gráfico lineal. Para mantener la función de las células fotorreceptoras, la membrana de Bruch requiere una función de conductividad hidráulica mínima, lo que representa una línea de fallo. Cuando la función de transporte desciende por debajo de la línea de fallo, la acumulación de líquido debajo del EPR produce el desprendimiento del EPR y la muerte de las células fotorreceptoras sobre él. Estos síntomas aparecen en aproximadamente entre el 12 y el 20 % de los pacientes con degeneración macular. En el caso de personas normales, esta línea no desciende por debajo del umbral de fallo, pero incluso en una población anciana normal, la línea puede cruzar el umbral de fallo y, en este caso, se producen problemas graves, tales como una visión nocturna anómala. Dado que la región macular de un paciente con degeneración macular está considerablemente dañada debido a la naturaleza de esta enfermedad, es imposible medir de forma independiente sólo la región macular. La conductividad hidráulica de la región periférica también disminuye exponencialmente con un patrón similar al de la región macular, y la semivida de la función es de aproximadamente 22 años (figura 5E). Se puede observar que todas las conductividades hidráulicas medidas para las regiones periféricas de los 11 pacientes con degeneración macular están por debajo de la línea de regresión media (véase el círculo negro y la línea roja en la figura 5E), lo que muestra que, en la región periférica, en lugar de la región macular, la disminución de la función de transporte de material progresa hasta un estado grave.

Posteriormente, para confirmar la capacidad de transporte de nutrientes de la membrana de Bruch, se realiza un experimento de difusión de proteínas. Específicamente, el experimento se realiza por difusión de FITC-dextrano (PM 23 kDa) a través de la membrana de Bruch utilizando una cámara Ussing general (figuras 6B y 6C). El dextrano se selecciona como un material que tiene un tamaño similar a la mayoría de las proteínas transportadoras implicadas en el transporte de materiales, tales como vitamina A, oligoelementos metálicos, lípidos, etc. Se puede confirmar que, debido al envejecimiento de la membrana de Bruch, la difusión de un material del tamaño de una proteína que pasa a través de la región macular disminuye rápidamente (figura 6D). Por este motivo, aunque hay un nivel normal de vitaminas o materiales antioxidantes en el plasma, se observa una deficiencia de estos materiales en la región macular. En la región periférica, en comparación con la región macular, la disminución de la difusión es más lenta (figura 6E), pero se confirma que la difusión disminuye muy rápidamente en el caso de un paciente con degeneración macular (véase el círculo negro y la línea roja en la figura 6E). Como se ha descrito anteriormente, en comparación con la disminución en la región periférica, si se puede medir la función de la región macular en un paciente con degeneración macular, se puede confirmar que la disminución puede progresar mucho más rápido y más drásticamente que la de la región periférica. La disminución del transporte por difusión interfiere con el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos nocivos, lo que a su vez aumenta el riesgo de daño y muerte del EPR y de las células fotorreceptoras y conduce a la muerte.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos. Los ejemplos se proporcionan simplemente para describir más completamente la presente invención, y será obvio para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de extracto de pepino de mar

El pepino de mar desecado se molió con una trituradora, preparando así polvo de pepino de mar, se le añadió etanol al 70 % y luego se realizó la extracción durante aproximadamente 3 a 6 horas. El etanol se eliminó en condiciones de vacío, preparando así un extracto de pepino de mar usado en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

Ejemplo 2. Efecto del extracto de pepino de mar sobre la mejora de la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch

Para confirmar el efecto del extracto de pepino de mar preparado en el ejemplo 1 sobre la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch, se utilizaron los ojos de 14 donantes oculares (de 52 a 84 años) para el experimento. Específicamente, la membrana de Bruch aislada del ojo de un donante se incubó con un extracto de pepino de mar al 2,5 % durante 24 horas y se utilizó Tris-HCl como control.

El resultado se muestra en la figura 7, y se puede observar que la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch aumentó 2,3 veces con el extracto de pepino de mar (figura 7A, $p < 0,001$). El efecto de mejora de la conductividad hidráulica del extracto de pepino de mar es el mismo que el de rejuvenecer la membrana de Bruch entre 20 y 25 años.

Debido a esta mejora de la conductividad hidráulica, la membrana de Bruch no alcanza el umbral de fallo y, por tanto, se reduce la probabilidad de desarrollar degeneración macular.

Además, para investigar la mejora de la función de transporte de la membrana de Bruch en función de la dosis de extracto de pepino de mar, se midieron las membranas de Bruch aisladas de los ojos de cuatro donantes con edades comprendidas entre 69 y 84 años, y se expresó una curva de dosis-respuesta para la mejora de la conductividad hidráulica. Específicamente, la membrana de Bruch se montó en una cámara Ussing de tipo abierto, se hizo pasar tampón Tris-HCl a través de un tubo con presión hidrostática y luego, después de un determinado período de tiempo, la solución que pasaba por el tubo se recogió para medir el transporte de líquido. Para el control sólo se utilizó Tris-HCl y los grupos experimentales se trataron con extractos de pepino de mar del 0 al 10 %. Después de una incubación durante 24 horas, el transporte de líquidos se midió nuevamente ([13] Moore D.J., Hussain A.A., Marshall J. (1995), Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36(7): 1290-1297. [17] Starita C., Hussain A.A., Pagliarini S., Marshall J. (1996), Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease, Exp. Eye Res., 62(5): 565-572).

Como resultado, de acuerdo con la curva de dosis-respuesta del extracto de pepino de mar mostrada en la figura 7, a medida que aumentaba la dosis del extracto de pepino de mar, se mejoró la conductividad hidráulica de la membrana y la conductividad hidráulica en estado saturado aumentó 3,2 veces, en comparación con cuando no se agregó el extracto de pepino de mar (figura 7B), lo que significa que la función de conductividad hidráulica mejoró hasta rejuvenecer en aproximadamente 33 años en la curva de reducción relacionada con la edad (figura 7C).

Por consiguiente, se confirmó que el extracto de pepino de mar puede tener una influencia significativa en la mejora de la función de transporte de la membrana de Bruch en diversos grupos de edad en los que avanza el envejecimiento.

Ejemplo 3. Efecto del extracto de pepino de mar sobre la eliminación de desechos lipídicos de la membrana de Bruch

Los principales componentes de los desechos lipídicos de la membrana de Bruch son ésteres de colesterol, colesteroles, triglicéridos y fosfolípidos. Para confirmar si el extracto de pepino de mar es eficaz para eliminar un extracto lipídico acumulado en la membrana de Bruch, se realizó un experimento de dosis-respuesta. En detalle, las membranas de Bruch aisladas de los ojos de cuatro personas (de 50 a 82 años) se suspendieron en tampón Tris-HCl y se homogeneizaron. Se centrifugó un homogeneizado para separarlo en un sobrenadante y un sedimento que contenía desechos lipídicos. El sedimento se mezcló nuevamente con tampón Tris-HCl y se incubó con extractos de pepino de mar al 0-2,5 % en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, la muestra se centrifugó para obtener un sedimento y se cuantificó mediante cromatografía en capa fina ("thin layer chromatography", TLC) la cantidad de lípido secretado en un sobrenadante del sedimento.

Como resultado, se obtuvieron datos de secreción y de cinética de diversos tipos de lípidos. Como se muestra en la figura 8, se confirmó que la secreción de ésteres de colesterol, colesteroles y triglicéridos mostraron un comportamiento cinético hiperbólico, y la secreción de fosfatidilcolina mostró un comportamiento cinético sigmoide, y cuando se incubaron con el extracto de pepino de mar, los desechos lipídicos depositados en la membrana de Bruch se difundieron y secretaron desde la membrana.

Ejemplo 4. Efecto del extracto de pepino de mar sobre la secreción de la enzima MMP de la membrana de Bruch

La enzima MMP de la membrana de Bruch está presente mientras está libre o unida a la membrana. Para confirmar si el extracto de pepino de mar puede eliminar la enzima MMP de la membrana de Bruch, en primer lugar, se confirmaron MMP de unión a membrana en la membrana de Bruch aislada.

Cuando la membrana de Bruch aislada se montó en una cámara de Ussing y se perfundió con tampón Tris-HCl, las MMP libres se secretaron lentamente desde la membrana de Bruch durante aproximadamente 6 a 12 horas de acuerdo con la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch (figura 9A). Después de que las MMP libres fueron secretadas de la membrana, la membrana de Bruch se separó de la cámara y luego las MMP que quedaron en la membrana se extrajeron usando tampón SDS. En el caso de componentes de MMP solubles o libres, la mayoría se secretó lentamente entre 5 y 12 horas de perfusión (figura 9B). Sin embargo, la mayoría de las MMP presentes en la membrana de Bruch estaban unidas o atrapadas en la membrana y, después de 5 a 12 horas de la perfusión, se pudo confirmar que las MMP permanecían en la membrana sin eliminarse.

Para demostrar si las MMP, que estaban unidas o atrapadas en la membrana, pueden ser retiradas con un extracto de pepino de mar, las membranas de Bruch aisladas de los ojos de donantes de 73 y 79 años se perfundieron con Tris-HCl durante 12 horas para secretar y así eliminar la enzima MMP libre. Posteriormente, como resultado de la perfusión con un extracto de pepino de mar al 2,5 %, como se muestra en la figura 10, se confirmó que las MMP unidas a la membrana se habían secretado.

Dado que HMW1 y HMW2 que bloquean la membrana de Bruch se pueden eliminar de la membrana, lo cual puede ayudar a la capacidad de transporte de la membrana de Bruch, y que la secreción de MMP en un estado activado tiene el efecto de descomponer proteínas anómalas, se prevé que esto tenga una influencia positiva para revertir el

envejecimiento de la membrana de Bruch.

Ejemplo 5. Efecto del extracto de pepino de mar sobre la secreción de la enzima MMP presente en el sedimento de la membrana de Bruch del ojo humano

Para confirmar el efecto del extracto de pepino de mar sobre la secreción de la enzima MMP de la membrana de Bruch, se utilizaron membranas de Bruch humanas aisladas de los dos ojos de un donante de 75 años. En un sedimento de membrana de Bruch utilizado como muestra, las enzimas MMP se encontraban atrapadas o unidas a la membrana. Como un control, se incubó un volumen predeterminado de un sedimento con tampón Tris-HCl y, como grupo experimental, se incubó un sedimento con un extracto de pepino de mar al 2,5 %. Después de la incubación a 37 °C durante 24 horas, se realizó una centrifugación para medir la cantidad de MMP secretada hacia el sobrenadante y las MMP presentes en un estado unido al sedimento.

Como resultado, se puede confirmar que, aunque en el control casi no se secretó ningún compuesto de HMW2 y la mayor parte del compuesto permaneció en el sedimento, en la membrana de Bruch incubada con el extracto de pepino de mar, la mayor parte del HMW2 unido a la membrana se secretó hacia el sobrenadante (figura 11). Esto significa que se mejoró el flujo de la membrana al eliminar el HMW2 que bloqueaba la membrana, lo que dio como resultado una mejora de la capacidad de transporte de la membrana de Bruch. Además, se confirmó que la incubación del extracto de pepino de mar puede tener una influencia positiva en la mejora de la función de transporte al eliminar los desechos presentes en la membrana de Bruch mediante la secreción de HMW1 activado y las proformas pro-MMP2 y pro-MMP9 desde la membrana.

Ejemplo 6. Efecto de la fracción de polvo de pepino de mar en la mejora de la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch humana

El pepino de mar seco se molió con una trituradora, preparando así polvo de pepino de mar, se disolvieron 1,5 g de polvo de pepino de mar en 15 ml de metanol, el disolvente se evaporó y se añadieron 3 ml de un disolvente CMW (cloroformo:metanol:H2O = 50:30:6) para preparar un concentrado de pepino de mar. Se separaron 0,8 ml del concentrado de pepino de mar preparado a través de una columna de gel de sílice. La columna utilizó el mismo disolvente CMW que el anterior y se obtuvo un total de 34 fracciones una vez (aproximadamente 2 ml) cada 20 minutos. Después de evaporar el disolvente, cada fracción se disolvió en 200 µl de metanol y se obtuvieron 5 µl de cada solución para cuantificar la cantidad de saponina mediante TLC (figura 12). Por consiguiente, tal como se muestra en la figura 12 y en la tabla 1, las fracciones que consistían en componentes similares se dividieron en 5 grupos (F1- F5), y cada grupo de fracción se sometió a TLC (figura 13). Para igualar la cantidad de saponinas presentes en cinco fracciones, cada grupo se diluyó con un disolvente CMW para normalizar la saponina por fracción a una concentración de 250 µg/ml.

