



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 345 378**

⑫ Número de solicitud: 200900756

⑬ Int. Cl.:
A61K 31/353 (2006.01)

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑮ Fecha de presentación: **20.03.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2010**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.09.2010

⑱ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑲ Inventor/es: **Messenguer, Ángel y**
Planas, Anna M.

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Uso de un compuesto para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de una lesión producida por una reperfusión post-isquémica.**

㉒ Resumen:

Uso de un compuesto para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de una lesión producida por una reperfusión post-isquémica.

La presente invención se refiere al uso del compuesto CR-6 (3,4-dihidro-6-hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetil-1(2H)-benzopirano) o de un compuesto derivado, para el tratamiento de una lesión producida en determinados individuos como consecuencia de la reperfusión tras un episodio de isquemia cerebral. Esta lesión se denomina lesión por reperfusión y se asocia a determinados signos precoces como es la hiperemia reactiva cuando ocurre la reperfusión post-isquémica. En la presente invención se demuestra que no todos los individuos que han sufrido isquemia van a responder favorablemente al tratamiento con este compuesto, sino solamente aquellos que presenten signos de lesión por reperfusión, donde dicho signo es hiperperusión o hiperemia reactiva. La hiperperusión se considera que tiene lugar cuando el flujo sanguíneo cerebral aumenta por encima de un 20% del valor basal, condición que no se da en todos los sujetos que han sufrido isquemia/reperfusión cerebral.

ES 2 345 378 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de una lesión producida por una reperusión post-isquémica.

La presente invención se refiere al uso del compuesto CR-6 (3,4-dihidro-6-hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetil-1(2H)-benzopirano) o de un compuesto derivado, para el tratamiento de una lesión producida en determinados individuos como consecuencia de la reperusión tras un episodio de isquemia cerebral. Esta lesión se denomina lesión por reperusión y se asocia a determinados signos precoces como es la hiperemia reactiva cuando ocurre la reperusión post-isquémica. En la presente invención se demuestra que no todos los individuos que han sufrido isquemia van a responder favorablemente al tratamiento con este compuesto, sino solamente aquellos que presenten signos de lesión por reperusión, donde dicho signo es hiperperusión o hiperemia reactiva. La hiperperusión se considera que tiene lugar cuando el flujo sanguíneo cerebral aumenta por encima de un 20% del valor basal, condición que no se da en todos los sujetos que han sufrido isquemia/reperusión cerebral.

Estado de la técnica anterior

La reperusión es actualmente la mejor estrategia para proteger el cerebro contra el daño isquémico, y la trombolisis con rtPA es el único tratamiento aprobado para el ictus isquémico (isquemia) en Europa y Norte América. Estudios preclínicos han demostrado que una oclusión de la arteria cerebral media (ACM) seguida de una reperusión causa menos daño que una oclusión permanente de la ACM en ratas (Menezawa *et al.*, 1992. *Stroke*, 23: 552-559; Rogers *et al.*, 1997. *Stroke*, 28: 2060-2065). No obstante, la reperusión conlleva algunos riesgos, como una transformación hemorrágica o edema, los cuales podrían ser atribuidos, al menos en parte, al daño o herida por reperusión (Pan *et al.*, 2007. *Neuroradiology*, 49: 93-102). El daño postisquémico asociado a la reperusión está bien documentado en el corazón (Kutala *et al.*, 2007. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 1193-1206) y en los órganos trasplantados (Jamieson y Friend, 2008. *Front. Biosci.*, 13: 221-235), pero la evidencia de que ocurre lesión por reperusión en el cerebro humano ha resultado más difícil de encontrar. Datos experimentales obtenidos en ciertos modelos de ratas sometidas a la oclusión intraluminal de la ACM (Aronowski *et al.*, 1997. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17: 1048-1056) evidencian el daño de la reperusión en el contexto preclínico. Estos estudios evidencian que las manifestaciones del daño por reperusión pueden depender de varios factores como la duración de la oclusión de la ACM o factores genéticos. Esto sugiere que la lesión por reperusión podría ser una variable en el ictus humano (isquémico o hemorrágico), así como factores genéticos también podrían estar involucrados, al igual que la duración y el grado de reducción del flujo pueden diferir en cada paciente. El daño por reperusión se atribuye a varios efectos de ésta, como el estrés oxidativo (Chan, 1996. *Stroke*, 27: 1124-1129), el daño de la barrera hematoencefálica (BBB) (del Zoppo y Mabuchi, 2003. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23: 879-894), y de la acumulación de leucocitos en los vasos sanguíneos (del Zoppo *et al.*, 1991. *Stroke*, 22: 1276-1283), la infiltración al parénquima cerebral (Zhang *et al.*, 1994. *J. Neurol. Sci.*, 125: 3-10) de plaquetas (Chong *et al.*, 2001. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22: 679-684), la activación del complemento (D' Ambrosio *et al.*, 2001. *Mol. Med.*, 7: 367-382) y la transformación hemorrágica (Pan *et al.*, 2007. *Neuroradiology*, 49: 93-102). La reperusión puede inducir un incremento en el flujo sanguíneo por encima de niveles basales, como se ha visto en animales (Tasdemirolu *et al.*, 1992. *Am. J. Physiol.*, 263:H533-6; Tsuchidate *et al.*, 1997. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17: 1066-1073). En humanos, la hiperperusión después de una trombolisis se encontró en el 40% de los pacientes (Kidwell *et al.*, 2001. *Neurology*, 57: 2015-2021).

El CR-6 es un derivado sintético de la vitamina E con capacidad de secuestrar especies reactivas de nitrógeno. Se ha demostrado previamente que CR-6 tiene efectos beneficiosos contra el daño causado por el estrés oxidativo *in vitro* (Montoliu *et al.*, 1999. *Biochem. Pharmacol.*, 58: 255-61; Sanvicens *et al.*, 2006. *J. Neurochem.*, 98: 735-747) e *in vivo* (Miranda *et al.*, 2007. *Free Radic. Biol. Med.*, 43: 1494-1498). Los ensayos clínicos con otros compuestos antioxidantes para el tratamiento de la isquemia/reperusión han fracasado, pese a las evidencias preclínicas de sus beneficios. Por tanto, sería necesario aumentar el número de recuperaciones de pacientes que sufran lesiones como consecuencia de haber padecido una isquemia.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso del compuesto CR-6 (3,4-dihidro-6-hidroxi-7-metoxi-2,2-dimetil-1(2H)-benzopirano) o de un compuesto derivado, para el tratamiento de una lesión producida como consecuencia de una hiperperusión ocurrida después de una isquemia. En la presente invención se demuestra que no todos los individuos que han sufrido isquemia van a responder favorablemente al tratamiento con CR-6 o de un compuesto derivado, sino solamente aquellos que presenten signos de lesión por reperusión, donde la reperusión es hiperperusión o hiperemia reactiva. La hiperperusión se considera que tiene lugar cuando el flujo sanguíneo cerebral aumenta por encima de un 20% de los valores basales, condición que no se da en todos los sujetos que han sufrido isquemia/reperusión cerebral.

CR-6 o compuestos derivados mejoran la eficacia del tratamiento de daños por isquemia con reperusión consiguiendo un efecto sorprendente en el tratamiento de las lesiones. El significado del término eficacia que se emplea en la presente invención se refiere al mayor número de recuperaciones de individuos, tratados con CR-6 o derivados, que sufren lesiones asociadas a hiperemia post-isquémica, respecto del colectivo de pacientes con isquemia con reperusión que no muestran signos que anticipan que se va a producir lesión por reperusión. Gracias a este aumento de la eficacia se pueden seleccionar antioxidantes derivados de CR-6, no contemplados en el estado de la técnica para este uso, para poder curar las lesiones citadas y asimismo, esta selección evitaría el posible abandono del tratamiento

de la isquemia con reperusión con estos compuestos por falta de eficacia en el colectivo de pacientes que padezcan isquemia con reperusiones de cualquier tipo, con hiperemia o sin ella.

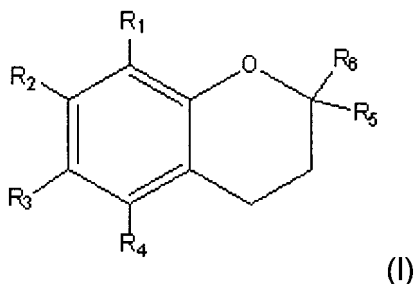
Es decir, la seleccin de pacientes con las caractersticas citadas, es un aspecto determinante en el tratamiento de la isquemia con reperusión mediante CR-6 o sus derivados cuando aparecen signos precoces que anticipan que se va a producir lesin por reperusión. Un signo precoz es la hiperperusión o hiperemia reactiva cuando ocurre la reperusión post-isquémica. La hiperperusión se considera que tiene lugar cuando el flujo sanguneo cerebral aumenta por encima de un 20% del valor basal.

Como se muestra en los ejemplos, se ha ensayado el compuesto CR-6 en ratas sometidas a un episodio de isquemia cerebral por oclusin de la arteria cerebral media de 90 minutos de duracin, seguido de reperusión. CR-6 se ha administrado de forma oral dos horas después del comienzo de la isquemia. De estos resultados se deriva que es factible trasladar este tratamiento a la prctica clnica. Además, se ha valorado el déficit neurológico de los animales, se ha cuantificado el volumen de infarto cerebral, el flujo sanguneo durante la isquemia y en la reperusión, y se ha correlacionado la hiperperusión con un mayor dao cerebral. Tambin se ha determinado el contenido tisular de glutatión, y se ha determinado la expresin en el cerebro de proteínas pro- inflamatorias como la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (Cox-2), que se ha localizado primordialmente en neuronas de la zona afectada por la isquemia.

Los resultados muestran que CR-6 atenúa el déficit neurológico, reduce el volumen de infarto cerebral, reduce el consumo de glutatión, así como ciertos procesos inflamatorios, y previene la rotura de la barrera hematoencefálica, particularmente en los sujetos que desarrollan hiperemia reactiva.

En determinados sujetos, la reperusión puede inducir un dao adicional denominado "lesin por reperusión" caracterizada por mayor estrés oxidativo, mayor consumo de antioxidantes endógenos (glutatión), mayor rotura de barrera hematoencefálica, mayor activacin de ciertas vías de sealizacin relacionadas con estrés oxidativo y con inflamacin, y como consecuencia de todo ello se produce mayor dao cerebral y mayor déficit neurológico. Uno de los marcadores de este tipo de lesin es la hiperemia reactiva que se asocia a esta lesin por reperusión. Por tanto, el tratamiento con CR-6 en la isquemia/reperusión sería adecuado si se detecta hiperemia reactiva u otro signo precoz de lesin por reperusión. La hiperemia reactiva se detecta con técnicas que permiten valorar la perfusión cerebral, por ejemplo, pero sin limitarse, con láser Doppler o técnicas no invasivas de neuroimagen como por ejemplo pero sin limitarse, la tomografía computerizada o resonancia magnética. Estas técnicas se aplican de manera rutinaria en la prctica clnica.

