

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 650**

21 Número de solicitud: 201100829

51 Int. Cl.:

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 31/7004 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/718 (2006.01)

A61P 7/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.02.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

**AVDA. SENECA 2
28040 MADRID ES y
SERVICIO MADRILEÑO DE SALUD "HOSPITAL
DE LA PRINCESA" (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORO SÁNCHEZ, María Ángeles;
LIZASOAIN HERNÁNDEZ, Ignacio;
SÁNCHEZ-PRieto BORJA, José;
VIVANCOS MORA, José Aurelio;
TORRES MOLINA, Magdalena;
GODINO ALARCÓN, María Del Carmen;
SOBRADO SANZ, Mónica y
GONZÁLEZ ROMERA, Víctor Manuel**

54 Título: **USO DE UNA COMPOSICIÓN EN LA ELABORACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE DIÁLISIS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES MEDIANTE DIÁLISIS PERITONEAL.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con el uso de una composición isotónica, tamponada con lactato/fosfato en un intervalo fisiológicamente aceptable de pH (6-7,5), con bajas concentraciones de glutamato y con una concentración fisiológica, o menor, de glucosa, en la elaboración de una solución de diálisis peritoneal para el tratamiento agudo del ictus y otras enfermedades cerebrovasculares. La aplicación de esta solución de diálisis en la cavidad peritoneal disminuye de forma muy significativa el volumen de infarto cerebral asociado a la oclusión de la arteria cerebral media y, por lo tanto, el daño neurológico asociado. De aplicación en Biomedicina en las patologías cerebrovasculares, incluido el ictus cerebral isquémico o hemorrágico.

ES 2 396 650 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de una composición en la elaboración de una solución de diálisis para el tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares mediante diálisis peritoneal.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una composición para la elaboración de una solución de diálisis peritoneal. Más concretamente, una solución de diálisis peritoneal que puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades
10 cerebrovasculares, en particular en el tratamiento del ictus cerebral. La invención se encuadra, por tanto, en el sector BIOMÉDICO y el ámbito de aplicación es el de la elaboración de soluciones de diálisis peritoneal para el tratamiento de patologías y enfermedades cerebrovasculares.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) o ictus comprenden un conjunto de trastornos de la vasculatura cerebral que se caracterizan por una disminución del flujo sanguíneo en el cerebro con la consecuente afectación, de forma transitoria o permanente, de la función del cerebro a nivel focal o
20 global. Las ECV son la tercera causa de muerte en el mundo desarrollado, la 2ª en hombres y la 1ª en mujeres en España; se consideran la primera causa de discapacidad y de demencia vascular y afectan a un 50% de la población mayor de 60 años, por lo que constituyen en la actualidad un problema de salud y una urgencia médica. Atendiendo al tipo de episodio vascular, pueden
25 ser hemorrágicas o isquémicas.

Un episodio cerebrovascular isquémico ocurre cuando una arteria que suministra sangre al cerebro queda bloqueada, reduciendo o interrumpiendo
30 repentinamente el flujo de sangre y, con el tiempo, ocasionando un infarto en el cerebro. Aproximadamente un 80 por ciento de todos los episodios cerebrovasculares son de tipo isquémico. Los trombos originados por aterosclerosis o los émbolos por alteraciones de la coagulación sanguínea

son la causa más común de bloqueo arterial y de infarto cerebral. La trombosis se debe a transformaciones patológicas en el árbol arterial que condicionan la oclusión del vaso y una interrupción del flujo a ese nivel. Generalmente se trata de placas ateromatosas, que favorecen la agregación plaquetaria por lo que trombos intraluminales pueden conducir a la oclusión. Por otra parte, el embolismo se debe a materiales que proceden de otro punto del torrente circulatorio y se debe a procesos de coagulación no deseados. El proceso de coagulación es necesario y beneficioso en todo el cuerpo debido a que detiene la hemorragia y permite reparar las áreas dañadas de las arterias o de las venas. Sin embargo, cuando los coágulos de sangre se forman en el lugar incorrecto dentro de una arteria, ocasionan una lesión devastadora al interferir el flujo normal de sangre. Los problemas de coagulación se hacen más frecuentes a medida que las personas avanzan en edad. Por otro lado, los ictus hemorrágicos son los que resultan de la ruptura de un vaso sanguíneo o una estructura vascular anormal y representan aproximadamente el 20% restante. Algunas hemorragias se desarrollan dentro de las zonas de isquemia lo que se denomina "transformación hemorrágica".

A pesar de la alta incidencia del ictus, las intervenciones terapéuticas son extremadamente limitadas y actualmente el único tratamiento eficaz para el ictus isquémico, que no el hemorrágico, es la administración de una terapia trombolítica con el activador de plasminógeno tisular (t-PA, alteplasa) para restaurar el flujo sanguíneo. Sin embargo, este tratamiento sólo es aplicable en un 3-5% de los pacientes. Los siguientes pasos son clave antes de administrar este compuesto:

- Los trombolíticos deben administrarse dentro de las 4,5 horas después del ictus (pero no más tarde) para que puedan tener algún efecto beneficioso (Hacke et al., New Eng J Med. 2008. 359: 1317–1329). Lamentablemente, la mayoría de pacientes con un ictus llegan al hospital en un plazo mayor de 4,5 horas después del ataque y, por ello, no se les puede administrar el tratamiento.

- Antes de administrar t-PA, debe confirmarse mediante una TAC (tomografía axial computerizada) que el ictus no es hemorrágico debido a que el tratamiento con t-PA conlleva riesgo de sangrado.
- Ciertos pacientes corren un riesgo mayor de hemorragia cuando se les administran estos fármacos. Se incluyen pacientes con las siguientes condiciones: en tratamiento con antiagregantes (ej. Aspirina) y/o anticoagulantes, con alteraciones en la coagulación, historia reciente de úlceras sangrantes o de fibrilación auricular.

10 Un objetivo en el tratamiento de las ECV es la limitación del daño neuronal (neuroprotección) a través de fármacos u otras estrategias terapéuticas que intervengan en la cascada isquémica y reduzcan la cantidad de tejido dañado. De este modo se podría obtener un mejor resultado clínico, traducido no sólo en supervivencia, sino también en la mejora de la calidad de vida de los
15 pacientes que sufren eventos vasculares agudos.