[Tabla 1]

Tipo de fracción	Fracción n.º	Cantidad de saponina (mg)
F1	11, 12, 13	6,1
F2	14, 15, 16, 17	11,4
F3	18,19, 20	7,7
F4	21, 22, 23, 24, 25	19,7
F5	26, 27, 28	17,5
Cantidad total de saponina		62,4

Para confirmar el efecto del polvo de pepino de mar en la mejora de la conductividad hidráulica específica de la fracción de la membrana de Bruch, la membrana de Bruch separada del ojo de un donante (78 u 82 años) se sometió a medición de la misma manera que se describe en el método experimental de conductividad hidráulica descrito en el ejemplo 2.

Por consiguiente, tal como se muestra en la tabla 2 y en la figura 14, la fracción F3 mostró una mejora estadísticamente significativa ($p < 0,001$), F2, F4 y F5 también mostraron un aumento en la conductividad hidráulica, en comparación con el control.

[Tabla 2]

Fracción	Grado de mejora en la conductividad hidráulica (cambio en n.º de veces, comparación entre antes y después de la incubación de la fracción), Media ± DE	**Significancia**
Control (tampón Tris)	1,1 ± 0,08 (5)	
F1	1,03 ± 0,01 (3)	NS

(continuación)

Fracción	Grado de mejora en la conductividad hidráulica (cambio en n.º de veces, comparación entre antes y después de la incubación de la fracción), Media ± DE	**Significancia**
F2	1,16 ± 0,06 (3)	NS
F3	1,39 ± 0,11 (3)	$p < 0,001$
F4	1,15 ± 0,05 (3)	NS
F5	1,19 ± 0,05 (3)	NS

Ejemplo 7. Identificación del principio activo presente en el polvo de pepino de mar

Para identificar un material específico de la fracción F3 que presenta el mayor efecto sobre la mejora de la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch en el ejemplo 6, se compararon y analizaron los tipos de saponinas presentes en las respectivas fracciones.

En la figura 15, una saponina presente en F3, pero no presente en F1 y F2, se representó con una flecha (→), y se demostró que estaba presente en una cantidad muy pequeña incluso en F4 y F5. Este material también se encontró en la misma posición que el resultado de la separación de la muestra entera de pepino de mar (PM), y se identificó como frondósido A (FA), que se conoce convencionalmente como saponina.

Ejemplo 8. Efecto de la fracción de pepino de mar sobre la secreción de MMP

Para confirmar el efecto de la fracción de pepino de mar sobre la secreción de MMP desde la membrana de Bruch, las membranas de Bruch se aislaron de ojos donados de pacientes de entre 65 y 76 años de edad. Específicamente, se prepararon 36 muestras redondas de la membrana de Bruch, cada una con un diámetro de 8 mm, se agregaron dos piezas circulares del tejido (trefina) a cada uno de los 18 tubos de ensayo en total, y luego se dividieron en un total de 6 grupos (control, F1, F2, F3, F4, F5), cada uno con tres tubos de ensayo para el experimento. En la fracción de pepino de mar, se ajustó igualmente una cantidad de saponina a 250 µg/ml como se describió anteriormente, y después de la incubación durante 24 horas, se sometieron 50 µl de una solución de cultivo a zimografía para confirmar la secreción de MMP. Como un control, en lugar de una fracción de pepino de mar, se añadió tampón Tris para la incubación. La solución de cultivo restante se mezcló con una solución CM (cloroformo:metanol = 2:1, v/v) para usarse para analizar la cantidad del lípido secretado en el ejemplo 9 a continuación.

Por consiguiente, como se muestra en la figura 16, en el control incubado con tampón Tris y la fracción F1, fueron secretados HMW2, Pro-MMP9 y una pequeña cantidad de HMW1, pero no se observó Pro-MMP2. Se confirmó que, en la fracción F3, en comparación con el control, también se secretó Pro-MMP2 y, en las fracciones F4 y F5, no sólo HMW2, HMW1 y Pro-MMP2 fueron secretados desde la membrana, sino que la cantidad de secreción de Pro-MMP9 también aumentó considerablemente. Como resultado, puede observarse que, en la fracción F3, se aumentó la cantidad de secreción de Pro-MMP2 y, en las fracciones F4 y F5, se secretaron la mayoría de los tipos de enzimas MMP unidas a la membrana de Bruch.

Ejemplo 9. Efecto del cambio de lípidos de la fracción de pepino de mar

Como se muestra en el ejemplo 8, después de incubar una membrana de Bruch con cada fracción de pepino de mar durante 24 horas, se extrajo un componente lipídico de 0,95 ml de la solución de cultivo utilizando una solución CM (cloroformo:metanol = 2:1, v/v). Después de evaporar el disolvente, se añadieron 50 µl de la solución CM y se posaron 30 µl de cada muestra en una placa de TLC para analizar el tipo de lípido presente en la placa.

Por consiguiente, como se muestra en la figura 17, en el control y en la fracción F1 no se secretó fosfatidilcolina (PC), pero sí se secretaron ésteres de colesterol (ChE) y triglicéridos (TG), y una pequeña cantidad de colesterol (Ch). Por otro lado, la fracción F3 fue eficaz en la secreción de ChE, TG y Ch, y en la eliminación de diferentes tipos de lípidos UL-1 y UL-3. Las fracciones F4 y F5 tuvieron un ligero efecto sobre la eliminación de lípidos, en comparación con el control.

Ejemplo 10. Efecto de frondósido A en la mejora de la conductividad hidráulica en la membrana de Bruch humana

Se usó la saponina única frondósido A identificada en el ejemplo 7 para confirmar si existe o no un efecto de mejora de la capacidad de transporte de material en la membrana de Bruch humana. Específicamente, el cambio en la conductividad hidráulica de 167 µg/ml de una solución de frondósido A se midió mediante el mismo método descrito en los ejemplos usando la membrana de Bruch de un paciente donante (68 o 79 años). Como un control, se utilizó tampón Tris. Por consiguiente, tal como se muestra a continuación en la tabla 3 y en la figura 18, se puede observar que el efecto del frondósido A sobre la mejora de la conductividad hidráulica fue 1,6 veces o mayor que el del control.

[Tabla 3]

	Cambio en número de veces Media ± DE (n)
Control (solo tampón Tris)	0,97 ± 0,16(4)
Frondósido A (167 µg/ml)	1,65 ± 0,2(3)***

Ejemplo 11. Efecto del frondósido A sobre la secreción de MMP

Se realizó una zimografía usando la solución incubada durante 30 horas en la medición de la conductividad hidráulica en el ejemplo 10. Específicamente, se incubó una membrana de Bruch con una solución de tampón Tris como control o una solución de frondósido A (167 µg/ml) durante 30 horas, se mezclaron 50 µl de la solución resultante con 50 µl del tampón de muestra de SDS y luego se cargaron 30 µl de la mezcla resultante en un gel para medir una enzima MMP secretada desde una membrana de Bruch humana.

Por consiguiente, como se muestra en la figura 19, se confirmó que, cuando la membrana de Bruch se incubó con tampón Tris como control, las MMP muy pocas veces se secretaban, y cuando la membrana de Bruch se incubó con frondósido A, se secretó una enorme cantidad de Pro-MMP9 unida a la membrana. A partir de esto, se puede observar que el frondósido A se une selectivamente a Pro-MMP9 entre diferentes tipos de MMP, eliminando así el Pro-MMP9 de la membrana de Bruch.

Ejemplo 12. Efecto de eliminación de lípidos del frondósido A

Para confirmar el efecto de eliminación de lípidos del frondósido A, después de la medición de la conductividad hidráulica en el ejemplo 10, la membrana de Bruch se cortó en un trozo que tenía un diámetro de 6 mm y luego se extrajo un lípido usando una solución CM (cloroformo:metanol = 2:1), seguido de la evaporación del disolvente. Después de agregarle nuevamente 50 µl de una solución CM, se posaron 40 µl de la solución resultante sobre una placa de TLF de gel de sílice y se analizaron el tipo y la cantidad del lípido.

Por consiguiente, como se muestra en la figura 20, se confirmó que, cuando la membrana de Bruch se incubó con frondósido A, no tuvo efecto de eliminación de ChE, TG y Ch, pero sí tuvo el efecto de eliminar la fosfatidilcolina de la membrana de Bruch.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que comprende un extracto o una fracción del extracto de pepino de mar, en donde:
la enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente: degeneración macular asociada a la edad (DMAE), distrofia del fondo de ojo de Sorsby, malattia levintanese (ML), enfermedad de Stargardt, distrofia retiniana viteliforme de Best o distrofia retiniana en panal de Doyne ("Doyne's honeycomb retinal dystrophy", DHRD);
el pepino de mar es un invertebrado marino perteneciente a la clase Holothuroidea y al filo Echinodermata; y
el extracto o la fracción del extracto de pepino de mar comprende frondósido A como principio activo, y el principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch.

2. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la función de transporte se mejora mejorando la conductividad hidráulica de la membrana de Bruch.

3. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la función de transporte se mejora mejorando la función de difusión de materiales de la membrana de Bruch.

4. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la función de transporte se mejora retirando una proteína o lípido unido o atrapado en la membrana de Bruch.

5. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el principio activo regenera la membrana de Bruch y mejora las funciones de la membrana de Bruch.

6. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el principio activo regenera la membrana de Bruch y mejora las funciones de la membrana de Bruch retirando el complejo 1 de alto peso molecular (HMW1) y el complejo 2 de alto peso molecular (HMW2) o un componente lipídico unido o depositado en la membrana de Bruch.

7. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el principio activo regenera la membrana de Bruch y mejora las funciones de la membrana de Bruch al secretar prometaloproteinasa matriz 2 (pro-MMP2), prometaloproteinasa matriz 9 (pro-MMP9), metaloproteinasa 2 de matriz activa (MMP2 activa) y metaloproteinasa de matriz 9 activa (MMP9 activa) de la matriz de la membrana de Bruch.

8. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el principio activo regenera la membrana de Bruch y mejora las funciones de la membrana de Bruch activando la secreción de MMP activas desde el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

9. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende además uno o más seleccionados del grupo que consiste en un aminoácido, un material antioxidante, un mineral, un material metálico, luteína, astaxantina y zeaxantina.

10. Una composición para su uso en la prevención, el retraso y el tratamiento de una enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch, que contiene frondósido A como principio activo, en donde:
la enfermedad asociada a la disfunción de la membrana de Bruch se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente: degeneración macular asociada a la edad (DMAE), distrofia del fondo de ojo de Sorsby, malattia levintanese (ML), enfermedad de Stargardt, distrofia retiniana viteliforme de Best o distrofia retiniana en panal de Doyne ("Doyne's honeycomb retinal dystrophy", DHRD); y
el principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch.

11. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el principio activo deriva del pepino de mar, que es un invertebrado marino que pertenece a la clase Holothuroidea y al filo Echinodermata.

12. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el principio activo mejora la función de transporte de la membrana de Bruch retirando Pro-MMP9 o fosfatidilcolina unidas o atrapadas en la membrana de Bruch.