En este sentido, un aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula general (I), para la elaboracin de un medicamento destinado al tratamiento de una lesin producida por una reperusión post-isquémica, donde el flujo sanguneo de la reperusión es igual o mayor de un 20% del valor basal,



El compuesto tiene la fórmula general (I), donde R_1 y R_4 son iguales o diferentes y se seleccionan de entre H ó un alquilo que tiene de entre 1 y 4 átomos de carbono (C_1-C_4);

R_2 y R_3 son iguales o diferentes y se seleccionan de entre H, OH, un alquilo que tiene de entre 1 y 4 átomos de carbono (C_1-C_4) o un alcoxilo (OR_a);

R_5 se selecciona de entre H ó un grupo alquilo que tiene de entre 1 y 4 átomos de carbono (C_1-C_4) y

R_6 es un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de entre 1 y 10 átomos de carbono (C_1-C_{10}).

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono.

El término "alcoxilo" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-OR_a$ en la que R_a es un alquilo (C_1-C_4), por ejemplo, pero sin limitarse a metoxilo, etoxilo ó propoxilo.

Una realización preferida de la presente invención es el uso del compuesto de fórmula general (I), o de cualquiera de sus sales, donde R_1 es H, R_2 es un alcoxilo ($O-(C_1)$), R_3 es un hidroxilo, R_4 es H, R_5 es un grupo alquilo (C_1-C_4) y R_6 es un grupo alquilo (C_1-C_4). Una realización aún más preferida es el uso del compuesto de fórmula general (I), donde R_5 es un grupo metilo y R_6 es también un grupo metilo.

En adelante, se hará referencia a cualquiera de los compuestos anteriores como “compuestos de la invención” o “compuestos de la presente invención”.

El medicamento comprende, al menos, cualquiera de los compuestos de la invención. Cualquiera de los compuestos de la presente invención, derivados farmacéuticamente aceptables o sus profármacos, se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El medicamento se emplea para el tratamiento de una lesión por reperfusión (post-isquémica) que se manifiesta con signos como la hiperemia reactiva (hiperperfusión post-isquémica), donde el flujo sanguíneo de la reperfusión es igual o mayor de un 20% del valor basal.

Por un “derivado farmacéuticamente aceptable” se entiende cualquier sal, farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que después de su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) cualquiera de los compuestos de la invención.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención supone combatir los efectos causados como consecuencia de una reperfusión post- isquémica para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores. El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sea la reperfusión post-isquémica.

La perfusión es la acción de introducir lenta y continuamente un líquido, como la sangre o una sustancia medicamentosa, por vía intravenosa o en el interior de órganos, cavidades o conductos. El término “reperfusión” hace referencia a la restauración del flujo sanguíneo después de la ocurrencia de una isquemia. La restauración del flujo sanguíneo se produce de forma espontánea, aunque en este caso la restauración es muy lenta, o se produce de forma inducida por medio de la administración de compuestos que se encargan de deshacer el trombo cuando ésta es la causa de la isquemia. En este último caso, se suele administrar un tratamiento trombolítico con activador de plasminógeno tisular recombinante rt-PA y a partir del momento en el que se administra el compuesto trombolítico se comienza la restauración del flujo sanguíneo a la zona afectada.

En la presente invención, la reperfusión post-isquémica donde el flujo sanguíneo de la reperfusión es igual o mayor de un 20% del valor basal se denomina hiperperfusión. El término “hiperperfusión” tal como se entiende en la presente invención es el fluir de la sangre por el interior de órganos, cavidades o conductos con un flujo sanguíneo superior al flujo que se da en un individuo en condiciones normales (valores basales). En la presente invención, el término hiperemia puede emplearse como un sinónimo de hiperperfusión.

El término “post-isquémica” indica que la hiperperfusión se da después de una isquemia. La isquemia es una reducción del flujo sanguíneo hasta niveles que son insuficientes para mantener el metabolismo necesario para la función y estructura normales de un tejido o de un órgano. La reducción del flujo sanguíneo causa la disminución del aporte de oxígeno a las células de un tejido biológico y como consecuencia se puede llegar a la muerte celular. La causa de una isquemia puede ser, pero sin limitarse, una embolia causada por un émbolo que provoca la oclusión o bloqueo de un vaso sanguíneo de menor diámetro al del émbolo.

El término “hiperperfusión post-isquémica” se utiliza como sinónimo de “hiperemia reactiva”. A lo largo de la memoria, estos dos términos se pueden utilizar indistintamente.

En la presente invención, el medicamento se destina al tratamiento de una lesión producida por una reperfusión post-isquémica, donde dicha reperfusión presenta un flujo sanguíneo igual o mayor de un 20% del valor basal. El término “valor basal” tal como se entiende en la presente invención se refiere al valor del flujo sanguíneo de un individuo antes de que se produzca la isquemia o bien al valor del flujo sanguíneo de la región homóloga del hemisferio cerebral contralateral. El valor del flujo sanguíneo de la vasculatura del hemisferio en el que no se produce la isquemia puede servir para establecer el valor basal con el que comparar el valor del flujo sanguíneo cuando se produce la reperfusión. Tal como se ha comentado anteriormente, en los casos en que la causa de la isquemia es un trombo se suele administrar un tratamiento trombolítico con activador de plasminógeno tisular recombinante rt-PA y a partir del momento en el que se administra el compuesto trombolítico se comienza la restauración del flujo sanguíneo a la zona afectada. En ese momento se puede llevar a cabo la medida del flujo sanguíneo para compararla con el flujo basal.

La hiperperfusión reactiva se puede detectar con técnicas que permiten valorar el flujo sanguíneo cerebral de la reperfusión cerebral como por ejemplo, pero sin limitarse, láser Doppler o técnicas no invasivas de neuroimagen como la tomografía computerizada o resonancia magnética.

La hiperperfusión puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo de un animal después de sufrir una isquemia que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, isquemia cerebral, isquemia miocárdica o isquemia renal. Preferiblemente el animal es un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano.

5 Los ejemplos que se presentan en la presente invención se llevan a cabo *in vivo* en ratas. El efecto conseguido mediante la administración del compuesto de la presente invención al mamífero rata, puede extrapolarse al resto de mamíferos ya que los mecanismos de acción de cualquiera de los compuestos de la invención, se conservan en todos los mamíferos. Por otra parte se ha demostrado que la hiperperfusión en pacientes después de sufrir una isquemia, no sólo ocurre en ratas sino que también puede ocurrir en pacientes, o bien de forma espontánea, o después de administración de un tratamiento trombolítico con activador de plasminógeno tisular recombinante rt-PA (Kidwell *et al.*, 2001. *Neurology*, 57:2015-2021).

Otra realización preferida se refiere al uso del compuesto donde la hiperperfusión post-isquémica es cerebral. A título informativo, las causas más frecuentes de isquemia cerebral son: infarto lacunar (en pacientes con hipertensión vascular), infartos dependientes de las carótidas (por mecanismos hemodinámicos) o embolias cerebrales de origen cardíaco.

Según otra realización preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral. Una realización más preferida se refiere a un compuesto donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jara-be, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. El compuesto de fórmula general (I) puede ir asociado, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana fosfolipídica. El liposoma contiene un núcleo de solución acuosa. La micela es un lípido esférico que contiene material no acuoso. Tanto los liposomas como las micelas pueden utilizarse como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula.

Otra posibilidad es que el medicamento se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Otra realización preferida se refiere al uso del compuesto, donde el medicamento incluye al menos un excipiente farmacológicamente aceptable.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los compuestos de la presente invención (sustancia activa), estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacológicamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Otra realización preferida se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de la invención, donde el medicamento incluye al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

Según otra realización preferida, el vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia grasa y el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral. Una realización más preferida se refiere al uso de un compuesto para la elaboración de un medicamento donde la sustancia grasa del vehículo farmacológicamente aceptable es aceite de oliva.

Cualquiera de los compuestos de la presente invención es liposoluble, es decir, es capaz de disolverse en una solución que tenga una sustancia grasa. El término "sustancia grasa" tal como se entiende en la presente invención es una sustancia formada mayoritariamente por ácidos grasos. La sustancia grasa se selecciona, por ejemplo, pero sin limitarse, de grasa de origen animal, grasa de origen vegetal o grasa de origen artificial.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso del compuesto descrito anteriormente donde el medicamento comprende además otra sustancia activa. Esta sustancia activa debe permitir la actividad de cualquiera de los compuestos de la invención, es decir, debe ser compatible.

Otra realización preferida se refiere al uso del compuesto descrito anteriormente donde el medicamento se administra en dos tomas de 100 mg de compuesto por kilogramo (Kg) de peso corporal, por vía oral. Según una realización más preferida, la primera toma se administra a partir de entre el momento en el que se produce la reperusión y 60 minutos después del inicio de la reperusión. Una realización aún más preferida se refiere al uso donde el medicamento se administra a partir de entre 15 y 45 minutos después del inicio de la reperusión.

Según otra realización preferida las dos tomas se administran con una diferencia de tiempo de entre 4 y 8 horas. Es decir, si la primera toma se realiza a los 30 minutos desde el inicio de la reperusión, la segunda toma se realizará entre las 4 horas y 30 minutos desde el inicio de la reperusión y las 8 horas y 30 minutos desde el inicio de la reperusión.

La administración del medicamento se lleva a cabo en un animal. Preferiblemente el animal es un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano. El término "toma" tal como se entiende en la presente invención es cada una de las veces que se administra el medicamento por vía oral. La dosis de cada una de las tomas es de 100 mg de cualquiera de los compuestos de la presente invención por kilogramo (Kg) de peso corporal. El medicamento se administra en dos tomas que se realizan después del inicio de la reperusión post-isquémica, a partir de entre 15 y 45 minutos después del inicio. Las dos tomas se administran separadas por un intervalo de tiempo de entre 4 y 8 horas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45 Descripción de las figuras

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

50 Fig. 1. *Muestra el volumen de infarto después de la isquemia transitoria y permanente. ** $p < 0.01$*

A: En el eje de ordenadas, se representa el volumen de infarto (I) en mm^3 en función del tipo de isquemia.