Los modelos de isquemia cerebral en animales han contribuido al desarrollo del conocimiento de este problema. Se han ensayado muchos agentes neuroprotectores en estos modelos; sin embargo, hasta el momento actual,
20 ninguno supera los criterios de eficacia y seguridad en ensayos clínicos. En la revisión *Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future* (Ginsberg MD. *Neuropharmacology*. 2008. 55:363-389), el autor hace una recopilación de los agentes neuroprotectores que se han evaluado, tanto en
25 estudios preclínicos como en ensayos clínicos, para el tratamiento del ictus isquémico. La variedad y cantidad de agentes, o grupos de agentes, cuyos efectos se han probado en los últimos años es enorme y entre ellos figuran: antagonistas del calcio, antagonistas del glutamato, GABA agonistas, antioxidantes o secuestradores de radicales, precursores de fosfolípidos,
30 reguladores de la transducción de señales dependiente de óxido nítrico, inhibidores de leucocitos, hemodilución, y otras terapias más recientes como la hipotermia, la albúmina humana en dosis elevadas, el magnesio o las terapias combinadas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al uso de una composición isotónica y tamponada en la elaboración de una solución de diálisis para reducir el volumen de infarto cerebral en las enfermedades cerebrovasculares, mediante la diálisis peritoneal. La composición de la presente invención comprende electrolitos, sustancias fisiológicas reguladoras del pH y
10 concentraciones de glucosa iguales o inferiores a las fisiológicas del plasma sanguíneo. Esta composición, además, no debe contener una concentración de glutamato superior a 200 μ M. El uso de una solución de diálisis peritoneal elaborada con esta composición reduce de forma muy significativa (43,1 \pm 10,0% de reducción) el volumen de infarto cerebral tras la oclusión de
15 la arteria cerebral media (OACM-MCAO).

La concentración de los electrolitos puede variar en el rango fisiológico de sus concentraciones plasmáticas manteniendo siempre la isotonicidad con respecto al plasma sanguíneo. La regulación de la tensión arterial tras un
20 ictus ha de ser muy cuidadosa para evitar tanto hemorragias por hipertensión como hipoperfusión por hipotensión, por lo que es necesario que la composición de la invención sea isotónica.

En esta memoria descriptiva se incluyen varios ejemplos de composiciones
25 con distintas concentraciones de glucosa, de glutamato o de sustancias tamponadoras con los que se pretende ofrecer una muestra de las posibles combinaciones eficaces en el tratamiento del ictus, sin que estos ejemplos limiten el alcance de la invención. Los ejemplos ofrecidos deben entenderse como modelos utilizados en representación de la amplia variedad de líquidos
30 que pueden utilizarse. Como ejemplo, una composición apropiada para la elaboración de una solución de diálisis sería aquella que contuviese de 110 a 150 mEq/L de ión sodio, de 0 a 5 mEq/L de ión potasio, de 0 a 2 mEq/L de ión

magnesio, de 0 a 6 mEq de ión calcio, de 80 a 150 mEq/L de ión cloruro, de 0,5-2 g/L de glucosa, de 0 a 200 μ M de glutamato, respetando la isotonicidad con respecto al plasma sanguíneo y manteniendo un pH fisiológicamente aceptable.

5

El pH de la composición de la invención debe ser fisiológicamente aceptable. El término "fisiológicamente aceptable", en esta memoria descriptiva, significa que el pH está en el intervalo de 6 a 7,5. Además, la composición contiene una sustancia fisiológica reguladora para el ajuste del pH para mantener tamponada la solución de diálisis. En cuanto a las sustancias fisiológicas reguladoras del pH, la composición de la presente invención podría contener hasta 3,5 mmol/L de lactato y debe contener 10 mmol/L de fosfato.

10

Puesto que la diálisis peritoneal implica la pérdida de metabolitos, la composición para la elaboración de la solución de diálisis puede contener diferentes concentraciones de glucosa (0,5-2,0 g/L), siendo el límite superior la concentración fisiológica de glucosa en plasma para evitar el aumento de la concentración plasmática de glucosa por una difusión de la misma desde el líquido de diálisis al plasma, dado que la hiperglucemia es un factor de mal pronóstico tras un ictus.

20

Así mismo, la glucosa puede ser parcialmente sustituida por una dextrina, que también contribuirá a la isotonicidad de la solución de diálisis.

Cualquier composición que cumpla estos requisitos (isotonicidad, baja concentración de glucosa, concentración de glutamato inferior a 200 μ M, pH tamponado con fosfatos) puede ser utilizada en la elaboración de una solución de diálisis peritoneal estéril para su empleo en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares mediante diálisis peritoneal.

30

Esta memoria descriptiva recoge ejemplos de utilización de la solución de diálisis a que da lugar la composición de la invención, que se ha empleado en

- diálisis peritoneal aplicada a ratas a las que se había practicado la oclusión de la arteria cerebral media, produciendo así un infarto cerebral. El volumen del infarto fue significativamente menor en los animales tratados (12,17±1,75% -promedio de todos los valores obtenidos en los ensayos en los
- 5 que se ha utilizado la composición de la TABLA 1-) que en el grupo de control sin tratamiento (21,42±1,48%), de lo que se deduce que la composición de la invención y la aplicación a que da lugar son eficaces en la reducción del daño cerebral asociado a un ictus isquémico.
- 10 La diálisis peritoneal es una de las opciones de tratamiento disponible para retirar los productos de desecho y el exceso de líquido de la sangre cuando los riñones no funcionan adecuadamente, como alternativa a la diálisis renal. Los buenos resultados obtenidos en esta invención en los modelos de enfermedad cerebrovascular podrían deberse a una acción similar, retirando
- 15 algún producto de desecho que llegara a la sangre después de un ictus u otra enfermedad cerebrovascular. En este sentido, algunos estudios sobre los efectos producidos por estas enfermedades han podido atribuir a la acumulación de glutamato en el medio extracelular del parénquima cerebral un papel fundamental en la evolución del daño neuronal, de ahí que las más
- 20 recientes investigaciones se hayan dirigido a secuestrar o eliminar el glutamato sanguíneo. En este contexto, se han utilizado la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y la glutamato-piruvato transaminasa (GPT) acompañadas en el tratamiento de piruvato o glutamato (WO2004012762). La solicitud de patente WO2007105203 recoge el uso de agentes capaces de
- 25 modular la actividad de las hormonas relacionadas con el estrés, especialmente agonistas y antagonistas adrenérgicos, acompañados o no de enzimas que modifican el glutamato (transaminasas, deshidrogenasas, decarboxilasas, transferasas, etc.). Más recientemente se ha ensayado también el oxalacetato. Se ha comprobado que estimula la glutamato-
- 30 oxalacetato transaminasa residente, lo que da lugar a la disminución de la concentración del glutamato plasmático por estimulación de la capacidad degradativa del plasma para este aminoácido. Se ha demostrado que este

procedimiento proporciona neuroprotección en un modelo animal (rata) de isquemia cerebral focal (Nagy D, *et al.* Cell Mol Neurobiol. 2009. 29:827-35) y de traumatismo craneal (Zlotnik A, *et al.* J Neurosurg Anesthesiol. 2009. 21:235-41).

