(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 850 650**

(51) Int. CI.:

A61K 38/28 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2017 PCT/EP2017/078900**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018 WO18087298**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2017 E 17804828 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3538132**

(54) Título: **Insulina rectal para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino**

(30) Prioridad:

14.11.2016 EP 16198633

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.08.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF COPENHAGEN (100.0%)
Nørregade 10
1165 Copenhagen K, DK

(72) Inventor/es:

OLSEN, JØRGEN;
YASSIN, MOHAMMAD, TAHA y
PEDERSEN, ELM, ANDERS

(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

Insulina rectal para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino

Campo técnico

La presente descripción se refiere a composiciones que comprenden insulina y que se administrarán por vía rectal en el intestino grueso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino y un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación.

Antecedentes

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) son comunes en Europa, con una prevalencia tan alta como 1 de cada 198 personas (colitis ulcerosa) y 1 de cada 310 personas (enfermedad de Crohn) (Wehkamp J y col. 2016). Tanto los jóvenes como los ancianos se ven afectados y una vez diagnosticada la EII es una enfermedad crónica caracterizada por episodios alternos de inflamación con síntomas agudos y remisión asintomática. En la perspectiva a largo plazo, especialmente la colitis ulcerosa (CU) es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de tumores colorrectales y cáncer.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, dos variedades de enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tienden a surgir en la edad adulta temprana, pero de hecho pueden surgir a cualquier edad desde la niñez en adelante. Su diagnóstico a menudo se retrasa a pesar de sus manifestaciones prominentes, incluyendo diarrea, dolor abdominal y, en la colitis ulcerosa, hemorragia perianal. La enfermedad de Crohn puede afectar a todo el tracto gastrointestinal de forma transmural, desde la boca hasta el ano, mientras que la colitis ulcerosa afecta principalmente a la mucosa colónica. El cuadro clínico se completa con manifestaciones extraintestinales en las articulaciones, los ojos y la piel, que pueden surgir antes que la enfermedad intestinal.

Los pacientes con EII, a diferencia de los individuos sanos, tienen bacterias directamente sobre y en su epitelio mucoso.

Las EII se consideran ahora como trastornos de barrera complejos. La barrera de la mucosa consiste en la capa epitelial y la capa de moco antibacteriano por encima de ella, que está formada por mucinas de células caliciformes y antibióticos peptídicos intrínsecos secretados por vía epitelial (defensinas). En la colitis ulcerosa, se observa una capa mucosa defectuosa y adelgazada. En la enfermedad de Crohn del intestino delgado, las células de Paneth en la base de las criptas y la formación defectuosa de defensina parecen desempeñar un papel central. Diversos defectos del reconocimiento bacteriano

(NOD2), la autofagia, el estrés del retículo endoplásmico, y la función de los monocitos deterioran las defensas antimicrobianas y alteran el microbioma. Las bacterias invasoras inducen una respuesta inflamatoria que involucra tanto a las células inmunes innatas (granulocitos, macrófagos, células dendríticas) como a las células inmunes adaptativas (linfocitos T).

El curso natural de la EII es muy variable: un paciente puede experimentar un curso leve después de un episodio inicial grave, una afección progresiva lenta o episódicamente, o síntomas crónicamente intermitentes o persistentes. Después de un episodio agudo inicial, existe un 40 % de probabilidad de un curso remitente, también llamado reaparición o recaída, con fases prolongadas de inactividad de la enfermedad, también llamadas fases de remisión, entre episodios. Aproximadamente el 20 % de todos los pacientes desarrollan enfermedad refractaria a los esteroides; el resto son dependientes de esteroides, es decir, desarrollan rápidamente una enfermedad recurrente cuando se hace cualquier intento de reducir la dosis de esteroides.

Los primeros síntomas más comunes de la EII son diarrea crónica (que a veces es sanguinolenta), calambres abdominales, fiebre, pérdida de apetito y pérdida de peso. Los síntomas pueden continuar durante días o semanas y pueden desaparecer sin tratamiento. La EII reaparece a intervalos irregulares a lo largo de la vida de un sujeto. La recaída puede ser leve, moderada o grave, breve o prolongada. Las recaídas graves pueden provocar dolor intenso, deshidratación y pérdida de sangre. Un sujeto está en remisión cuando no está presente ninguno de los síntomas anteriores.

El tumor colorrectal inducido por inflamación y, también llamado cáncer asociado a colitis (CAC), es el subtipo de cáncer colorrectal que está asociado a las EII, es difícil de tratar y tiene una alta mortalidad. Más del 20 % de los pacientes con EII desarrollan cáncer colorrectal inducido por inflamación dentro de los 30 años posteriores al inicio de la enfermedad, y el 50 % de ellos morirá por ello (Terzic y col. 2010).
Varios de los tratamientos utilizados actualmente para enfermedades inflamatorias del intestino, en particular para la

enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, tienen efectos secundarios graves y, por lo tanto, su uso debería ser lo más breve posible. Además, algunas personas son resistentes a algunos de los fármacos que se utilizan actualmente. De hecho, hasta el 50 % de los pacientes con EII no responden satisfactoriamente al fármaco más utilizado (5-aminosalicilato) y hasta el 20 % de los pacientes con EII no responden al segundo fármaco más utilizado (corticosteroides).

Se necesitan terapias alternativas adecuadas para una gran parte de los individuos afectados por EII con efectos secundarios reducidos. Además, son deseables tratamientos que reduzcan el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal en sujetos con EII.

El documento WO 2005/117951 se refiere a procedimientos y formulaciones para aumentar la función intestinal y describe formulaciones de insulina para aumentar la función intestinal. El documento WO 2008/132731 describe procedimientos y composiciones para la administración rectal de insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus. El documento WO 97/34580 describe composiciones de supositorios de fármacos con alteraciones gastrointestinales y que experimentan descomposición por el ácido gástrico. El documento FR 2 455 897 describe composiciones para la administración rectal de productos farmacéuticos activos con el fin de facilitar la capacidad de absorción mejorada de dicho producto farmacéutico activo en la circulación sanguínea. El documento JP H0383915 describe preparaciones transmucosa para la administración rectal de fármacos hidrófilos con el fin de obtener una alta biodisponibilidad y mostrar una irritabilidad mínima en el sitio de las membranas mucosas, en comparación con el uso de preparaciones conocidas.

Resumen

La presente descripción se refiere al hallazgo de que la administración rectal de insulina a un individuo que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino da como resultado la curación de la mucosa durante la inflamación, induce y también mantiene la remisión. Además, la administración rectal de insulina a un individuo que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino también da como resultado una aparición reducida de tumores y/o cánceres colorrectales inducidos por inflamación.

Una de las ventajas de la presente descripción es que la insulina administrada por vía rectal en el intestino grueso tiene efectos sistémicos bajos o nulos y, por lo tanto, efectos secundarios mínimos o nulos.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino y/o tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, donde la composición se administra por vía rectal en intestino grueso de un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para reducir la pérdida de peso en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En otro aspecto adicional, la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para curar la mucosa colónica en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Descripción de los dibujos

Figura 1. La señalización de la insulina inhibe la colitis por DSS. Los ratones con inactivación intestinal específica del receptor de insulina (INSR KO) desarrollan una inflamación colónica más grave, como lo indica la mayor pérdida de peso, que los ratones de control (INSR Flox).

Figura 2. Los ratones con inactivación intestinal específica del receptor de insulina (INSR KO) desarrollan más tumores que los ratones de control (INSR flox).

Figura 3. El tratamiento con insulina rectal inhibe la colitis inducida por DSS. Los ratones con colitis inducida por DSS se trataron diariamente con insulina humana recombinante administrada por vía rectal (2 unidades/kg) y volvieron a aumentar de peso.

Figura 4. El tratamiento con insulina rectal mejora la puntuación de inflamación en la fase de remisión tardía de la colitis inducida por DSS según lo determinado por inspección endoscópica (colonoscópica) del colon inflamado.

Figura 5. Efecto de respuesta a la dosis del tratamiento con insulina rectal en ratones con colitis inducida por DSS.

Figura 6. Protección dependiente de la dosis del tratamiento con insulina contra la pérdida de peso inducida por inflamación.

Figura 7. Aumento de peso en la fase de remisión dependiente de la dosis del tratamiento con insulina.

Figura 8. Efecto de la estimulación con insulina sobre la expresión del ARNm del receptor de insulina en criptas colónicas cultivadas.

Figura 9. Análisis de micromatrices de ADN y pcaGOpromoter de muestras colónicas inflamadas de ratones INSR -/- y ratones INSR +/+.

Figura 10. Expresión de COX2 en las células epiteliales colónicas de pacientes con EC y CU colónica activa.

Figura 11. Concentración de glucosa en sangre después de la instilación de insulina rectal o PBS.

Figura 12. Expresión de ARNm de Car3 en el colon de ratones tratados con PBS, 2 u/kg o 6 u/kg de insulina rectal durante la inflamación intestinal (inducida por AOM + DSS).

Figura 13. Número de células en las criptas positivas para Ki67 en (A) el colon de ratón de ratones INSR KO y ratones INSR Flox y (B) ratones C57BL6 tratados con PBS, 2 u o 6 unidades/kg de insulina.

Definiciones

Los términos "tratamiento" y "tratar" como se usan en esta invención, se refieren a la gestión y cuidado de un paciente para efectos de combatir una afección, enfermedad o trastorno. El término pretende incluir el espectro completo de tratamientos para una afección dada que el paciente padece o se sospecha que padece, tal como la administración del compuesto activo con el propósito de: aliviar o mitigar síntomas o complicaciones; retrasar la progresión de la afección, enfermedad o trastorno; curar o eliminar la afección, enfermedad o trastorno; y/o prevenir la afección, enfermedad o trastorno, en el que "prevenir" o "prevención" debe entenderse como el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de obstaculizar, reducir o retrasar el desarrollo de la afección, enfermedad o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o reducir el riesgo de aparición de síntomas o complicaciones. Por lo tanto, el tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico. El paciente a tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano. Los pacientes a tratar pueden tener distintas edades.

Una "enfermedad inflamatoria del intestino" o "EII" es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y el intestino delgado. Los principales tipos de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Otras formas de EII representan muchos menos casos:

- Colitis colágena
- Colitis linfocítica
- Colitis isquémica
- Colitis por desviación
- Enfermedad de Behçet
- Colitis indeterminada
- Colitis del lado izquierdo,
- colitis no infecciosa.

Un "sujeto" es un individuo de una de las especies de mamíferos o aves de corral descritas en esta invención. Un "paciente" es un sujeto que padece, se sospecha que padece o que ha sido diagnosticado con un trastorno particular. El "intestino grueso" es la última parte del tracto gastrointestinal del sistema digestivo en los vertebrados. Comprende el ciego, el colon, el recto y el canal anal. En los seres humanos, el intestino grueso comienza en la región ilíaca derecha de la pelvis, justo en la cintura o debajo de ella, donde se une al final del intestino delgado en el ciego, a través de la válvula ileocecal. A continuación continúa como el colon ascendiendo por el abdomen, a lo ancho de la

cavidad abdominal como el colon transverso, y después descendiendo hasta el recto y su punto final en el canal anal. En general, en los seres humanos, el intestino grueso mide aproximadamente 1,5 metros de largo, que es aproximadamente una quinta parte de la longitud total del tracto gastrointestinal.

El término "remisión" representa en esta invención periodos con control de la enfermedad, es decir, periodos en los que los síntomas están esencialmente ausentes, frente a la enfermedad activa, donde están presentes los síntomas, que a menudo se denominan "ataque" o "fase aguda". Por ejemplo, el término remisión usado en el contexto de las EII se refiere a la ausencia de cáncer activo o enfermedad inflamatoria del intestino cuando se espera que estas enfermedades se manifiesten de nuevo en el futuro. Un sujeto en remisión suele seguir una terapia de mantenimiento. Los primeros síntomas más comunes de la EII son diarrea crónica (que a veces es sanguinolenta), calambres abdominales, fiebre, pérdida de apetito y pérdida de peso. Otros síntomas son dolor abdominal, vómitos, hemorragia rectal, calambres internos/espasmos musculares graves en la región de la pelvis, úlceras serpiginosas y geográficas profundas, úlcera continua, inflamación transmural, inflamación de las mucosas, estenosis, granulomas en la biopsia (por ejemplo, granulomas de las criptas no necrotizantes o no peri-intestinales), niveles elevados de calprotectina fecal, anemia, trombocitosis, anomalías arquitectónicas del tejido rectal en el examen histológico, fístulas o abscesos en cualquier segmento del tracto gastrointestinal, megacolon tóxico. Durante la fase de remisión, los síntomas enumerados anteriormente no están presentes. Por lo tanto, esta fase también puede denominarse asintomática.

La "fase aguda" o "ataque" es un periodo de enfermedad activa donde la actividad de la enfermedad puede ser de diversas intensidades, usualmente clasificadas como leve, moderada o grave, que corresponden a muy baja, baja y alta intensidad, respectivamente. Un sujeto que padece o se sospecha que padece un ataque o una recaída suele seguir una terapia de inducción, que es una terapia que induce la remisión. Una enfermedad también puede ser muy grave, denominada "fulminante". Una EII fulminante normalmente requiere una intervención quirúrgica inmediata, pero la composición de la presente descripción se puede utilizar como terapia complementaria antes, simultáneamente con, o después de la cirugía.

El término "recaída" representa en esta invención la reaparición de los síntomas de la EII. Los primeros síntomas más comunes de la EII son diarrea crónica (que a veces es sanguinolenta), calambres abdominales, fiebre, pérdida de apetito y pérdida de peso. Se han enumerados otros síntomas anteriormente. Los síntomas pueden continuar durante días o semanas y pueden desaparecer sin tratamiento. La EII reaparece a intervalos irregulares a lo largo de la vida de un sujeto. La recaída puede ser leve o grave, breve o prolongada. Las recaídas graves pueden provocar dolor intenso, deshidratación y pérdida de sangre.

"Tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación" es una forma de tumor y/o cáncer colorrectal que se desarrolla en sujetos que padecen o se sospecha que padecen EII. El tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación parece tener una etiología, una vía de carcinogénesis y un curso clínico diferentes a los de su equivalente esporádica. Por lo tanto, pueden ser necesarios diferentes enfoques de tratamiento.