55 B: En el eje de ordenadas se representa la puntuación obtenida en el test neurológico en función del tipo de isquemia. En la isquemia permanente se analizan 5 individuos. En la isquemia transitoria se analizan 18 individuos.

60 Fig. 2. *Muestra el efecto de la administración del agente antioxidante CR-6 (dos dosis a las 2 y 8 h después de la oclusión de la ACM).*

Volumen infartado ($p \leq 0.05$) (A): (I). Valoración neurológica ($p \leq 0.05$) (2B) (N). Medidas del volumen infartado en córtex (C): (IC). Medidas del volumen infartado en subcórtex (D): (IS). Volumen infartado después de la isquemia permanente (E): (I). Valoración neurológica (F): (N). En A, B, C y D se analizan 16 individuos a los que se les ha administrado sólo el vehículo y 14 individuos a los que se les ha administrado CR-6 junto con el vehículo. En E y F se analizan 5 individuos control y 4 individuos a los que se les ha administrado CR-6 junto con el vehículo.

Fig. 3. Muestra el efecto de una dosis única de CR-6 sobre el volumen de infarto y sobre el déficit neurológico.

A. Efecto de una dosis única de CR-6 sobre el volumen de infarto. En el eje de ordenadas se representa el volumen infartado (I) en mm³. En el eje de abscisas se representan los valores medios del volumen infartado de 18 individuos a los que se les ha administrado el vehículo, 16 individuos a los que se les ha administrado CR-6 y 8 individuos a los que se les administró CR-6 únicamente 30 minutos después de la reperusión.

B: En el eje de ordenadas se representa la puntuación obtenida en el test neurológico con una dosis única del vehículo (6 individuos) o de CR-6 con el vehículo (8 individuos).

Fig. 4. Muestra la influencia de la administración de CR-6 en los niveles de GSH.

A: En el eje de ordenadas se representa la concentración de GSH cortical (nmol/mg de proteína) en el córtex. CR-6 previene la caída de GSH en el córtex después de que los individuos sufran una isquemia.

B: En el eje de ordenadas se representa la concentración de GSH (nmol/mg de proteína) en el núcleo estriado. Hay dos regiones cerebrales afectadas por la isquemia: la corteza (o córtex) y el estriado. CR-6 previene la caída de GSH en el córtex después de que los individuos sufran una isquemia.

C: En el eje de ordenadas se representa el volumen de infarto (I) en mm³ frente a la concentración de GSH tanto para individuos a los que se administra el vehículo como a los que se administra CR-6 más el vehículo.

Fig. 5. Muestra la expresión neuronal de Cox-2 después de la isquemia y el efecto de CR-6. Magnificación x200.

Fig. 6. Muestra el resultado de la isquemia en función de si hubo (SI) o no (NO) hiperemia.

A: En el eje de ordenadas se representa el infarto de volumen (Log mm³) frente al flujo sanguíneo en la reperusión (Log del porcentaje de incremento respecto del flujo sanguíneo basal) en el eje de abscisas.

B: En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de flujo en la reperusión de 5 individuos sin hiperemia (NO) y de 13 individuos con hiperemia (SI), todos ellos administrados con el vehículo.

C: En el eje de ordenadas se representa el volumen de infarto en los grupos que se han comentado para la figura B.

D: En el eje de ordenadas se representa la puntuación de la valoración neurológica en los grupos que se han comentado anteriormente.

E: En el eje de ordenadas se representa el volumen de infarto cortical en los grupos que se han comentado anteriormente.

F: En el eje de ordenadas se representa el volumen de infarto subcortical en los grupos que se han comentado anteriormente.

Fig. 7. Muestra el efecto de CR-6 y vehículo (aceite de oliva) en animales hiperémicos (SI) y no hiperémicos (NO).

Los términos SI y NO siempre hacen referencia a si hubo o no hiperemia. Por ejemplo, vehículo-SI = administrado con vehículo, con hiperemia; vehículo-NO = administrado con vehículo, sin hiperemia.

En los ejes de abscisas se representan los valores medios de determinados parámetros en los siguientes grupos de individuos: 5 individuos a los que se les administra el vehículo y que no desarrollan hiperemia, 13 individuos a los que se les administra el vehículo y que sí desarrollan hiperemia, 7 individuos a los que se les administra CR-6 y que no desarrollan hiperemia, y 7 individuos a los que se les administra CR-6 y que sí desarrollan hiperemia. Los parámetros que se representan en cada uno de los ejes de ordenadas son: porcentaje de flujo sanguíneo respecto del flujo basal en la reperusión (A), porcentaje de flujo sanguíneo respecto del flujo basal durante la oclusión de la arteria cerebral media, MCA (B), volumen de infarto (C), valoración neurológica (D), medidas del volumen infartado en córtex (E) y medidas del volumen infartado en subcórtex (F).

Fig. 8. Muestra cómo la hiperemia (SI) se asocia a rotura de BHE y cómo CR-6 atenúa dicho efecto.

En el eje de ordenadas se representa la concentración de Evans Blue (Azul de Evans) en el grupo de individuos a los que no se administra ni vehículo ni CR-6 y a los que sí que se les administra vehículo o CR-6 (junto con su vehículo).

Fig. 9. Muestra el número de neutrófilos por área de tejido isquémico en función de si los animales desarrollaron hiperemia y del tratamiento recibido.

En el eje de ordenadas se representa el valor medio del nº de células MPO+ por área. En las imágenes de microscopía en las que se ha realizado una tinción para ver los neutrófilos marcados por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-mieloperoxidasa (MPO) se ha contado el número de células positivas por área.

Fig. 10. Muestra la formación de ión superóxido en la arteria cerebral media (MCA) en el grupo de ratas tratadas sólo con el vehículo pero no en el grupo de ratas tratadas con CR-6, según tinción con dihidroetidio (DHE).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el uso de prolactina para la hepatoprotección y regeneración de células hepáticas.

Ejemplo 1

Métodos

1.1. Animales

Fueron usadas ratas macho adultas *Sprague-Dawley* (Harlan, Spain) de entre 300 y 350 gramos de peso. El trabajo con los animales se llevó a cabo de acuerdo con la legislación local y con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Barcelona y de acuerdo con la legislación Europea vigente. Los animales se mantuvieron respetando el ciclo de vigilia/sueño de 12 h, y controlando las condiciones ambientales de temperatura y humedad, y se les dio agua y comida *ad libitum*. La anestesia utilizada en las intervenciones quirúrgicas fue isoflurano.

1.2. Inducción de la isquemia focal

La isquemia cerebral focal fue inducida por oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (ACM) derecha (Justicia *et al.*, 2006 *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 26: 321-32). Un grupo de ratas fueron sometidas a 90 minutos de isquemia seguida de perfusión, mientras que otro grupo fue sometido a una isquemia permanente. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano e intubadas por la tráquea bajo ventilación controlada. Durante todo el procedimiento quirúrgico se obtuvieron varias muestras sanguíneas para la determinación de gases en sangre. La presión arterial fue monitorizada durante todo el procedimiento y la temperatura corporal mantenida entre 36,5 y 37,5°C. La arteria carótida común y externa fueron expuestas y la arteria pterigopalatina fue ligada. Un filamento de nylon (4/0, looksutures, Havard-Apparatus) de 21 mm se introdujo a través de la arteria carótida externa hasta el nivel donde se ramifica la ACM. Este filamento fue cuidadosamente retirado en el grupo sometido a la perfusión tras 90 minutos de la oclusión, y la ligadura de la ACM fue desecha permitiendo la perfusión. En el grupo sometido a una isquemia permanente el filamento intraluminal se mantuvo en su sitio sin ser retirado. Las ratas se recuperaron de la anestesia, y a las 8, 24 ó 48 horas después de la oclusión de la ACM fueron profundamente anestesiadas con isoflurano y sacrificadas por perfusión coronaria con bomba de infusión de 60 mL de salino heparinizado (30 U/mL) a un volumen de infusión de 10 mL/min seguido por 120 mL de salino para retirar la sangre de los tejidos cerebrales.

1.3. Medida de la perfusión cortical

La perfusión cortical fue medida con un sistema de láser-Doppler (Perimed, Sweden) en las ratas sometidas a la oclusión de ACM. El día anterior a la inducción de la isquemia, las ratas se anestesiaron para la implantación de una guía en la superficie del cráneo después de reducir 1mm el grosor del hueso con una pequeña broca. La guía se fijó al cráneo con cemento dental y 2 pequeños tornillos siguiendo las coordenadas: 2 mm posterior y 3,5 mm lateral con relación a bregma, sobre el hemisferio ipsilateral (derecho). Al día siguiente se introdujo una sonda láser-Doppler a través de la guía y se empezó el registro. Después de un registro estable, la isquemia fue inducida. La perfusión fue continuamente monitorizada antes de la isquemia, durante los 90 minutos de ésta y los primeros 15 minutos de perfusión. Algunos datos de la perfusión se usaron para la exclusión de algunos animales del estudio como por ejemplo:

- 1) Las ratas que después de la introducción del filamento para la oclusión de MCA no recuperaron la perfusión hasta el 40% o más del nivel basal; éstos animales fueron excluidos del estudio ya que se consideró que la isquemia no había sido exitosa posiblemente debido a factores individuales de la anatomía cerebrovascular. El porcentaje de disminución del flujo sanguíneo necesario para causar infarto según nuestras condiciones experimentales fue del 40%, verificando que con una caída inferior las ratas no desarrollaron un infarto.
- 2) Las ratas que no mostraron una recuperación a la perfusión por encima del 80% del nivel basal fueron excluidas del estudio ya que sólo mostraron una restauración parcial del flujo sanguíneo. Estos criterios de

exclusión son independientes del tratamiento que se inició a los 30 minutos de la reperusión, una vez que se obtuvieron datos del flujo sanguíneo.

1.4. Tratamiento

CR-6 fue sintetizado químicamente como previamente se refirió (Casas *et al.*, 1992. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 585-90). CR-6 fue disuelto en aceite de oliva comestible y comercializado (Carbonell, España) y se administró oralmente a las ratas a una dosis de 1 mL (100 mg/Kg) usando un medidor de comida. El mismo aceite fue usado como vehículo. Cada animal fue tratado dos veces a las 2 h y 8 h del comienzo de la isquemia, ó sólo a las 2 h. Las ratas recibieron un código que no revelaba el tipo de tratamiento asignado a cada animal.