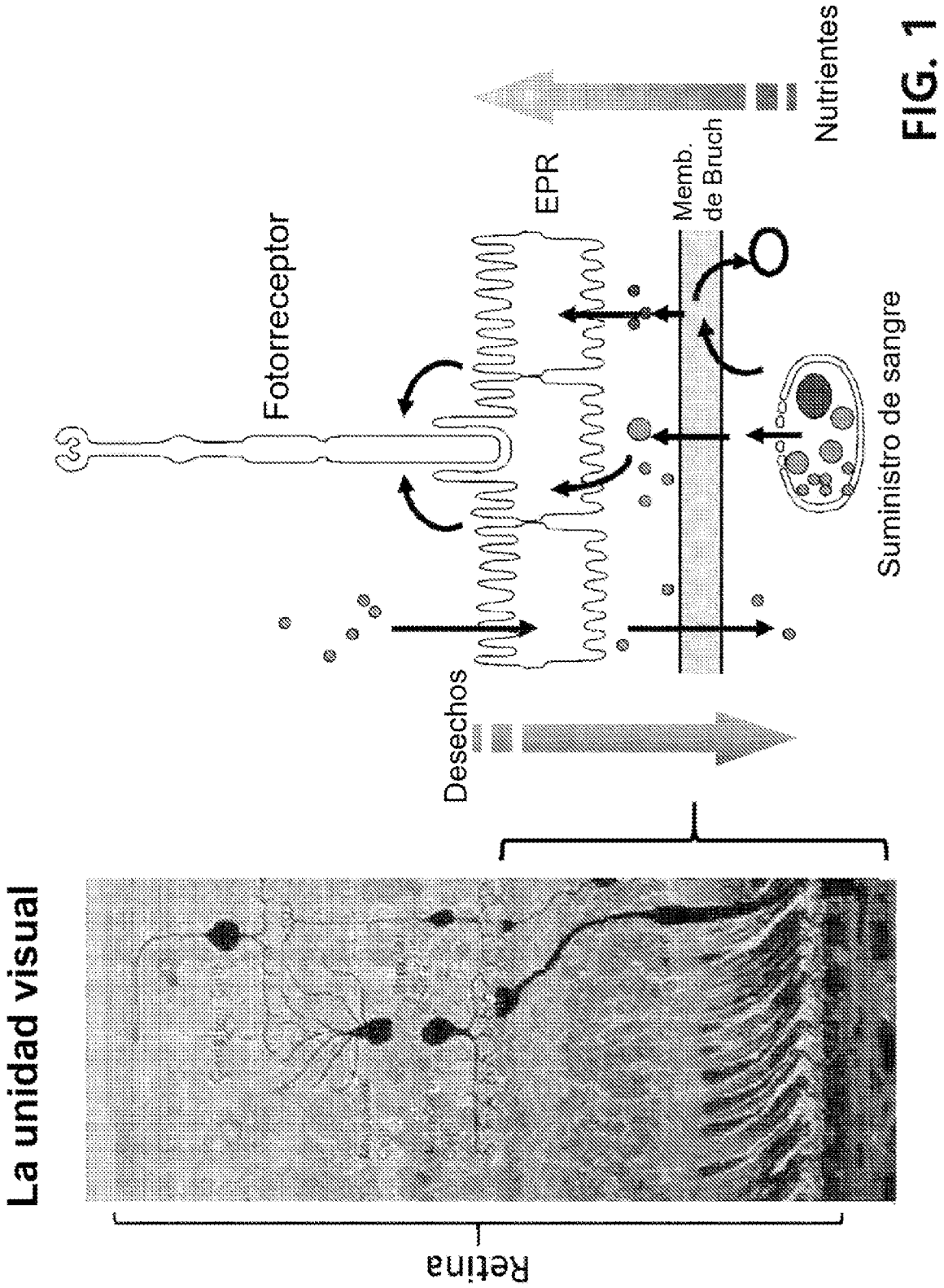

La unidad visual
Retina
Fotorreceptor
EPR
Memb. de Bruch
Nutrientes
Suministro de sangre
Desechos

FIG. 1

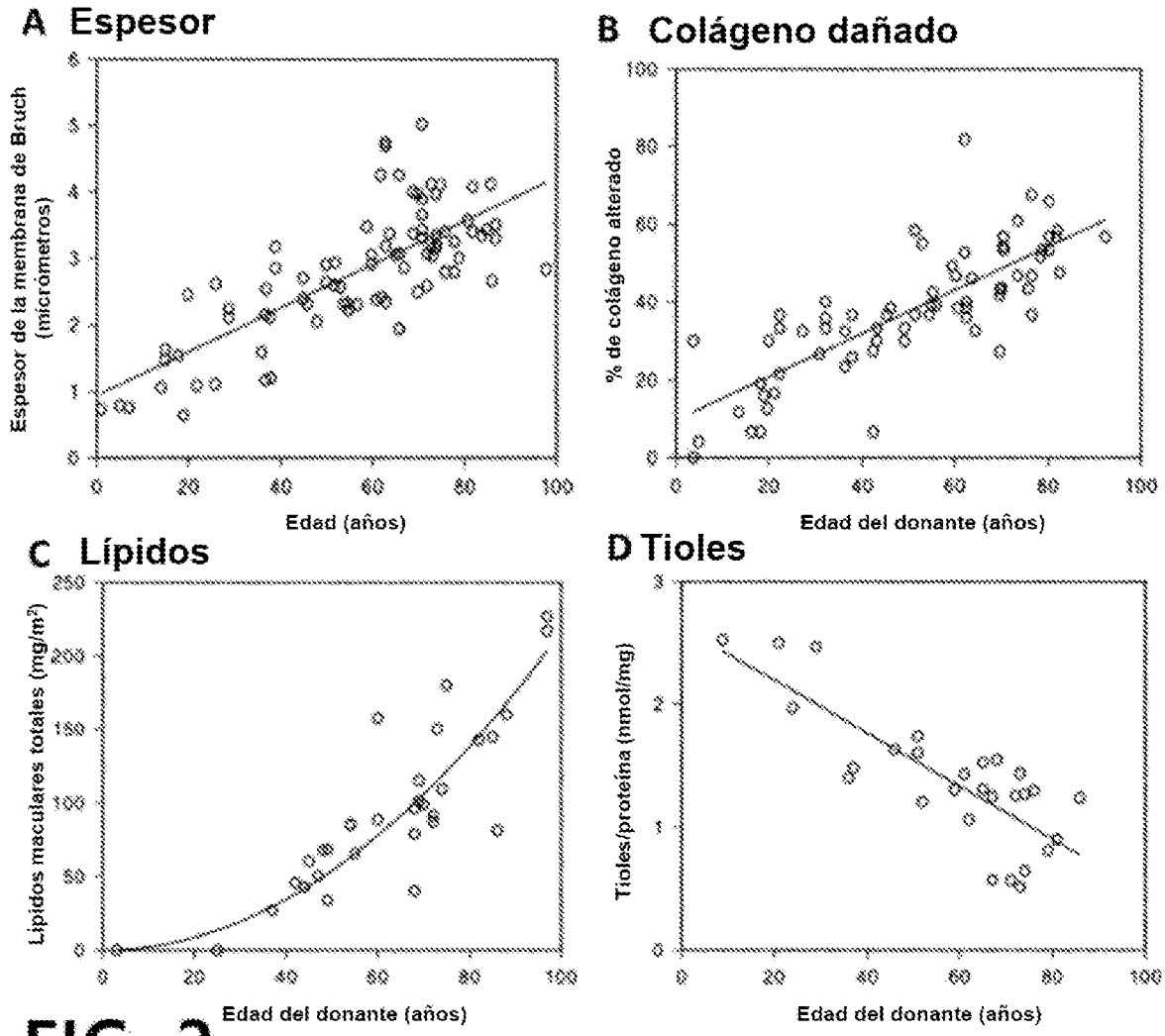

A Espesor
Espesor de la membrana de Bruch (micrómetros)
Edad (años)
B Colágeno dañado
% de colágeno alterado
Edad del donante (años)
C Lípidos
Lípidos maculares totales (mg/m²)
Edad del donante (años)
D Tioles
Tioles/proteína (nmol/mg)
Edad del donante (años)

FIG. 2

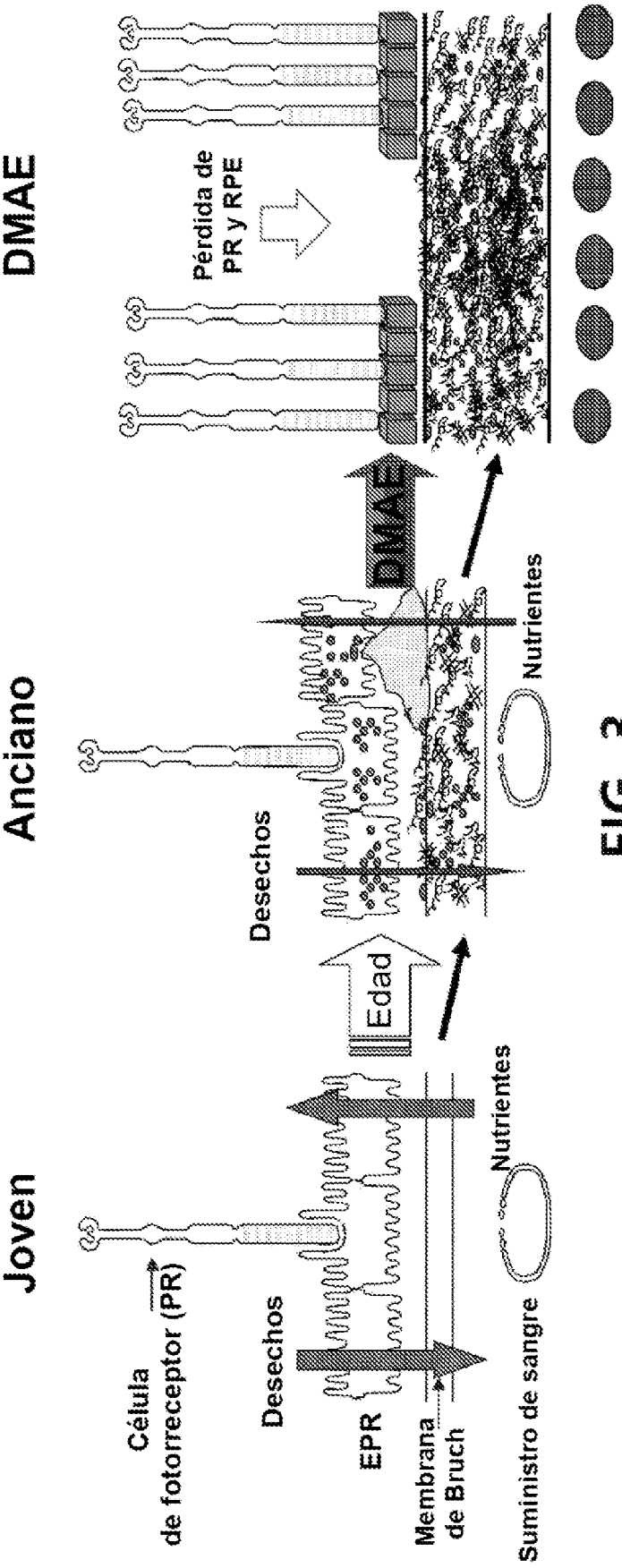

Joven
Célula
de fotorreceptor (PR)
Desechos
EPR
Membrana
de Bruch
Suministro de sangre
Nutrientes
Edad
Anciano
Desechos
DMAE
Nutrientes
DMAE
Pérdida de
PR y RPE