Una "unidad" o "unidad de insulina" o "U" o "UI" como se usa en esta invención se define como el equivalente biológico de 34,7 µg de insulina cristalina pura, que también corresponde a 6 µmol (siempre que la masa molecular de la insulina se considere 5800 Da. Esto corresponde a la antigua unidad de insulina de la Farmacopea de los Estados Unidos, donde una unidad (U) de insulina se ajustaba equivalente a la cantidad necesaria para reducir la concentración de glucosa en sangre en un conejo en ayunas a 45 mg/dl (2,5 mmol/l).

"Administración local" se usa en la presente descripción para indicar que las composiciones se administran a una determinada área "localizada" del cuerpo de un sujeto que lo necesite y actúan localmente en el sitio de administración. En particular, la presente descripción está dirigida a la "administración rectal" de insulina, que corresponde a la administración de insulina al recto, o más en general al intestino grueso, de un sujeto que lo necesite y donde dicha insulina actúa casi exclusivamente sobre las células del intestino grueso. Por consiguiente, un principio farmacéuticamente activo administrado por vía rectal no es adsorbido por el intestino y, por lo tanto, no es absorbido por el torrente sanguíneo del sujeto tratado.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.
La presente descripción se refiere a la administración rectal de insulina para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación en un individuo que lo necesite.

Enfermedades inflamatorias del intestino

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, dos variedades de enfermedad inflamatoria del intestino (EII), tienden a

surgir en la edad adulta temprana, pero de hecho pueden surgir a cualquier edad desde la niñez en adelante. Su diagnóstico a menudo se retrasa a pesar de sus manifestaciones prominentes, incluyendo diarrea, dolor abdominal y, en la colitis ulcerosa, hemorragia perianal. La enfermedad de Crohn puede afectar a todo el tracto gastrointestinal de forma transmural, desde la boca hasta el ano, mientras que la colitis ulcerosa afecta principalmente a la mucosa colónica. El cuadro clínico se completa con manifestaciones extraintestinales en las articulaciones, los ojos y la piel, que pueden surgir antes que la enfermedad intestinal.

Los pacientes con EII, a diferencia de los individuos sanos, tienen bacterias directamente sobre y en su epitelio mucoso.

Las EII se consideran ahora como trastornos de barrera complejos. La barrera de la mucosa consiste en la capa epitelial y la capa de moco antibacteriano por encima de ella, que está formada por mucinas de células caliciformes y antibióticos peptídicos intrínsecos secretados por vía epitelial (defensinas). En la colitis ulcerosa, se observa una capa mucosa defectuosa y adelgazada. En la enfermedad de Crohn del intestino delgado, las células de Paneth en la base de las criptas y la formación defectuosa de defensina parecen desempeñar un papel central. Diversos defectos del reconocimiento bacteriano (NOD2), la autofagia, el estrés del retículo endoplásmico, y la función de los monocitos deterioran las defensas antimicrobianas y alteran el microbioma. Las bacterias invasoras inducen una respuesta inflamatoria que involucra tanto a las células inmunes innatas (granulocitos, macrófagos, células dendríticas) como a las células inmunes adaptativas (linfocitos T).

El curso natural de la EII es muy variable: un paciente puede experimentar un curso leve después de un episodio inicial grave, una afección progresiva lenta o episódicamente, o síntomas crónicamente intermitentes o persistentes. Después de un episodio agudo inicial, existe un 40 % de probabilidad de un curso remitente, también llamado reaparición o recaída, con fases prolongadas de inactividad de la enfermedad, también llamadas fases de remisión, entre episodios. Aproximadamente el 20 % de todos los pacientes desarrollan enfermedad refractaria a los esteroides; el resto son dependientes de esteroides, es decir, desarrollan rápidamente una enfermedad recurrente cuando se hace cualquier intento de reducir la dosis de esteroides.

Un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII generalmente presenta periodos de enfermedad, cuando los síntomas de la EII están presentes, y periodos de remisión, cuando no hay síntomas presentes. Después de un periodo de remisión, los síntomas pueden regresar y puede reaparecer o recaer.

Los primeros síntomas más comunes de la EII son diarrea crónica (que a veces es sanguinolenta), calambres abdominales, fiebre, pérdida de apetito y pérdida de peso. Los síntomas pueden continuar durante días o semanas y pueden desaparecer sin tratamiento. La EII reaparece a intervalos irregulares a lo largo de la vida de un sujeto. La recaída puede ser leve, moderada o grave, breve o prolongada. Las recaídas graves pueden provocar dolor intenso, deshidratación y pérdida de sangre. Un sujeto está en remisión cuando no está presente ninguno de los síntomas anteriores.

La presente descripción se refiere a composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino, donde la composición se administra por vía rectal a un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, colitis microscópica tal como colitis colágena o colitis linfocítica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada, colitis del lado izquierdo, colitis no infecciosa, enfermedad de Crohn y pouchitis.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, colitis por desviación, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada, colitis del lado izquierdo, colitis no infecciosa, enfermedad de Crohn y pouchitis.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis por desviación.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Behçet.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis indeterminada.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis del lado izquierdo.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis no infecciosa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es pouchitis.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis no infecciosa.

La pouchitis es la inflamación de la bolsa ileal (un recto artificial creado quirúrgicamente a partir del tejido ileal del intestino en pacientes que se han sometido a una colectomía), que se crea en el tratamiento de pacientes con colitis ulcerosa, colitis indeterminada, poliposis adenomatosa familiar (PAF) o, en algunos casos, otras colitis. Los sujetos con pouchitis suelen presentar síntomas asociados a las EII, en particular diarrea sanguinolenta, calambres extremos y dolor abdominal.

La colitis ulcerosa normalmente es continua desde el recto hasta el colon. La enfermedad se clasifica según el grado de afectación, dependiendo de la extensión del colon hacia arriba, en (a) colitis distal, que incluye proctitis, proctosigmoiditis y colitis del lado izquierdo, y (b) colitis extensa, que incluye pancolitis. Para los fines de esta descripción, el término "colitis ulcerosa" se refiere a cualquiera de las formas en las que se presenta la enfermedad, en particular las formas mencionadas anteriormente.

El diagnóstico de una EII normalmente se considera complejo; pueden requerirse varios análisis y/o exámenes y, por lo tanto, el diagnóstico puede llegar mucho tiempo después de que el sujeto haya buscado consejo médico.

La composición que comprende insulina para administración rectal como se describe en esta invención puede administrarse a un sujeto que lo necesite y que presente uno o más síntomas típicos de EII y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, pero que aún no ha sido diagnosticado que padece dichas enfermedades.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que lo necesite, donde el sujeto presenta uno o más de los siguientes síntomas: dolor abdominal, vómitos, diarrea crónica, hemorragia rectal, calambres internos graves/espasmos musculares en la región de la pelvis, pérdida de peso, úlceras geográficas profundas y serpiginosas, úlcera continua, inflamación transmural, inflamación de las mucosas, estenosis, granulomas en la biopsia (por ejemplo, granulomas de las criptas no necrotizantes y no peri-intestinales), niveles altos de calprotectina fecal, anemia, trombocitosis, alteraciones arquitectónicas del tejido rectal en el examen histológico, fístulas o abscesos en cualquier segmento del tracto gastrointestinal, megacolon tóxico.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que ha sido diagnosticado con una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para reducir la pérdida de peso en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento de curación de la mucosa colónica en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

La administración rectal de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención a un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII da como resultado una reducción de la pérdida de peso de dicho sujeto, por ejemplo, el sujeto puede perder menos peso, mantener su peso o incluso aumentar de peso en comparación con sujetos que padecen o se sospecha que padecen una EII y no reciben la composición de insulina.

La administración rectal de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma a un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII da como resultado otros efectos, por ejemplo, se reduce el sangrado rectal, así como el número, tamaño y gravedad de los tumores colorrectales asociados con la inflamación. Un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII presenta una reducción de los síntomas típicos de las EII, que se describen en otra parte de esta descripción, como resultado de la administración rectal de una composición que comprende insulina.

La composición que comprende insulina como se describe en esta invención se puede utilizar como monoterapia para el tratamiento de una EII tanto como terapia de inducción, por ejemplo durante un ataque o en caso de recaída, y como terapia de mantenimiento, por ejemplo durante la fase de remisión de la enfermedad. Como alternativa, la composición que comprende insulina como se describe en esta invención puede usarse en combinación con otras terapias para el tratamiento de una EII tanto como terapia de inducción como terapia de mantenimiento.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición que comprende insulina se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino durante la fase aguda y/o durante la recaída de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino durante la fase de remisión de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa de leve a moderada.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa de leve a moderada durante la fase aguda y/o durante la recaída de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa de leve a moderada durante la fase de remisión de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece la enfermedad de Crohn.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece la enfermedad de Crohn durante la fase aguda y/o durante la recaída de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece la enfermedad de Crohn durante la fase de remisión de la enfermedad.

Tumor y/o cánceres colorrectales inducidos por inflamación

El tumor colorrectal inducido por inflamación, también llamado cáncer asociado a colitis (CAC), es el subtipo de cáncer colorrectal que está asociado a las EII, es difícil de tratar y tiene una alta mortalidad. Más del 20 % de los pacientes con EII desarrollan cáncer colorrectal inducido por inflamación dentro de los 30 años posteriores al inicio de la enfermedad, y el 50 % de ellos morirá por ello (Terzic y col. 2010).

La inflamación crónica precede al desarrollo de tumores inducidos por inflamación. La inflamación crónica causa daño oxidativo al ADN, lo que conduce a las mutaciones de p53 observadas en las células tumorales y en el epitelio inflamado, pero no displásico. La mutagénesis inducida por inflamación también puede causar la inactivación o represión de genes MMR y ROS puede oxidar e inactivar directamente las enzimas reparadoras de desajustes a nivel de proteína (Terzic y col. 2010).

Las presentes composiciones son útiles para el tratamiento de tumores y/o cánceres colorrectales inducidos por inflamación.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para reducir la pérdida de peso en un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por

inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento de curación de la mucosa colónica en un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

El tumor o cáncer colorrectal inducido por inflamación es una neoplasia del intestino grueso, por ejemplo, una neoplasia maligna del intestino grueso. La neoplasia puede localizarse en cualquiera de: ciego, apéndice, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide, ángulo hepático, ángulo esplénico, unión rectosigmoidea, recto, ano, canal anal y zona cloacogénica. La ubicación de la neoplasia también puede superponerse en dos o más de las áreas del intestino grueso mencionadas anteriormente.

La administración rectal de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención a un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación da como resultado una reducción de la pérdida de peso de dicho sujeto, por ejemplo, el sujeto puede perder menos peso, mantener su peso o incluso aumentar de peso en comparación con sujetos que padecen o se sospecha que padecen un tumor colorrectal inducido por inflamación y no reciben la composición de insulina.

Un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación presenta una reducción de los síntomas típicos de las EII, que se describen en otra parte de esta descripción, como resultado de la administración rectal de una composición que comprende insulina.

La composición que comprende insulina como se describe en esta invención se puede utilizar como monoterapia para el tratamiento de un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación tanto como terapia de inducción, por ejemplo durante un ataque o en caso de recaída, y como terapia de mantenimiento, por ejemplo durante la fase de remisión de la enfermedad. Como alternativa, la composición que comprende insulina como se describe en esta invención puede usarse en combinación con otras terapias para el tratamiento de un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación tanto como terapia de inducción como terapia de mantenimiento.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición que comprende insulina se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación durante la fase aguda y/o durante la recaída de la enfermedad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación durante la fase de remisión de la enfermedad.

Composición que comprende insulina para el tratamiento de EII y un tumor y/o cánceres colorrectales inducidos por inflamación

La presente descripción se refiere al tratamiento de EII y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación mediante la administración rectal de insulina.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino y/o tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, donde la composición se administra por vía rectal a un sujeto que lo necesite.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para reducir la pérdida de peso en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal

farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Incluso un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento para curar la mucosa colónica en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, comprendiendo el procedimiento la administración rectal de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en esta invención.

Los procedimientos de la presente descripción se describen en detalle en las secciones anteriores "Enfermedad inflamatoria del intestino" y "Tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación". Estos procedimientos tienen en común la administración de una composición que comprende insulina, donde la insulina se administra al intestino grueso.

En particular, la presente descripción está dirigida a la "administración rectal" de insulina, que corresponde a la administración de insulina al recto, o más en general al intestino grueso, de un sujeto que lo necesite y donde dicha insulina actúa casi exclusivamente sobre las células del intestino grueso. Por consiguiente, un principio farmacéuticamente activo administrado por vía rectal no es adsorbido por el intestino y, por lo tanto, no es absorbido por el torrente sanguíneo del sujeto tratado. Según la presente descripción, la insulina puede ingerirse por vía oral y liberarse en el intestino grueso, como se conoce en la técnica para otros compuestos. Woods y col., 2015, describen un endoscopio de cápsula inalámbrica para la administración de fármacos dirigida a diversas áreas del intestino. Katsuma y col., 2004, describen un sistema de administración dirigido al colon (CODES) administrado a voluntarios sanos mediante gammagrafía. La administración rectal de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma según la presente descripción está generalmente destinada al uso en el tratamiento de la inflamación crónica del colon en un sujeto que presenta ulceraciones en la mucosa colónica, por ejemplo, presentando la mucosa colónica áreas epiteliales erosionadas, y/o defectos de la barrera epitelial colónica debido a alteraciones en la expresión de transportadores de membrana y/o de proteínas implicadas en la polaridad celular.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra a un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición descrita reduce la inflamación de las células epiteliales del colon.

Por ejemplo, la reducción de la inflamación puede medirse mediante la reducción de la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2/PTGS2), que suele ser mayor en las células epiteliales del colon de sujetos que padecen o se sospecha que padecen inflamación del colon, tal como enfermedad de Crohn colónica o colitis ulcerosa, en comparación con células epiteliales colónicas de sujetos que no padecen inflamación colónica. La reducción de la inflamación también se puede medir monitorizando la expresión de otros marcadores de inflamación.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición descrita reduce la expresión de ARNm de COX2 en células epiteliales colónicas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición descrita aumenta la expresión de ARNm de anhidrasa carbónica 3 (Car3) en células epiteliales colónicas.

Car3 codifica una anhidrasa carbónica citosólica y en las células epiteliales colónicas y las anhidrasas carbónicas están implicadas en el transporte de NaCl electroneutro a través del epitelio. Car3 también tiene una función como eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Räisänen y col. 1999, Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis, FASEB Journal 13(3):513-22).