1.5. Evaluación del volumen de infarto

Para la determinación del volumen de infarto, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y sacrificadas por decapitación a las 24 h. El cerebro se retiró y se cortó en secciones coronales de 2 mm de grosor, que fueron teñidos con una solución al 1% de cloruro de 2,3,5-triphenyltetrazolio (TTC) durante 10 minutos a 37°C. Los cortes se sumergieron toda la noche en una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato y después se lavaron y se guardaron en tampón fosfato 0,1 M a un pH de 7.4. Las mitocondrias de los tejidos isquémicos no reaccionaron a la tinción con TTC, mientras que se adquirieron color rojo en los tejidos sanos. En las imágenes de las secciones, se midieron las zonas blancas o claras de cada sección, rectificando la zona del edema producido en la zona cerebral infartada por el ratio entre las áreas contralateral e ipsilateral. Las áreas fueron integradas para calcular el volumen infartado.

1.6. Valoración neurológica

Un simple test neurológico en una escala de 0 a 9 puntos (0 = no déficit y 9 = la deficiencia más alta) se realizó como se indicaba previamente (Justicia *et al.*, 2006. *J Cereb. Blood Flow Metab.*, 26: 321-32) antes de la muerte de los animales. Se siguieron 4 test para la evaluación:

- 1) Actividad espontánea (movimiento/exploración = 0; movimiento sin exploración = 1; no movimiento ó sólo cuando se le tira de la cola = 2).
- 2) Rotación hacia la izquierda (si no hace nada = 0; si hay elevación de la cola o la rata se estira o se arrastra (*push & pull*) = 1; espontáneamente = 2; rotación sin desplazamiento (*spinning top*) = 3).
- 3) Resistencia a la extensión de la pata izquierda (si no se puede realizar la extensión = 0; si se puede realizar extensión = 1; si no hay resistencia a la extensión = 3).
- 4) Reflejo a la caída (simétrico = 0; asimétrico = 1; pata delantera contralateral retraída = 3)

1.7. Análisis de permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Para el análisis de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB, siglas del término en inglés), se inyectaron 4 mL/Kg (por Kg de peso corporal) de solución de *Evans Blue* al 2% en solución salina a través de la vena femoral 4 h después la inducción de la reperusión. 2 h más tarde, las ratas fueron anestesiadas y se realizó perfusión transcardíaca para eliminar la sangre del tejido. El cerebro se cortó en secciones coronales y en cortes de 2 mm de grosor y dos de las secciones (coordenadas de Bregma) fueron usadas para la extracción de *Evans Blue*, mientras una tercera sección fue guardada para la extracción de RNA. El córtex ipsilateral y contralateral y el estriado se diseccionaron, se pesaron y se sumergieron en una solución al 50% de ácido tricloroacético (TCA) (1.3 mL por gramo de tejido). El tejido se homogenizó por medio de un *polytron* y se centrifugó a 12000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con etanol (1:3). La intensidad de fluorescencia fue medida en un fluorímetro a 680 nm usando una alícuota de 110 µL de muestra.

La concentración de *Evans Blue* (ng/mL) se calculó usando una curva estándar con las concentraciones conocidas de este colorante.

1.8. Determinación de la concentración de GSH

24 horas después de provocar la isquemia, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas a través del corazón usando una bomba de infusión a una frecuencia de 10 mL/min con 60 mL de solución salina heparinizada a la concentración de (30 U/mL) seguido de 120 mL de solución salina para extraer toda la sangre del cuerpo. El tejido cerebral se extrajo y se diseccionó separando el córtex y el estriado ipsilateral y contralateral y fue rápidamente congelado y almacenado a -80°C hasta su análisis. La concentración de GSH fue estimada según la siguiente fórmula: $GSH = GSH - (2 \times GSSG)$.

1.9. Inmunohistoquímica

La expresión de la proteína ciclooxygenasa-2 (Cox-2) se estudió por inmunohistoquímica como previamente se describe (Planas *et al.*, 2002. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22: 918-925) a las 24 h post-isquemia. Se sumergieron 2 mm de una sección coronal de cerebro en 4% de paraformaldehído en tampón fosfato a pH 7.4 durante toda la noche y después se

lavaron en el mismo tampón. La inmunohistoquímica de Cox-2 se realizó en secciones flotantes obtenidas en el vibratomo. Se obtuvieron secciones de 50 μm de grosor y se sometieron a inmunotinción usando anticuerpos monoclonales contra Cox-2 (Cayman) diluido 1:200. La inmunohistoquímica contra la mieloperoxidasa (MPO) (Pharmingen) se realizó en secciones de parafina que se obtuvieron después de incluir 2 mm de cerebro en parafina y de obtener cortes de 5 μm de grosor en el microtomo. Se usaron anticuerpos monoclonales de ratón contra MPO a una dilución de 1:500. Después del anticuerpo primario, las secciones fueron incubadas con anticuerpos secundarios biotinilados seguidos por el procedimiento de ABC (Serotec). La reacción de revelado se llevó a cabo con diaminobencidina como se describe en (Planas *et al.*, 2002. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22: 918-925). El número de células por área se contó en tres áreas de cada sección.

1.10. Determinación de la formación de anión superóxido en la arteria cerebral media aislada

La ACM ipsilateral al hemisferio isquémico se aisló de algunos animales después de 24 h post-isquemia. Los segmentos de la arteria se colocaron en solución KHS (de las siglas en inglés de *Krebs-Henseleit solution*) conteniendo sacarosa al 30% durante la noche y se transfirieron a un criomolde (Bayer Química Farmacéutica, Barcelona, Spain) relleno de medio de inclusión (*Tissue Tek OCT embedding medium*, Sakura Finetek Europe, The Netherlands) durante 20 minutos, y después se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C . El colorante fluorescente dihidroetidio (DHE) se utilizó para evaluar la producción de $\text{O}_2^{\cdot -}$ *in situ*, tal como se ha descrito previamente (Jimenez-Altayó *et al.*, 2006. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 316: 42-52; Martinez-Revelles *et al.*, 2008. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 325: 363-369).

1.11. Análisis estadístico

La comparación entre los dos grupos se hizo con la realización del t-test ó del test no paramétrico de Mann-Whitney, dependiendo de si los valores pasaron o no pasaron el test de normalidad (*D'Agostino & Pearson omnibus normally test*). Las comparaciones entre más de dos grupos se hicieron con *one-way* ANOVA seguida del análisis *post-hoc* de Bonferroni's para valores que se ajustaban a la normalidad, o con el test de Kruskal-Wallis seguido del *Dunn's Multiple Comparison Test*. Se consideraron significativos aquellos valores $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó con *GraphPad Prism software*.

Ejemplo 2

Resultados

2.1. Volumen de infarto después de la isquemia transitoria y permanente

La oclusión de la ACM en rata *Sprague-Dawley* puede inducir varios grados de lesión tisular y consecuencias funcionales. El volumen infartado (media $\pm$ desviación estándar) fue menor ($p \leq 0.01$) después de una isquemia transitoria ($140.2 \pm 64.4 \text{ mm}^3$) que en la isquemia permanente ($265.6 \pm 69.2 \text{ mm}^3$) (Fig. 1B). Sin embargo, el déficit neurológico sólo mostró una insignificante tendencia a incrementar después de isquemia permanente comparado con la transitoria ($p=0.1$) (Fig. 1C). Esta observación sugiere que, en relación a la extensión del tejido lesionado, el déficit funcional fue comparativamente peor después de la isquemia transitoria que de la permanente.

2.2. CR-6 reduce el volumen de infarto y mejora el déficit neurológico después de la isquemia transitoria pero no en la permanente

La administración del agente antioxidante CR-6 (dos dosis a las 2 y 8 h después de la oclusión de la ACM redujo el volumen infartado ($p \leq 0.05$) (Fig. 2A) y mejoró la valoración neurológica ($p \leq 0.05$) (Fig. 2B) después de la isquemia transitoria. El CR-6 protegió al córtex y al estriado (Fig. 2C, D). No obstante, este tratamiento con CR-6 no tuvo efecto protector después de la isquemia permanente (Fig. 2E, F). En el grupo del CR-6, el volumen infartado fue significativamente más extenso ($p \leq 0.001$) después de la isquemia permanente ($300.1 \pm 38.4 \text{ mm}^3$) que de la isquemia transitoria, pero, de nuevo, la valoración neurológica sólo demostró una insignificante tendencia a aumentar después de la isquemia permanente vs a la transitoria ($p=0.06$).

Una administración única de CR-6 a las 2 h de la reperusión no fue suficiente para inducir la protección, puesto que no redujo el volumen infartado (Fig. 3A) ni tampoco mejoró el déficit neurológico (Fig. 3B). Esto sugiere que una acción prolongada del antioxidante puede ser necesaria para neutralizar los efectos de la reperusión.

2.3. El consumo de glutatión endógeno fue atenuado en los animales tratados con CR-6

La concentración del glutatión total (GSx) y del oxidado (GSSG) se determinó en el córtex ipsilateral y contralateral y en el estriado a las 24 h post-isquemia en las ratas tratadas con vehículo ó CR-6 y la reducción del contenido en glutatión reducido (GSH) se calculó con las medidas previas (ver Métodos). A las 24 h después de la isquemia transitoria, la concentración de GSH, estaba significativamente reducida en el córtex ipsilateral ($p \leq 0.05$) (Fig. 4A) y en el estriado ($p \leq 0.001$) (Fig. 4B) de las ratas isquémicas que recibieron vehículo. Este efecto fue atenuado por CR-6, ya que el contenido en GSH en este grupo no fue significativamente diferente de los controles no isquémicos. (Fig. 4A, B). Se encontró una relación negativa entre el contenido en GSH y el volumen infartado (Fig. 4C), lo que sugirió que el grado de consumo de GSH era un indicativo de la magnitud de la lesión tisular después de la isquemia/perfusión.

2.4. CR-6 atenuó la expresión marcadores de inflamación y de daño cerebral

La isquemia induce la expresión de la proteína Cox-2 a las 24 h (Fig. 5) y este efecto fue altamente atenuado por CR-6 (Fig. 5). Cox-2 fue principalmente detectado en neuronas (Fig. 5) sugiriendo que el estrés oxidativo está involucrado en la inducción de Cox-2 neuronal y que el efecto de CR-6, también directa ó indirectamente alcanza las neuronas.