FIG. 3

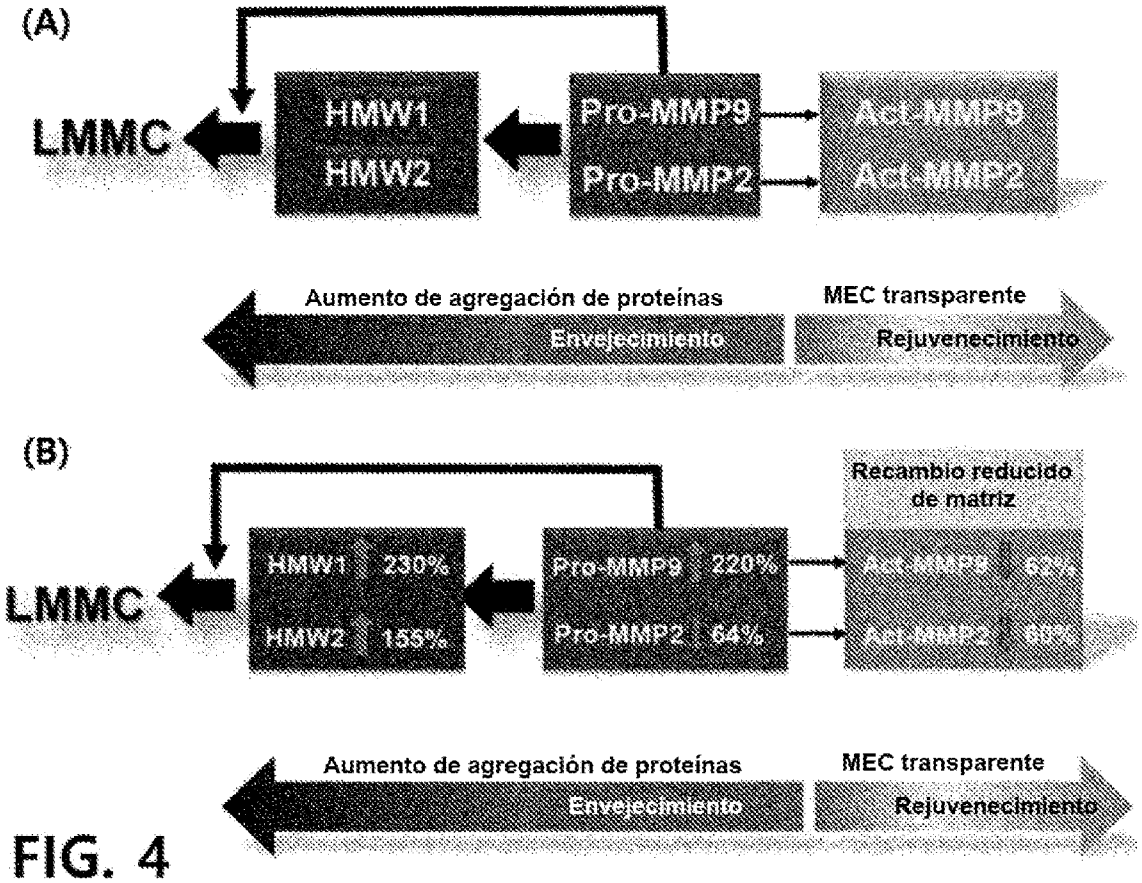

(A)
LMMC
HMW1
HMW2
Pro-MMP9
Pro-MMP2
Act-MMP9
Act-MMP2
Aumento de agregación de proteínas
Envejecimiento
MEC transparente
Rejuvenecimiento
(B)
LMMC
HMW1 230%
HMW2 155%
Pro-MMP9 220%
Pro-MMP2 64%
Recambio reducido de matriz
Act-MMP9 62%
Act-MMP2 69%
Aumento de agregación de proteínas
Envejecimiento
MEC transparente
Rejuvenecimiento

FIG. 4

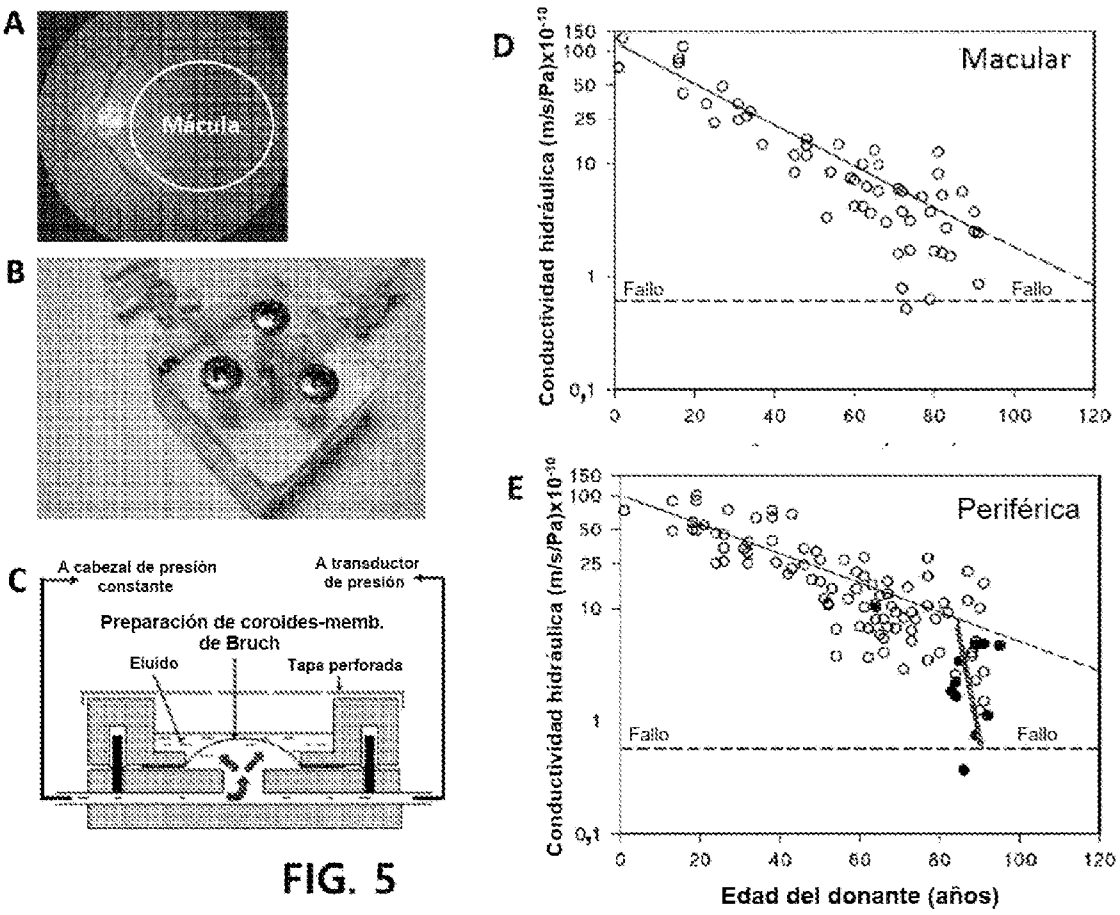

A
Mácula
B
C
A cabezal de presión constante
A transductor de presión
Preparación de coroides-memb. de Bruch
Eluído
Tapa perforada
D
Macular
Conductividad hidráulica (m/s/Pa)x10⁻¹⁰
150
100
50
25
10
1
0,1
Fallo
Fallo
0
20
40
60
80
100
120
E
Periférica
Conductividad hidráulica (m/s/Pa)x10⁻¹⁰
Edad del donante (años)

FIG. 5

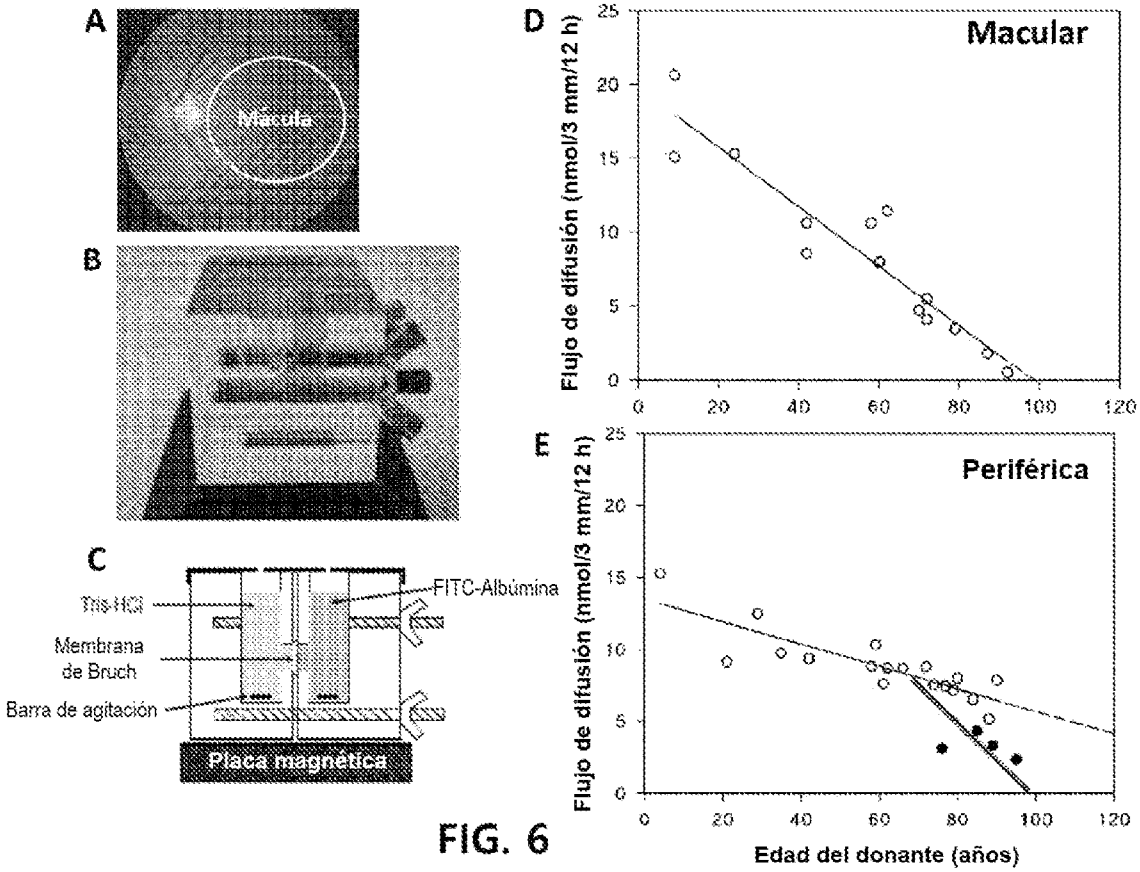

A
Mácula
B
C
Tris-HCl
Membrana de Bruch
Barra de agitación
FITC-Albúmina
Placa magnética
D
Macular
Flujo de difusión (nmol/3 mm/12 h)
E
Periférica
Flujo de difusión (nmol/3 mm/12 h)
Edad del donante (años)