5

Para comprobar si el mecanismo de acción de la solución de diálisis elaborada con la composición de la invención estaba relacionado con estos hallazgos, se ha analizado la influencia de la presencia de diferentes concentraciones de glutamato en dicha composición y la presente memoria
10 descriptiva recoge ejemplos en los que se ha comprobado que el efecto beneficioso es mayor cuanto menor es la concentración de glutamato en el mismo, de manera que, preferentemente, esta composición no debe contener concentraciones de glutamato superiores a 200 μM y, más preferentemente aún, no debe contener glutamato.

15

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una composición isotónica, con baja concentración de glucosa, concentración de glutamato igual o inferior a 200 μM , preferentemente igual a cero, y pH tamponado con una mezcla de lactato y fosfato, para su uso en el tratamiento
20 de las enfermedades cerebrovasculares mediante diálisis peritoneal.

Un segundo aspecto de esta invención se refiere al uso de una composición isotónica, con baja concentración de glucosa, concentración de glutamato igual o inferior a 200 μM , preferentemente igual a cero, y pH tamponado con
25 una mezcla de lactato y fosfato, en la elaboración de una solución de diálisis estéril con aplicación en el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular mediante diálisis peritoneal.

Como se ha mencionado anteriormente, el término "enfermedad
30 cerebrovascular o ECV", tal como aquí se emplea, se refiere a un conjunto de trastornos de la vasculatura cerebral que se caracterizan por una disminución del flujo sanguíneo en el cerebro con la consecuente afectación, de forma

transitoria o permanente, de la función del cerebro a nivel focal o global. Entre ellas se encuentran el ataque isquémico transitorio, el traumatismo craneoencefálico, el ictus cerebral isquémico y el ictus cerebral hemorrágico.

- 5 Así mismo, la invención se refiere a un método de diálisis peritoneal para tratar las enfermedades cerebrovasculares mediante la utilización de una solución de diálisis estéril elaborada con una composición isotónica, con baja concentración de glucosa, concentración de glutamato igual o inferior a 200 μ M, preferentemente igual a cero, y pH tamponado con una mezcla de lactato
10 y fosfato.

Para los expertos en ictus las ventajas de este invento y su aplicación son: (1) Utilidad en todos los tipos de ictus. (2) Rápida aplicación de la técnica, incluso en la ambulancia, tan pronto como se activa el código ictus. (3) La técnica de
15 diálisis peritoneal ya se aplica con éxito en otras patologías y las soluciones de diálisis peritoneal son conocidas y utilizadas. (4) No se requiere la aplicación de fármaco alguno al paciente. (5) No se requiere equipamiento sofisticado.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 1 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).
25

A) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas (los datos son medias \pm SEM, n=8). B) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas y sometidos a dos ciclos de diálisis (Los datos
30 son medias \pm SEM, n=12, *p<0,001 con respecto al control). t=0 indica el inicio de la cirugía para ocluir la arteria cerebral media.

Figura 2: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 2 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). A) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas (los datos son medias \pm SEM, n=8).
5 B) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas y sometidos a dos ciclos de diálisis (Los datos son medias \pm SEM, n=4, *p>0,05 con respecto al control). t=0 indica el inicio de la cirugía para ocluir la arteria cerebral media.

10

Figura 3: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 3 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).

15

A) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas (los datos son medias \pm SEM, n=8). B) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas y sometidos a dos ciclos de diálisis (Los datos
20 son medias \pm SEM, n=4, *p>0,05 con respecto al control). t=0 indica el inicio de la cirugía para ocluir la arteria cerebral media.

20

Figura 4: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 4 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).

25

A) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas (los datos son medias \pm SEM, n=8). B)
30 Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas y sometidos a dos ciclos de diálisis (Los datos

30

son medias \pm SEM, n=4 *p>0,05 con respecto al control). t=0 indica el inicio de la cirugía para ocluir la arteria cerebral media.

5 **Figura 5: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 5 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).**

A) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO
10 permanente durante 24 horas (los datos son medias \pm SEM, n=6). B) Volumen de infarto medio en el grupo de animales expuesto a una MCAO permanente durante 24 horas y sometidos a dos ciclos de diálisis (Los datos son medias \pm SEM, n=4, *p<0,05 con respecto al control). t=0 indica el inicio de la cirugía para ocluir la arteria cerebral media.

15

Figura 6: Efecto de la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 1 en la concentración plasmática de glutamato después de la oclusión de la
20 **arteria cerebral media (MCAO).**

Las muestras se recogieron a diferentes tiempos indicados en la gráfica, según se indica en el esquema. Los valores de glutamato plasmático están normalizados a sus respectivos valores basales (obtenidos antes de la cirugía). (Los datos son medias \pm SEM, n=5 para el grupo SHAM; n=6 para el
25 grupo MCAO, *p<0,05 con respecto al basal; n=5 para MCAO+DP –diálisis peritoneal-; #p<0,05 con respecto al MCAO).

Figura 7: Efecto de la adición de glutamato a la solución de diálisis
30 **elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 1 en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).**

Las ratas se expusieron a una MCAO permanente durante 24 horas (MCAO, n=6) y dos grupos de animales se sometieron a dos ciclos de diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de la composición que se especifica en la Tabla 1 al que se añadió glutamato a 200 μ M (MCAO+DP 200 μ M; n=6) ó 400 μ M (MCAO+DP 400 μ M; n=4). * p<0.05 con respecto al MCAO.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

10

A continuación se muestran diferentes ejemplos para ilustrar la presente invención, que no son limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

15

Test para evaluar si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una composición que contiene una concentración fisiológica de glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con fosfato reduce significativamente el volumen de infarto producido por la oclusión de la arteria cerebral media.

20

Ratas Sprague-Dawley macho de peso 250–300g sanas se anestesiaron con Isoflurano 1.5% en una mezcla de aire atmosférico 80% / oxígeno 20%. La temperatura corporal de los animales se monitorizó durante toda la experimentación mediante una sonda rectal y se mantuvo a 36.5 \pm 0.5 °C empleando una manta térmica. La isquemia cerebral focal permanente fue inducida por oclusión de la arteria cerebral media distal (ACM) tal como se ha descrito anteriormente (Sobrado M, et al. Neuroscience 2003. 118:107-13). Para la ligadura de la ACM se realizó una craneotomía para exponer la región del tronco de la misma. La oclusión de la ACM se realizó con un nylon 9/0, justo antes de la bifurcación de las ramas frontal y parietal. A continuación se expusieron las arterias carótidas comunes (ACC), pasando a ocluírlas con un

30

nylon 6/0 de forma permanente en el caso de la ipsilateral y transitoria en la contralateral, quitando la oclusión de esta última pasados 90 minutos. Como controles con intervención simulada (SHAM, n=5) se utilizaron ratas en la cuales la ACM estaba expuesta pero no ocluida.