2.5. Relación de la hiperemia reactiva después de una isquemia transitoria y volumen infartado

El estudio de la perfusión cortical antes (basal), durante y después de la isquemia, demostró que algunas ratas muestran valores de flujo sanguíneo en la reperusión muy similar a los valores basales, mientras que otras ratas muestran valores muy por encima de los basales. En el grupo vehículo (n=18), se encontró una relación entre el grado de incremento del flujo sanguíneo a la reperusión y el volumen infartado, ya que el logaritmo de estos valores está positivamente correlacionado ($p \leq 0.002$) (Fig. 6A). Esto indica que el aumento del flujo sanguíneo en la reperusión por encima de los niveles basales (i.e hiperemia reactiva) se asocia a una mayor extensión del volumen infartado. Sin embargo, no se encontró relación entre el desarrollo de la hiperemia reactiva y la bajada del flujo sanguíneo durante la isquemia, indicando que la magnitud de la hiperemia no depende del grado de caída de flujo durante la isquemia. La hiperperusión se definió como un aumento de flujo superior al 20% del basal, por encima de la cual se consideró que las ratas mostraban hiperemia reactiva (para referirse a este término, en la presente invención también se utiliza el término hiperperusión) (Fig. 6B). La media idesviación estándar (DE) de flujo sanguíneo durante la isquemia fue similar en el grupo de ratas con hiperemia ($44.1 \pm 17.5\%$ del flujo basal) que en el grupo sin ella ($53.4 \pm 10.7\%$ del flujo basal). Entonces los volúmenes infartados fueron comparados en función de la presencia o ausencia de hiperemia reactiva, de acuerdo con nuestra definición. El volumen infartado (valor medio $\pm$ SD) fue más extenso ($p < 0.01$) en el grupo de ratas que mostró hiperemia (162.7 ± 56.6) que en el grupo que no mostró hiperemia (81.7 ± 45.5 mm³) (Fig. 6C). Además, la valoración neurológica (valor medio $\pm$ SD) fue peor ($p \leq 0.05$) en el grupo con hiperemia (5.4 ± 1.5 puntos) que en el no-hiperémico (3.6 ± 1.3 puntos). (Fig. 6D). La hiperemia se refiere a la hiperperusión cortical ya que con la sonda del láser *Doppler* se midió el flujo de sanguíneo cortical. De acuerdo con esto, el infarto cortical (valor medio $\pm$ SD) fue más extenso ($p < 0.01$) en el grupo hiperémico (93.7 ± 48.4 mm³) que en el no hiperémico (17.6 ± 16.0 mm³) (Fig. 6E). En cambio, no se encontraron diferencias significativas en el volumen infartado (valor medio $\pm$ SD) entre el estriado del grupo con hiperemia (67.4 ± 17.8 mm³) y el grupo no hiperémico (56.5 ± 28.4 mm³) (Fig. 6F). Estos resultados sugieren que la hiperemia cortical en la reperusión tiene valor predictivo de la exacerbación del daño cortical por reperusión y por lo tanto es un marcador de daño de la reperusión.

2.6. CR-6 es protector en aquellos animales que muestran hiperemia reactiva

Tomando todos los animales juntos (n=33), la incidencia de hiperemia fue del 62%. No obstante, la hiperemia no fue equitativamente distribuida en los dos grupos. Así, la hiperemia fue retrospectivamente encontrada en el 72% de las ratas asignadas en el grupo vehículo (n=18) mientras que sólo fue del 50% en el grupo del CR-6 (n=14) las que la habían desarrollado. El aumento de la perfusión en los grupos hiperémicos fue similar entre el grupo del CR-6 y el del vehículo (Fig. 7A). Además, el grado de caída del flujo sanguíneo durante la isquemia fue similar en todos los grupos (Fig. 7B). En el grupo de animales que fueron tratados con CR-6, el volumen infartado (valor medio $\pm$ SD) fue similar tanto si previamente habían desarrollado hiperemia (85.7 ± 39.2 mm³) como si no la habían desarrollado (73.8 ± 40.6 mm³) (Fig. 7C). Sin embargo, las ratas hiperémicas tratadas con CR-6 mostraron una reducción del volumen infartado ($p \leq 0.01$) respecto a las ratas hiperémicas tratadas con vehículo (Fig. 7C). En cambio el volumen de infarto fue similar en la ratas no hiperémicas tratadas con CR-6 ó vehículo (Fig. 7C).

Resultados similares se encontraron para la valoración neurológica, ya que las ratas hiperémicas tratadas con CR-6 tenían un déficit neurológico menor que aquellas que recibieron vehículo. Sin embargo no hubo grandes diferencias en la valoración entre las ratas no hiperémicas tratadas con CR-6 o con vehículo (Fig. 7D). La proteína CR-6 protegió de una manera más efectiva el córtex (i.e la región que desarrolló más lesión con la hiperemia) que el estriado (Fig. 7E, F). Estos resultados mostraron que CR-6 protegió de manera más efectiva a las ratas hiperémicas que a las no hiperémicas, sugiriendo que éste antioxidante ejerce más efecto en condiciones en las que aparecen signos de lesión por reperusión como se ha visto en el córtex en el presente modelo experimental.

2.7. CR-6 atenúa las alteraciones de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Los animales con hiperemia desarrollaron alteraciones de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, BHE (BBB, de las siglas en inglés), según se observó con extravasación de *Evans Blue* (Fig. 8). La extravasación de *Evans Blue* tendió a ser menor después de la administración de CR-6. Las diferencias que se vieron con el grupo vehículo no fueron significativas. Los signos de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica no se observaron en todas las ratas.

2.8. CR-6 reduce la infiltración de neutrófilos

La expresión de mieloperoxidasa (MPO) se examinó para valorar la infiltración de neutrófilos al tejido lesionado. En los animales hiperémicos se detectó un aumento en la infiltración de neutrófilos comparado con los no hiperémicos. El número de células MPO-positivas (MPO+) por área fue mayor en el grupo vehículo que en el grupo CR-6. Se demuestra que los individuos que no sufren hiperemia tienen menor número de células MPO+ que los individuos que sí que han sufrido una hiperemia.

2.9. CR-6 atenuó el estrés oxidativo en la ACM aislada

Se procedió con el aislamiento de la ACM de ratas tratadas con CR-6 o con vehículo a las 24 h post-isquemia. Comparado con las ratas operadas del grupo control, la isquemia transitoria indujo la formación de superóxido (que detectamos con la técnica de dihidroetidio; DHE) en la ACM en el grupo vehículo (Fig. 10), mientras que el CR-6 inhibió la formación de superóxido en la ACM.

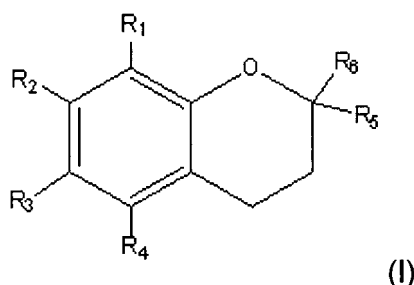
En base a todos estos hallazgos, se concluye que la hiperemia reactiva a una temprana reperfusión es un signo de lesión por reperfusión. Dado el beneficio de la supresión prolongada del estrés oxidativo después de la reperfusión que hemos descrito aquí, tenemos la hipótesis de que una isquemia transitoria puede inducir alteraciones del flujo sanguíneo cerebral que se producen durante varias horas después de la reperfusión y que pueden contribuir significativamente a la lesión por reperfusión.

La hiperperfusión en la reperfusión post-isquémica no es un fenómeno que ocurre sólo en ratas, ya que algunos pacientes pueden desarrollar una hiperperfusión después una trombólisis con rt-PA (Kidwell *et al.* 2001. Los resultados que se muestran en la presente invención muestran que sólo algunos individuos (ratas) que desarrollan hiperperfusión son diana para el tratamiento con antioxidantes, lo que significa que los efectos beneficiosos del CR-6 en la afectación neurológica y el volumen infartado sólo se dieron en esos animales, pero no en animales que no desarrollaron hiperperfusión en la reperfusión ó en animales que no presentaron reperfusión.

En conclusión, los presentes resultados muestran que el antioxidante CR-6 es protector en la isquemia/reperfusión en ratas, que esta protección es específica para un subgrupo de animales que desarrollaron hiperemia en el momento de la reperfusión, que el daño cerebral fue mayor en esos animales comparado con los animales que no mostraron hiperperfusión, que el tratamiento con antioxidante se debe mantener durante varias horas después de la reperfusión y que CR-6 confiere beneficios en la interfase entre la sangre y el cerebro previniendo la generación de estrés oxidativo y nitrosativo en los vasos sanguíneos y previniendo el colapso o ruptura de la BHE.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general I,



donde R_1 y R_4 son iguales o diferentes y se seleccionan de entre H ó un alquilo (C_1-C_4);

R_2 y R_4 son iguales o diferentes y se selecciona de entre H, OH, un alquilo (C_1-C_4) o un alcóxido ($O-(C_1-C_4)$);

R_5 se selecciona de entre H y un grupo alquilo (C_1-C_4) y

R_6 es un grupo alquilo (C_1-C_{10}),

para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de una lesión producida por una reperfusión post-isquémica, donde el flujo sanguíneo al inicio de la reperfusión es igual o superior a un 20% del valor basal.

2. Uso del compuesto según la reivindicación 1 donde R_1 es H, R_2 es un alcóxido ($O-(C_1)$), R_3 es un hidróxido, R_4 es H, R_5 es un grupo alquilo (C_1-C_4) y R_6 es un grupo alquilo (C_1-C_4).

3. Uso del compuesto según la reivindicación 2, donde R_5 y R_6 son un grupo metilo.

4. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la reperfusión post-isquémica es cerebral.

5. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.

6. Uso del compuesto según la reivindicación 5, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

7. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el medicamento incluye al menos un excipiente farmacológicamente aceptable.

8. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el medicamento incluye al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

9. Uso del compuesto según la reivindicación 8, donde el vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia grasa y el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

10. Uso del compuesto según la reivindicación 9 donde la sustancia grasa es aceite de oliva.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el medicamento comprende además otra sustancia activa.

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el medicamento se administra en dos tomas de 100 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal, por vía oral.

13. Uso según la reivindicación 12, donde la primera toma se administra a partir de entre el momento en el que se produce la reperfusión y 60 minutos después del inicio de la reperfusión.

ES 2 345 378 A1

14. Uso según la reivindicación 13, donde la primera toma se administra a partir de entre 15 y 45 minutos después del inicio de la reperfusión.

