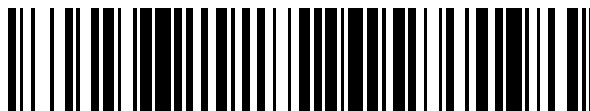


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 230**

21 Número de solicitud: 201101263

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

29.11.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.07.2013

Fecha de la concesión:

28.03.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.04.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**AVD. SENECA, 2
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**LIZASOÁIN HERNÁNDEZ, Ignacio;
MORO SÁNCHEZ, María Ángeles;
HURTADO MORENO, Olivia y
PRADILLO JUSTO, Jesús Miguel**

74 Agente/Representante:

PLUMET ORTEGA, Joaquín

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CEREbroVASCULARES.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un activador de SIRT1 para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular.

ES 2 410 230 B1

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, en particular para el tratamiento de la isquemia cerebral.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) comprenden un conjunto de trastornos de la vasculatura cerebral que conllevan a una disminución del flujo sanguíneo en el cerebro con la consecuente afectación, de forma transitoria o permanente, de la función de una región generalizada del cerebro o de una zona pequeña o focal. Las ECV son la tercera causa de muerte en el mundo desarrollado, y 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 ser hemorrágicas o isquémicas.

La estrategia del tratamiento de la isquemia cerebral en su fase aguda tiene dos objetivos principales: la restauración del flujo sanguíneo cerebral (reperusión) y la limitación del daño neuronal (neuroprotección). La orientación terapéutica más importante en estos pacientes con infarto cerebral consiste en mejorar el flujo sanguíneo cerebral y reducir o bloquear las consecuencias metabólicas a nivel celular y subcelular.

Uno de los objetivos principales de las investigaciones en el tratamiento de la isquemia cerebral es desarrollar fármacos que intervengan en la cascada isquémica y reduzcan la cantidad de tejido dañado. De este modo se podrá obtener un mejor resultado clínico, traducido no sólo en supervivencia, sino también en la mejora de la calidad de vida de los 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 y muy pocos rebasan los criterios de eficacia y seguridad en ensayos clínicos.

5 La CDP-Colina (Citidina Difosfato Colina), también llamada Citicolina, es un precursor esencial para la síntesis de fosfatidilcolina, componente de la membrana celular. La administración exógena de CDP-Colina reduce la destrucción de la membrana celular en modelos experimentales, provocando un aumento de la síntesis de la fosfatidilcolina y una reducción de los niveles de ácidos grasos libres. Se ha demostrado que la citicolina posee efectos
10 neuroprotectores en varios modelos animales de lesión del sistema nervioso central (SNC) incluyendo la isquemia cerebral, aunque el mecanismo neuroprotector de la CDP-Colina no se conoce en toda su extensión. Actualmente, se relaciona este efecto con una reducción de ácidos grasos libres, una menor producción de radicales libres, estabilización de la
15 membrana neuronal, decremento de la toxicidad provocada por el glutamato y un aumento de la supervivencia neuronal. Además, la CDP-colina ha mostrado propiedades beneficiosas en diferentes escenarios, que incluyen traumatismos craneales, trastornos cognitivos, enfermedad de Parkinson, drogadicción, ambliopia, glaucoma, lesión de médula espinal, lesión axonal,
20 lesión de nervio periférico y nocicepción. De modo apreciable, las propiedades de la CDP-colina parecen extenderse incluso a otros escenarios, tales como la regulación de la liberación de insulina, lo que sugiere la implicación de efectos pleiotrópicos desconocidos de esta sustancia.

25 Las sirtuinas, las cuales pertenecen a una familia de desacetilasas dependientes de NAD⁺, han aparecido recientemente como proteínas implicadas en el metabolismo, envejecimiento, resistencia al estrés oxidativo y mantenimiento del genoma. Las sirtuinas modulan la expresión génica de acuerdo con el estado energético de la célula, actuando como sensores de
30 energía de los niveles NAD⁺ mediante la desacetilación de histonas, factores de transcripción y co-reguladores. SIRT1 (primer miembro de esta familia) es una nueva diana terapéutica emergente que está implicada en la regulación del metabolismo, senescencia y cáncer, y que desempeña un papel crucial en las rutas de señalización sensibles al estrés. Diversos planteamientos
35 experimentales han implicado sus acciones beneficiosas en muchas enfermedades, incluyendo las enfermedades metabólicas (diabetes tipo 2,

miopatías mitocondriales), cardiovasculares e inflamatorias, cáncer, neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, entre otras) e ictus.

De acuerdo con lo expuesto, se ha demostrado que la sobreexpresión y/o
5 activación de SIRT1 ralentizan la muerte neuronal in vitro así como la neurodegeneración in vivo. En este contexto, se han descrito varias moléculas que actúan, directamente o indirectamente, aumentando la actividad enzimática desacetilasa de SIRT1. Este es el caso del polifenol natural, resveratrol, conocido desde hace tiempo por promover los efectos
10 protectores sobre las enfermedades cardiovasculares, y del cual también se ha demostrado que es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y ejercer un marcado efecto neuroprotector en varios escenarios patológicos del SNC. Concretamente, en el contexto de la isquemia cerebral, el resveratrol ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos animales, los
15 cuales parecen estar mediados por la activación de SIRT1. Además, se han identificado compuestos activadores de SIRT1 de bajo peso molecular con características in vivo e in vitro semejantes a las del resveratrol, los cuales actúan probablemente sobre las mismas rutas y son 1000 veces más potentes.

20
El documento WO0238141 describe un método para el tratamiento de trastornos cognitivos leves (alteraciones de la memoria relacionadas con la edad) y síntomas relacionados (Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas) así como la isquemia cerebral, que comprende la
25 administración de un agente serotoninérgico, en particular, resveratrol. Aunque dicho documento menciona que dicho compuesto se puede administrar junto con otros compuestos activadores de la memoria, en la parte experimental sólo se demuestra el uso de resveratrol a distintas dosis para el tratamiento de la demencia asociada a la edad (MCI).

30

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han demostrado que la CDP-colina y el activador de SIRT1, resveratrol, poseen sorprendentemente un potente efecto sinérgico que lleva hasta reducciones del 60% del volumen de infarto en un
35 modelo animal de isquemia cerebral, cuando se emplean conjuntamente a dosis individualmente sub-efectivas de dichas sustancias.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una combinación de (i) una cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un
5 activador de SIRT1 junto uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular.