5

Después de la intervención quirúrgica, un grupo de animales (n=6) fue devuelto a sus jaulas y tuvieron libre acceso a la comida y a la bebida, otro grupo (n=5) fue sometido a dos ciclos de diálisis peritoneal (de una hora de duración cada uno) con 40 mL/Kg de la solución de diálisis elaborada a partir de la composición que viene especificada en la TABLA 1 y esterilizada por filtración a través de un filtro de membrana de 0,22 μm , entre las 2,5 y las 4,5 horas post-cirugía. A las 24 horas de la intervención quirúrgica, las ratas fueron sacrificadas para determinar el volumen de infarto.

10

TABLA 1. COMPOSICIÓN		
Compuesto	Concentración	mEq/L
Na ⁺		140
Cl ⁻		140
Ca ²⁺		3,5
Mg ²⁺		0,0
K ⁺		0,0
Lactato	3,5 mmol/L	
Fosfato	10 mmol/L, pH=6,5	
Glucosa	1,5 g/L	

15

Para determinar el volumen de infarto se extrajo el cerebro y se hicieron cortes coronales de 2 mm de grosor (Brain Matrix, WPI, UK) que se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (1% TTC en tampón fosfato 0.2 M). Se calcularon los volúmenes de infarto tomando imágenes de las muestras de cada lado de las secciones coronales con una cámara digital (Nikon Coolpix 990), y se analizaron las imágenes utilizando ImageJ 1.33u (National Institutes of Health, Bethesda, MD). La imagen digitalizada se proyectó en un

20

video monitor, habiendo ocultado las condiciones experimentales al observador. El perímetro del hemisferio contralateral se superpuso al hemisferio ipsilateral para excluir edema, y se delinearon los márgenes del infarto con un cursor. Se determinó el área de infarto, que se encontraba sin teñir, por medio del recuento de píxeles contenidos en las regiones delineadas. Se obtuvieron los volúmenes de infarto (en % de hemisferio infartado –VHI-) a partir de la integración de las áreas de infarto a lo largo de la extensión del infarto calculada como una proyección ortogonal. Todos los animales exhibieron infarto después del proceso de oclusión, el cual afectó sólo a la corteza cerebral

En el grupo de animales en los que no se ocluyó la arteria (SHAM) no se detectó ninguna lesión. La oclusión de la arteria cerebral media produjo un volumen de infarto, determinado a las 24 horas post-cirugía, de $21,42 \pm 1,48\%$, $n=8$ (Fig.1). En el grupo de animales que se sometieron a los dos ciclos de diálisis peritoneal con la solución obtenida a partir de la composición de la tabla 1, el volumen de infarto fue significativamente menor (Fig.1), siendo de $12,1 \pm 2,1\%$, $n=12$ ($p < 0,001$).

Ejemplo 2

Test para evaluar si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una composición que contiene una concentración fisiológica de glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con bicarbonato reduce significativamente el volumen de infarto producido por la oclusión de la arteria cerebral media.

Se realizó un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 1, utilizando la composición que se especifica en la tabla 2 para elaborar la solución de diálisis estéril.

TABLA 2. COMPOSICIÓN

Compuesto	Concentración	mEq/L
Na ⁺		140
Cl ⁻		140
Ca ²⁺		3,5
Mg ²⁺		0,0
K ⁺		0,0
Lactato	15 mmol/L	
Bicarbonato	25 mmol/L, pH=6,5	
Glucosa	1,5 g/L	

La determinación del volumen de infarto, utilizando bicarbonato como tampón de pH, reveló que no hubo diferencia en los volúmenes de infarto entre los animales control (21,42±1,48%%, n=8) y el grupo dializado (18,95 ± 3,01%, n=4; p>0.05, t-test) (Fig 2).

Ejemplo 3

10 **Test para evaluar si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una composición hipertónica que contiene una concentración muy elevada de glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con fosfato reduce significativamente el volumen de infarto producido por la oclusión de la arteria cerebral media.**

15

Se realizó un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 1, utilizando la composición que se especifica en la tabla 3 para elaborar la solución de diálisis estéril.

TABLA 3. COMPOSICIÓN		
Compuesto	Concentración	mEq/L
Na ⁺		140
Cl ⁻		140

Ca ²⁺		3,5
Mg ²⁺		0,0
K ⁺		0,0
Lactato	3,5 mmol/L	
Fosfato	10 mmol/L, pH=6,5	
Glucosa	38 g/L	

La determinación del volumen de infarto, utilizando una composición hipertónica con una concentración muy elevada de glucosa, reveló que no hubo diferencias en el volumen de infarto entre animales control (21,42±1,48%%, n=8) y el grupo de animales dializados (17,61±2,12%, n=4; p>0,05 t-test) (Fig. 3).

Ejemplo 4

Test para evaluar si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una concentración isotónica que no contiene glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con fosfato reduce significativamente el volumen de infarto producido por la oclusión de la arteria cerebral media.

Se realizó un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 1, utilizando la composición que se especifica en la tabla 4 para elaborar la solución de diálisis estéril.

Compuesto	Concentración	mEq/L
Na ⁺		140
Cl ⁻		140
Ca ²⁺		3,5
Mg ²⁺		0,0
K ⁺		0,0

Lactato	3,5 mmol/L	
Fosfato	10 mmol/L, pH=6,5	
Glucosa	0 g/L	
Maltodextrina	29,9 g/L	

La determinación del volumen de infarto, utilizando una composición isotónica sin glucosa, reveló que no hubo diferencias en el volumen de infarto entre animales control ($21,42 \pm 1,48\%$, $n=8$) y el grupo de animales dializados (21,37±2,76%, $n=4$; $p>0,05$, t-test) (Fig. 4).

Ejemplo 5

Test para evaluar si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una composición isotónica que contiene una concentración reducida de glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con fosfato reduce significativamente el volumen de infarto producido por la oclusión de la arteria cerebral media.

Se realizó un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 1, utilizando la composición que se especifica en la tabla 5 para elaborar la solución de diálisis estéril.