FIG. 6

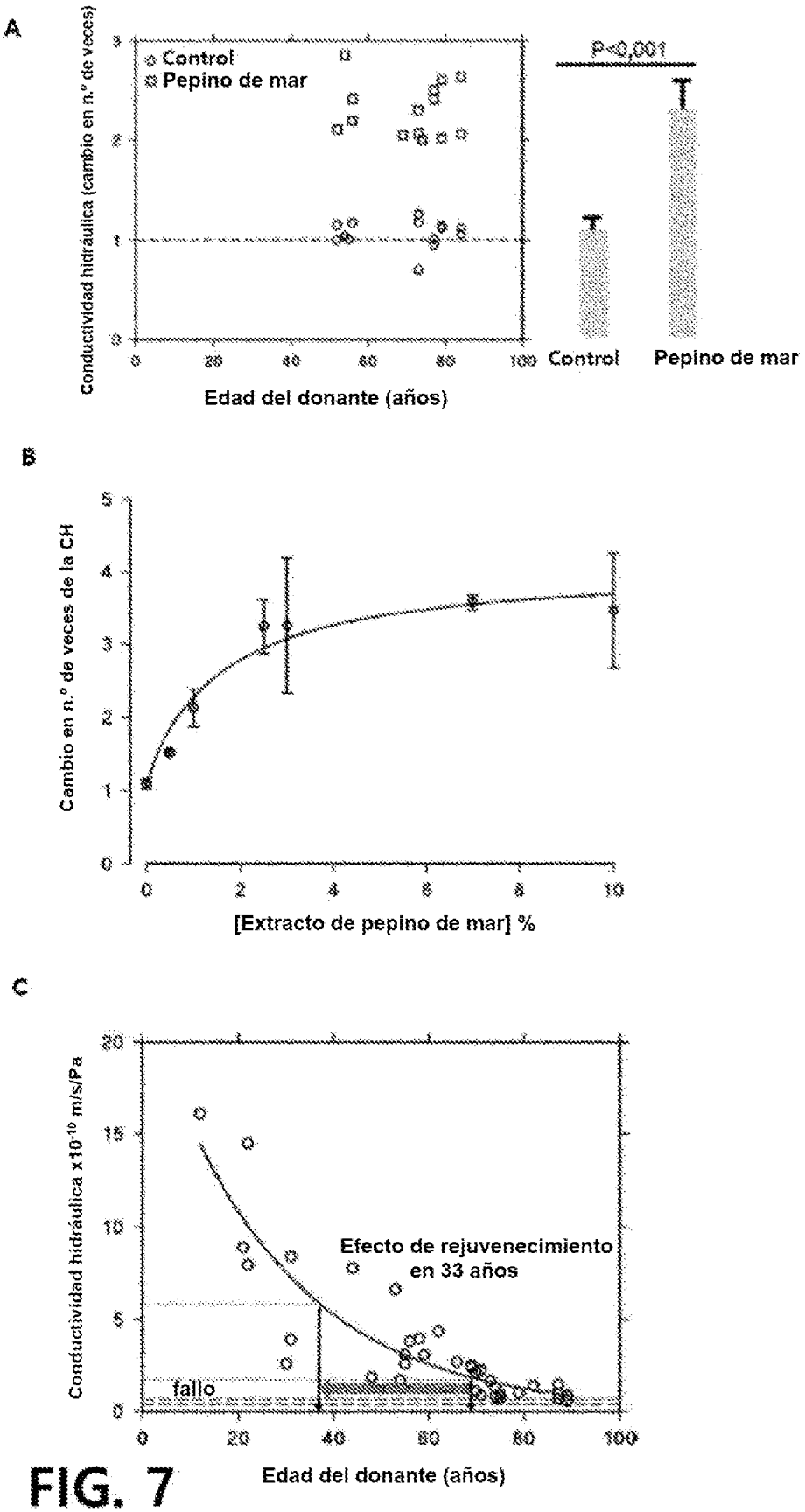
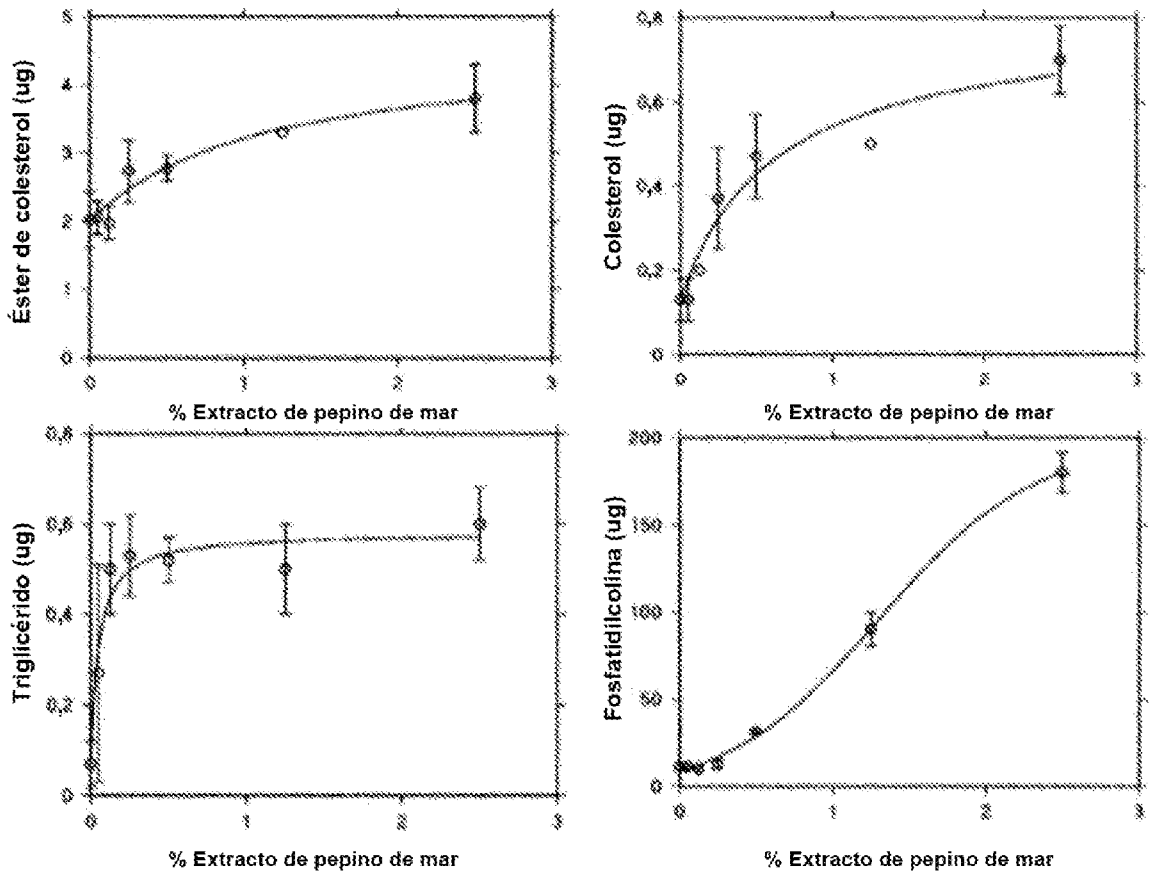

A
Conductividad hidráulica (cambio en n.º de veces)
Control
Pepino de mar
P<0,001
Control
Pepino de mar
Edad del donante (años)
B
Cambio en n.º de veces de la CH
[Extracto de pepino de mar] %
C
Conductividad hidráulica x10⁻¹⁰ m/s/Pa
Efecto de rejuvenecimiento en 33 años
fallo
Edad del donante (años)

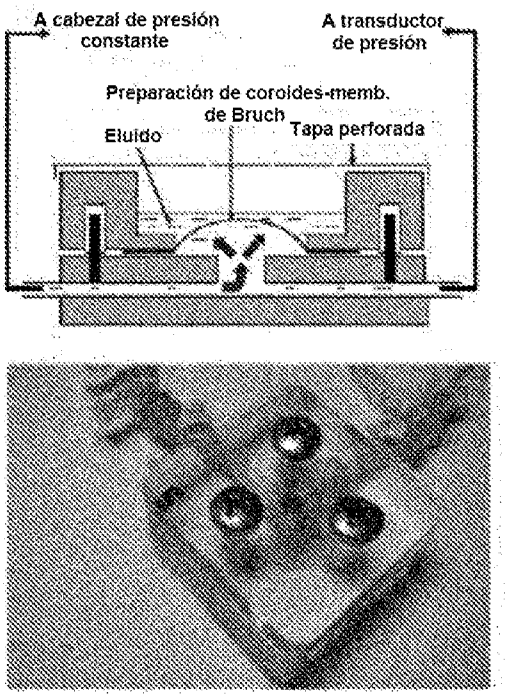
FIG. 7



	Función ajustada	Parámetros cinéticos
Ésteres de colesterol	Hiperbólico	Km = 1,2%; Vm = 4,6ug
Colesterol	Hiperbólico	Km = 0,62%; Vm = 0,9ug
Triglicéridos	Hiperbólico	Km = 0,05%; Vm = 0,58ug
Fosfatidilcolina	Sigmoide	X-50 = 1,3%; Vm = 197ug

FIG. 8

A


A cabezal de presión constante
A transductor de presión
Preparación de coroides-memb. de Bruch
Eluido
Tapa perforada

B

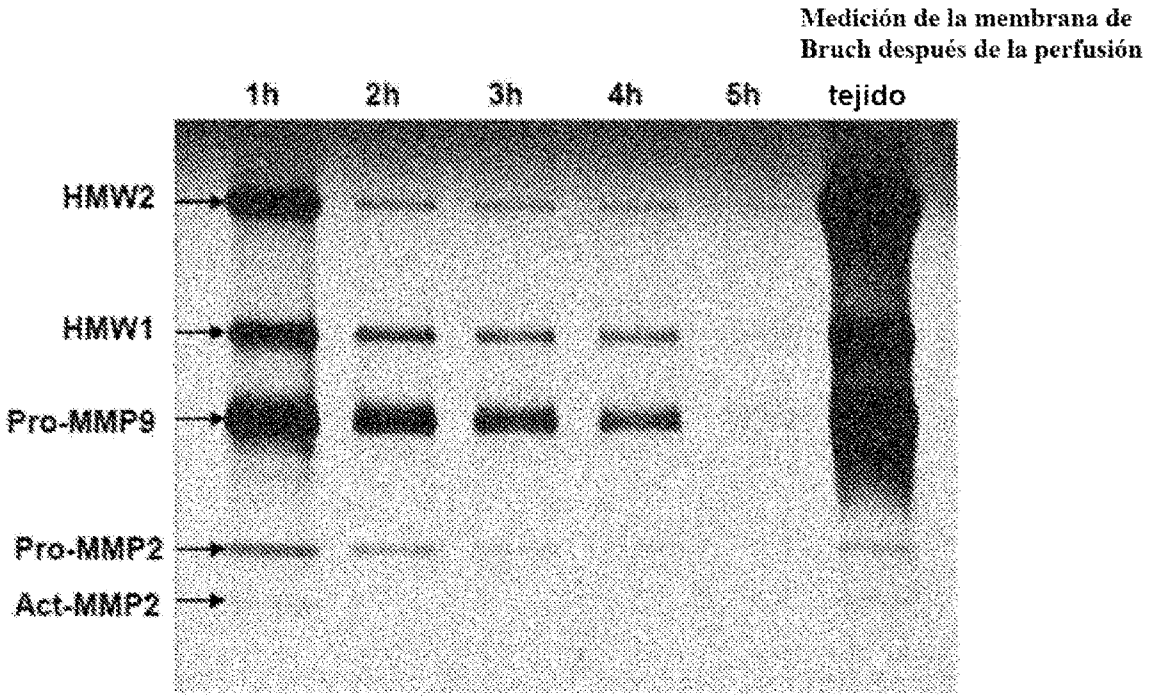
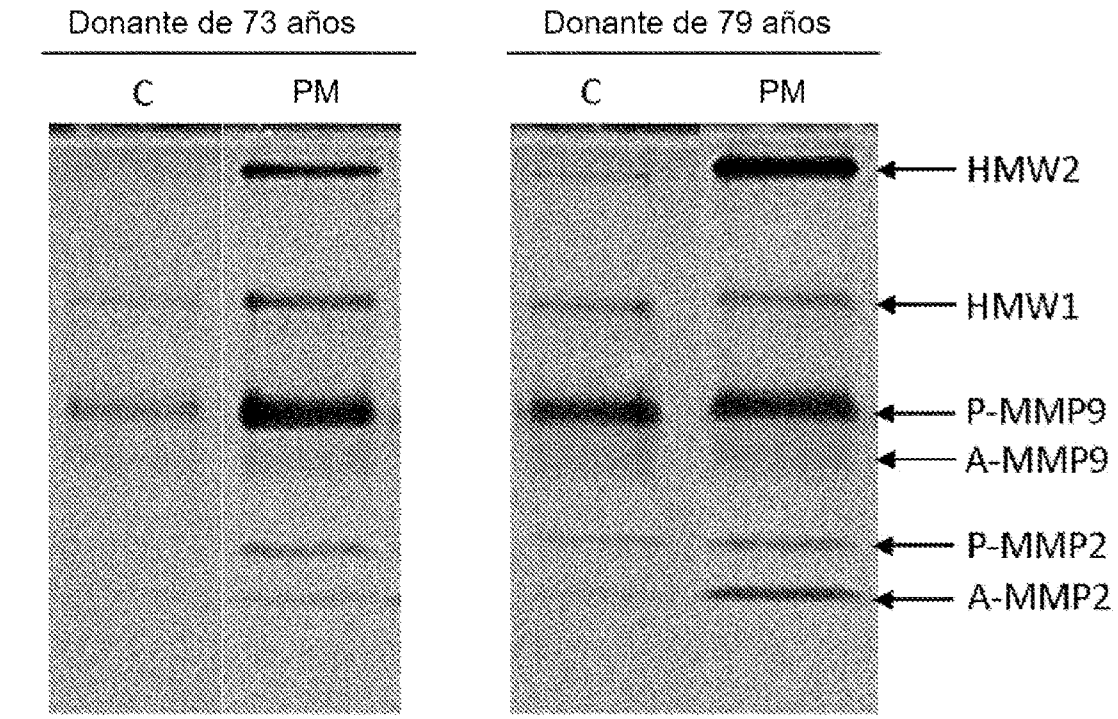