En una realización particular, dicho activador de SIRT1 se selecciona del
10 grupo formado por resveratrol, 3,4,5-trimetoxi-N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)benzamida, N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalin-2-carboxamida, (R)-N-(2-(3-(3-hidroxi-
pirrolidin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-naftamida.

15 En una realización particular de la invención, dicha enfermedad cerebrovascular es la isquemia cerebral. Más particularmente, dicha isquemia cerebral es isquemia cerebral aguda o crónica. En una realización preferida, dicha isquemia cerebral es ataque isquémico transitorio, traumatismo craneoencefálico o ictus cerebral.

20

En otra realización particular de la invención, dicha composición se administra de forma separada, simultánea o secuencial.

En un caso particular, dicho medicamento es para la administración por vía
25 oral. En otro caso particular, dicho medicamento es para la administración por vía parenteral.

En otra realización particular, la dosis de citicolina o sal farmacéuticamente aceptable es de entre 100 mg y 5000 mg al día. En una realización más
30 particular, la dosis de citicolina o sal farmacéuticamente aceptable es de entre 500 mg y 2000 mg al día. En otra realización de la invención, la dosis de dicho activador de SIRT-1 es de entre 0,1 mg a 500 mg al día. Más particularmente, la cantidad de activador de SIRT-1 es de entre 1 mg a 500 mg.

35

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una combinación de (i) una cantidad

terapéuticamente efectiva de citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular.

5

En una realización particular, dicho activador de SIRT1 se selecciona del grupo formado por resveratrol, 3,4,5-trimetoxi-N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)benzamida, N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalin-2-carboxamida, (R)-N-(2-(3-((3-hidroxi-pirrolidin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-naftamida.

10

En otra realización particular, dicha enfermedad cerebrovascular es isquemia cerebral.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto de CDP-colina sobre el volumen de infarto después de oclusión de la arteria cerebral media (OACM o MCAO)

20 Se expusieron las ratas a una OACM permanente durante 48 horas y se cuantificaron los volúmenes de infarto (ver Materiales y Métodos) en secciones coronales en serie teñidas con TTC. Los datos son medias \pm SEM, n=6; *P<0.05).

25 **Figura 2: Efecto de CDP-colina sobre los niveles de SIRT1 en homogenados de cerebro de rata después de OACM.**

(A) Inmunoblot representativo mostrando la expresión de la proteína SIRT-1 en tejido cortical peri-infarto de animales SHAM y OACM y el efecto del tratamiento con CDP-colina. Se normalizó la carga de proteína determinando β -actina. (B) Análisis densitométrico de la proteína SIRT-1 de 3 ensayos independientes. Los datos representan media \pm SEM; *P<0.05 vs SHAM; #p<0.05 vs. SHAM o MCAO (OACM).

35 **Figura 3: Efecto de CDP-colina sobre los niveles (A,B) y actividad (C) de la proteína SIRT1 en neuronas corticales cultivadas de ratas.**

(A) Inmunoblot representativo mostrando la expresión de SIRT-1 en extractos citosólicos y nucleares (ver Métodos). Se normalizó la carga de proteína

determinando Sp-1. (B) Análisis densitométrico de la proteína SIRT-1 de 3 ensayos independientes. Los datos son media±SEM, *P<0.05 vs Control nuclear. (C) La actividad enzimática de SIRT-1 se determinó en extractos totales, nucleares y citosólicos 24 h después del tratamiento con CDP-colina.
5 Los datos son media±SEM, *P<0.05 vs control total y nuclear.

Figura 4: Efecto de CDP-colina sobre los niveles de la proteína SIRT1 en células mononucleares de ratas.

(A) Inmunoblot representativo mostrando la expresión de SIRT-1 en células mononucleares (ver Métodos). Se normalizó la carga de proteína determinando GAPDH. (B) Análisis densitométrico de la proteína SIRT-1 de 3 ensayos independientes. Los datos son media±SEM, *P<0.05 vs Control.
10

Figura 5. Efecto sinérgico de CDP-colina y el activador de SIRT1, resveratrol, sobre el volumen de infarto después de OACM en ratas.

15 ANOVA<0,0001. #p<0.01 vs CDP 200mg/kg; Resveratrol 2.5mg/kg. *p<0.001 vs control; Post-hoc test: Bonferroni

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención se refiere a combinaciones terapéuticas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cerebrovasculares (ECV), en particular, para el tratamiento de la isquemia cerebral, que comprenden citicolina y un activador de SIRT1 a dosis fijas que son adaptables a las dosis requeridas por pacientes de forma individual o determinados subgrupos de
25 población.

Según se ha mencionado anteriormente, los autores de la presente invención han observado que una composición que comprende la combinación (i) CDP-colina y (ii) un activador de SIRT1, diferente de citicolina, por ejemplo,
30 resveratrol, muestra, sorprendentemente, un potente efecto sinérgico tras su administración conjunta en modelos animales de isquemia cerebral que produce unas reducciones del 60% del volumen de infarto después de la OACM (oclusión de la arteria cerebral media).

35 Por tanto, la presente invención se relaciona en un primer aspecto con una composición farmacéutica, de aquí en adelante denominada "composición farmacéutica de la invención", que comprende una combinación de (i) una

cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 junto uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular. En una realización preferida de la invención, dicha enfermedad es la isquemia cerebral.

Por tratamiento profiláctico o preventivo se entiende cuando la composición de la invención se administra antes de la posible aparición de la isquemia. En otra realización particular de la invención, ésta se refiere al uso de la composición de la invención para prevenir la extensión del tejido cerebral dañado. De acuerdo con un aspecto más específico, ésta se refiere al uso de la composición de la invención cuando el tejido cerebral dañado y en particular el infarto cerebral está asociado con la isquemia cerebral.

Como se ha mencionado anteriormente, el término "enfermedad cerebrovascular o ECV" tal como aquí se emplea, se refiere a un conjunto de trastornos de la vasculatura cerebral que conllevan a una disminución del flujo sanguíneo en el cerebro con la consecuente afectación, de forma transitoria o permanente, de la función de una región generalizada del cerebro o de una zona pequeña o focal.