Compuesto	Concentración	mEq/L
Na ⁺		140
Cl ⁻		140
Ca ²⁺		3,5
Mg ²⁺		0,0
K ⁺		0,0
Lactato	3,5 mmol/L	
Fosfato	10 mmol/L, pH=6,5	
Glucosa	0,75 g/L	

Maltodextrina	14,95 g/L	
---------------	-----------	--

La determinación del volumen de infarto, utilizando una composición isotónica con baja concentración de glucosa, reveló que hubo diferencias en el volumen de infarto entre animales control ($21,42 \pm 1,48\%$, $n=8$) y el grupo de animales dializados ($15,19 \pm 2,2\%$, $n=4$; $p < 0,05$; t-test) (Fig. 5).

Ejemplo 6

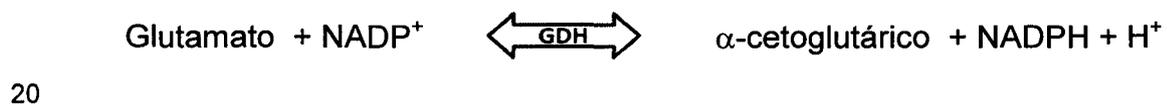
Test para evaluar si la oclusión de la arteria cerebral media produce un incremento de los niveles de glutamato plasmático y si la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir de una composición isotónica que contiene una concentración fisiológica de glucosa y que está tamponada a pH 6,5 con fosfato los reduce.

Ratas Sprague-Dawley macho de peso 250–300g sanas fueron anestesiadas con Isoflurano 1.5% en una mezcla de aire atmosférico 80%/oxígeno 20%. Se insertó una cánula en la arteria femoral para la toma de muestras sanguíneas. Y se procedió tal y como se ha descrito en el ejemplo 1. Las ratas se dividieron en tres grupos, un grupo en las cuales la ACM estaba expuesta pero no ocluida sirvieron como controles con intervención simulada (SHAM, $n=5$), otro grupo en los que se ocluyó la arteria cerebral media (MCAO, $n=6$) y otro grupo en los que se ocluyó la arteria cerebral media y se sometieron a dos ciclos de diálisis peritoneal (MCAO+DP, $n=5$) con la solución de diálisis elaborada a partir de la composición que está indicada en la Tabla 1. Después de la intervención quirúrgica y finalizada la toma de muestras sanguíneas, los animales fueron devueltos a sus jaulas y tuvieron libre acceso a la comida y a la bebida. A las 24 horas tras la intervención quirúrgica, las ratas fueron sacrificadas.

Las muestras de plasma se obtuvieron mediante centrifugación a 4°C de la muestra sanguínea (100µl) en presencia de tampón citrato al 3,15% (10µl) a 3.500 r.p.m. durante 5 minutos. El plasma, que constituye la capa superior, se retiró con una pipeta Pasteur y se depositó en un tubo almacenándose a -
 5 80°C hasta su procesamiento.

El glutamato plasmático se determinó mediante un ensayo enzimático descrito por Nicholls, DG *et al.* (J. Neurochem. 1987. 49: 50-57) midiendo el incremento de la fluorescencia producido al generarse NADPH en la reacción
 10 catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADP⁺.

Las variaciones de fluorescencia se registraron en fluorímetros Perkin-Elmer LS-50B y LS-55 a unas longitudes de onda de emisión y excitación de 340 nm
 15 y 460 nm, respectivamente. Las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 3 nm y 9 nm.



Las determinaciones se realizaron en medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4) que contenía NADP⁺ 1 mM, CaCl₂ 1,33 mM y 50 unidades de glutamato
 25 deshidrogenasa. El ensayo se inició añadiendo 5 µl de plasma. Al final de cada determinación se añadió un patrón de 2 nmoles de glutamato para la cuantificación del contenido de la muestra.

La oclusión de la arteria cerebral media produjo un incremento de más de dos
 30 veces en la concentración plasmática de glutamato a las 4,5 horas de la oclusión, tal como se muestra en la Fig. 6. En las ratas del grupo SHAM, así

como en el grupo de ratas dializadas no se observó dicho incremento de glutamato plasmático (Fig. 6).

5 Los resultados mostrados en la Fig.6 confirman que el glutamato plasmático se eleva tras una isquemia cerebral y que la diálisis peritoneal con una solución de diálisis elaborada a partir la composición de la invención es un método muy eficaz para reducirlo.

10 **Ejemplo 7**

Test para evaluar el efecto de la presencia de glutamato en la solución de diálisis elaborada a partir de la composición de la invención en el volumen de infarto después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO).

15

Ratas Sprague-Dawley macho de peso 250–300g sanas fueron anestesiadas con Isoflurano 1.5% en una mezcla de aire atmosférico 80%/oxígeno 20%. Y se procedió tal y como se ha descrito en el ejemplo 1. Las ratas se dividieron en tres grupos, un grupo control en el que se ocluyó la arteria cerebral media (MCAO, n=6), un grupo en el que se ocluyó la arteria cerebral media y los animales se sometieron a dos ciclos de diálisis peritoneal con la solución de diálisis elaborada a partir de la composición que está indicada en la Tabla 1 a la que se añadió una concentración de glutamato de 200 $\mu\text{mol/L}$ (MCAO+DP 200 μM ; n=6), un tercer grupo en el que se ocluyó la arteria cerebral media y los animales se sometieron a dos ciclos de diálisis peritoneal con la solución de diálisis elaborada a partir de la composición que está indicada en la Tabla 1 a la que se añadió una concentración de glutamato de 400 $\mu\text{mol/L}$ (MCAO+DP 400 μM ; n=4). A las 24 horas, las ratas fueron sacrificadas para determinar el volumen de infarto, según se ha explicado en el ejemplo 1.

30

Cuando se realiza una diálisis peritoneal cabe esperar que se dialicen todas las sustancias que no están presentes en la solución de dializado. Por tanto,

para verificar si la reducción del volumen de infarto se debía a la reducción de la concentración plasmática de glutamato y no a la de otra sustancia, en la composición de la invención se introdujo glutamato a dos concentraciones diferentes, 200 y 400 μM . Tal como se muestra en la Fig. 7, cuando el glutamato estaba presente en la composición a una concentración de 200 μM todavía se redujo de forma significativa el volumen de infarto con relación al encontrado en las ratas control (MCAO). Cuando en composición se aumentó la concentración de glutamato hasta 400 μM el volumen de infarto fue similar al de las ratas isquémicas control ($24,40 \pm 0,91\%$).

10

Según los resultados mostrados en la Fig. 7 cuando la solución de diálisis peritoneal contiene glutamato a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$ disminuye su capacidad para reducir el volumen de infarto, y es totalmente ineficaz cuando la concentración de glutamato es de 400 $\mu\text{mol/L}$.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de una composición isotónica y tamponada a un pH aceptable
5 fisiológicamente en la elaboración de una solución de diálisis para el
tratamiento de una enfermedad cerebrovascular mediante diálisis peritoneal.