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición descrita mejora el transporte de iones epiteliales en el intestino grueso regulando la expresión de genes implicados en el transporte de iones transmembrana, por ejemplo, aumentando la expresión de ARNm de Car3.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición descrita mejora la protección de las células epiteliales del intestino grueso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) liberadas por las células inflamadas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la insulina administrada por vía rectal no provoca la proliferación celular en el intestino delgado.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento

de enfermedad inflamatoria del intestino y/o tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, donde la composición se administra por vía rectal a un sujeto que lo necesite, y donde la composición aumenta la expresión de ARNm de Car3 en células epiteliales del intestino grueso.

Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación aumentando la expresión de ARNm de Car3 en células epiteliales del intestino grueso.

Un aspecto incluso adicional de la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para aumentar la expresión de ARNm de Car3 en células epiteliales del intestino grueso.

Dosificación

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,01 U y 1000 U de insulina. La insulina administrada por vía rectal no suele tener efectos sistémicos en el sujeto, por lo que se puede administrar una dosis alta con efectos secundarios bajos o nulos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la insulina administrada por vía rectal no tiene efectos sistémicos, por ejemplo, no afecta a los niveles sistémicos de glucosa en sangre.

Además, como no se prevén efectos sistémicos, la cantidad de insulina administrada no depende del peso corporal del sujeto, sino de la gravedad de la inflamación. De hecho, la insulina administrada por vía rectal ejercerá su efecto terapéutico principalmente en el intestino grueso. La dosis será, por ejemplo, baja para un sujeto en fase de remisión, que padece o se sospecha que padece una EII leve. Por el contrario, podría requerirse una dosis alta para el tratamiento de un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII moderada o grave.

Otros factores pueden afectar a la dosis. Por ejemplo, si otros tratamientos complementarios se administran simultáneamente con la insulina, véase la sección "Tratamiento adicional" a continuación.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,01 UI y 900 UI, tal como entre 0,01 UI y 800 UI, tal como entre 0,01 UI y 800 UI, tal como entre 0,01 UI y 700 UI, tal como entre 0,01 UI y 600 UI, tal como entre 0,01 UI y 500 UI, tal como entre 0,01 UI y 400 UI, tal como entre 0,01 UI y 300 UI, tal como entre 0,01 UI y 200 UI, tal como entre 0,01 UI y 100 UI, tal como entre 0,01 UI y 50 UI, tal como entre 0,01 UI y 25 UI, tal como entre 0,01 UI y 10 UI, tal como entre 0,01 UI y 1 UI, tal como entre 0,01 UI y 0,1 UI.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,01 UI y 1000 UI, tal como entre 1 UI y 1000 UI, tal como entre 10 UI y 1000 UI, tal como 25 UI y 1000 UI, tal como entre 50 UI y 1000 UI, tal como entre 100 UI y 1000 UI, tal como entre 200 UI y 1000 UI, tal como entre 300 UI y 1000 UI, tal como entre 400 UI y 1000 UI, tal como entre 500 UI y 1000 UI, tal como entre 600 UI y 1000 UI, tal como entre 700 UI y 1000 UI, tal como entre 800 UI y 1000 UI.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,35 µg y 35 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 30 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 25 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 20 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 15 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 5 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 µg de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,35 µg y 35 g de insulina, tal como entre 1 µg y 35 g de insulina, tal como entre 10 µg y 35 g de insulina, tal como entre 50 µg y 35 g de insulina, tal como entre 100 µg y 35 g de insulina, tal como entre 1 mg y 35 g de insulina, tal como entre 10 mg y 35 g de insulina, tal como entre 50 mg y 35 g de insulina, tal como entre 100 mg y 35 g de insulina, tal como entre 1 g y 35 g de insulina, tal como entre 10 g y 35 g de insulina, tal como entre 20 g y 35 g de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,006 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 mol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 100 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 50 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 10 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 100 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 50 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 10 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 0,1 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 0,01 µmol de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,006 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,01 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,05 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,1 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,5 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 10 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 50 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 100 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 10 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 50 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 100 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 2 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 3 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 4 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 5 mol y 6 mol de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,01 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 9 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 8 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 7 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 6 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 5 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 4 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 3 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 2 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 1 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 0,1 UI/ml, tal como entre 0,1 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 1 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 2 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 3 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 4 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 5 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 6 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 7 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 8 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 9 UI/ml y 10 UI/ml.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,35 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 300 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 250 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 200 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 150 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 100 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 50 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 25 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 10 µg/ml de insulina, tal como entre 0,35 µg/ml y 1 µg/ml de insulina, tal como entre 0,5 µg/ml y 1 µg/ml de insulina, tal como entre 1 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 10 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 25 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 50 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 100 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 150 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 200 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 250 µg/ml y 350 µg/ml de insulina, tal como entre 300 µg/ml y 350 µg/ml de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende entre 0,006 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 0,01 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 0,05 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 0,1 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 0,5 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 1 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 10 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 50 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 100 µmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 1 mmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 10 mmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 50 mmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 100 mmol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 1 mol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 2 mol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 3 mol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 4 mol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 5 mol/ml y 6 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 5 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 4 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 3 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 2 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 1 mol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 100 mmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 50 mmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 10 mmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 1 mmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 100 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 50 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 10 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 1 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 0,5 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 0,1 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 0,05 µmol/ml de insulina, tal como entre 0,006 µmol/ml y 0,01 µmol/ml de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene un volumen comprendido entre 0 y 500 ml, tal como entre 0 y 450 ml, tal como entre 0 y 400 ml, tal como entre 0 y 350 ml, tal como entre 0 y 300 ml, tal como entre 0 y 250 ml, tal como entre 0 y 200 ml, tal como entre 0 y 150 ml, tal como entre 0 y 100 ml, tal como entre 0 y 50 ml.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis total de insulina al día es entre 0,01 y 1000 UI, tal como entre 0,01 UI y 900 UI, tal como entre 0,01 UI y 800 UI, tal como entre 0,01 UI y 800 UI, tal como entre 0,01 UI y 700 UI, tal como entre 0,01 UI y 600 UI, tal como entre 0,01 UI y 500 UI, tal como entre 0,01 UI y 400 UI, tal como entre 0,01 UI y 300 UI, tal como entre 0,01 UI y 200 UI, tal como entre 0,01 UI y 100 UI, tal como entre 0,01 UI y 50 UI, tal como entre 0,01 UI y 25 UI, tal como entre 25 UI y 1000 UI, tal como entre 50 UI y 1000 UI, tal como entre 100 UI y 1000 UI, tal como entre 200 UI y 1000 UI, tal como entre 300 UI y 1000 UI, tal como entre 400 UI y 1000 UI, tal como entre 500 UI y 1000 UI, tal como entre 600 UI y 1000 UI, tal como entre 700 UI y 1000 UI, tal como entre 800 UI y 1000 UI.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis total de insulina al día es entre 0,35 µg y 35 g de insulina,

tal como entre 0,35 µg y 30 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 25 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 20 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 15 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 5 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 µg de insulina, tal como entre 1 µg y 35 g de insulina, tal como entre 10 µg y 35 g de insulina, tal como entre 50 µg y 35 g de insulina, tal como entre 100 µg y 35 g de insulina, tal como entre 1 mg y 35 g de insulina, tal como entre 10 mg y 35 g de insulina, tal como entre 50 mg y 35 g de insulina, tal como entre 100 mg y 35 g de insulina, tal como entre 1 g y 35 g de insulina, tal como entre 10 g y 35 g de insulina, tal como entre 20 g y 35 g de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis total de insulina al día es entre 0,006 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 mol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 100 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 50 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 10 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 mmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 100 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 50 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 10 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 1 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 0,1 µmol de insulina, tal como entre 0,006 µmol y 0,01 µmol de insulina, tal como entre 0,01 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,05 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,1 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 0,5 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 10 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 50 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 100 µmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 10 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 50 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 100 mmol y 6 mol de insulina, tal como entre 1 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 2 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 3 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 4 mol y 6 mol de insulina, tal como entre 5 mol y 6 mol de insulina.

Por lo tanto, la composición que comprende insulina como se describe en esta invención puede administrarse al sujeto que la necesite una vez al día, tal como dos veces al día, tal como tres veces al día. La composición que comprende insulina como se describe en esta invención también se puede administrar al sujeto que lo necesite una vez cada día, tal como tres veces a la semana, tal como dos veces a la semana, tal como una vez a la semana.

Las EII se caracterizan por fases agudas y fases de remisión y, por lo tanto, se convierten fácilmente en enfermedades crónicas. El tratamiento de las EII suele prolongarse en el tiempo.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra al sujeto que lo necesite durante un periodo de al menos 3 semanas, tal como durante un periodo de al menos 4 semanas, tal como durante un periodo de al menos 5 semanas, tal como durante un periodo de al menos 6 semanas, tal como durante un periodo de al menos 7 semanas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra al sujeto que lo necesite durante un periodo comprendido entre 3 semanas y 3 meses, tal como entre 3 semanas y 4 meses, tal como entre 3 semanas y 5 meses, tal como entre 3 semanas y 6 meses, tal como entre 3 semanas y 7 meses, tal como entre 3 semanas y 8 meses, tal como entre 3 semanas y 9 meses, tal como entre 3 semanas y 10 meses, tal como entre 3 semanas y 11 meses, tal como entre 3 semanas y 12 meses.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra al sujeto que lo necesite durante un periodo de 1 año o más de 1 año.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra al sujeto que lo necesite durante toda la vida.

La duración del tratamiento dependerá de varios factores, por ejemplo, de la respuesta del sujeto a la insulina administrada por vía rectal, así como a otros tratamientos comúnmente usados para las EII. La duración del tratamiento dependerá también de la gravedad de la enfermedad, así como del estadio de la enfermedad. Si el propósito del tratamiento es mantener la enfermedad en una fase de remisión, el tratamiento puede continuarse durante un periodo de tiempo prolongado, tal como meses o años, o durante toda la vida. Dado que la insulina administrada por vía rectal no suele tener efectos sistémicos, no se esperan efectos secundarios cuando se administre durante largos periodos de tiempo.

Formulación

La insulina para administración rectal se puede formular de diversas formas, como resultará evidente para el experto. Las composiciones para administración rectal descritas en esta invención se pueden formular con excipientes apropiados para proporcionar un efecto emoliente o de secado a la mucosa rectal. Pueden usarse excipientes adecuados tales como, pero sin limitación, vehículo (tal como un vehículo acuoso o no acuoso), conservantes,

tensioactivos, emulsionantes, aceites minerales, propulsores, agentes espesantes, lubricantes, conservantes, agentes de ajuste del pH, agentes quelantes, emolientes y/o humectantes, potenciadores de la permeación, agentes formadores de suspensión o agentes mucoadhesivos o combinaciones de los mismos, para formular las composiciones para administración rectal descritas en esta invención.

Usualmente, la insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se disolverá en un disolvente adecuado, por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato o cloruro de sodio isotónico, entre otros.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición está en forma de espuma rectal, un gel, un enema, un aerosol, un ungüento, una crema, un lavado gástrico, un supositorio, un lavado rectal usando un catéter, un dispositivo mecánico de liberación de insulina que se ingiere por vía oral o un sistema farmacéutico de liberación colónica, donde la insulina se libera en el intestino grueso. Por ejemplo, el lavado rectal se puede administrar usando un catéter colocado en el recto o usando un catéter colocado, durante la cirugía, en el íleon distal o en el ciego.

Un dispositivo mecánico de liberación de insulina que se ingiere por vía oral es, por ejemplo, un microdispositivo, o cualquier dispositivo adecuado que pueda ser ingerido por un sujeto que lo necesite sin complicaciones, que libera insulina solo cuando llega al intestino grueso, por ejemplo, cuando llega al colon. Se encuentran ejemplos de dichos dispositivos en Woods y col., 2015,

Un sistema farmacéutico de liberación colónica es una formulación farmacéutica que libera el agente activo, insulina, en el sentido de la presente descripción, en un momento determinado o en determinadas condiciones. Por ejemplo, puede ser una composición farmacéutica que se desintegra, y libera así el agente activo, un periodo de tiempo predeterminado después de la administración en respuesta a las condiciones *in vivo*.
En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra mediante un catéter percutáneo, mediante un catéter intraintestinal, endoscópicamente o a través de un dispositivo intraluminal mecánico.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende además un inhibidor de la proteasa y/o un antibiótico. De hecho, el inhibidor de la proteasa puede aumentar la estabilidad *in vivo* de la insulina y prolongar así la semivida *in vivo* y los efectos. Los antibióticos también pueden prolongar los efectos de la insulina. De hecho, la degradación colónica de las proteínas se debe en gran medida a las proteasas bacterianas. Por lo tanto, disminuyendo el contenido bacteriano del colon con la administración de antibióticos, preferentemente la administración local, se reducen las cantidades de proteasas bacterianas y, en consecuencia, también se reduce la degradación de las proteínas luminales.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende además uno o más compuestos adicionales que mejoran los efectos terapéuticos de la insulina administrada por vía rectal.

La formulación descrita en esta invención es para "administración rectal" de insulina, que corresponde a la administración de insulina al recto, o más en general al intestino grueso, de un sujeto que lo necesite y donde dicha insulina actúa casi exclusivamente sobre las células del intestino grueso. Por consiguiente, un principio farmacéuticamente activo administrado por vía rectal no es adsorbido por el intestino y, por lo tanto, no es absorbido por el torrente sanguíneo del sujeto tratado.

Tratamiento adicional

La administración rectal de insulina para el tratamiento de EII y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación puede complementarse con un tratamiento adicional, por ejemplo, mediante una terapia utilizada actualmente para el tratamiento de EII y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra conjuntamente con un tratamiento adicional para una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación.

Actualmente, con respecto a la enfermedad de Crohn, la remisión se induce, en los casos con exacerbación con actividad leve a moderada, mediante la administración de budesonida o mesalazina (afectación ileocecal) o sulfasalazina (afectación colónica). En los casos donde se observa una exacerbación con actividad intensa, se administra prednisolona para inducir la remisión. Los fármacos administrados en el estado de la técnica para mantener la remisión son azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina, infliximab, anticuerpos anti-TNFa o anti-integrina complementados opcionalmente con azatioprina o adalimumab, o vedolizumab. Los fármacos administrados para la inducción de la remisión y, por lo tanto, durante la fase aguda, en la enfermedad de Crohn son budesonida, mesalazina, glucocorticoides, sulfasalazina, anti-TNFa, anti-integrinas u otros anticuerpos. Para la colitis ulcerosa, se administra mesalazina opcionalmente complementada con esteroides o glucocorticoides, o tacrolimus durante los ataques,

mientras que se administran ciclosporina, infliximab, tacrolimus o mesalazina seguidos de E. coli Nissle y a continuación azatioprina o 6-mercaptopurina y anticuerpos anti-TNFa o anti-integrina.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente descripción, el tratamiento adicional comprende o consiste en la administración de un esteroide, un corticosteroide, un aminosalicilato, un anticuerpo anti-TNFa, un anticuerpo anti-integrina, un fármaco inmunosupresor, un inhibidor de calcineurina o un probiótico.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tratamiento adicional comprende o consiste en la administración de budesonida, mesalazina, sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), infliximab, adalimumab, golimumab, vedolizumab, un fármaco de tiopurina tal como azatioprina o 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina, tacrolimus o una cepa bacteriana viable no patógena de Escherichia coli Nissle 1917 (E. coli Nissle).