Medición de la membrana de Bruch después de la perfusión
1h
2h
3h
4h
5h
tejido
HMW2
HMW1
Pro-MMP9
Pro-MMP2
Act-MMP2

FIG. 9



Membrana de Bruch. C: Control; PM: pepino de mar al 2,5 %

FIG. 10

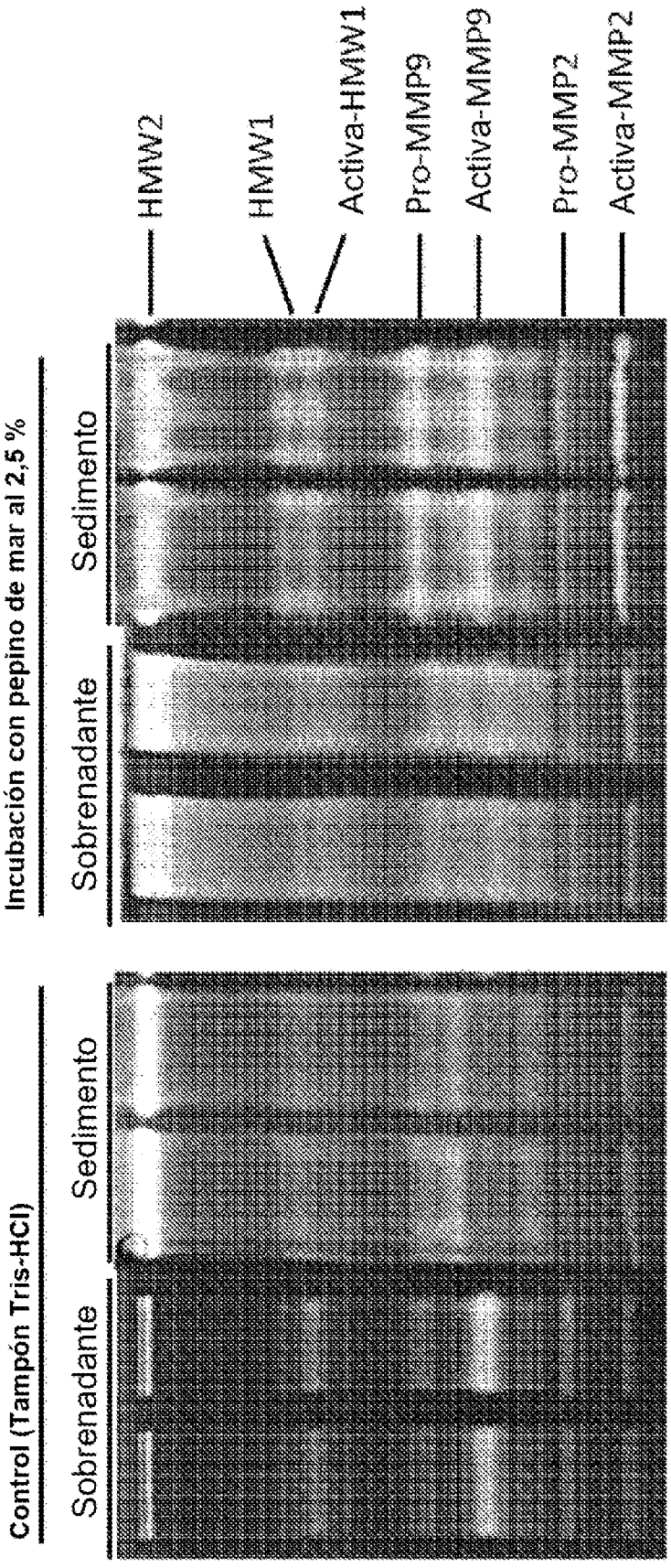

Control (Tampón Tris-HCl)
Sobrenadante
Sedimento
Incubación con pepino de mar al 2,5 %
Sobrenadante
Sedimento
HMW2
HMW1
Activa-HMW1
Pro-MMP9
Activa-MMP9
Pro-MMP2
Activa-MMP2

FIG. 11

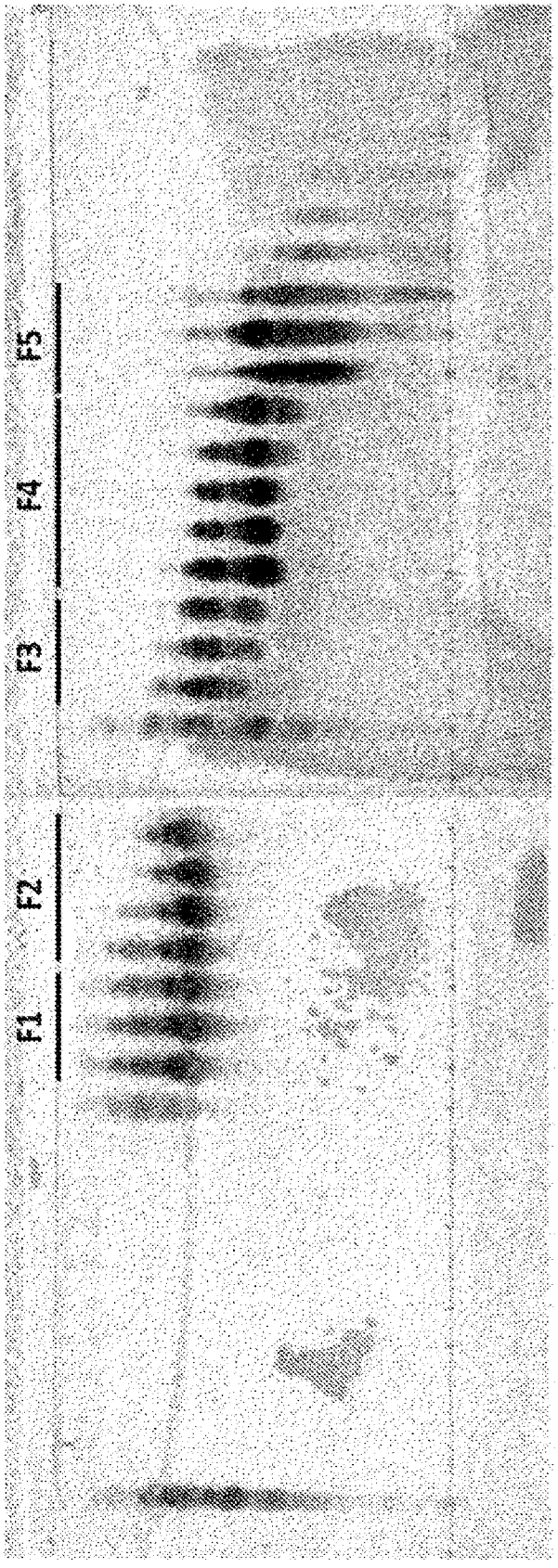


FIG. 12

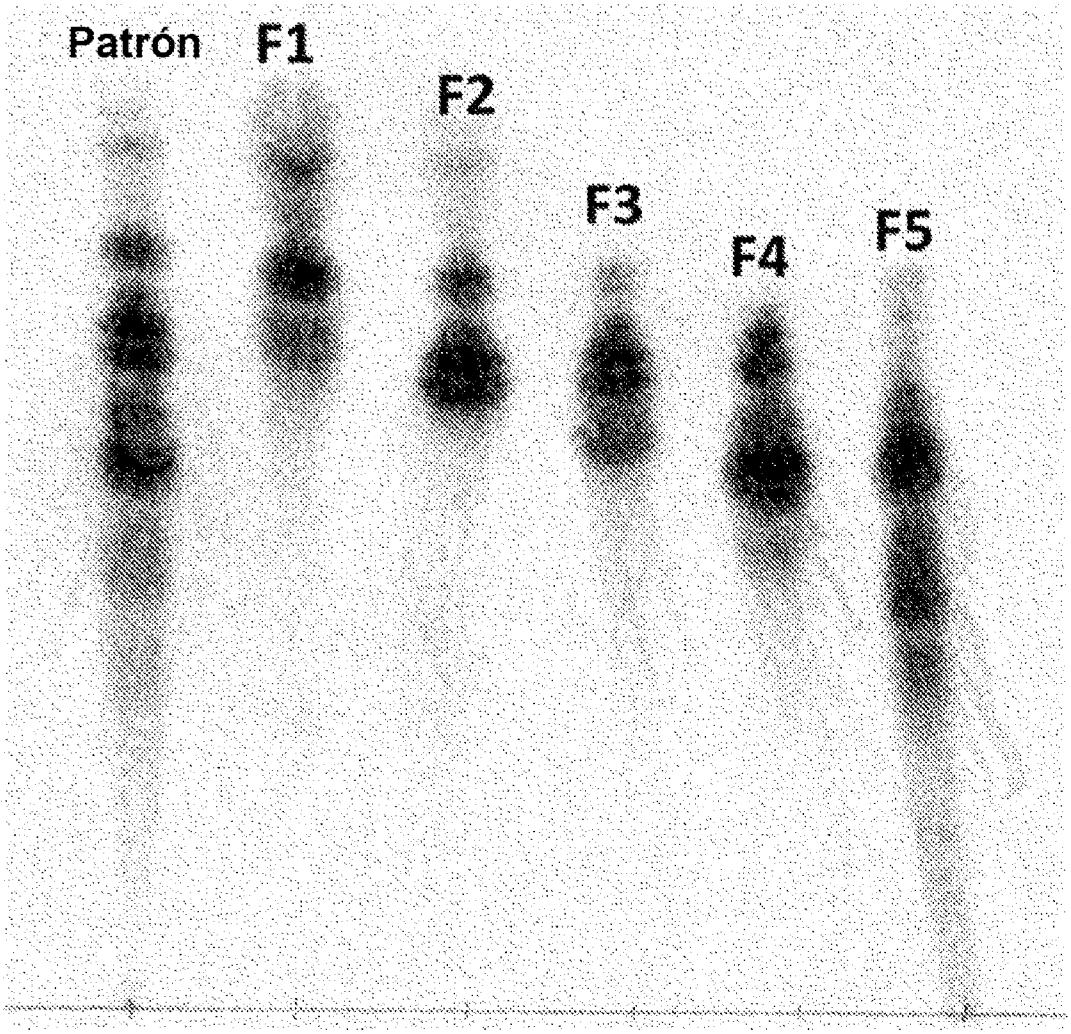


FIG. 13

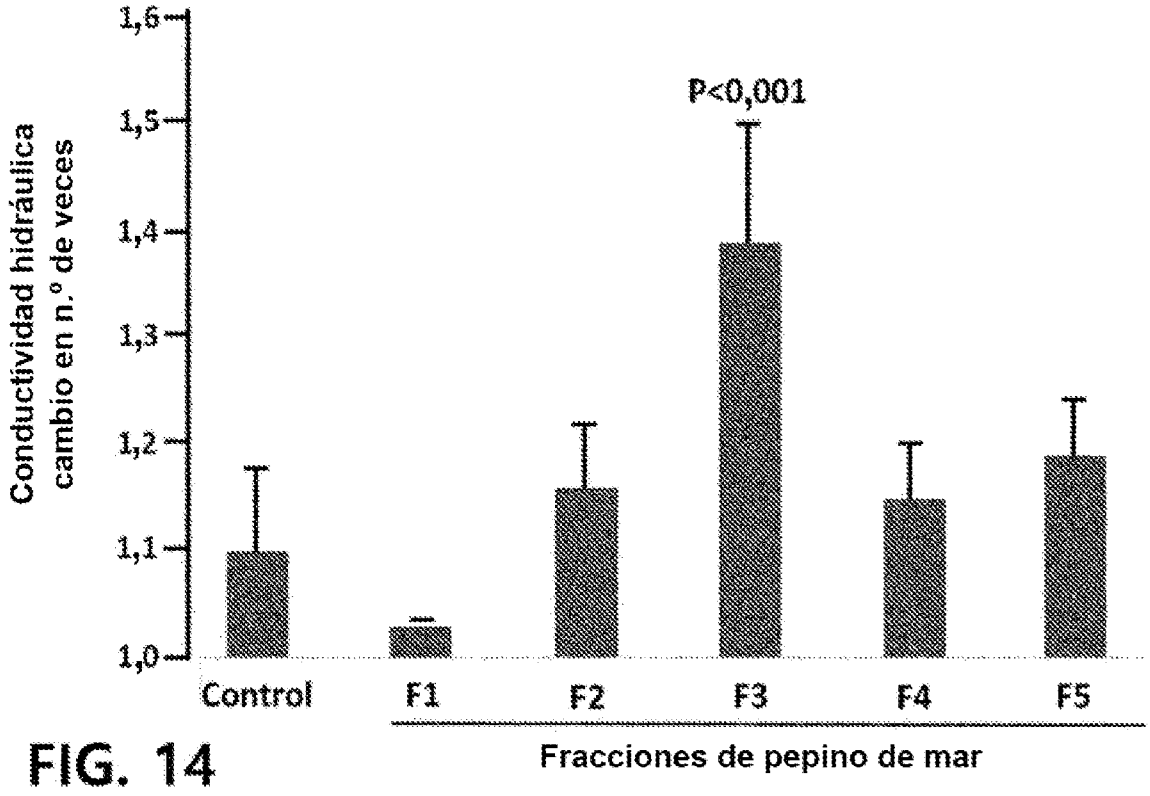

Conductividad hidráulica
cambio en n.º de veces
1,6
1,5
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
P<0,001
Control
F1
F2
F3
F4
F5
Fracciones de pepino de mar