El término "isquemia cerebral", tal como aquí se utiliza, consiste en un episodio isquémico cerebral que puede definirse como una reducción de la aportación de sangre a un tejido. La isquemia cerebral puede ser causada por una disminución o interrupción de la aportación de sangre desde la arteria que irriga el cerebro. La isquemia cerebral puede ser aguda o crónica. Por tanto, en una realización particular de la invención, dicha isquemia cerebral incluye isquemia cerebral aguda e isquemia cerebral crónica. En una realización más particular, es un ataque isquémico transitorio, traumatismo craneoencefálico o ictus cerebral.

El término "ataque isquémico transitorio", tal como aquí se utiliza, se refiere a un episodio cerebrovascular de tipo isquémico que se produce por la falta de aporte sanguíneo a una parte del cerebro, de forma transitoria, desapareciendo los síntomas, por definición, antes de 24 horas, generalmente antes de 1 hora. Durante un ataque isquémico transitorio, la

interrupción temporal del suministro sanguíneo a un área del cerebro ocasiona una reducción breve y repentina en la función cerebral.

5 En la presente invención, los términos “CDP-Colina”, “citidina difosfato colina” o “citicolina” se usan indistintamente. Como se ha mencionado anteriormente, la citicolina o CDP-colina, un intermedio en la biosíntesis de la fosfatidilcolina, ha demostrado poseer efectos neuroprotectores en varios modelos animales de lesión del SNC incluyendo la isquemia cerebral.

10 Por otra parte, el término “SIRT 1” tal como aquí se emplea, se refiere a la sirtuina 1. SIRT1 es una sirtuina implicada en la regulación del metabolismo, senescencia, cáncer, y que desempeña un papel crucial en las rutas de señalización sensibles al estrés. Se ha visto que la sobreexpresión y/o activación de SIRT1 ralentizan la muerte neuronal in vitro así como la
15 neurodegeneración in vivo.

Así, en una realización particular de la presente invención, la composición de la presente invención, que comprende citicolina y un activador de SIRT1, se usa como medicamento para el tratamiento de enfermedades
20 neurodegenerativas, tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. En otra realización particular de la invención, la composición de la invención se usa para el tratamiento de trastornos neurológicos, diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento o la edad.

25 El término “activador de SIRT1” tal como aquí se menciona, se refiere a cualquier molécula que directa o indirectamente active dicha sirtuina 1, tanto a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional o postraduccional. Se han descrito en la literatura varias moléculas que actúan, directa o
30 indirectamente, aumentando la actividad enzimática desacetilasa de SIRT1. Este es el caso del polifenol natural, resveratrol, conocido desde hace tiempo por promover los efectos protectores sobre las enfermedades cardiovasculares, y del cual también se ha demostrado que es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y ejercer un marcado efecto
35 neuroprotector en varios escenarios patológicos del SNC. Así, a modo ilustrativo, el resveratrol se une directamente a SIRT1 promoviendo un cambio conformacional en la enzima. Recientemente, se han descrito otras

pequeñas moléculas como activadores potentes de SIRT1 (Milne et al, 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. Nature, 450: 712-6). Algunas de dichas moléculas se están ensayando en clínica para el tratamiento de diabetes y enfermedades oncológicas, enfermedades relacionadas con la edad y la enfermedad de Alzheimer (www.sirtrispharma.com/pipeline.html).

Así, en una realización particular de la invención, dicho activador de SIRT1 se selecciona del grupo formado por resveratrol, 3,4,5-trimetoxi-N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)benzamida, N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalin-2-carboxamida, (R)-N-(2-(3-((3-hidroxi-pirrolidin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-naftamida.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la composición de la invención comprende como uno de sus componentes citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Como sales farmacéuticamente aceptables de la CDP-Colina, se encuentran sus sales de adición básicas, en particular las sales alcalinas o alcalinotérreas, tales como sus sales de sodio, potasio, calcio y magnesio, o bien sus sales con ácidos minerales u orgánicos, como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido acético, el ácido trifluoroacético, el ácido cítrico, el ácido láctico, el ácido malónico, el ácido tartárico, el ácido acrílico, el ácido metacrílico, el ácido málico, el ácido maleico, el ácido fumárico, el ácido benzoico, el ácido salicílico, el ácido cinámico, el ácido metansulfónico, el ácido bencenosulfónico, el ácido p-toluensulfónico y el ácido nicotínico.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) un activador de SIRT1, ambos en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficiente" se refiere a la cantidad de citicolina y activador de SIRT1 calculada para producir el efecto deseado. La dosis de los componentes (i) e (ii) a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de citicolina y activador de SIRT1 utilizada, e.g., su actividad y vida media biológica, la concentración en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica

de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o con otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.

- 5 En una realización particular de la invención, los componentes de la composición de la invención se administran de de forma separada, simultánea o secuencial.

10 En otra realización particular de la invención, dicho medicamento es para la administración por vía oral. Así, la composición de la invención puede administrarse para la puesta en práctica de la presente invención por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, sellos, pastillas para chupar, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, geles y afines. En otra realización particular, la composición se administra por vía parenteral en
15 forma de soluciones, suspensiones, emulsiones o afines para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular. También se contemplan fórmulas para su inhalación o administración intranasal.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes saborizantes, edulcorantes, etc., en vehículos o diluyentes sólidos o líquidos adecuados, o en medios estériles adecuados para formar suspensiones o soluciones adecuadas para inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular. Dichas composiciones contienen normalmente de un 1 a un 40%, preferiblemente de un 1 a un 10% en peso del compuesto activo, siendo el resto de la
25 composición vehículos, diluyentes, disolventes y similares farmacéuticamente aceptables.

30 La citicolina se administra preferiblemente de forma oral como una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. La sal preferida es la sal monosodio de citicolina, ya que esta forma está normalmente disponible con una pureza aceptable desde el punto de vista farmacéutico. El monosodio de citicolina es una forma de exógeno de citidina 5'cc, difosfato de colina (CDP-colina). El endógeno CDP-colina es un intermediario clave en la biosíntesis de la fosfatidilcolina, un componente lipídico primario de la membrana
35 involucrado en la regulación dinámica de la integridad celular.