Algunos de los fármacos mencionados anteriormente se administran preferentemente durante la fase aguda y/o durante la recaída de la EII y/o el tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, mientras que algunos otros fármacos se administran preferentemente durante la recaída de la fase de remisión de la lEE y/o el tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación. Además, algunos fármacos son adecuados para el tratamiento tanto de la fase aguda/recaída como de la remisión de la EII y/o del tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición que comprende insulina se administra conjuntamente con un tratamiento adicional a un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación durante la fase aguda y/o en caso de recaída y donde el tratamiento adicional comprende o consiste en la administración de un esteroide, un corticosteroide, un aminosalicilato, un anticuerpo anti-TNFα, un anticuerpo anti-integrina, un fármaco inmunosupresor o un inhibidor de calcineurina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición que comprende insulina se administra conjuntamente con un tratamiento adicional a un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación durante la fase de remisión y donde el tratamiento adicional comprende o consiste en la administración de un aminosalicilato, un anticuerpo anti-TNFα, un anticuerpo anti-integrina, un fármaco inmunosupresor, un inhibidor de calcineurina o un probiótico.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tratamiento adicional es rectal, oral, sublingual, nasal, intravenoso, intramuscular o subcutáneo. Por ejemplo, cualquiera de los fármacos mencionados anteriormente puede administrarse por vía rectal, oral, sublingual, nasal, intravenosa, intramuscular o subcutánea a un sujeto que padece o se sospecha que padece una EII y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación en el mismo periodo de tiempo en que se administra por vía rectal la insulina al mismo sujeto según la presente descripción.

Por ejemplo, la administración rectal de insulina se puede combinar con la administración oral de ácido 5-aminosalicílico o con la administración tanto oral como rectal de ácido 5-aminosalicílico.

La administración rectal de insulina también se puede combinar con la administración oral o rectal de corticosteroides, o con la administración oral de corticosteroides y la administración rectal de ácido 5-aminosalicílico, o con la administración oral de tanto corticosteroides como ácido 5-aminosalicílico, o con la administración rectal de corticosteroides y la administración oral de ácido 5-aminosalicílico.

La administración rectal de insulina también se puede combinar con la administración de un anticuerpo anti-TNFα, por ejemplo infliximab, o con la administración de una combinación de un anticuerpo anti-TNFα y una tiopurina. La administración rectal de insulina también se puede combinar con la administración de un anticuerpo anti-TNFα, por ejemplo infliximab, y un corticosteroide, o con la administración de una combinación de un anticuerpo anti-TNFα, un corticosteroide y una tiopurina.

La administración rectal de insulina también se puede combinar con la administración de un anticuerpo anti-integrina, por ejemplo vedolizumab, o con la administración de una combinación de un anticuerpo anti-integrina y una tiopurina. La administración rectal de insulina también se puede combinar con la administración de un anticuerpo anti-integrina, por ejemplo vedolizumab, y un corticosteroide, o con la administración de una combinación de un anticuerpo anti-integrina, un corticosteroide y una tiopurina.

El tratamiento adicional se puede administrar durante un periodo de tiempo más largo, durante el mismo periodo de tiempo o durante un periodo de tiempo más corto que la administración rectal de insulina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece la enfermedad de Crohn se trata adicionalmente con la administración de budesonida y/o esteroides y/o aminosalicilatos tales como

mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab) y/o un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, vedolizumab) y/o un fármaco inmunosupresor, tales como los fármacos de tiopurina azatioprina y/o 6-mercaptopurina, y/o metotrexato.

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece la enfermedad de Crohn se trata adicionalmente durante la fase aguda y/o en caso de recaída con la administración de budesonida y/o esteroides y/o aminosalicilatos tales como mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab) y/o un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, vedolizumab).

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece enfermedad de Crohn se trata adicionalmente durante la fase de remisión con la administración de un fármaco inmunosupresor, tal como los fármacos de tiopurina azatioprina y/o 6-mercaptopurina, y/o metotrexato y/o aminosalicilatos tales como mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab).

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa se trata además con la administración de aminosalicilatos tales como mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y/o esteroides y/o corticosteroides tales como prednisona y/o inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina y tacrolimus y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab o golimumab) y/o un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, vedolizumab).

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa se trata además durante la fase aguda y/o en caso de recaída con la administración de aminosalicilatos tales como mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y/o esteroides y/o corticosteroides tales como prednisona y/o inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina y tacrolimus y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab o golimumab) y/o un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, vedolizumab).

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que padece o se sospecha que padece colitis ulcerosa se trata además durante la fase de remisión con la administración de aminosalicilatos tales como mesalazina, sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) y/o esteroides y/o corticosteroides tales como prednisona y/o inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina y tacrolimus y/o un anticuerpo anti-TNFα (por ejemplo, infliximab o adalimumab o golimumab) y/o un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, vedolizumab) y/o la cepa bacteriana viable no patógena probiótica de Escherichia coli Nissle 1917 (E. coli Nissle).

En algunas realizaciones de la presente descripción, no se administran esteroides ni corticosteroides a un sujeto que lo necesite durante la fase de remisión. De hecho, los esteroides y corticosteroides pueden tener efectos adversos y su uso prolongado debe evitarse cuando sea posible.

Ejemplos

Ejemplo 1. La señalización de insulina inhibe la colitis y el desarrollo de tumores.

En el modelo de carcinogénesis/colitis de azoximetano y dextrano sulfato de sodio (AOM/DSS), la colitis es inducida por DSS que promueve tumores inducidos por AOM. Este modelo de AOM/DSS se utilizó en ratones que tenían inactivación intestinal específica del receptor de insulina. Estos ratones se obtuvieron cruzando ratones (B6.129S4(FVB)-Insrtm1Khn/J) con sitios loxP que flanquean el exón 4 en el gen del receptor de insulina con ratones (B6.Cg-Tg(Vilcre)997Gum/J) que expresan la cre-recombinasa bajo el promotor de vilina (ambos ratones se obtuvieron comercialmente en el Laboratorio Jackson).

Como se ve en la **figura 1**, los ratones con inactivación intestinal específica del receptor de insulina (INSR KO) pierden más peso durante el tratamiento con DSS y su recuperación progresa más lentamente según lo determinado por las curvas de peso, en comparación con los ratones de tipo silvestre (INSR Flox). Es importante destacar que en el modelo AOM+DSS, la pérdida de peso es una medida de la gravedad de la inflamación. Además, los ratones INSR KO desarrollan el doble de tumores que los ratones de control INSR floxed (**figura 2**).

Resultados: Estos resultados indican que una señalización de insulina funcional es importante para la curación de la mucosa colónica inflamada y para minimizar la aparición de tumores en ratones que padecen colitis (ratones tratados con AOM+DSS).

Ejemplo 2. La administración de insulina rectal promueve la remisión e inhibe el desarrollo de tumores.

El descubrimiento de que la señalización de insulina inactivada en el intestino aumenta la inflamación y estimula el desarrollo de tumores inducidos por inflamación, llevó a la idea de que la insulina podría usarse para tratar la colitis. Esto se investigó en un estudio de intervención. Por lo tanto, los ratones de tipo silvestre se establecieron en el régimen AOM+DSS y se dividieron en dos grupos. Un grupo de ratones se trató con administración rectal de insulina mientras que el grupo de control se trató con vehículo (solución salina tamponada con fosfato; PBS).

Los resultados muestran una diferencia significativa (prueba t, p<0,05) en la pérdida de peso desde el inicio de DSS (día 1) hasta el inicio de la remisión (día 8 - primera s7 en la **figura 3**). Las pérdidas de peso fueron: 1,68 g (2,26; 1,09) en el grupo tratado con insulina y 2,56 g (3,19; 1,92) en el grupo de PBS.

Los ratones anestesiados también se sometieron a colonoscopia en la fase de remisión tardía (flecha en la figura 3) y los vídeos grabados de la endoscopia se puntuaron de forma ciega. Los resultados (figura 4) muestran que los ratones tratados con insulina tienen una puntuación de inflamación significativamente menor (y mejor), lo que demuestra directamente que la insulina afecta a la inflamación.

La sangre por recto es un signo de colitis y durante el tratamiento con insulina todos los ratones que recibieron solo PBS mostraron signos de sangrado rectal, mientras que esto solo se observó en dos ratones tratados con insulina. Este hallazgo complementa los resultados de las curvas de peso y también demuestra directamente que el tratamiento con insulina reduce significativamente la inflamación (p <0,05) basándose en el patrón de sangrado rectal observado. Además, hubo una reducción significativa en el número de tumores con un tamaño superior a 2 mm en el grupo tratado con insulina (0 ratones tuvieron tumores >2 mm en el grupo de insulina frente a 1,3 tumores >2 mm por ratón en el grupo de PBS (p <0,05)).

El régimen de tratamiento con insulina fue el siguiente: cada día durante el tratamiento con DSS y los primeros 4 días siguientes durante la remisión (sin tratamiento con DSS), los ratones se anestesiaron con isoflurano y se les inyectaron 600 µl de PBS o PBS + 0,06 unidades de insulina humana por vía intrarrectal. Para la inyección, se utilizó una jeringa equipada con una aguja de alimentación de silicona flexible (para roedores). Los ratones se colocaron boca arriba con el extremo inferior elevado durante 10 minutos mientras todavía estaban bajo anestesia con isoflurano. Después de recuperarse de la anestesia, los ratones fueron devueltos a sus jaulas. Los ratones se pesaron diariamente y se puntuaron los signos de sangrado rectal.

Cabe apreciar que la anestesia general antes de la administración intrarrectal de insulina no forma parte de la descripción. Sólo se requiere anestesia para que los ratones toleren la administración intrarrectal. Sin embargo, la administración rectal de productos farmacéuticos en seres humanos es una vía de administración bien conocida. Es fácil de aplicar y bien tolerada por los pacientes también sin ningún tipo de analgesia o anestesia.

La figura 5 muestra los resultados de un experimento separado de AOM+DSS + insulina rectal diseñado para investigar un efecto de respuesta a la dosis del tratamiento con insulina rectal. En este experimento, se utilizó un 3 % de DSS en lugar de un 2 % de DSS en el experimento anterior (**figura 3**). Durante la inducción de la inflamación hay un efecto significativo (figura 6, prueba t, p <0,05) de la administración de 6 u/kg de insulina, mientras que no hay ningún efecto con la administración de solo 2 u/kg. Específicamente, la pérdida de peso (peso al final del tratamiento con DSS - el peso al comienzo del tratamiento con DSS) es un 16 % menor en el grupo de 6 u/kg de insulina en comparación con el grupo de PBS (4,3 g en el grupo de PBS frente a 3,6 g en el grupo de 6 u/kg de insulina; véase la **figura 5.**

Con respecto a la fase de remisión después del final del tratamiento con DSS (**figura 5, día 6**) hay un aumento de peso dependiente de la dosis desde el día 8 al día 11 después del tratamiento con insulina (**figura 7**).

Con respecto al sangrado rectal en este experimento, los resultados fueron:

Tabla 1. Sangrado rectal en ratones no tratados y tratados con insulina.

	Sangrado	Sin sangrado
Grupo PBS	9	4
2 u/kg de insulina	3	8
6 u/kg de insulina*	3	12

Por lo tanto, existe una diferencia significativa (*p <0,05, prueba exacta de Fischer) entre el grupo de 6 u/kg y el grupo de PBS. De nuevo, la hemorragia rectal es un parámetro para el grado de inflamación colorrectal y, por lo tanto, los resultados apoyan la idea de una inhibición de la inflamación dependiente de la dosis mediante la administración de

insulina rectal.

Para investigar el efecto de la insulina sobre las células epiteliales colónicas aisladas, se cultivaron criptas colónicas como organoides con y sin la adición de insulina al medio. La figura 8 muestra que la concentración de ARNm del receptor de insulina aumenta casi dos veces con el tratamiento con insulina. Son posibles varios mecanismos. Primero, es posible que la insulina induzca la diferenciación de las células epiteliales y que este procedimiento aumente la expresión de insulina. Como alternativa, el receptor de insulina puede estimular directamente su propia expresión de ARNm mediante mecanismos aún no descritos. El hallazgo es importante porque se espera que el bucle de retroalimentación positiva prolongue la duración del efecto de la insulina sobre la mucosa colónica.

La ciclooxigenasa 2 (COX2/PTGS2) cataliza la primera etapa en la síntesis de los mediadores inflamatorios, las prostaglandinas, a partir del ácido araquidónico. La expresión de COX2 está aumentada en las células epiteliales colónicas de pacientes con EC y CU colónicas activas y, por lo tanto, es un biomarcador de inflamación colónica en la EII. La figura 10 muestra que la expresión de ARNm de COX2 en el colon de ratones con inflamación inducida por AOM+DSS disminuye cuando se administra insulina rectal. En particular, las dosis de 2 u/kg o 6 u/kg fueron capaces de reducir significativamente la expresión de ARNm para COX2.

Resultados: Estos datos indican que la administración rectal de insulina a ratones tratados con AOM+DSS da como resultado: reducción del sangrado rectal, reducción de la pérdida de peso, reducción de la inflamación (como se observa en los estudios endoscópicos e histológicos, así como en la disminución de la expresión del mediador inflamatorio COX2), y reducción de la aparición de tumores colorrectales en comparación con los ratones tratados con AOM+DSS no tratados con insulina rectal.