FIG. 14

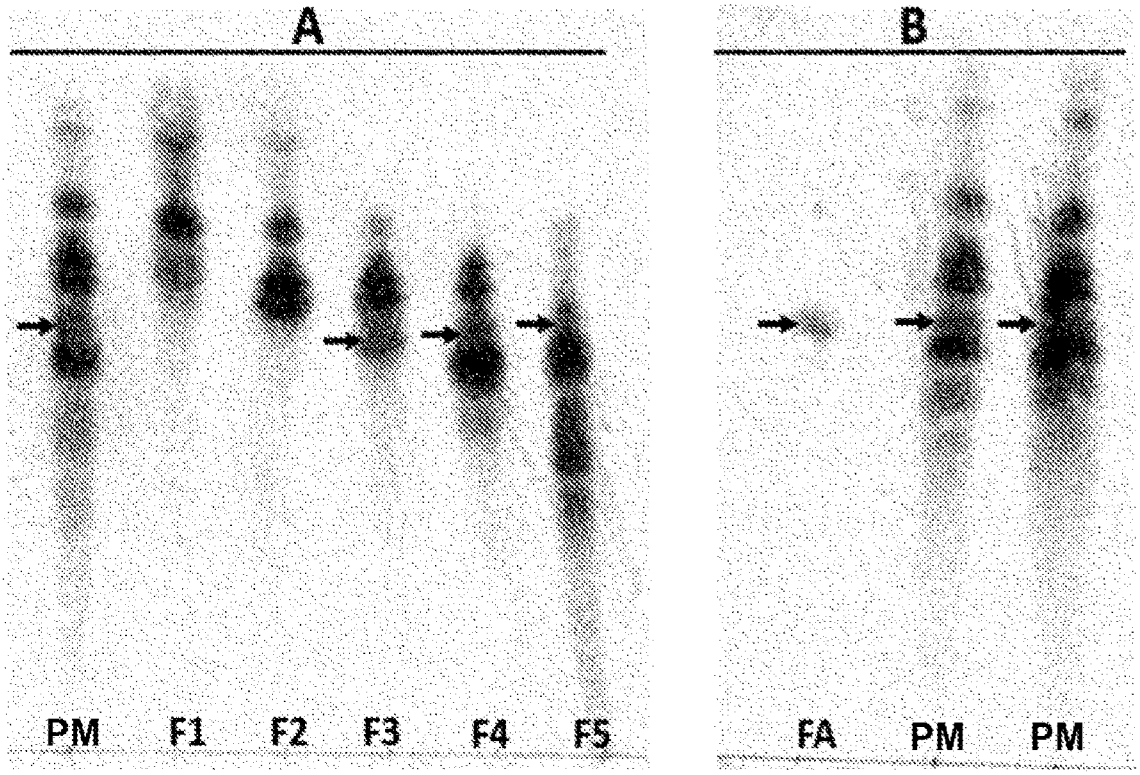


FIG. 15

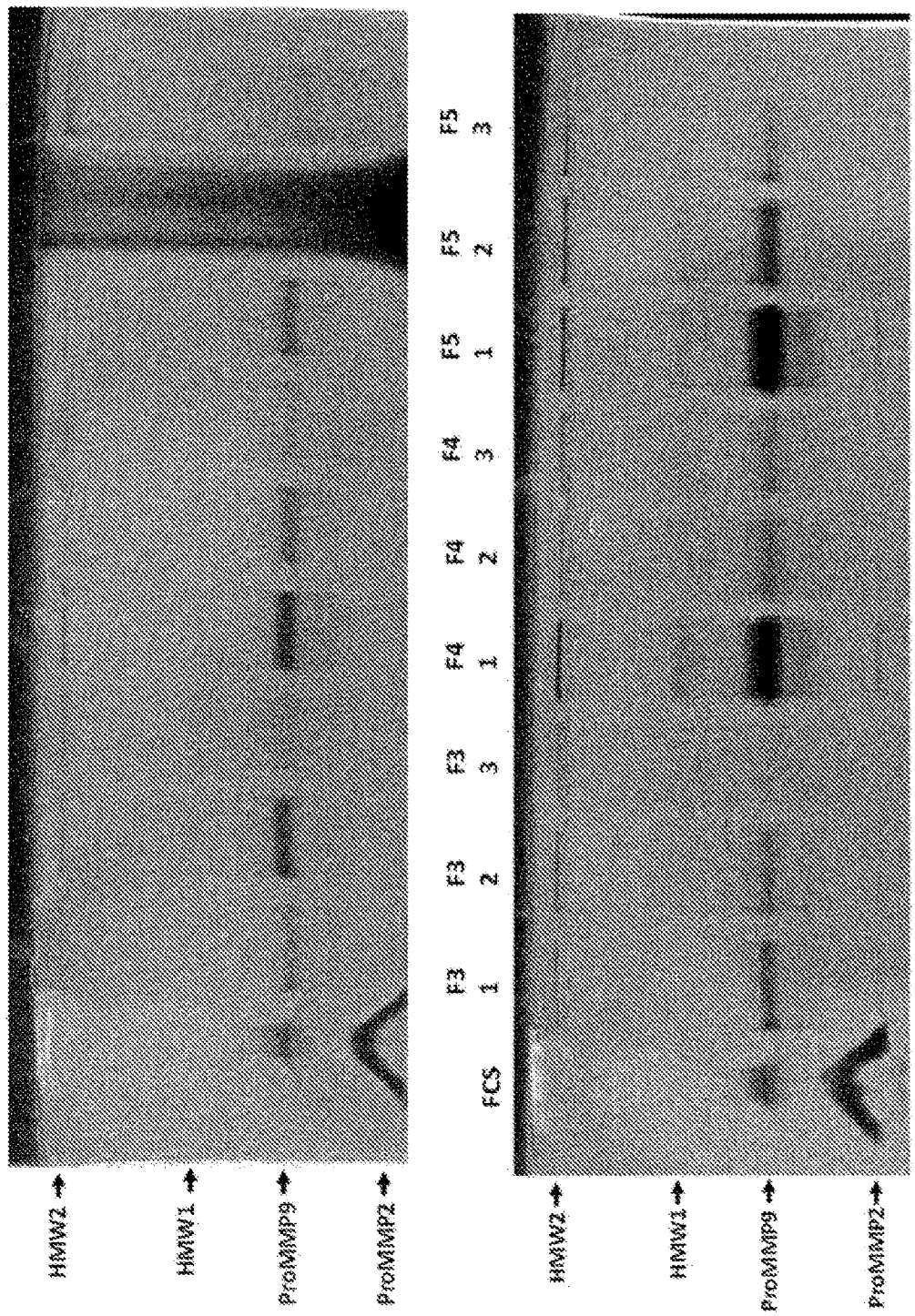

FCS
C 1
C 2
C 3
F1 1
F1 2
F1 3
F2 1
F2 2
F2 3
HMW2
HMW1
ProMMP9
ProMMP2
FCS
F3 1
F3 2
F3 3
F4 1
F4 2
F4 3
F5 1
F5 2
F5 3
HMW2
HMW1
ProMMP9
ProMMP2