Las dosis de citicolina se suministran según una base por paciente (oscilando entre aproximadamente 45 kg hasta 100 kg por paciente, o una media de 70 kg por paciente). Generalmente, las dosis diarias de citicolina pueden variar desde aproximadamente 100 mg hasta unos 5000 mg, preferiblemente desde 5 250 mg hasta 3000 mg, y más preferiblemente desde 500 mg hasta 2000 mg. Las dosis pueden ser administradas una sola vez o hasta cuatro o más veces al día. Una dosis altamente preferida es de 500 mg administrados dos veces al día a cada paciente. Si se requiere una mayor eficacia terapéutica se recomienda una administración de 2000 mg en una sola toma o repartida en 10 dos tomas de 1000 mg.

La duración del tratamiento es variable, pero se ha observado que los pacientes toleran bien la citicolina en dosis comprendidas entre los 250 mg y los 2000 mg aproximadamente en periodos prolongados, es decir, desde 15 varias semanas hasta varios años. Las dosis deben variar a lo largo del tiempo dependiendo de la gravedad de los síntomas, de la tolerancia individual de cada paciente, ruta de administración y respuesta al tratamiento. Éste puede ser continuado de forma indefinida si se tolera bien.

20 En otra realización particular de la invención, la cantidad de dicho activador de SIRT-1, en particular, la dosis de resveratrol a administrar en la composición de la invención es de entre 0,1 mg a 500 mg. Más preferiblemente, la cantidad de activador de SIRT-1 a administrar es de entre 1 mg a 500 mg.

25 Además de contener los portadores y/o excipientes farmacéuticos estándar, en una realización particular de la invención, la composición de la invención también puede contener otras sustancias terapéuticas activas. Así, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el 30 tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares, en particular, de la isquemia cerebral, con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden 35 facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos

diferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende una combinación de (i) una cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular, en particular, para el tratamiento de la isquemia cerebral.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares, en particular, de la isquemia cerebral, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficiente de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención que comprende citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un activador de SIRT1.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, tal como "comprendiendo", no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes con el examen de la descripción o se pueden conocer por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de isquemia cerebral focal permanente en rata

Los ensayos se efectuaron en ratas Fischer macho de peso 250–300g. Las ratas fueron anestesiadas con halotano 1.5% en una mezcla de nitrógeno 70%/oxígeno 30%. Se insertó una cánula en la arteria femoral para la monitorización continua de la presión y la toma de muestras de sangre para el análisis de pH, gases y glucosa. Las temperaturas corporales y cerebrales se mantuvieron a $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante todo el proceso. Las variables fisiológicas estudiadas no fueron significativamente diferentes entre los grupos de animales antes, durante o después de la oclusión de la arteria cerebral media

(OACM o MCAO) (datos no presentados). La isquemia cerebral focal permanente fue inducida por ligadura de la arteria carótida común izquierda (ACC) y oclusión de la arteria cerebral media distal ipsilateral (ACM) tal como se ha descrito anteriormente (Hurtado et al., 2008. Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke. *Neurobiol Dis* 2008. 29:123–131). En resumen, para la ligadura de la ACC, se efectuó una incisión cervical ventral longitudinal y se aisló la ACC ipsilateral ocluyéndola permanentemente con una ligadura de hilo de seda. Después, se realizó una pequeña craniotomía sobre el tronco de la ACM y encima de la fisura rinal. En algunos ensayos, para la oclusión, la ACM se elevó y se cauterizó (oclusión de la arteria cerebral media; OACM). Por otra parte, en los ensayos dirigidos al estudio de la sinergia entre CDP-colina y resveratrol, la ACM se ligó con una sutura 9-0 justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal. A continuación, también se ocluyó la ACC con una ligadura de hilo de seda y se confirmó la interrupción completa del flujo sanguíneo en un microscopio quirúrgico. Finalmente, una hora después, se reabrió la ACC contralateral.

Las ratas en la cuales la ACM estaba expuesta pero no ocluida sirvieron como controles con intervención simulada (SHAM). Después de la intervención quirúrgica, los animales fueron devueltos a sus jaulas y tuvieron libre acceso a la comida y a la bebida. La temperatura corporal de los animales se monitorizó durante toda la experimentación y se mantuvo a $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ empleando una manta térmica. Todos los procesos cumplieron con los criterios del Comité del Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con las Normas UE (86/609/CEE, 2003/65/CE y RD 1201/2005). El índice de supervivencia de los animales hasta el final de la experimentación fue del 90%.

30

Grupos experimentales en isquemia cerebral focal

La CDP-colina fue administrada por inyección intraperitoneal (i.p.). Se establecieron dos series de ensayos:

En la primera serie, se utilizaron cuatro grupos de animales para los estudios proteómicos y su confirmación por medio de la prueba Western Blot: 1) animales controles con intervención simulada, sacrificados 24 horas después de la simulación (SHAM; n=4); 2) animales controles con intervención

simulada + CDP-colina 2 g/kg (administrados 4 horas después de la intervención) y sacrificados 24 horas después de la administración (SHAM + CDP-colina; n=4); 3) animales con oclusión permanente de la arteria cerebral media + inyección i.p. de solución salina 4 horas después de la oclusión, sacrificados 24 h después de la administración de la solución salina (OACM; n=4); 4) animales con OACM permanente + inyección i.p. de CDP-colina 2 g/kg 4 horas después de la oclusión, sacrificados 24 horas después de la administración de citicolina (OACM+CDP-colina; n=4). Adicionalmente, para la determinación del volumen de infarto, los animales con el mismo protocolo de tratamiento fueron sacrificados 48 horas después de la oclusión (OACM; n=6; OACM+CDP; n=6).

En la segunda serie de ensayos dirigidos al estudio del efecto sinérgico entre CDP-colina y los activadores de SIRT1, se utilizaron cuatro grupos de animales para la determinación del volumen de infarto: 1) animales con OACM + inyección i.p. de solución salina 10 minutos y 3 horas después de la OACM (OACM; n=8); 2) animales con OACM + CDP-colina (0.2g/kg 10 minutos después de la OACM; n=6); 3) animales con OACM + el activador de SIRT1, resveratrol (2.5 mg/kg 3h después de la OACM; n=7); 4) animales con OACM+CDP-colina+resveratrol (0.2 g/kg CDP-colina 10 minutos y 2.5 mg/kg de resveratrol 3 horas después de OACM; n=6).