Ejemplo 3. Expresión génica en INSR +/+ e INSR -/-

Para obtener alguna información sobre los efectos de la señalización de insulina en las células epiteliales colónicas, se realizó un experimento de micromatrices de ADN utilizando ARN extraído del colon inflamado de ratones INSR +/+ y ratones INSR -/-. Los datos se analizaron mediante un enfoque bioinformático (análisis pcaGoPromoter) previamente utilizado por nosotros para analizar los datos de la expresión génica de todo el genoma de pacientes con EII y utilizando un software desarrollado por nosotros. El principio detrás del análisis es un análisis de componentes principales de los datos de expresión génica con la adición de una anotación funcional de los ejes de componentes principales utilizando análisis estadístico de sobrerrepresentación. Por lo tanto, en el caso donde un grupo de muestras se extrae de células sometidas a mitosis y se comparan mediante análisis pcaGopromoter con otro grupo de muestras extraídas de células en reposo, a continuación la diferencia en la expresión génica multivariada se reflejará en el análisis de anotación. Por lo tanto, típicamente, las muestras de las células en ciclo se representarán a lo largo de un eje PC anotado con términos como "ciclo celular mitótico", "ciclo celular" y "fase M". Los resultados del análisis pcaGopromoter de las muestras de ratones INSR +/+ e INSR -/- se muestran en la **figura 9.**

En primer lugar, se observa que no hay una separación clara de las muestras INSR +/+ e INSR -/- a lo largo de ninguno de los dos primeros ejes PC. Por lo tanto, la diferencia global en la expresión génica multivariada en el colon inflamado de los ratones INSR +/+ y los ratones INSR -/- es pequeña. Sin embargo, en un modelo con los primeros 3 ejes PC hay una diferencia significativa en la expresión génica multivariada entre las muestras INSR +/+ e INSR -/- (prueba T2 de Hotelling, $p < 0,05$).

En la **figura 9** se puede observar que las muestras INSR -/- se representan principalmente hacia valores negativos en el primer eje PC mientras que las muestras INSR +/+ se distribuyen uniformemente entre valores positivos y negativos en el primer eje PC. La dirección negativa del primer eje PC está anotada con los términos: "proceso del sistema inmunitario", "activación celular", "regulación del proceso del sistema inmunitario", "regulación positiva del proceso del sistema inmunitario", "respuesta inmunitaria". Por el contrario, la dirección positiva del primer PC está anotada con los términos "transporte transmembrana de cationes", "transporte de iones", "transporte de cationes", "transporte transmembrana de iones" y "transporte transmembrana".

Por lo tanto, del análisis bioinformático de los datos de micromatrices de ADN se puede concluir que las muestras de colon inflamado de ratones INSR -/- están ligeramente más inflamadas (a nivel molecular) en comparación con las muestras INSR +/+. Además, no hay evidencia de más actividad del ciclo celular en las muestras colónicas de ratones INSR +/+ de tipo silvestre en comparación con las muestras de los ratones inactivados INSR -/-, lo que indica que la señalización de la insulina no afecta al ciclo celular en las células epiteliales colónicas.

En su lugar, existe cierta evidencia de que las muestras de tipo silvestre tienen una mayor expresión de genes implicados en el transporte de iones transmembrana.

Resultados: Estos resultados indican que es más probable que el mecanismo detrás del efecto curativo de la insulina

en los ratones tratados con AOM+DSS implique un mejor transporte de iones epiteliales en lugar de una mayor proliferación de células epiteliales.

Ejemplo 4. Niveles de glucosa sistémica

Se trataron ratones C57BL6 con DSS al 3 % en el agua de bebida. En el pico de inflamación, los ratones se trataron con insulina rectal y se midió la concentración de glucosa en sangre a los 0, 15, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos. La anestesia se indujo después de que se tomó la primera medición en el punto temporal cero. La anestesia se completó en el punto temporal de 15 minutos y la instilación de insulina rectal o la instilación de control de PBS también comenzó en el punto temporal de 15 minutos. La anestesia dio como resultado una caída en la tasa metabólica básica en los ratones que condujo a un aumento transitorio de la concentración de glucosa en sangre tanto en los ratones de control como en los tratados con insulina por vía rectal. Los ratones se habían recuperado completamente de la anestesia a los 30 minutos. No se observaron diferencias significativas entre los ratones de control tratados con PBS y los ratones tratados con insulina por vía rectal. Además, la concentración de glucosa en sangre se mantuvo cerca del nivel inicial observado (punto temporal cero) para cada grupo, excepto por el aumento observado en ambos grupos debido a la anestesia. Estos resultados se muestran en la figura 11.

Resultados: La insulina rectal no tiene ningún efecto sobre la concentración de glucosa en sangre sistémica en los ratones tratados. Por consiguiente, la captación sistémica de insulina después de la instilación rectal de insulina en el lumen del colon y el recto es insignificante. Por lo tanto, el efecto terapéutico de la insulina administrada por vía rectal es un efecto tópico y se observa directamente sobre las células epiteliales del lumen del colon y el recto.

Ejemplo 5. Expresión de Car3

A partir del experimento de micromatrices descrito en el Ejemplo 3, se pudo observar que la expresión de ARNm de la anhidrasa carbónica 3 (Car3) se aumentó significativamente en ratones INSR Flox durante la inflamación. Por el contrario, en los ratones INSR KO con receptor de insulina inactivado en las células epiteliales intestinales, la expresión de Car3 no aumentó por la inflamación. Por lo tanto, se investigó si Car3 es una diana para la señalización de la insulina intestinal. Se siguió la metodología descrita en el Ejemplo 2.

Car3 codifica una anhidrasa carbónica citosólica y en las células epiteliales colónicas y las anhidrasas carbónicas están implicadas en el transporte de NaCl electroneutro a través del epitelio. Car3 también tiene una función como eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Räisänen y col. 1999).

Se encontró que la expresión de ARNm de Car3 aumentó significativamente durante la inflamación intestinal (inducida por AOM+DSS) en el colon de ratones tratados con 6 u/kg de insulina, pero no en ratones tratados con PBS o solo 2 u/kg de insulina como se muestra en la figura 12.

Resultados: Estos resultados indican que es más probable que el mecanismo detrás del efecto curativo de la insulina en los ratones tratados con AOM+DSS implique un mejor transporte de iones epiteliales y la protección de las células de los efectos dañinos de las ROS liberadas de las células inflamatorias en lugar de un aumento de la proliferación de células epiteliales.

Ejemplo 6. Proliferación de células epiteliales colónicas

Se tiñeron secciones de colon de ratón de ratones INSR KO y ratones INSR Flox con un anticuerpo contra el marcador de proliferación Ki67. Posteriormente, las secciones de colon inflamado (inducido por DSS) obtenidas de ratones C57BL6 tratados con PBS, 2 u o 6 unidades/kg de insulina también se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el marcador de proliferación Ki67 y se contó el número de células positivas para KI67 por cripta.

Sólo se encontró un aumento significativo en las células de la cripta positivas para Ki67 para los ratones que carecían del receptor de insulina en las células epiteliales (INSR KO) como se muestra en la figura 13A. No se encontró ninguna diferencia significativa en los patrones de tinción de secciones de colon obtenidas de ratones tratados con PBS, 2 u o 6 unidades/kg de insulina como se muestra en la figura 13B.

Resultados: Los resultados indican que la terapia con insulina rectal no induce la proliferación de las células epiteliales del colon.

Bibliografía

Terzic J, Grivennikov S, Karin E and Karin M, 2010. Inflammation and Colon Cancer. Gastroenterology138:2101-2114.

Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W and Stange EF, 2016. Inflammatory Bowel Disease,Crohn's disease and ulcerative colitis. Dtsch Arztebl Int. 113(5): 72-82.

Räisänen et al. 1999, Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis, FASEB Journal 13(3):513-22

Katsuma M, Watanabe S, Takemura S, Sako K, Sawada T, Masuda Y, Nakamura K, Fukui M, Connor AL, Wilding IR. (2004). Scintigraphic evaluation of a novel colon-targeted delivery system (CODES) in healthy volunteers. J Pharm Sci May;93(5):1287-99

Woods SP and Constandinou TG (2013) Wireless Capsule Endoscope for Targeted Drug Delivery: Mechanics and Design Considerations, IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, VOL. 60, NO. 4

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino y/o tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, donde la composición se administra por vía rectal en intestino grueso de un sujeto que lo necesite.

2. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en un procedimiento para curar la mucosa colónica en un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad inflamatoria del intestino y/o un tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación, donde la composición se administra por vía rectal en el intestino grueso de un sujeto que lo necesite.

3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicha composición tiene efectos sistémicos bajos o nulos.

4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición no afecta a los niveles sistémicos de glucosa en sangre.

5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende entre 0,35 µg y 35 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 30 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 25 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 20 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 15 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 5 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 g de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 mg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 100 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 50 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 10 µg de insulina, tal como entre 0,35 µg y 1 µg de insulina, tal como entre 1 µg y 35 g de insulina, tal como entre 10 µg y 35 g de insulina, tal como entre 50 µg y 35 g de insulina, tal como entre 100 µg y 35 g de insulina, tal como entre 1 mg y 35 g de insulina, tal como entre 10 mg y 35 g de insulina, tal como entre 50 mg y 35 g de insulina, tal como entre 100 mg y 35 g de insulina, tal como entre 1 g y 35 g de insulina, tal como entre 10 g y 35 g de insulina, tal como entre 20 g y 35 g de insulina.

6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende entre 0,01 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 9 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 8 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 7 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 6 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 5 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 4 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 3 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 2 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 1 UI/ml, tal como entre 0,01 UI/ml y 0,1 UI/ml, tal como entre 0,1 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 1 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 2 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 3 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 4 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 5 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 6 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 7 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 8 UI/ml y 10 UI/ml, tal como entre 9 UI/ml y 10 UI/ml.

7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición se administra al sujeto que lo necesite durante un periodo de al menos 3 semanas, tal como durante un periodo de al menos 4 semanas, tal como durante un periodo de al menos 5 semanas, tal como durante un periodo de al menos 6 semanas, tal como durante un periodo de al menos 7 semanas, tal como de por vida.

8. La composición para el uso de cualquiera de los elementos anteriores, donde la composición se administra al sujeto que lo necesite durante la fase de remisión de la enfermedad inflamatoria del intestino y/o tumor y/o cáncer colorrectal inducido por inflamación durante un periodo entre 3 semanas y 3 meses, tal como entre 3 semanas y 4 meses, tal como entre 3 semanas y 5 meses, tal como entre 3 semanas y 6 meses, tal como entre 3 semanas y 7 meses, tal como entre 3 semanas y 8 meses, tal como entre 3 semanas y 9 meses, tal como entre 3 semanas y 10 meses, tal como entre 3 semanas y 11 meses, tal como entre 3 semanas y 12 meses, tal como entre 3 semanas y 18 meses, tal como entre 3 semanas y 24 meses.

9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición está en forma de una espuma rectal, un gel, un enema, un aerosol, un ungüento, una crema, una lavado gástrico, un supositorio, un lavado rectal usando un catéter, un dispositivo mecánico de liberación de insulina ingerida por vía oral o un sistema farmacéutico de liberación colónica, donde la insulina se libera en el intestino grueso; o donde dicha composición se administra a través de un catéter percutáneo, a través de un catéter intraintestinal, por vía endoscópica, o a través de un dispositivo mecánico intraluminal.

10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad inflamatoria del intestino se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, colitis por desviación, enfermedad

de Behçet, colitis indeterminada, colitis del lado izquierdo, colitis microscópica tal como colitis colágena o colitis linfocítica, enfermedad de Crohn, colitis no infecciosa y pouchitis.

11. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es capaz de reducir la inflamación de las células epiteliales del colon.

12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es capaz de reducir la expresión de ARNm de COX2.

13. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición es capaz de mejorar el transporte de iones epiteliales en el intestino grueso.

14. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición no provoca proliferación celular en el intestino delgado.

15. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición comprende además un inhibidor de proteasa y/o un antibiótico.

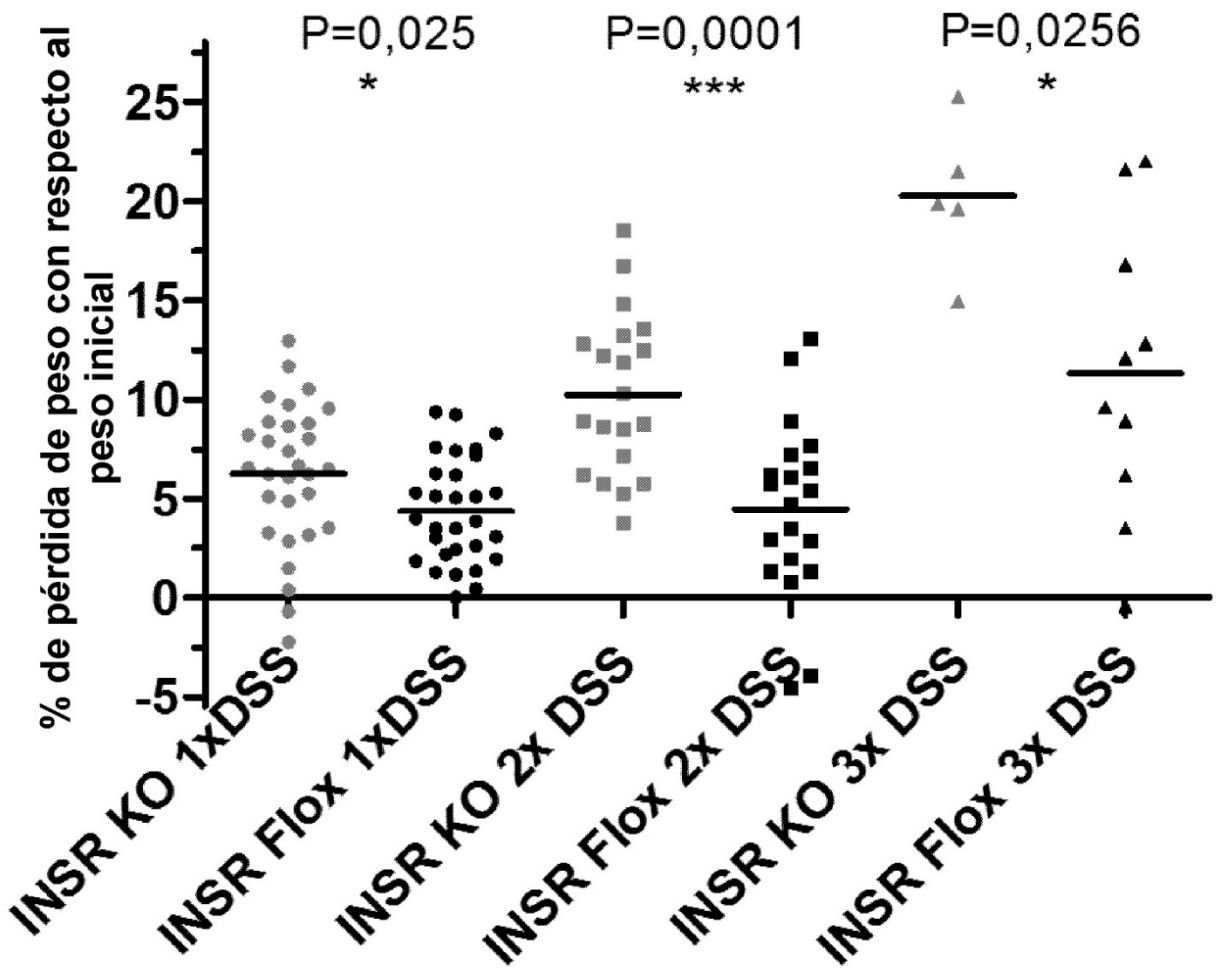

P=0,025
*
P=0,0001
***
P=0,0256
*
% de pérdida de peso con respecto al peso inicial
25
20
15
10
5
0
-5
INSR KO 1xDSS
INSR Flox 1xDSS
INSR KO 2x DSS
INSR Flox 2x DSS
INSR KO 3x DSS
INSR Flox 3x DSS