2.-Uso según la reivindicación 1 en donde la composición comprende unas
concentraciones de electrolitos de 110 a 150 mEq/L de ión sodio, de 0 a 5
10 mEq/L de ión potasio, de 0 a 2 mEq/L de ión magnesio, de 0 a 6 mEq de ión
calcio y de 80 a 150 mEq/L de ión cloruro.

3.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el pH está entre 6
y 7,5 y se tampona mediante una mezcla de ácido láctico y fosfato.

15

4.- Uso según la reivindicación 3 en que la concentración de ácido láctico es
de 0 a 3,5 mmol/L.

5.- Uso según la reivindicación 4 en que la concentración de fosfato es de 10
20 mmol/L.

6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en que la
composición contiene una concentración de glucosa entre 0,5 y 2,0 g/L.

25 7.- Uso según la reivindicación 6, en que la concentración de glucosa es de
0,75 g/L.

8.- Uso según la reivindicación 6, en que la concentración de glucosa es de
1,5 g/L.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en que la composición contiene una concentración de glutamato igual o inferior a 200 μ M.

5 10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en que la composición contiene dextrina.

11.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la enfermedad cerebrovascular es la isquemia cerebral.

10

12.- Uso según la reivindicación 9, donde la isquemia cerebral es aguda o crónica y es una de las siguientes enfermedades: ataque isquémico transitorio, traumatismo craneoencefálico, ictus cerebral isquémico o ictus cerebral hemorrágico.

FIG. 1

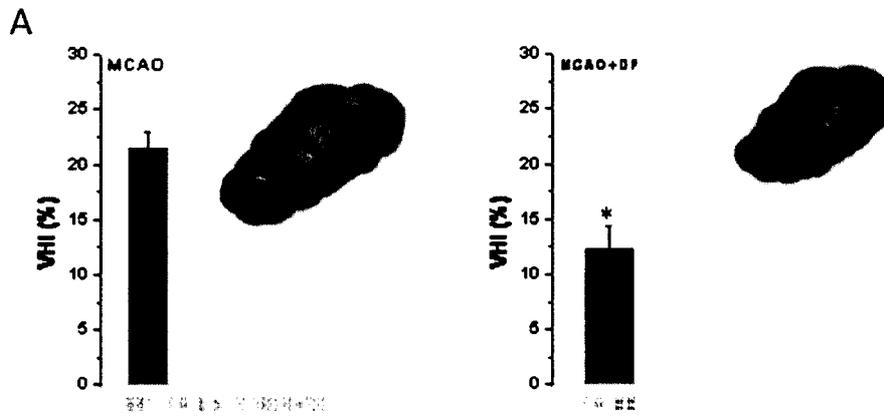
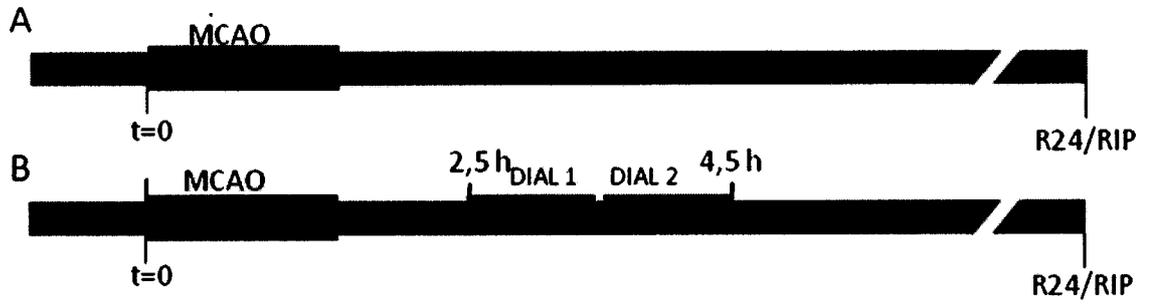


FIG. 2

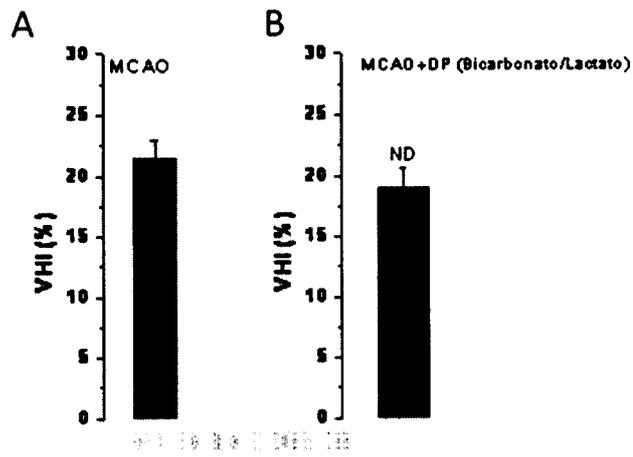
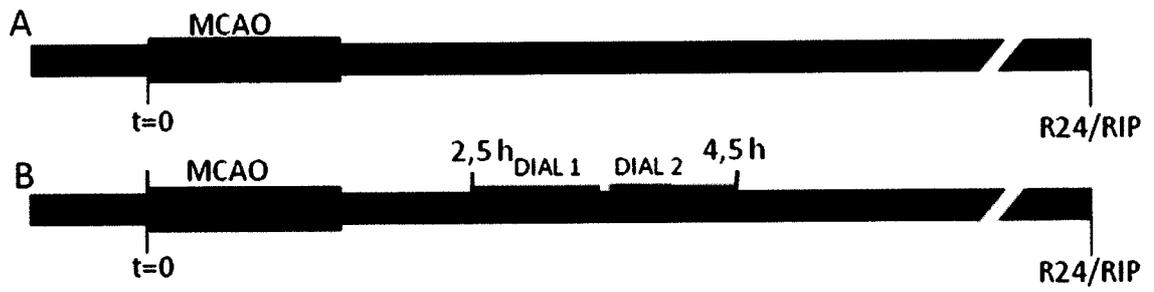