Estudio proteómico

Se emplearon tres métodos proteómicos diferentes: proteómica clásica, método DIGE más MALDI-TOF y proteómica de expresión diferencial con marcaje iTRAQ más LC/MS/MS, en el Centro de Apoyo a la Investigación en Genómica y Proteómica de la UCM.

Determinación del tamaño del infarto

Dos días después de la OACM, se sacrificaron los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico para valorar la consecuencia del infarto. Se extrajo el cerebro y se cortaron porciones de 2 mm de espesor para obtener cortes coronales de 1 mm (Brain Matrix, WPI, UK) que se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (1% TTC en tampón fosfato 0.1 M). Se calcularon los volúmenes de infarto tomando 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 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, y se expresó en milímetros cuadrados. Se integraron los volúmenes de infarto (en mm³ o en % de hemisferio infartado –VHI-) a partir 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 incluía la corteza, subcorteza y estriado, dependiendo de la intensidad de la lesión.

Cultivo primario de neuronas corticales de ratas

Los cultivos primarios de neuronas corticales de ratas se han realizado según está descrito (Romera et al., 2004. *In vitro* ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-TNF- α pathway, *J. Neurosci.* 24, 1350-7). Los estudios se efectuaron *in vitro* a los días 9–10, tiempo en el cual los cultivos estaban compuestos del 94% de neuronas, tal como se ha determinado por citometría de flujo (Romera et al., 2004, citado supra).

Análisis por Western Blot

Se recogió tejido cerebral del área peri-infarto de las ratas (n=4 para cada grupo) sacrificadas 24 horas después de la OACM. La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría (NanoDrop ND1000). Cantidades iguales de proteína total (10 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (HybondTM-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania). La inmunodetección se efectuó por procedimientos estándares. Se bloquearon las membranas con 5% de leche desnatada en TBS-T (0.05% Tween 20 en TBS) y se sondaron con anticuerpos primarios específicos contra SIRT1 (Santa Cruz; 1:100 dilución, banda 120 kDa) y se incluyeron anti- β -actina de ratón (Sigma; 1:10000) y anti GAPDH de ratón (Sigma; 1:10000) para normalizar la carga de proteína. Las proteínas reconocidas por el anticuerpo se revelaron utilizando el kit ECL según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania).

Aislamiento de los extractos nucleares

Se recogieron las neuronas corticales de ratas cultivadas 24 horas después del tratamiento con 100 μ M de CDP-colina en solución salina tamponada con fosfato (106 células/mL). El homogeneizado se centrifugó a 4°C, 12.000 x g. Se descartó el sobrenadante y los extractos nucleares se prepararon tal como se describe: se homogeneizaron células neuronales corticales de ratas en 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, y 0.5% Nonidet P-40. Los núcleos se sedimentaron a 12.000 x g durante 1 minuto a 4°C y sometidos a lisis en 20 mM HEPES, pH 7.9, 15 mM MgCl₂, 420 mM NaCl y 0.2 mM EDTA. Después de centrifugación (12.000 g x durante 5 minutos a 4°C), el pellet se descartó.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica de ratas

24 horas después de la administración de 2 g/kg de CDP-colina en ratas Fischer, se recogieron muestras de sangre en un tubo de centrifuga con 2 ml de sangre tratada con anticoagulante y un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (pH 7.6). Se añadió Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia) al tubo de centrifuga y se colocaron con cuidado en capas las muestras de sangre diluida en Ficoll-Paque Premium. La muestra se centrifugó a 400 x g durante 20 minutos a 20°C y la capa de células mononucleares se transfirió a un tubo de centrifuga estéril. Las células mononucleares se suspendieron en un tampón de homogeneización y se mezclaron con tampón de muestra de electroforesis para el análisis Western Blot.

Determinación de la actividad de SIRT1

Para determinar la actividad SIRT1, 24 horas después de la administración de 100 μ M de CDP-colina se recogieron neuronas corticales cultivadas, y se analizaron los extractos totales, nucleares y citosólicos. Se recogieron las células después de la administración de CDP-colina, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4) y se homogeneizaron en tampón homogeneizador (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, y 0.5% Nonidet P-40). Los núcleos se sedimentaron a 12.000 x g durante 1min a 4°C y se lisaron en 20 mM HEPES, pH 7.9, 15 mM MgCl₂, 420 mM NaCl y 0.2 mM EDTA.

Tras una centrifugación (12,000 x g durante 5 minutos a 4°C), el pellet se descartó. El sobrenadante obtenido al final de la centrifugación se dializó utilizando un aparato Millipore Amicon Ultraconcentrator (YM-10) (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). El dializado resultante se conservó a -80°C hasta su empleo. Dicho la capa de las células mononucleares se utilizó como fuente del enzima para el ensayo enzimático de SIRT-1. La actividad enzimática de SIRT-1 se determinó utilizando un kit de ensayo de actividad por fluorescencia de SIRT1 (Biomol International) basado en el péptido sustrato Fluor de Lys-SIRT1.

10

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SEM del número indicado de ensayos. Las comparaciones entre los grupos de animales se efectuaron con el test-t de Student no pareado o la prueba ANOVA de un factor con la prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados se consideraron significativos a $p < 0.05$.

15

RESULTADOS

Confirmación del efecto de CDP-colina sobre el volumen de infarto después de la OACM

20

El volumen de infarto se determinó 48 horas después de la oclusión en los animales tratados con solución salina o con CDP-colina 2 g/kg 4 horas después de la oclusión. El volumen de infarto determinado 48 horas después de la OACM mostró una reducción en el grupo tratado con CDP-colina (Figura 1). Estas condiciones de neuroprotección se seleccionaron para el estudio.

25

Estudio proteómico en cerebro de ratas control y ratas tratadas con CDP-colina después de la exposición a la OACM permanente

Con las tres técnicas proteómicas empleadas se han identificado varias proteínas que experimentaron cambios $>20\%$, entre las cuales se seleccionó SIRT1, la cual fue aumentada por CDP-colina en el cerebro tanto de ratas controles con intervención simulada (SHAM) como de las expuestas a OACM.

30

Confirmación por el análisis Western Blot del aumento inducido por CDP-colina en los niveles de SIRT1 en homogenados de cerebro de rata

35

A fin de confirmar que la CDP-colina es capaz de aumentar los niveles de SIRT1, se determinó la presencia de esta proteína por medio de análisis

Western Blot en homogenados de cerebro. Tal como muestra la Figura 2, los niveles de proteínas de SIRT1 aumentaron después de la OACM. Más especialmente, la CDP-colina aumentó dichos niveles tanto en las ratas controles con intervención simulada (SHAM) como de las expuestas a OACM.