Fig. 1

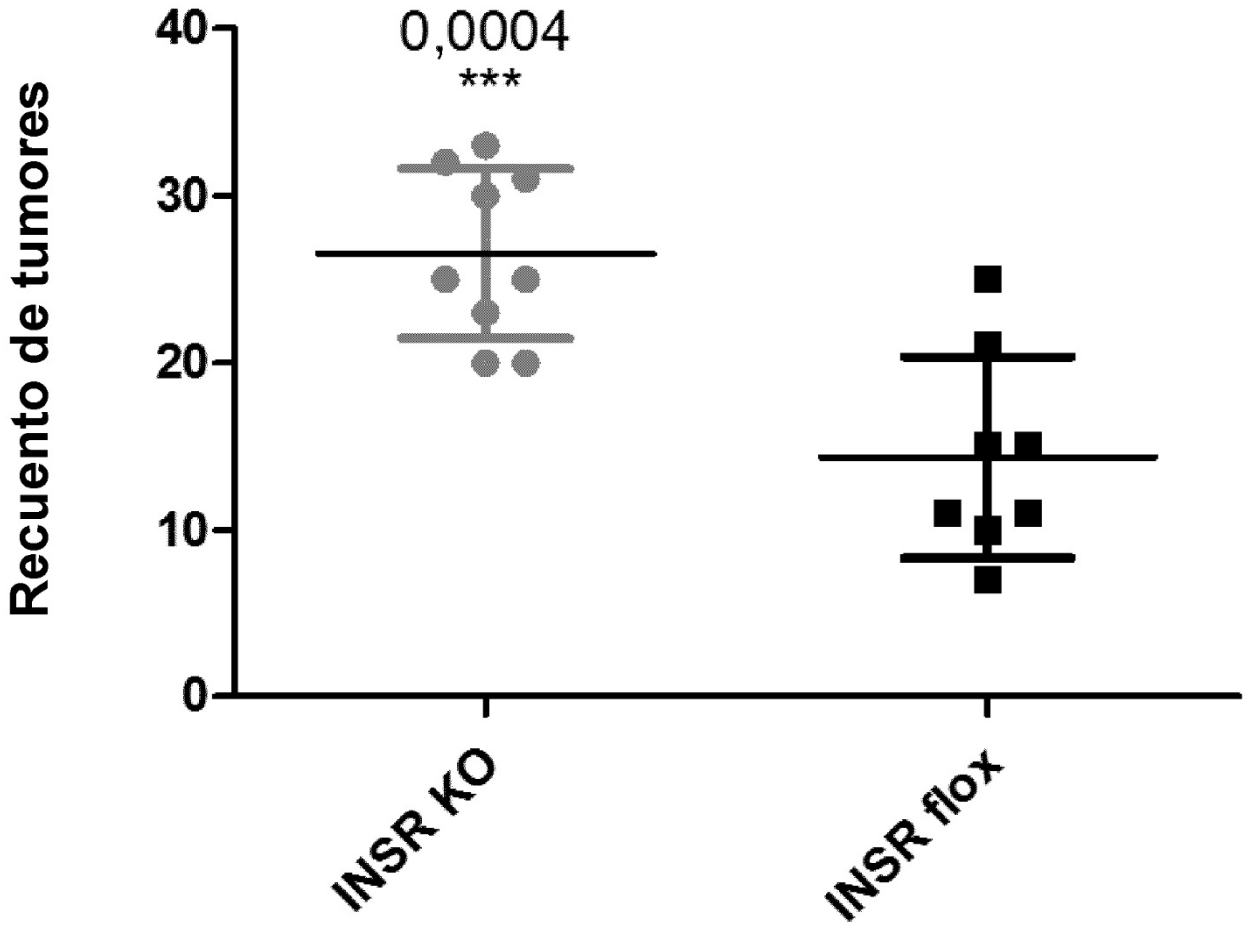


Fig. 2

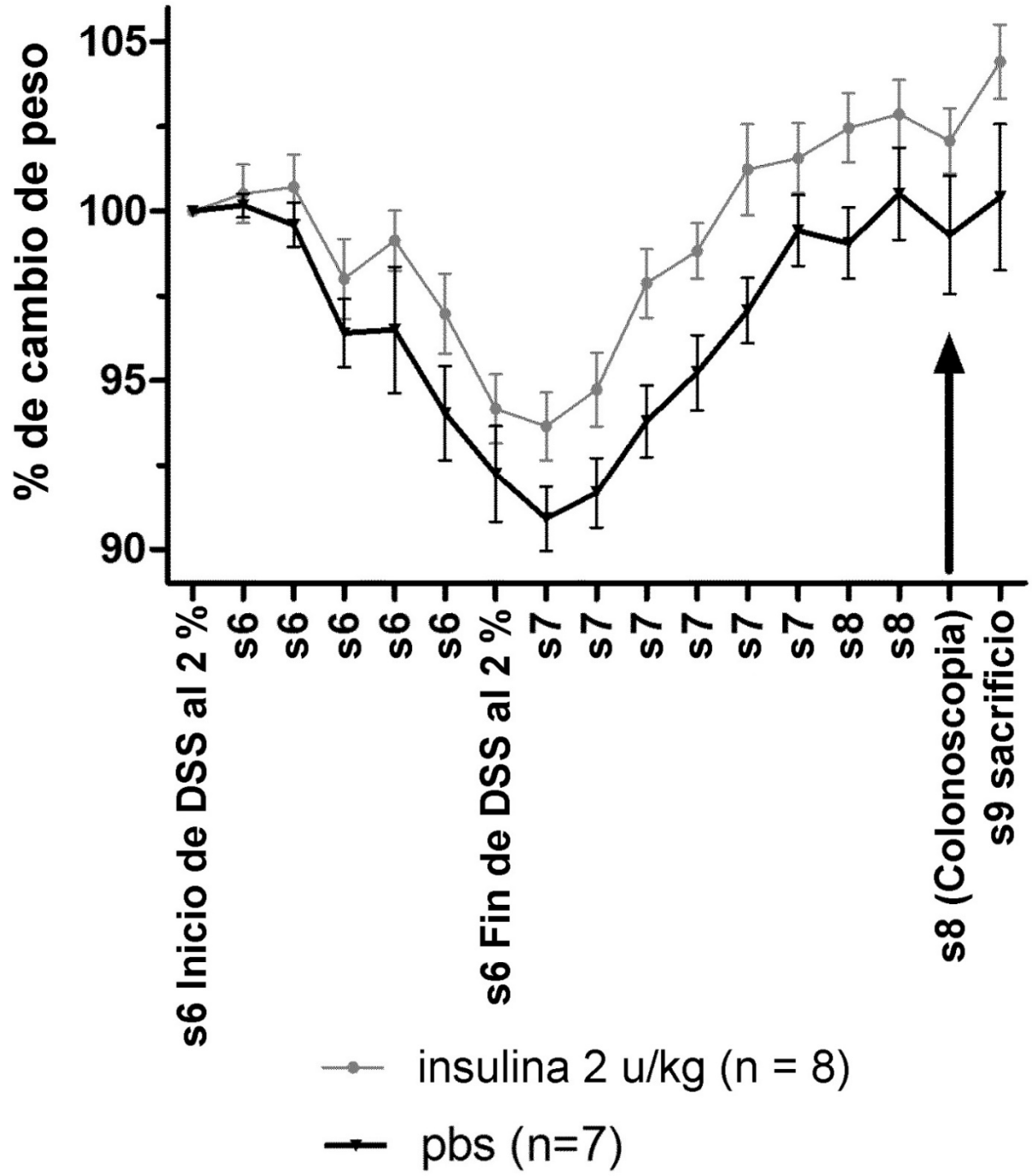

% de cambio de peso
105
100
95
90
s6 Inicio de DSS al 2 %
s6
s6
s6
s6
s6
s6 Fin de DSS al 2 %
s7
s7
s7
s7
s7
s7
s8
s8
s8 (Colonoscopia)
s9 sacrificio
insulina 2 u/kg (n = 8)
pbs (n=7)