5 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde las dos tomas se administran con una diferencia de tiempo de entre 4 y 8 horas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

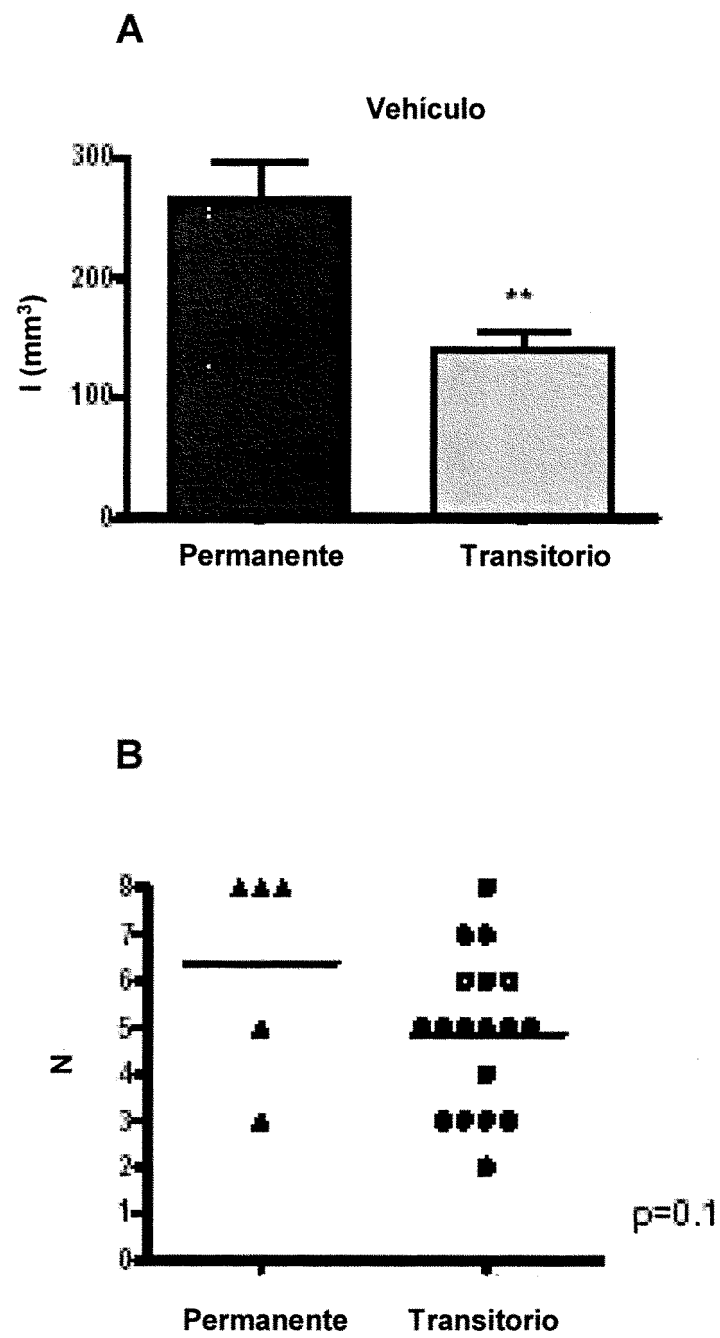


FIG. 1

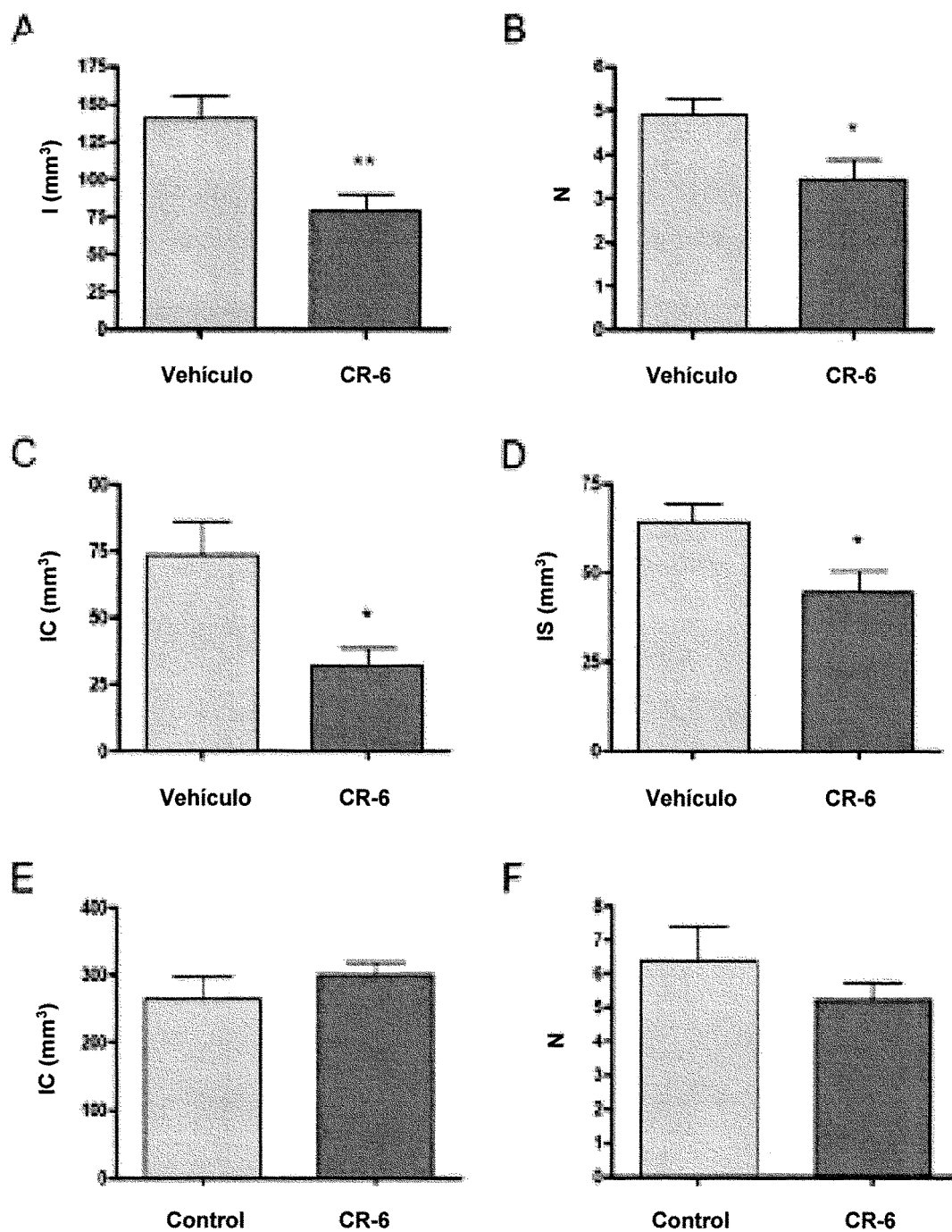


FIG. 2

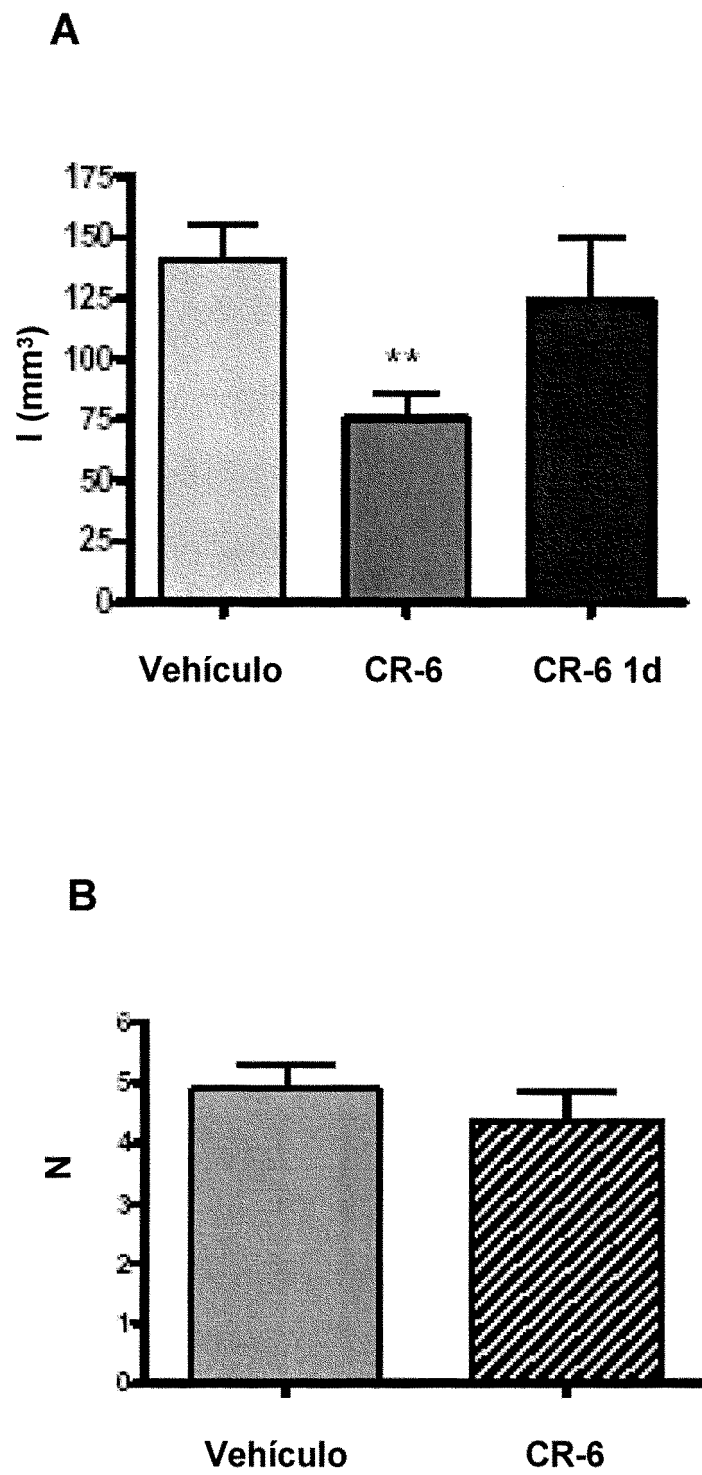


FIG. 3

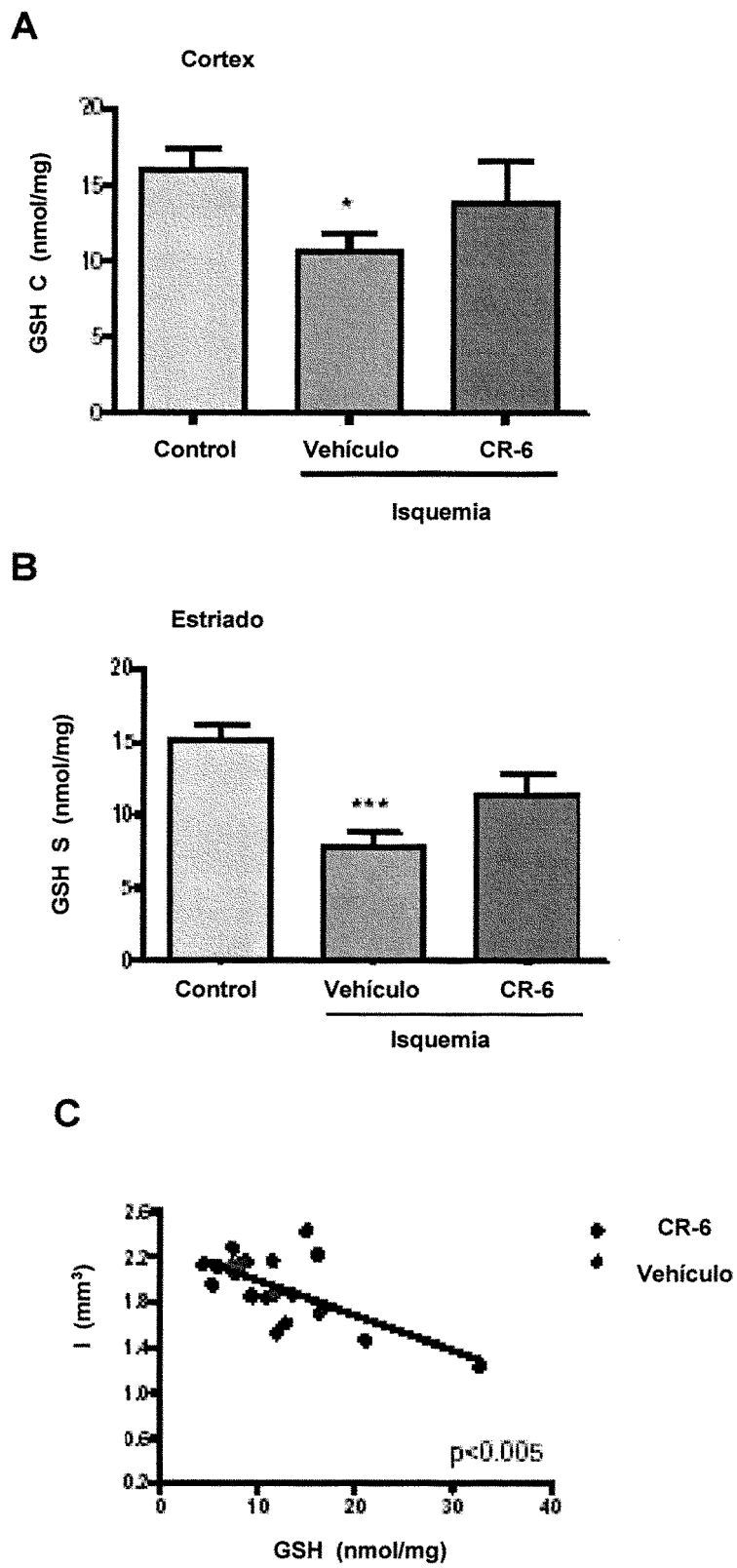


FIG. 4

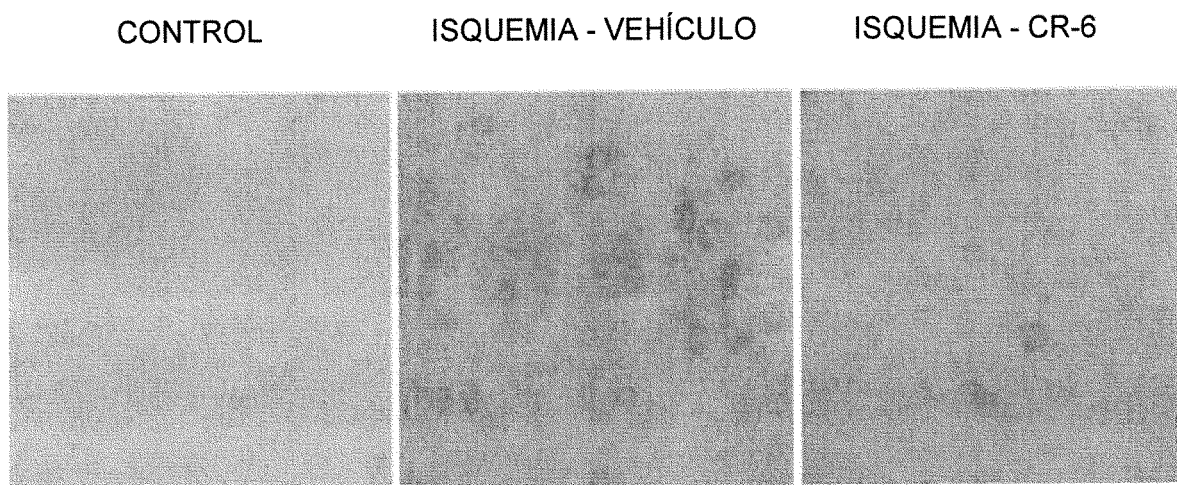


FIG. 5

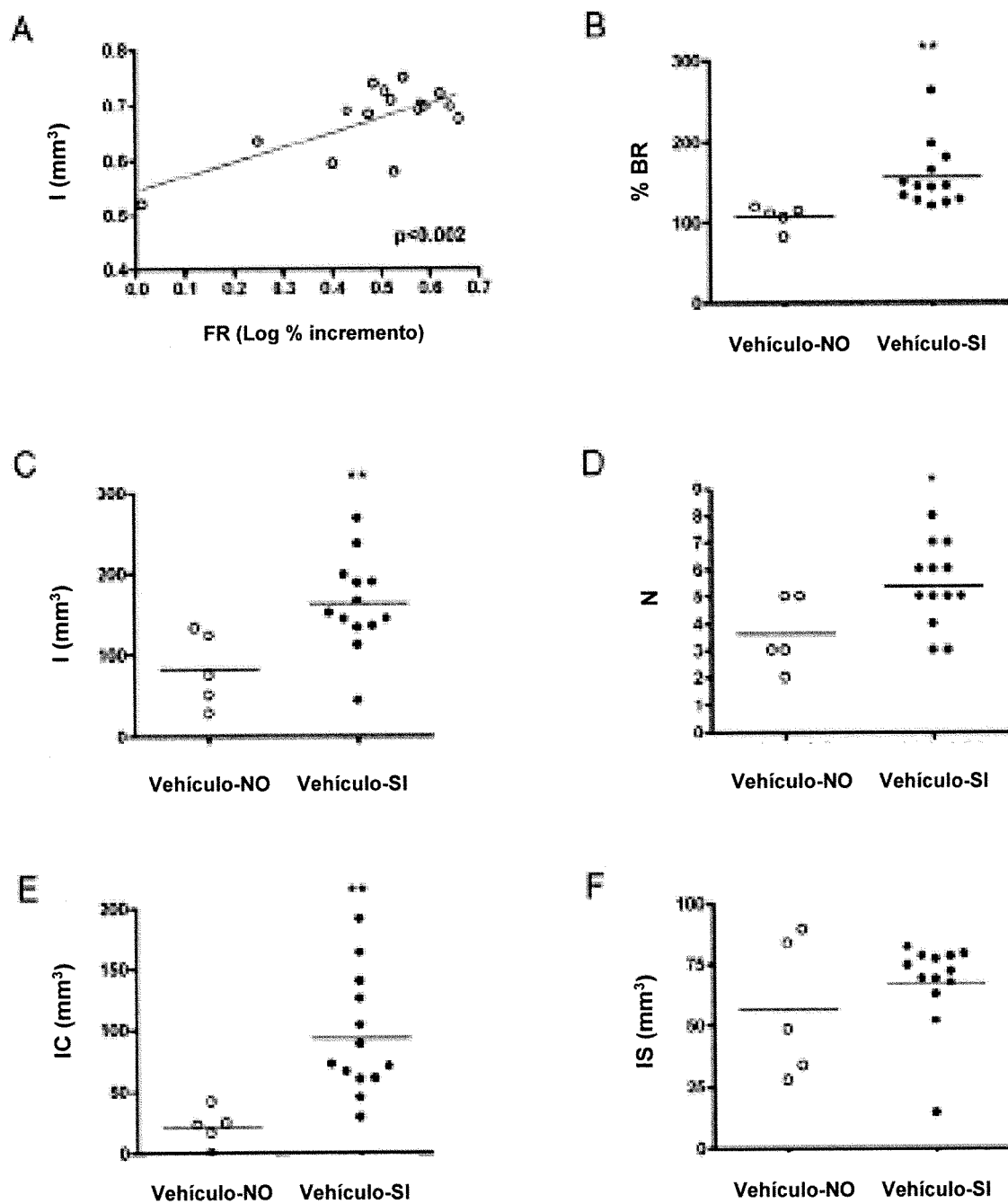


FIG. 6

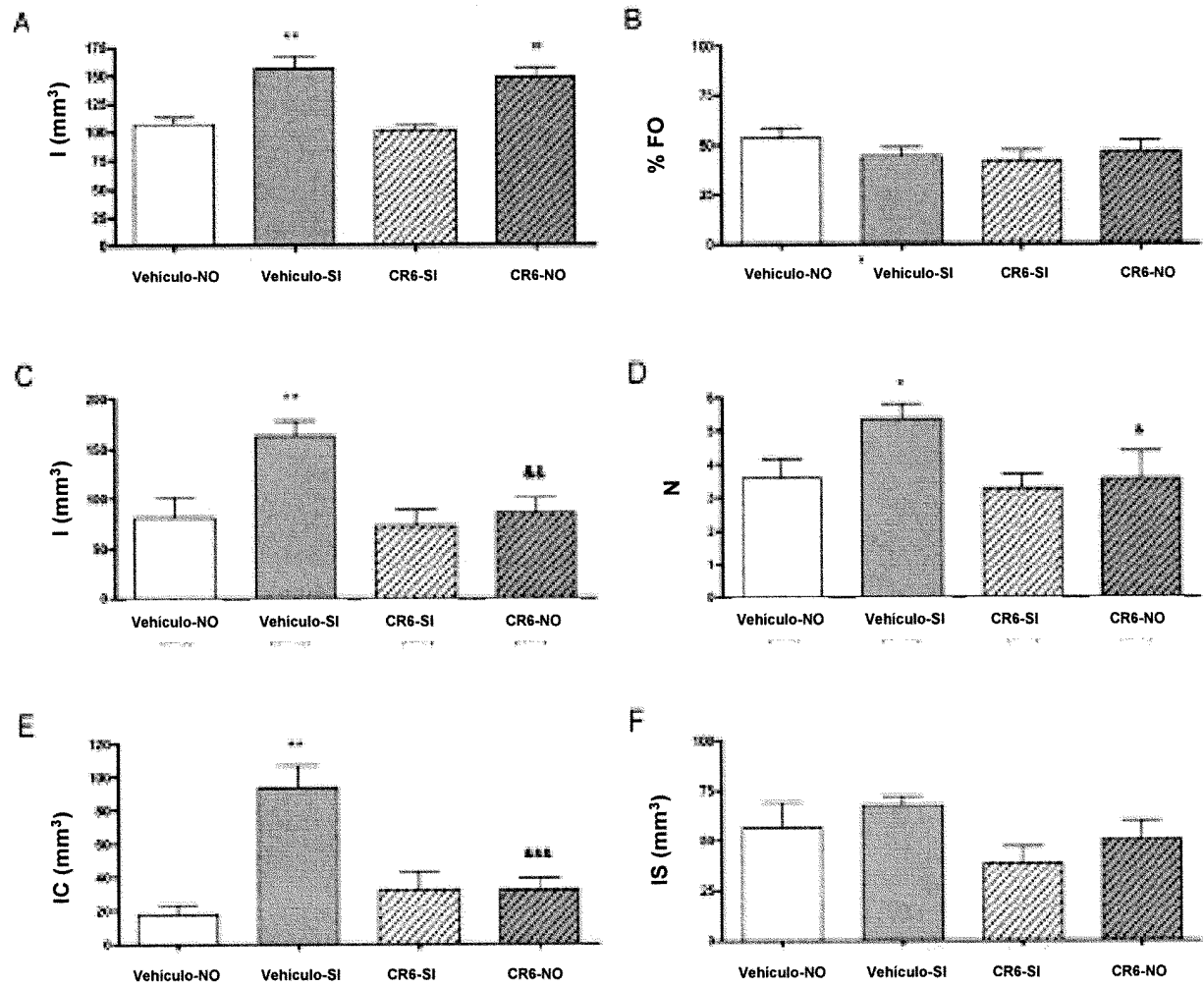


FIG. 7

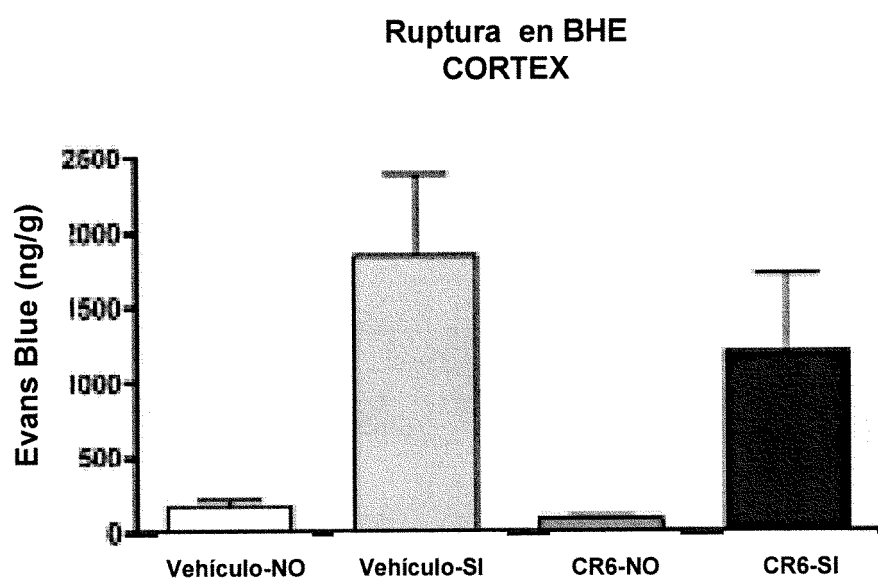


FIG. 8

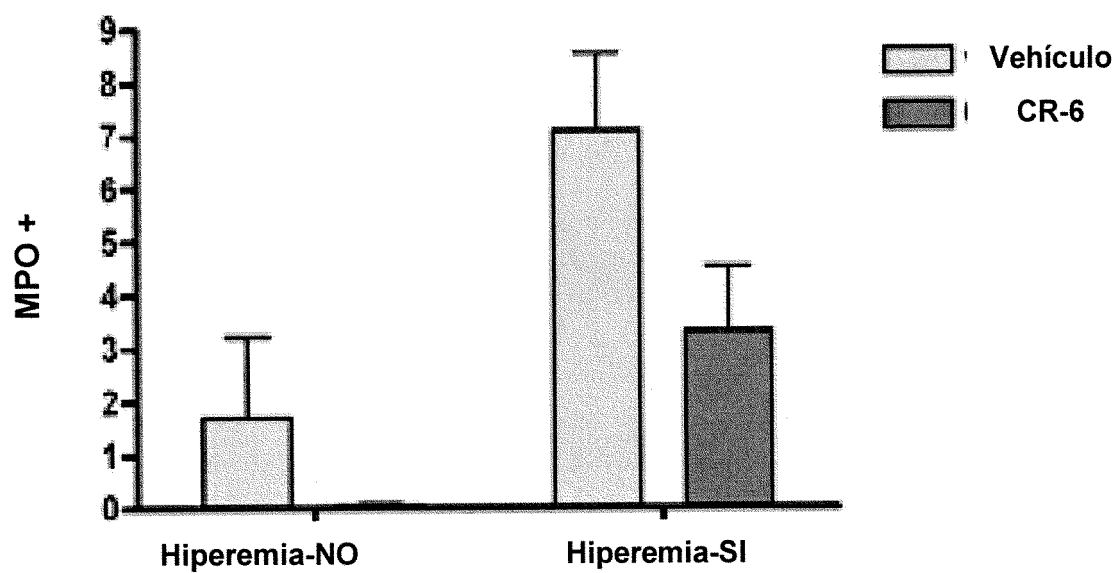


FIG. 9

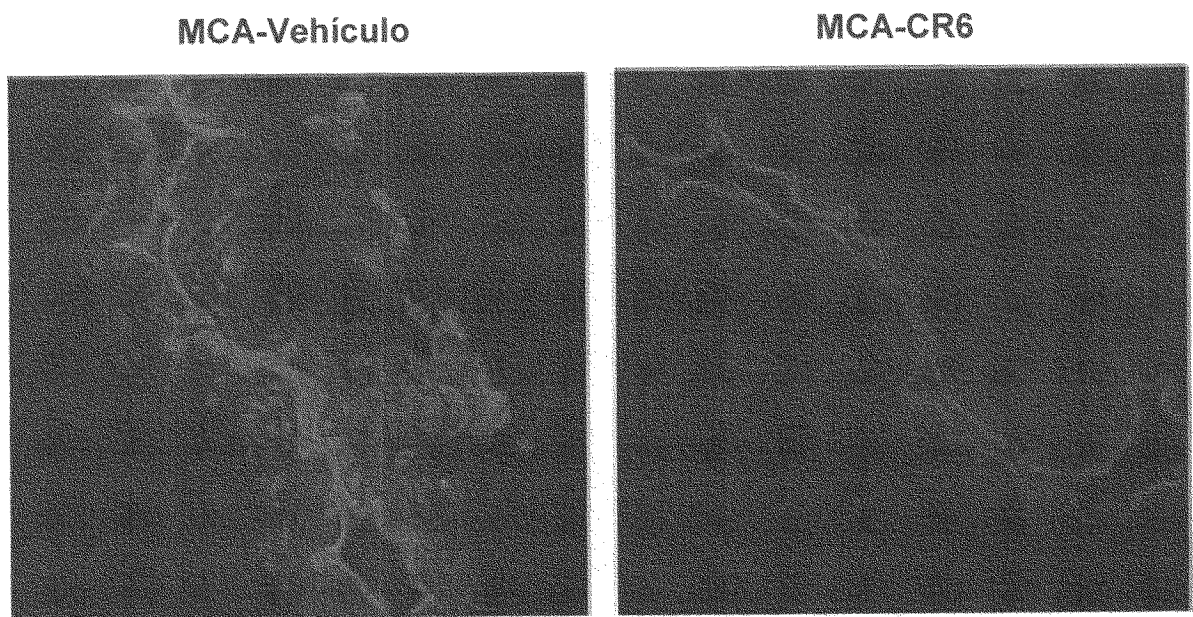


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 345 378

⑫ Nº de solicitud: 200900756

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **20.03.2009**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 31/353** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4877810 A (MICKLE ET AL) 31.10.1989, columna 1, reivindicaciones.	1-15.