5

CDP-colina aumentó los niveles de SIRT1 en las fracciones nucleares y citosólicas de neuronas corticales cultivadas de rata

Se ha descrito que la localización subcelular de SIRT1, aunque referida principalmente como nuclear, podría cambiar en respuesta a diferentes estímulos, lo que podría implicar un mecanismo regulador de dicha proteína. Se ha estudiado si la CDP-colina afecta la expresión y la localización subcelular de SIRT1 en neuronas corticales de rata tratadas durante 24 horas con CDP-colina. El tratamiento de neuronas corticales cultivadas con CDP-colina (100 μ M) aumentó los niveles de SIRT1 en dichas células, localizándose este aumento principalmente en la fracción nuclear de dichas células (Fig. 3A, B).

Actividad de SIRT1 en las fracciones nucleares y citosólicas de neuronas corticales cultivadas de ratas tratadas con CDP-colina

Los resultados aquí mostrados indican que la CDP-colina aumenta la expresión de SIRT1 tanto en homogenados de cerebro como en extractos nucleares de neuronas corticales de ratas. Posteriormente se determinó si esta expresión aumentada estaba correlacionada con un aumento en la actividad enzimática de SIRT1, en los extractos totales, nucleares y citosólicos de neuronas corticales de ratas tratadas durante 24 horas con CDP-colina (100 μ M). Los resultados demuestran que, de acuerdo con los niveles de expresión de SIRT1, la CDP-colina aumentó significativamente la actividad de SIRT1 en los extractos totales y nucleares de dichas células (Fig. 3C).

30

CDP-colina aumentó los niveles de SIRT1 en células mononucleares

A continuación, se examinó si la CDP-colina podría afectar la expresión proteica de SIRT1 no sólo en el cerebro de ratas y neuronas cultivadas, sino también en otras células, tal como las células mononucleares de sangre periférica. Los resultados muestran que los niveles de expresión proteica de SIRT1 fueron significativamente superiores en las células mononucleares

circulantes de ratas tratadas con CDP-colina, cuando se comparó con las ratas control (Fig. 4).

Efecto sinérgico entre CDP-colina y el activador de SIRT1 resveratrol

5 Debido a que se ha demostrado que la CDP-colina aumenta la expresión proteica de SIRT1, se analizó si esta sustancia podría exhibir efectos sinérgicos con otros compuestos que actúan como activadores de la actividad enzimática de SIRT1. Por tanto, se estudió el efecto de la asociación de dosis sub-efectivas de CDP-colina (200 mg/kg) y del activador de SIRT1, 10 resveratrol (2.5 mg/kg). Los datos muestran (Fig. 5) que la asociación de estas dos sustancias posee un notable efecto sinérgico demostrado en forma de una reducción del 60% en el volumen de infarto después de la OACM.

DISCUSIÓN

15 En la presente invención se ha demostrado que la CDP-colina aumenta la expresión de SIRT1 en cerebro de rata in vivo tanto de animales control como expuestos a OACM de forma concomitante a su efecto neuroprotector, e in vitro en células mononucleares de sangre circulante, y en neuronas corticales cultivadas de rata. Considerando las acciones beneficiosas de SIRT1 en el 20 SNC, los resultados sugieren firmemente que esta enzima está implicada en los efectos neuroprotectores inducidos por CDP-colina. Además, los resultados presentes demuestran por primera vez un potente efecto sinérgico con un activador de SIRT1, resveratrol.

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de (i) una cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 junto uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso como medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular.
5
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, donde dicho activador de SIRT1 se selecciona del grupo formado por resveratrol, 3,4,5-trimetoxi-N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)benzamida, N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalin-2-carboxamida, (R)-N-(2-(3-((3-hidroxi-pirrolidin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-
15 naftamida.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, donde dicha enfermedad cerebrovascular es la isquemia cerebral.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, donde dicha isquemia cerebral es isquemia cerebral aguda o crónica.
5. Composición según la reivindicación 4, donde dicha isquemia cerebral es ataque isquémico transitorio, traumatismo craneoencefálico o ictus cerebral.
25
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha composición se administra de forma separada, simultánea o secuencial.
- 30 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho medicamento es para la administración por vía oral.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho medicamento es para la administración por vía parenteral.
35
9. Composición según la reivindicación 1 a 8, donde la dosis de citicolina o sal farmacéuticamente aceptable es de entre 100 mg y 5000 mg al día.

10. Composición según la reivindicación 9, donde la dosis de citicolina o sal farmacéuticamente aceptable es de entre 500 mg y 2000 mg al día.
- 5 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la dosis de dicho activador de SIRT-1 es de entre 0,1 mg a 500 mg al día.
12. Uso de una composición farmacéutica que comprende una combinación de (i) una cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina o una
10 sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular.
- 15 13. Uso según la reivindicación 12, donde dicho activador de SIRT1 se selecciona del grupo formado por resveratrol, 3,4,5-trimetoxi-N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)benzamida, N-(2-(3-(piperazin-1-ilmetil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)quinoxalin-2-carboxamida, (R)-N-(2-(3-((3-hidroxirolindin-1-il)metil)imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)fenil)-2-
20 naftamida.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde dicha enfermedad cerebrovascular es isquemia cerebral.