Fig. 3

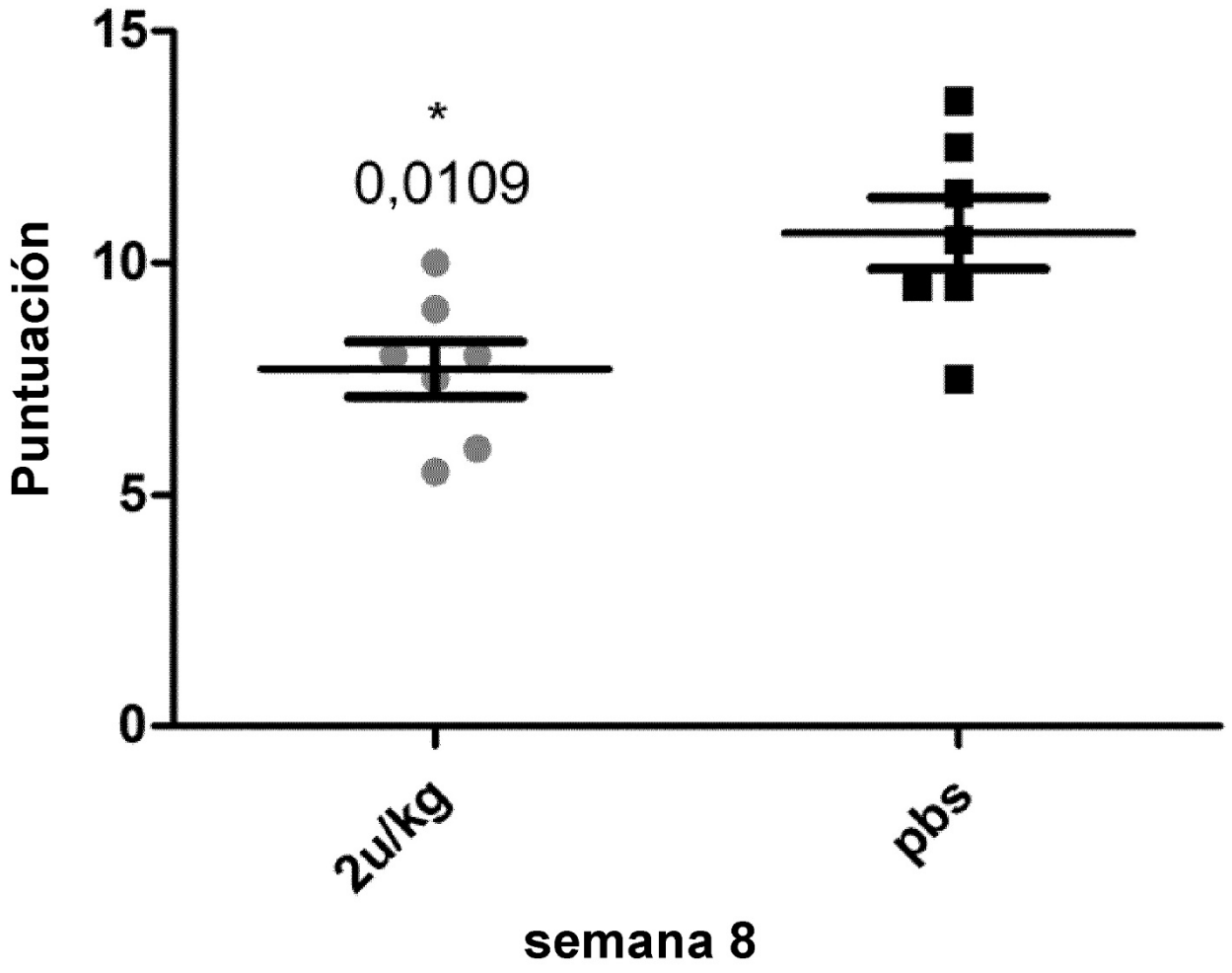


Fig. 4

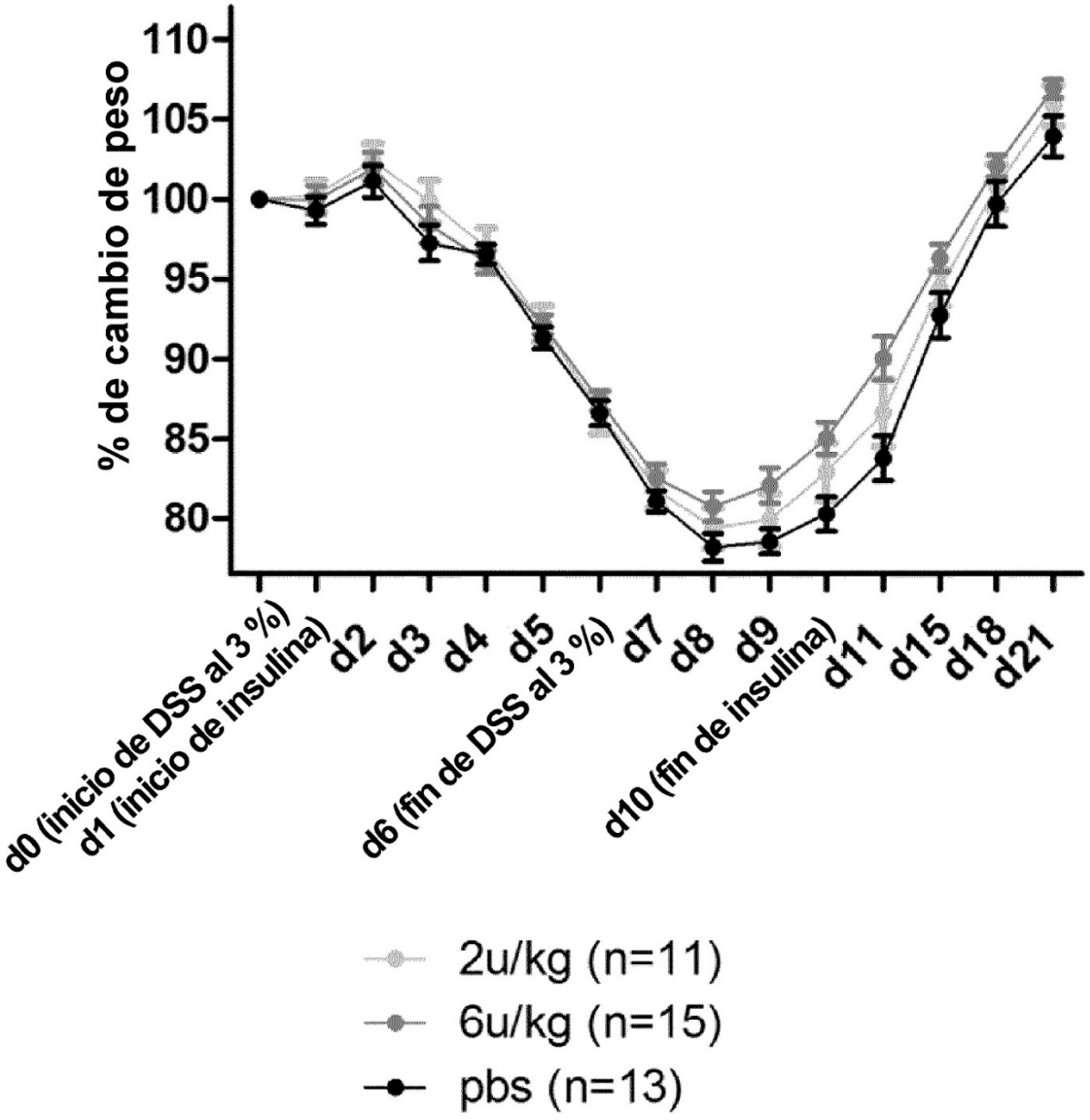

% de cambio de peso
110
105
100
95
90
85
80
d0 (inicio de DSS al 3 %)
d1 (inicio de insulina)
d2
d3
d4
d5
d6 (fin de DSS al 3 %)
d7
d8
d9
d10 (fin de insulina)
d11
d15
d18
d21
2u/kg (n=11)
6u/kg (n=15)
pbs (n=13)

Fig. 5

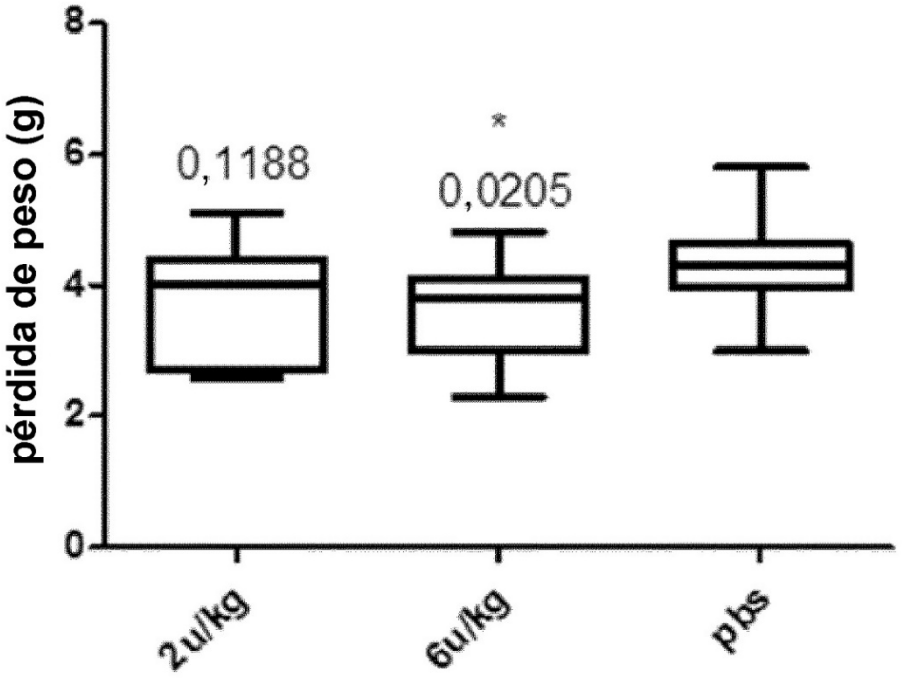


Fig. 6

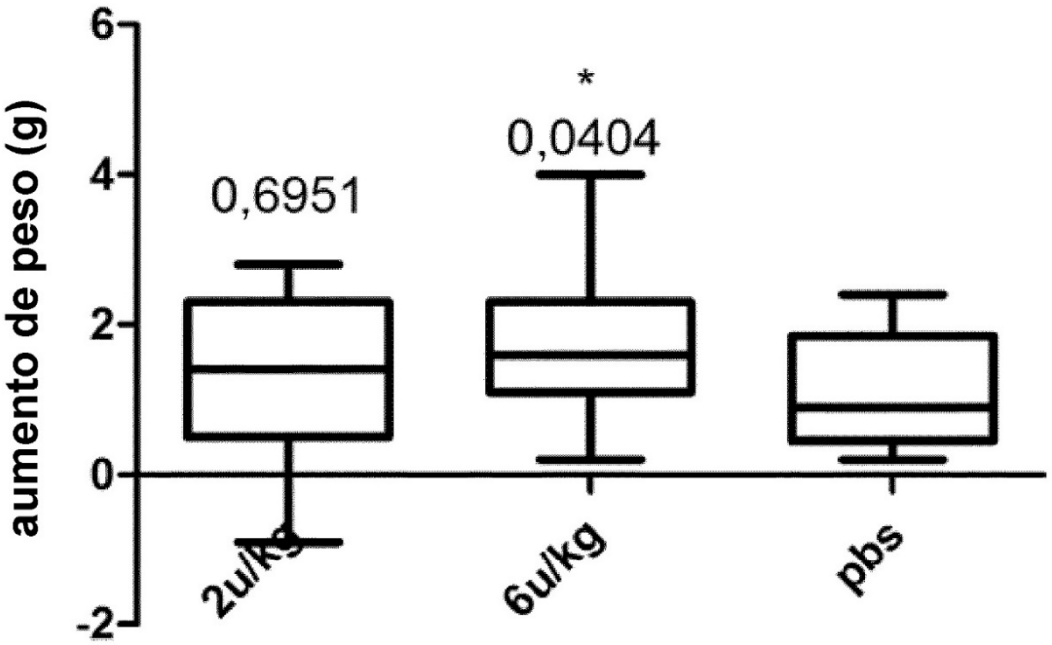


Fig. 7

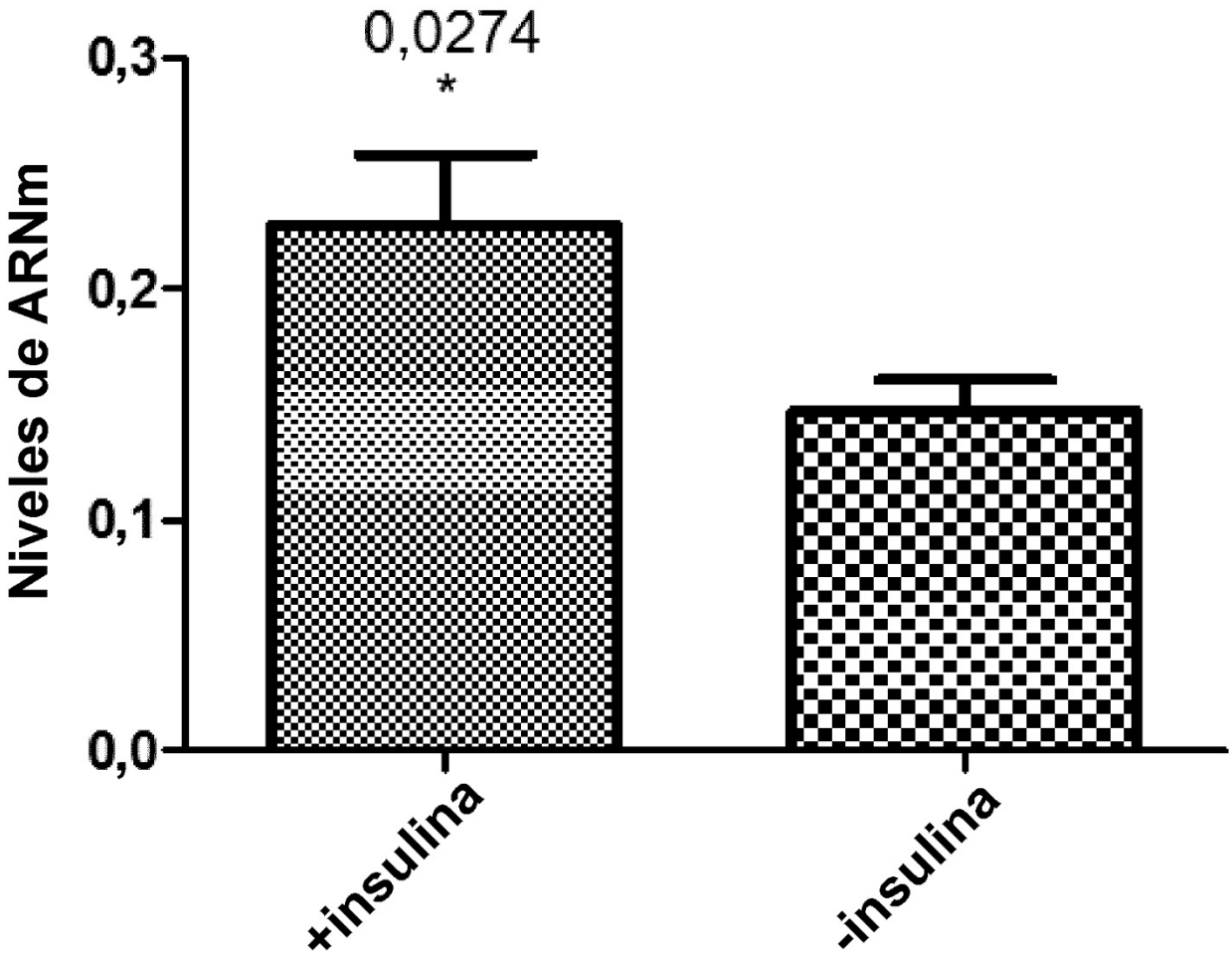


Fig. 8

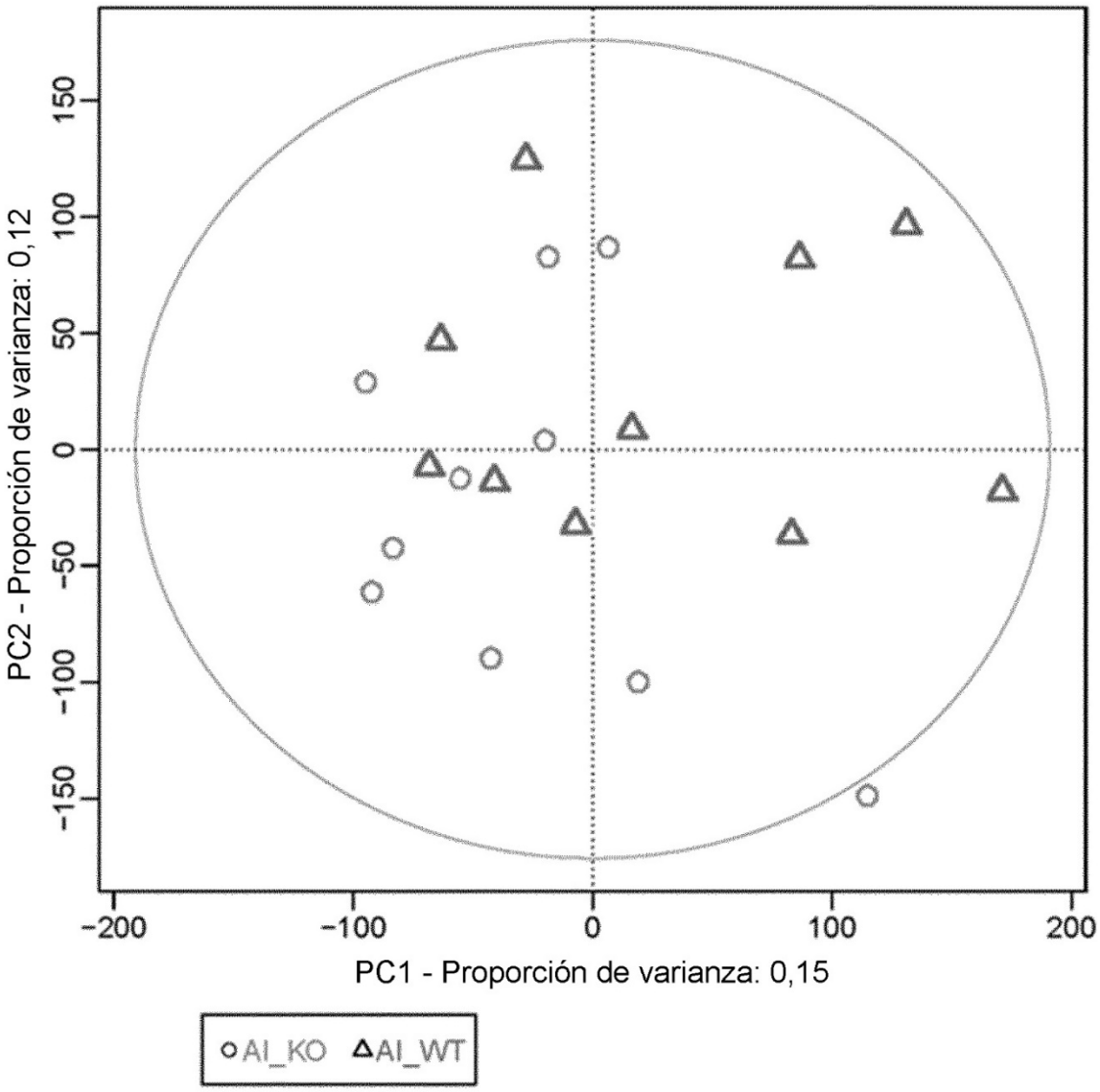

PC2 - Proporción de varianza: 0,12
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-100
0
100
200
PC1 - Proporción de varianza: 0,15
AI_KO
AI_WT