FIG. 3

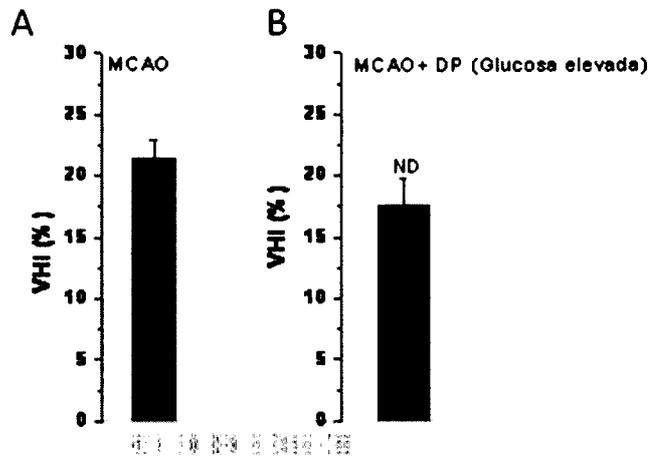
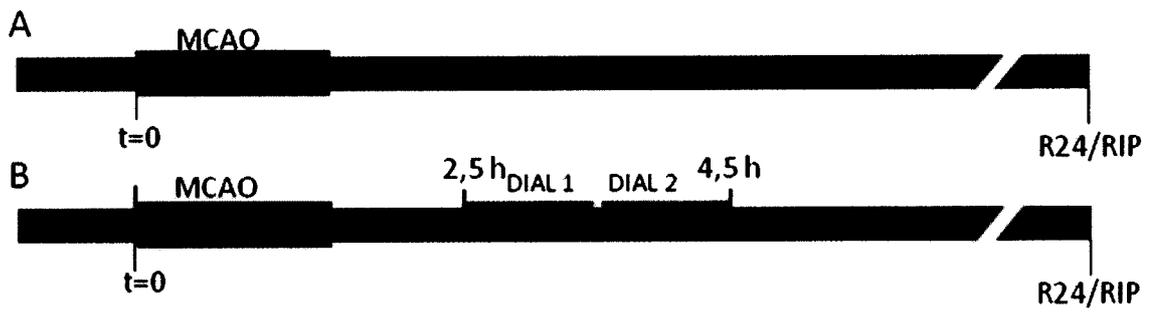


FIG. 4

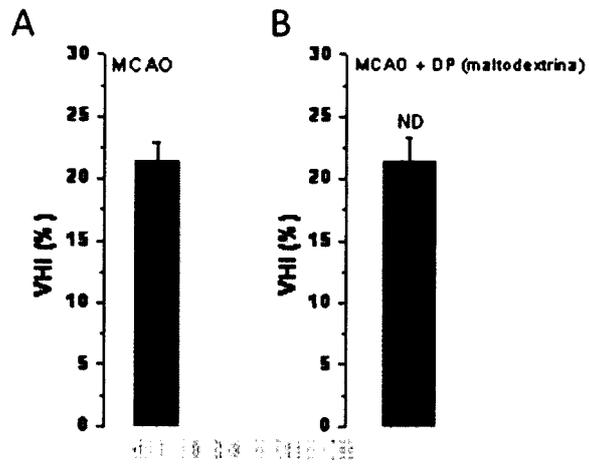
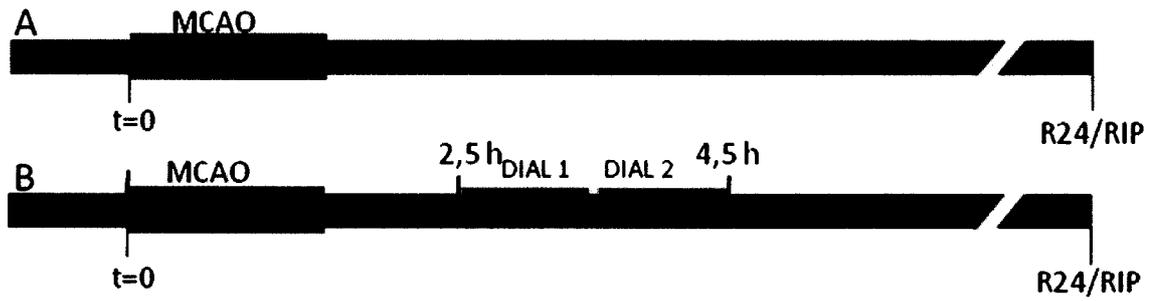


FIG. 5

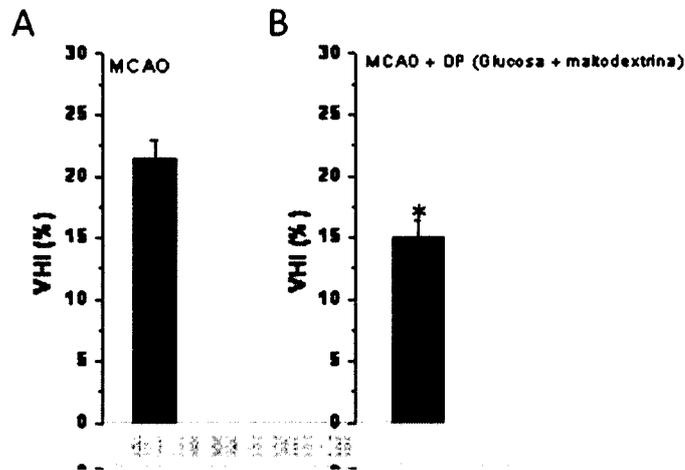
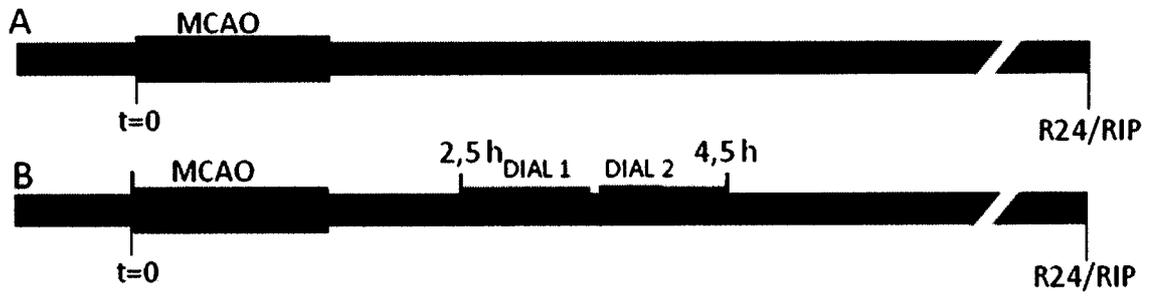