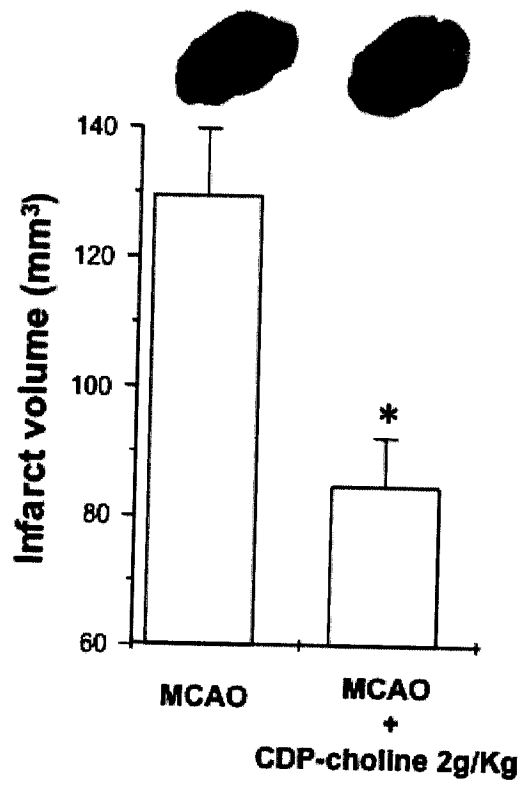


Figura 1

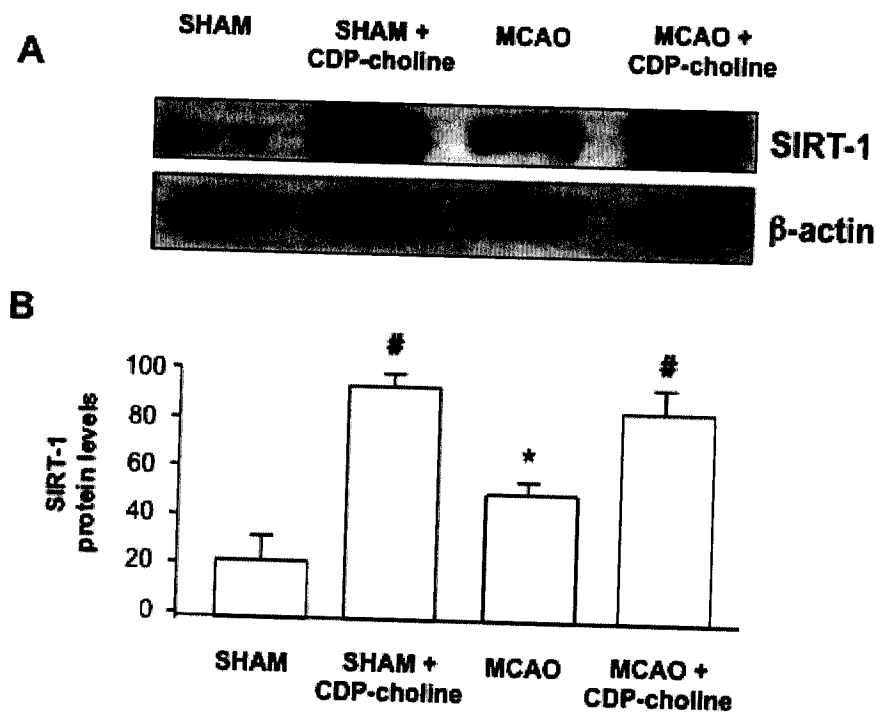


Figura 2

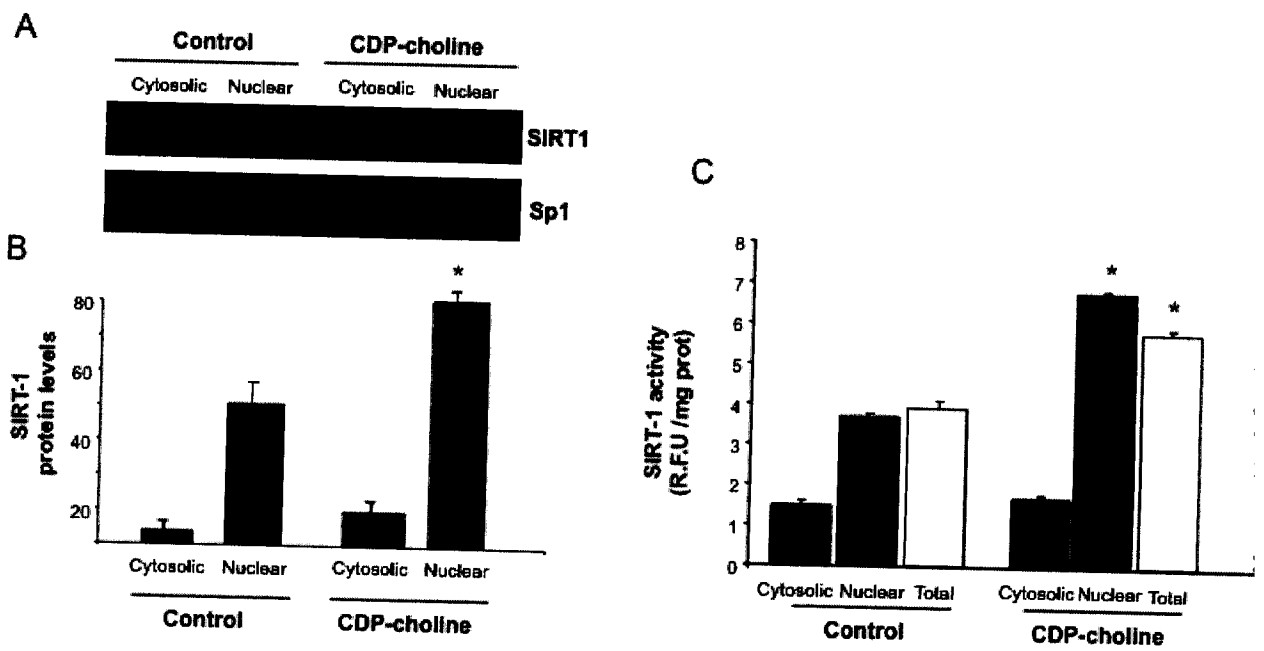


Figura 3

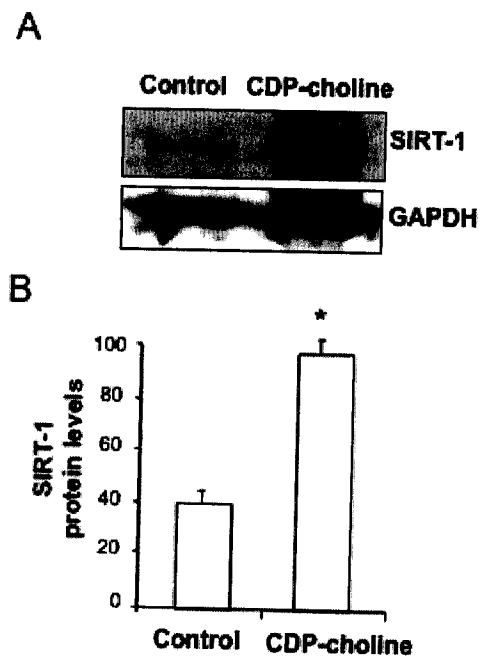


Figura 4

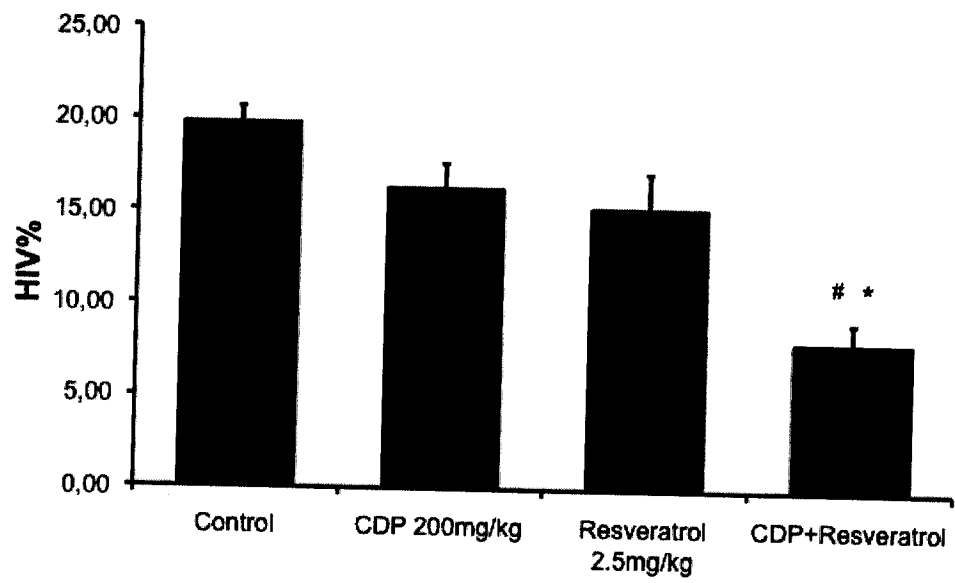


Figura 5

ANOVA<0,0001. #p<0.01 vs CDP 200mg/kg; Resveratrol 2.5mg/kg. *p<0.001 vs control; Post-hoc test: Bonferroni



- ②¹ N.º solicitud: 201101263
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 29.11.2011
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US US2002173549 A1 (WURTMAN et al.) 21.11.2002, página 2, párrafo 14; página 3, párrafos 44,46-48; página 4, párrafos 56,58.	1-14
Y	SHIN J A et al. Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 08.10.2010 VOL: 227 No: 1-2 Pags: 93-100 ISSN 0165-5728, todo el documento.	1-14
Y	GARCIA-COBOS R et al. Citicoline, use in cognitive decline: Vascular and degenerative. JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, 15.12.2010 VOL: 299 No: 1-2 Pags: 188-192 ISSN 0022-510X, página 189, apartado 3.	1-14
Y	ADIBHATLA RAO MURALIKRISHNA et al. Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. Journal of Neurochemistry 01.2002 VOL: 80 No: 1 Pags: 12-23 ISSN 0022-3042, página 15.	1-14

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:

<p>Fecha de realización del informe 19.03.2013</p>	<p>Examinador H. Aylagas Cancio</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7068 (2006.01)

A61K31/05 (2006.01)

A61P9/10 (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, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.03.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	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 US2002173549 A1 (WURTMAN et al.)	21.11.2002
D02	SHIN J A et al. Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, 08.10.2010 VOL: 227 No: 1-2 Pags: 93-100 ISSN 0165-5728, todo el documento.	08.10.2010
D03	GARCIA-COBOS R et al. Citicolina, use in cognitive decline: Vascular and degenerative. JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, 15.12.2010 VOL: 299 No: 1-2 Pags: 188-192 ISSN 0022-510X, página 189, apartado 3.	15.12.2010
D04	ADIBHATLA RAO MURALIKRISHNA et al. Citicolina: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. Journal of Neurochemistry 01.2002 VOL: 80 No: 1 Pags: 12-23 ISSN 0022-3042, página 15.	31.12.2001