Fig. 9

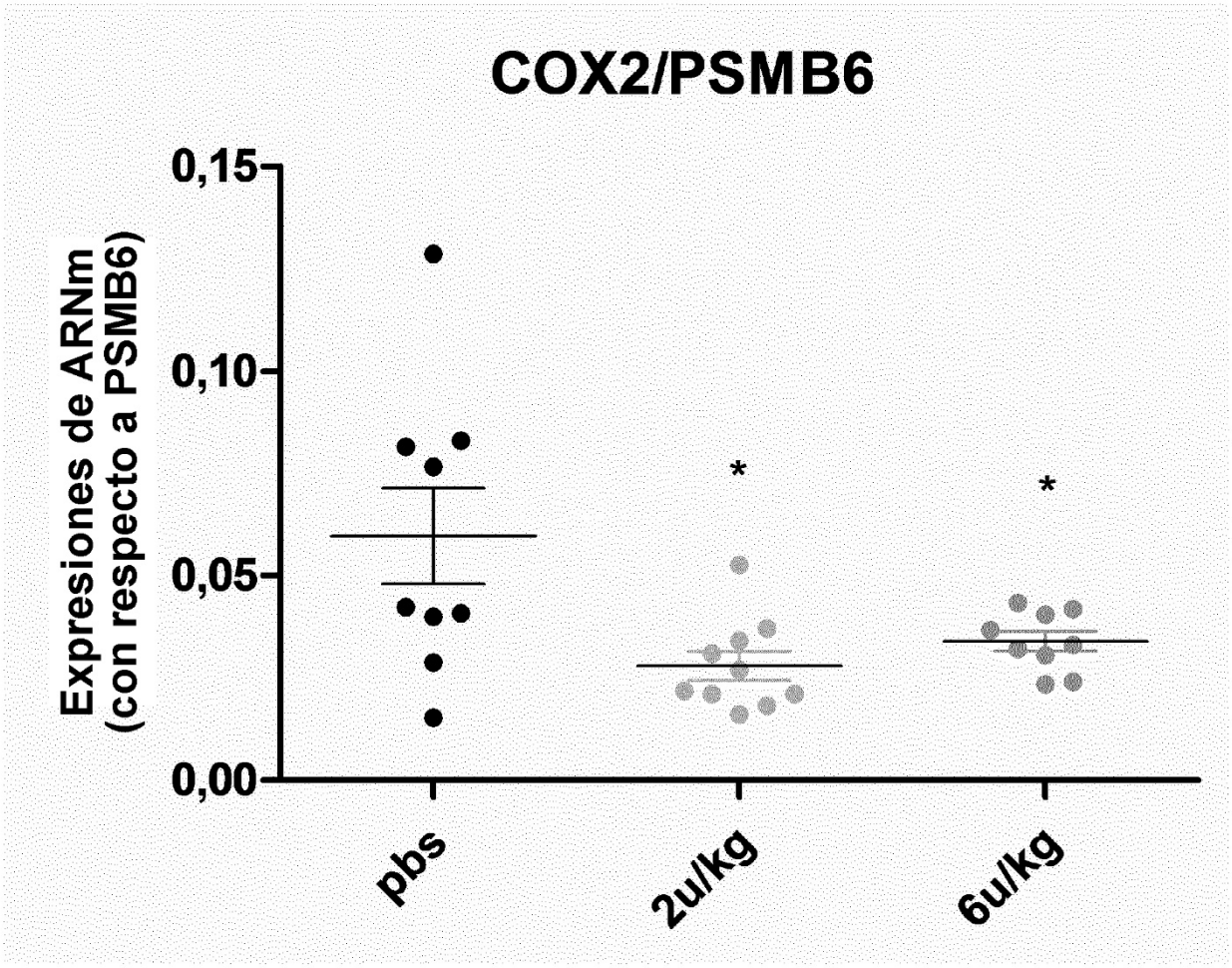

COX2/PSMB6
Expresiones de ARNm
(con respecto a PSMB6)
0,15
0,10
0,05
0,00
*
*
pbs
2u/kg
6u/kg

Fig. 10

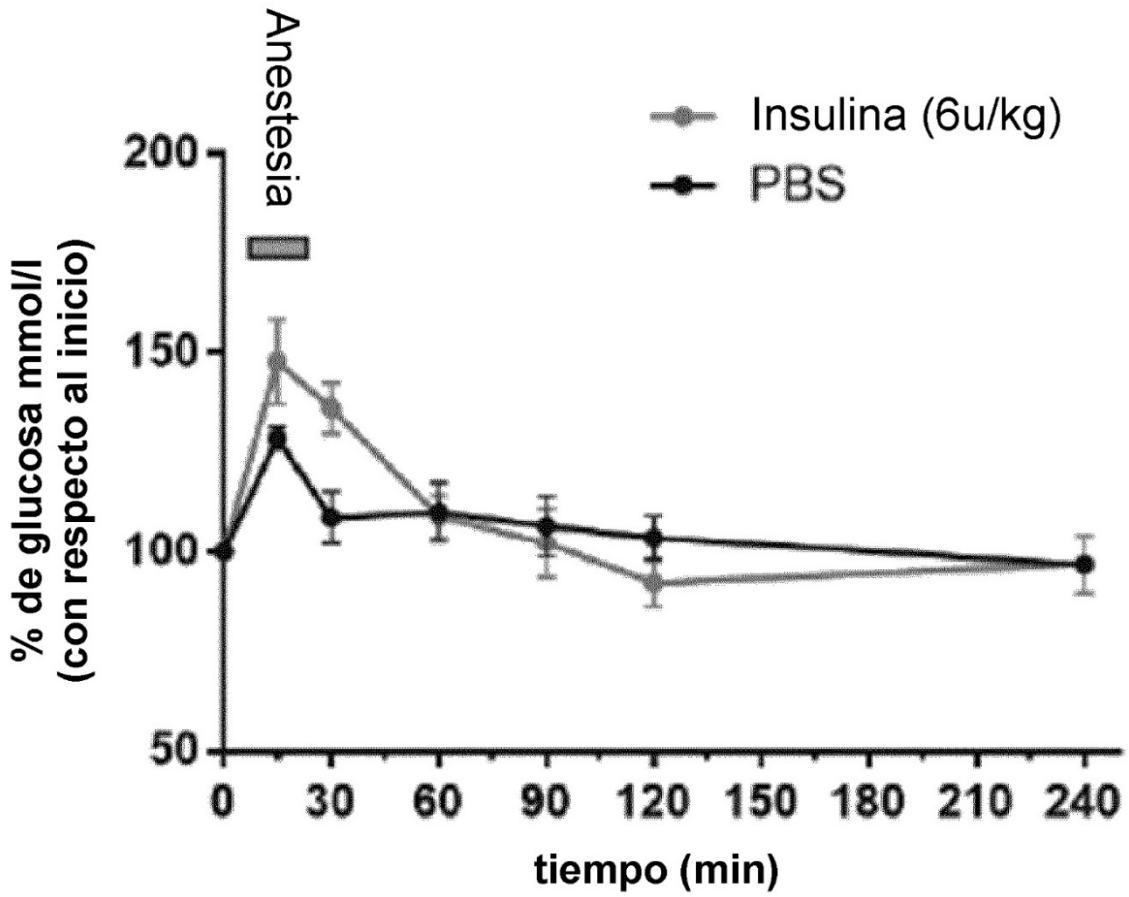

Anestesia
Insulina (6u/kg)
PBS
% de glucosa mmol/l
(con respecto al inicio)
200
150
100
50
0
30
60
90
120
150
180
210
240
tiempo (min)

Fig. 11

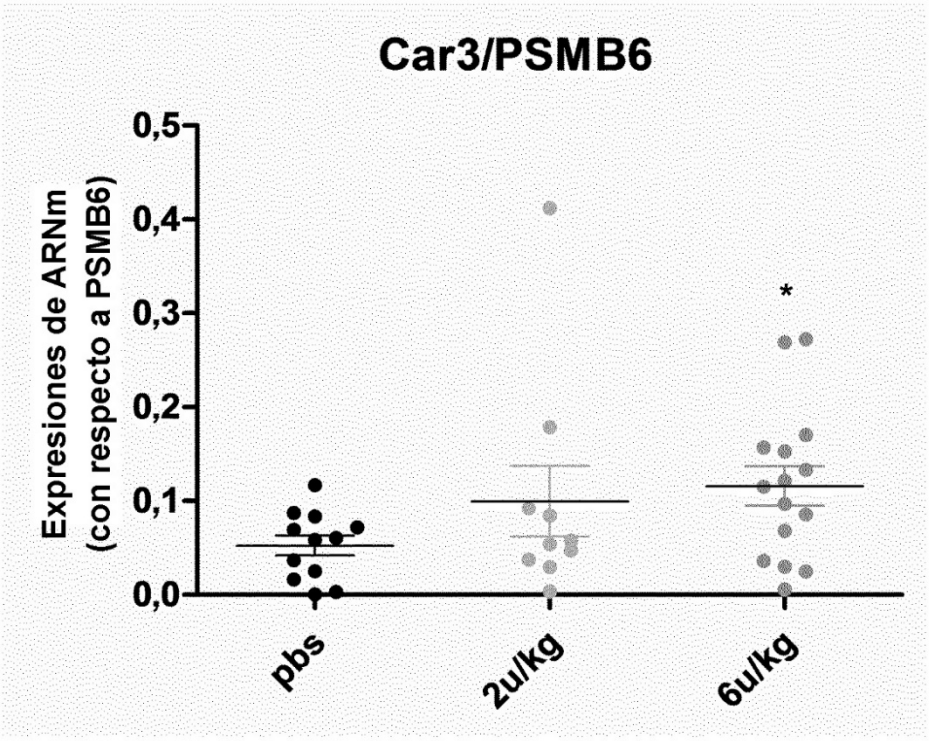

Car3/PSMB6
Expresiones de ARNm
(con respecto a PSMB6)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
*
pbs
2u/kg
6u/kg

Fig. 12

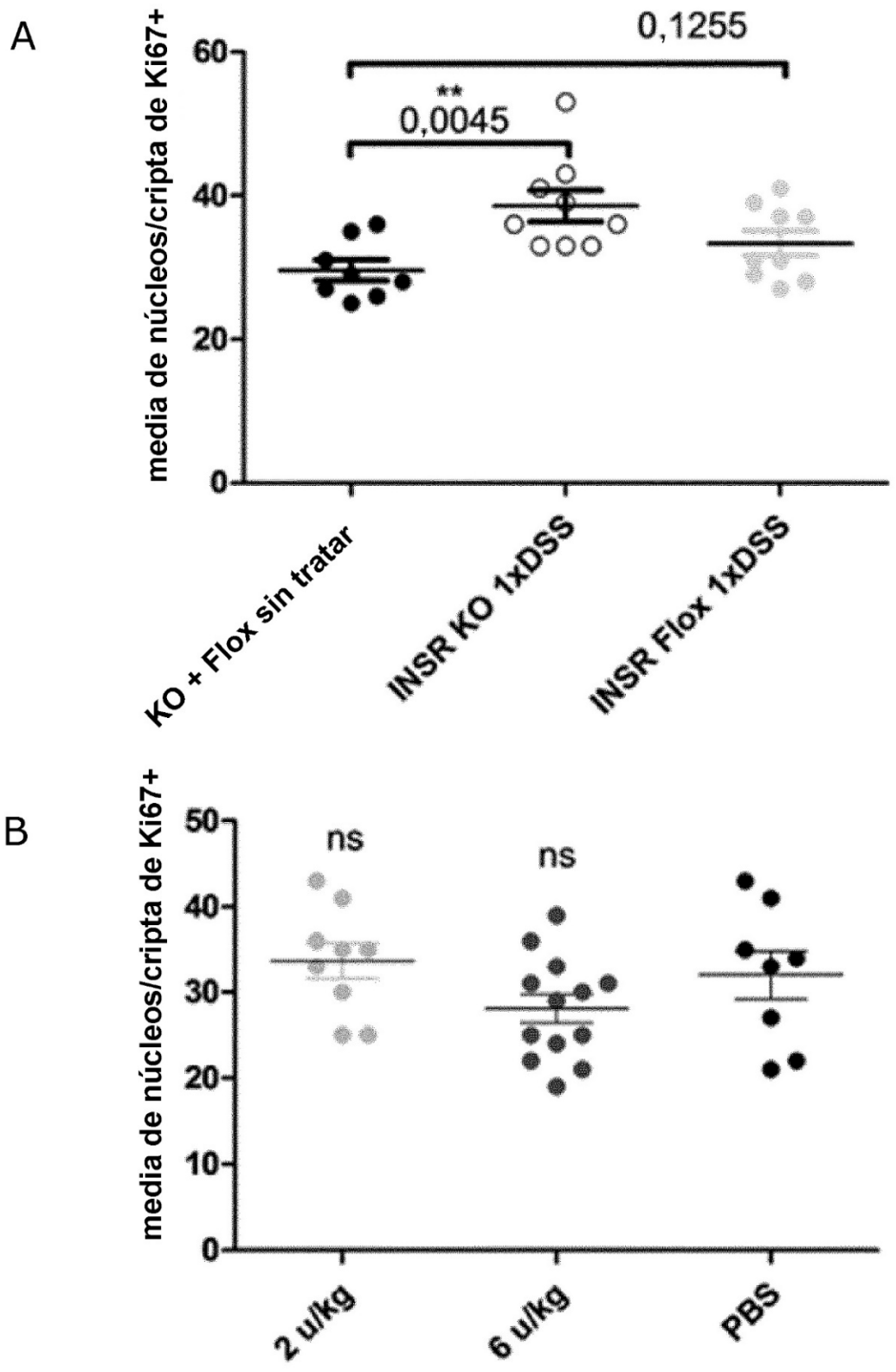

A
media de núcleos/cripta de Ki67+
60
40
20
0
0,1255
**
0,0045
KO + Flox sin tratar
INSR KO 1xDSS
INSR Flox 1xDSS
B
media de núcleos/cripta de Ki67+
50
40
30
20
10
0
ns
ns
2 u/kg
6 u/kg
PBS

Fig. 13