A	EP 1987829 A1 (SANWA KAGAKU KENKYUSHO, CO, LTD) 05.11.2008, reivindicaciones.	1-15.
A	EP 1066832 A1 (CCI CORPORATION) 10.01.2001, páginas 2, 3, reivindicaciones.	1-15.

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.06.2010

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS MEDLINE, NPL, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-15	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-15	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4877810 A	31.10.1989
D02	EP 1987829 A1	05.11.2008
D03	EP 1066832 A1	10.01.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al uso de compuestos de fórmula general I, derivados del cromano, y específicamente el compuesto CR-6, (3, 4-dihidro-6-hidroxi-7-metoxi-2, 2-dimetil-1 (2H)-benzopirano), para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de una lesión producida por una reperusión post-isquémica, donde el flujo sanguíneo al inicio de la reperusión es igual o superior a un 20% del valor basal.

El documento D1 se refiere al uso de un compuesto 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametil cromano 2 carboxílico (conocido como Trolox-C) en la prevención o reducción del daño tisular cardíaco que ocurre con la reperusión del corazón isquémico que ocurre después de un infarto de miocardio o cirugía cardiovascular.

El documento D2 se refiere al uso de un compuesto 6 fluoro 2'5' dioxospiro (cromano- 4, 4'imidazolidina) 2 carboxamida en la prevención y uso terapéutico para el daño isquémico cerebral o daño producido por la reperusión cerebral isquémica.

El documento D3 se refiere a compuestos derivados del cromano glucósido y su uso como agentes para prevenir y curar las alteraciones de la reperusión isquémica.

Si bien los documentos D1-D3 se refieren a compuestos con una estructura relacionada con la de la presente solicitud, es decir derivados del cromano y el uso que se cita es el mismo, ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de ellos se refiere a los compuestos de la presente solicitud.

Por lo tanto, la materia técnica de las reivindicaciones 1-15 de la solicitud es nueva, implica actividad inventiva y tiene aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.