FIG. 6

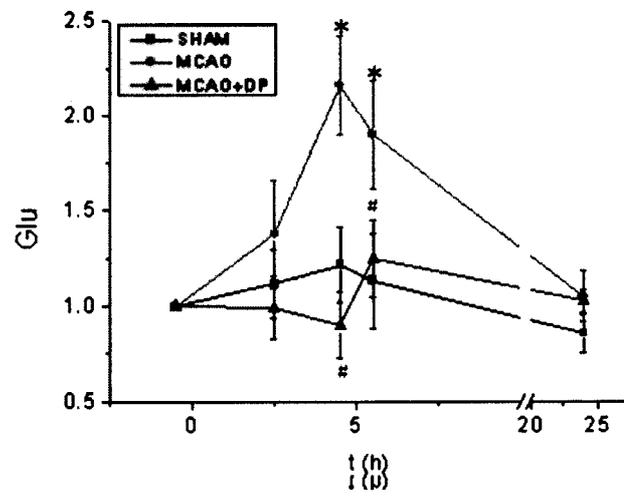
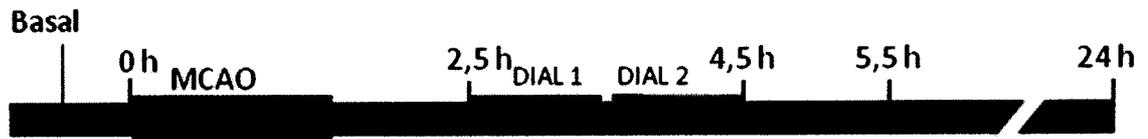
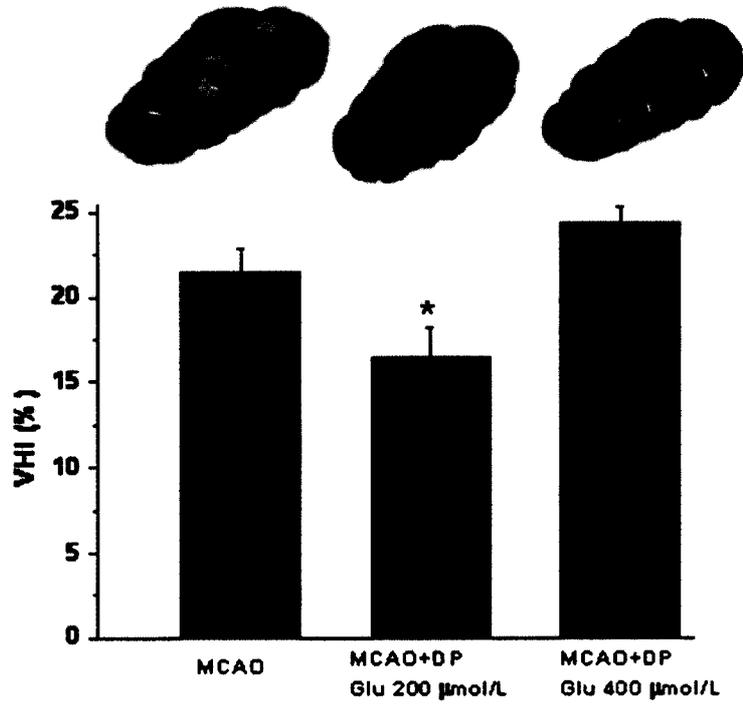


FIG. 7





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100829

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20090232908 A1 (ZHOU, F.) 17.09.2009, párrafos [0003]-[0004],[0056],[0086].	1-12
A	WO 2004096204 A1 (INNOGENE KALBIOTECH PTE LTD) 11.11.2004, párrafos [0001],[0005],[0014]-[0017],[0019],[0027].	1-12
A	WO 2009152070 A2 (SHETTY, A.) 17.12.2009, páginas 6-7,12; reivindicaciones.	1-12
A	EP 1690857 A1 (TOKAI UNIVERSITY EDUCATIONAL SYSTEM) 27.11.2006, párrafo [0015].	1
A	WO 2001026649 A1 (SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.) 19.04.2001, página 1, líneas 4-7; página 10, líneas 13-16; página 17, línea 2 – página 18, línea 2.	1

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
05.03.2012

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K33/06 (2006.01)

A61K31/7004 (2006.01)

A61K31/198 (2006.01)

A61K31/718 (2006.01)

A61P7/08 (2006.01)

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

A61K, A61P

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, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	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 se publica.

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 20090232908 A1	17.09.2009
D02	WO 2004096204 A1	11.11.2004
D03	WO 2009152070 A2	17.12.2009

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

El objeto de la invención es el uso de una composición isotónica y tamponada a un pH aceptable fisiológicamente en la elaboración de una solución de diálisis para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular mediante diálisis peritoneal.

El documento D01 divulga una solución acuosa hiperosmótica de cloruro sódico y piruvato sódico que puede utilizarse para el tratamiento del shock inducido por diversas etiologías (ver párrafo [0086]). La solución comprende una serie de electrolitos, como son iones sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro, además de lactato, glucosa y/o aditivos coloidales (ver reivindicaciones), y es útil como fluido de diálisis, incluyendo diálisis peritoneal (ver párrafo [0056]). La presencia de piruvato ejerce un efecto protector de órganos, especialmente para la isquemia tisular o la hipoxia inducida por el shock (ver párrafo [0086]).

La diferencia existente entre la solución de la invención y la divulgada en D01 es la presencia en esta última de piruvato sódico, al que se atribuye el efecto protector (ver párrafos [0003]-[0004]).

El documento D02 divulga el uso de una solución hipertónica de lactato para el tratamiento de desórdenes cerebrales, como son traumatismos e isquemia (párrafos [0001], [0005]). La composición, además de ácido láctico o lactato, comprende iones cloruro, potasio, calcio y sodio, en diversas concentraciones (ver párrafos [0014]-[0017]), y puede contener otros ingredientes, como magnesio y fosfato, y aditivos capaces de incrementar el efecto osmótico, como hidratos de carbono, entre los que se encuentran los derivados de dextrosas (ver párrafo [0019]). Esta composición se administra como un fluido, preferentemente en forma parenteral, por infusión o inyección, para el tratamiento del ictus (ver párrafo [0027]).

Aunque la solución divulgada en el documento D02 comprende electrolitos comunes con la disolución de la invención en concentraciones similares, y también es útil para el tratamiento de enfermedades cerebrales, no se especifica la administración de la misma mediante diálisis peritoneal.

El documento D03 divulga una solución para diálisis peritoneal que comprende tiosulfato sódico y otros electrolitos, como sodio, magnesio, calcio, cloruro y lactato (ver página 12), y su uso para la prevención de enfermedades asociadas a la calcificación, como pueden ser la isquemia cerebral, debido al efecto citoprotector que ejerce el tiosulfato sódico sobre las membranas mesentéricas (páginas 6 y 7).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene su gerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de la composición isotónica y tamponada de la invención en la elaboración de una solución de diálisis para el tratamiento de una enfermedad cerebrovascular mediante diálisis peritoneal.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-12 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.