FIG. 16

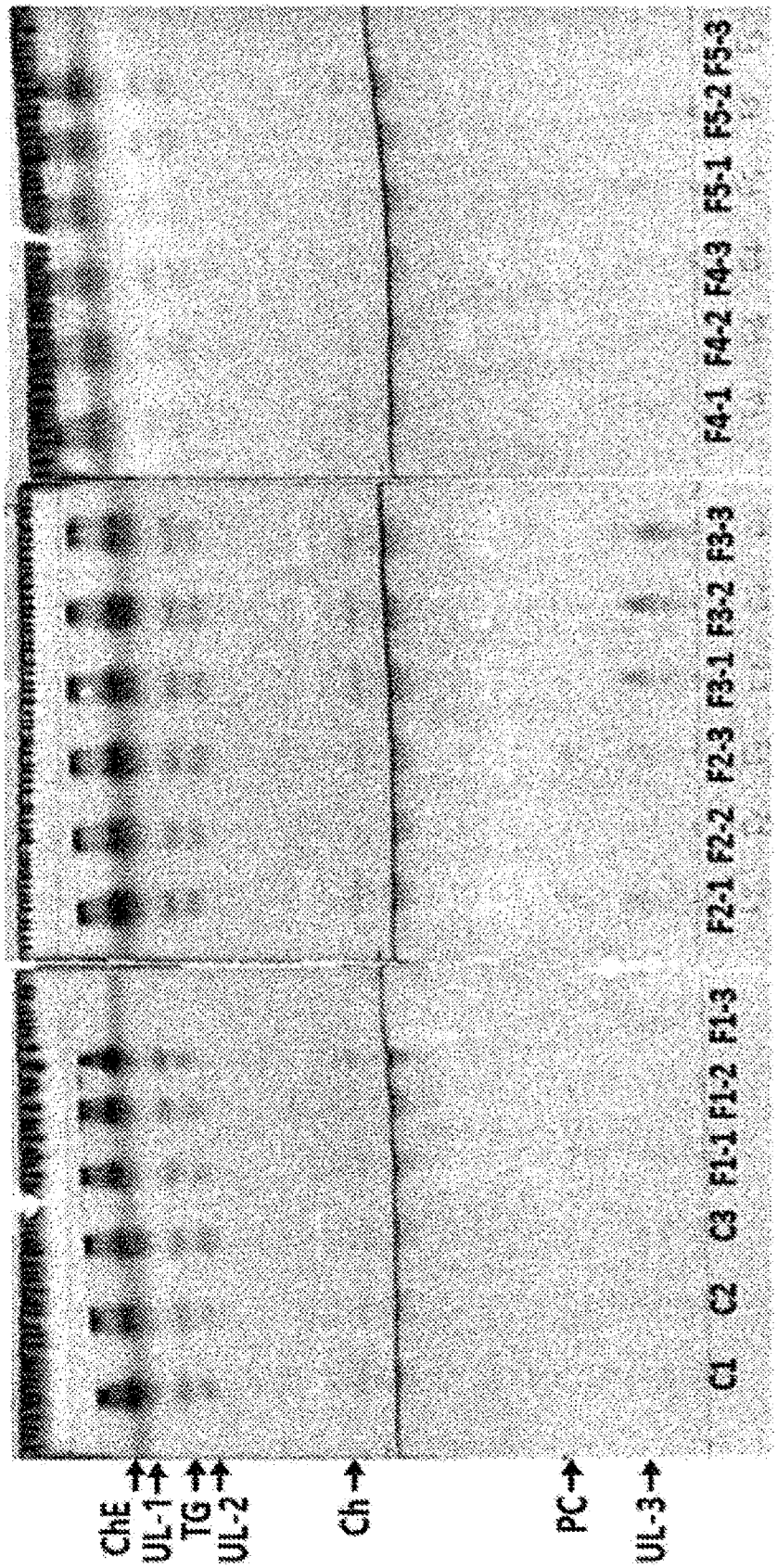

ChE
UL-1
TG
UL-2
Ch
PC
UL-3
C1 C2 C3 F1-1 F1-2 F1-3 F2-1 F2-2 F2-3 F3-1 F3-2 F3-3 F4-1 F4-2 F4-3 F5-1 F5-2 F5-3

FIG. 17

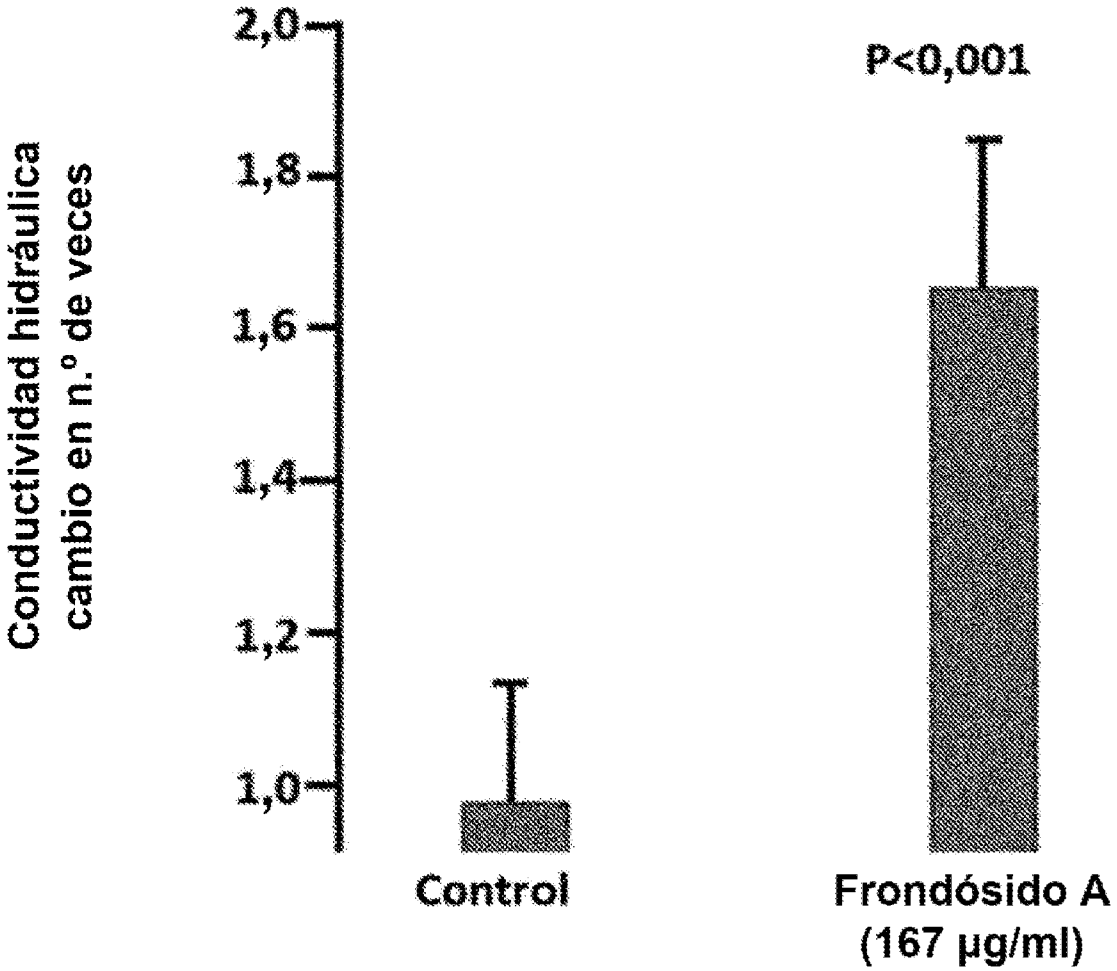

Conductividad hidráulica
cambio en n.º de veces
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
P<0,001
Control
Frondósido A
(167 µg/ml)

FIG. 18

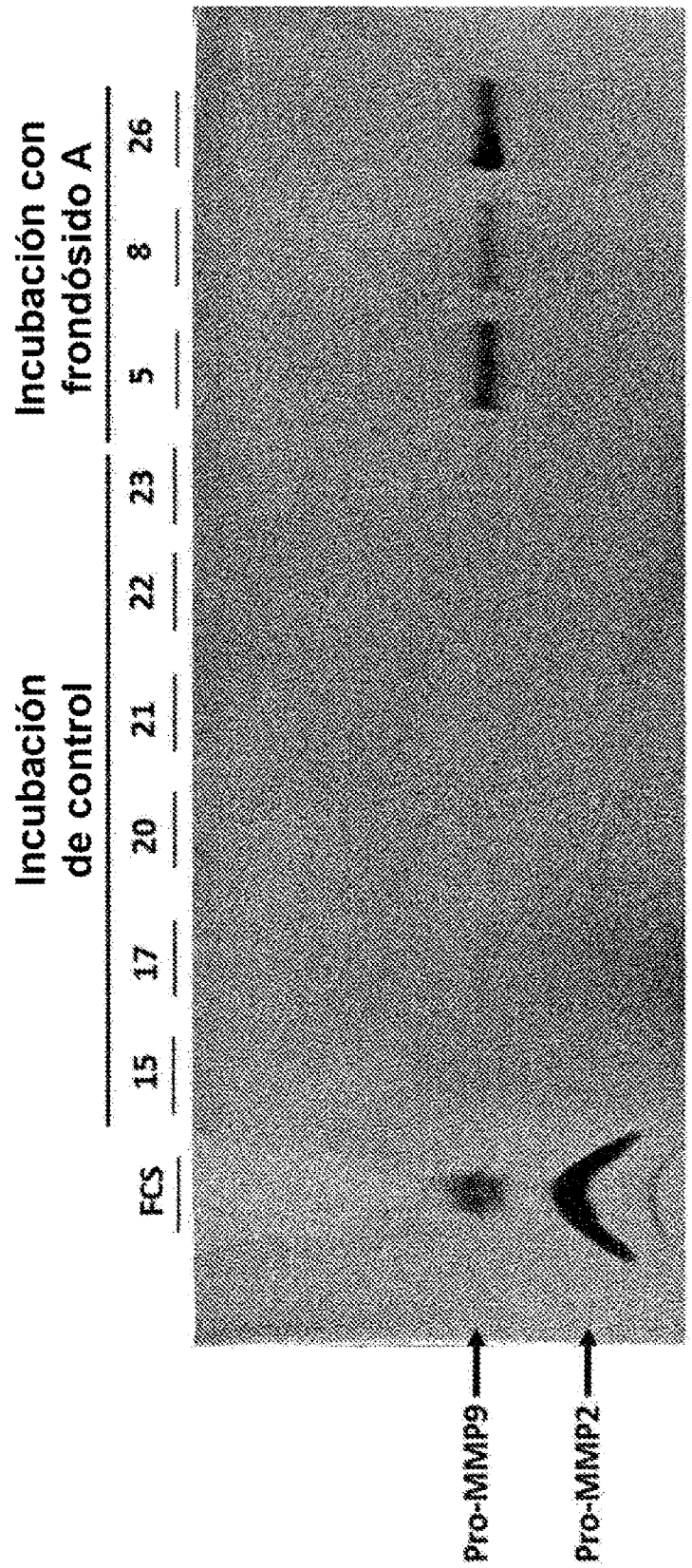

Incubación con frondósido A
Incubación de control
FCS
15
17
20
21
22
23
5
8
26
Pro-MMP9
Pro-MMP2

FIG. 19

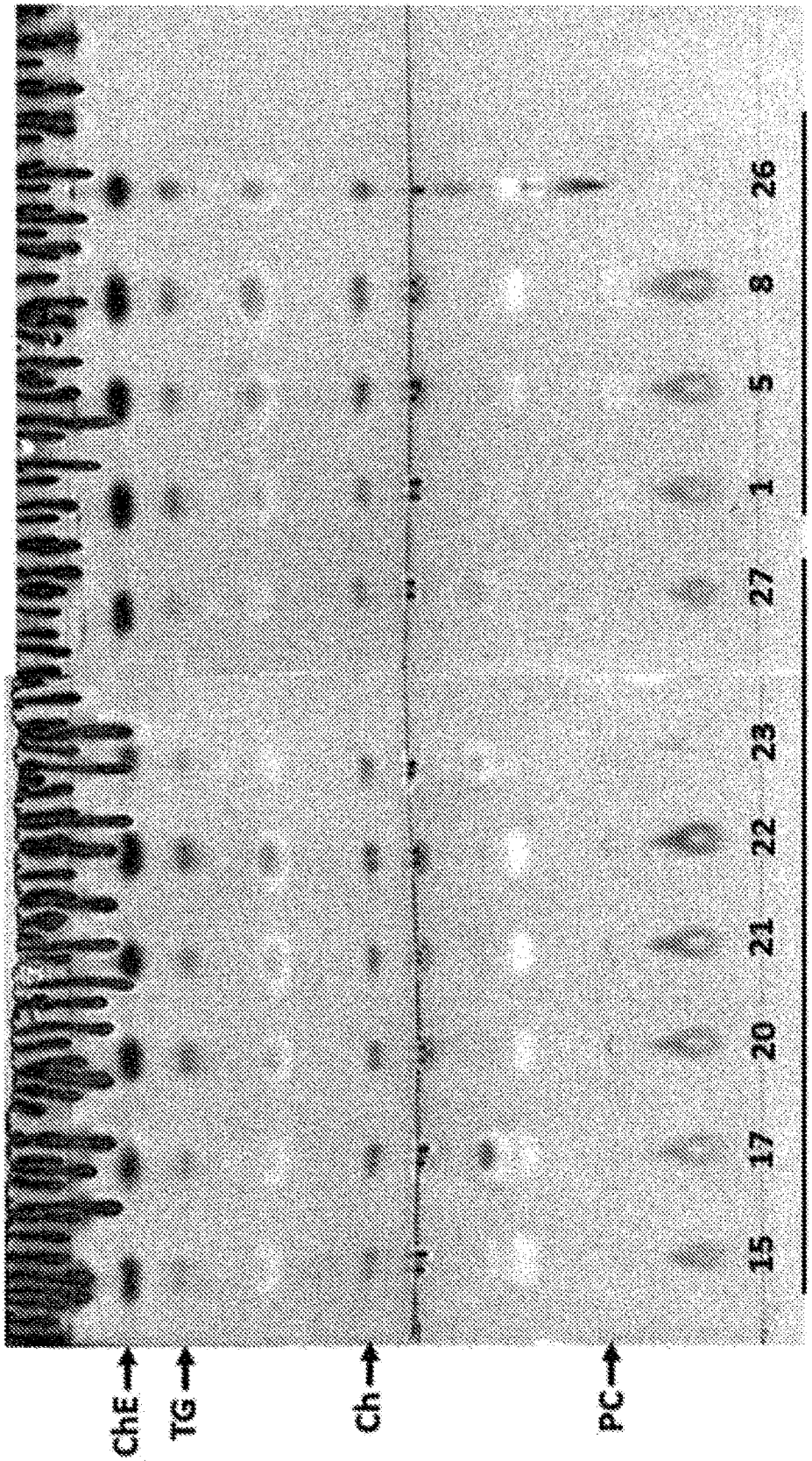

ChE
TG
Ch
PC
15
17
20
21
22
23
27
1
5
8
26
Incubación
de control (Tris)
Incubación con
frondósido A

FIG. 20