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 a una composición farmacéutica que comprende una combinación de 1) una cantidad terapéuticamente efectiva de citicolina y 2) una cantidad farmacéuticamente efectiva de un activador de SIRT1 (sirtuinas) para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad cerebrovascular como la isquemia cerebral. Como activador de sirtuinas se selecciona entre otros el resveratrol.

El documento D1 se refiere a composiciones para el tratamiento del deterioro cognitivo leve y la isquemia cerebral. La composición comprende sustancias que pueden ser productos naturales tales como resveratrol, capsaicina y otras, preferentemente el resveratrol (ver párrafo 14, página 2), Estos productos naturales pueden ser usados en combinación con otros compuestos como los inhibidores de acetilcolinesterasa, CDP-colina, uridina, etc (ver página 4, párrafo 56). En el párrafo 58 se cita la utilización del resveratrol en la isquemia cerebral.

En el documento D2 se reportan los efectos terapéuticos del resveratrol durante los periodos agudos de la isquemia cerebral.

Los documentos D3 y D4 se refieren a la utilización de la citicolina en la isquemia cerebral sola o en combinación con otros compuestos (ver apartado 3, página 189) del documento D3 y página 15 del documento D4.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados la combinación de citicolina y de un activador de sirtuinas se puede considerar nueva por no estar comprendido en el estado de la técnica. Sin embargo no es posible reconocer actividad inventiva ya que a la vista de los documentos D1-D4 dicha combinación constituye una mera yuxtaposición de elementos conocidos. En general, no se puede considerar inventivo el hecho de combinar 2 o más principios activos para tratar una enfermedad particular en el caso en que dichos agentes activos sean conocidos de manera individual como terapéuticamente eficaces en el tratamiento de esa enfermedad. Por lo tanto las reivindicaciones 1-8 y 12-14 carecen de actividad inventiva.

Respecto a las reivindicaciones 9-11 relativas a las dosis de administración, tampoco es posible reconocer actividad inventiva, ya que se considera que la optimización de las cantidades administradas forman parte de la práctica rutinaria del experto en la materia de cara a alcanzar el efecto terapéutico deseado.

Por lo tanto, a la vista de los documentos D1-D4, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-14 carece de actividad inventiva según el artículo 8.1 de la L.P.