

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 912**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/7024 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06805091 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1848445**

54 Título: **Composición farmacéutica y método de neoangiogénesis/revascularización útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas**

30 Prioridad:

27.10.2005 WO PCT/IB2005/003202

27.10.2005 WO PCT/IB2005/003191

13.04.2006 US 791462 P

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

14.07.2015

73 Titular/es:

**LEAD BILLION LIMITED (100.0%)
22/F, CHEVALIER COMMERCIAL CENTRE 8
WANG HOI ROAD KOWLOON BAY
KOWLOON, HONG KONG, CN**

72 Inventor/es:

**LI, MING;
CHENG, LEI y
LIU, HONGWEI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 540 912 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica y método de neoangiogénesis/revascularización útiles en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas

Campo de la técnica

- 5 Esta invención se refiere a una composición farmacéutica en relación con su uso en un método para tratar enfermedades cardíacas isquémicas. Particularmente, se refiere a una composición farmacéutica y un método para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que aportan oxígeno y nutrientes a tejidos cardiovasculares infartados a lo largo de toda la zona infartada y para prevenir la apoptosis de cardiomiocitos en episodios isquémicos.

Antecedentes de la invención

- 10 Las enfermedades cardíacas isquémicas, que incluyen la enfermedad cardíaca coronaria y el infarto cardíaco, son enfermedades debidas a un insuficiente aporte de sangre coronaria o a una interrupción del flujo sanguíneo a una parte del corazón, causando daños o muerte de células musculares cardíacas. Esta es la causa más destacada de muerte para hombres y mujeres de todo el mundo. Por ejemplo, alrededor de 1,5 millones de americanos sufren un ataque cardíaco cada año (que es alrededor de un ataque cardíaco cada 20 segundos) y millones sufren de enfermedades cardíacas isquémicas.

- 15 Durante el proceso de remodelación post infarto, la neoangiogénesis/revascularización de los tejidos cardíacos infartados es insuficiente para mantener el ritmo de crecimiento tisular requerido para la compensación contráctil y es incapaz de soportar las mayores demandas del miocardio hipertrofiado, pero viable, especialmente el miocardio a lo largo de la zona limítrofe del infarto-cardiomiocitos en riesgo. La falta relativa de oxígeno y nutrientes a los miocitos hipertrofiados puede ser un importante factor etiológico en la muerte en otra forma viable del miocardio, que da como resultado una progresiva extensión del infarto y reemplazamiento fibroso. Por lo tanto, aparentemente la forma más directa para rescatar del riesgo a los miocitos cardíacos es establecer un nuevo aporte de flujo sanguíneo, en una etapa temprana que permitiera distribuir en la zona infartada células del sistema circulatorio, nutrientes y factores de crecimiento, además de la oxigenación. La restauración de la circulación sanguínea coronaria mediante una angiogénesis rápida debería ofrecer una modalidad terapéutica efectiva y directa a las enfermedades cardíacas isquémicas.

- 20 Aunque la angiogénesis terapéutica se ha estudiado intensamente como una alternativa del tratamiento para enfermedades vasculares isquémicas utilizando factores de crecimiento tales como VEGF, aFGF, bFGF o PDGF, estos factores tardan semanas en actuar¹⁻⁶, mientras que la necrosis miocárdica debida a la oclusión coronaria ocurre muy rápidamente en cuestión de horas^{5,7,8}. La consecuencia es que el tejido fibroso crece rápidamente a pesar de la condición isquémica, lo que reemplaza los tejidos cardíacos infartados y deja una pequeña capacidad para cualquier regeneración nueva del miocito reemplazado. Hasta ahora, no hay ningún fármaco ni método terapéutico disponibles que puedan promover la reconstitución temprana de la circulación coronaria dañada con vasos sanguíneos recién formados.

- 25 Por lo tanto, para aprovechar el valor terapéutico de la angiogénesis en la lucha contra las enfermedades cardíacas isquémicas, hay una necesidad de componentes químicos que posean propiedades biológicas que puedan promover suficientemente el crecimiento temprano de nuevos vasos sanguíneos en la zona infartada para restaurar rápidamente la circulación sanguínea coronaria una vez que ocurre un acontecimiento isquémico.

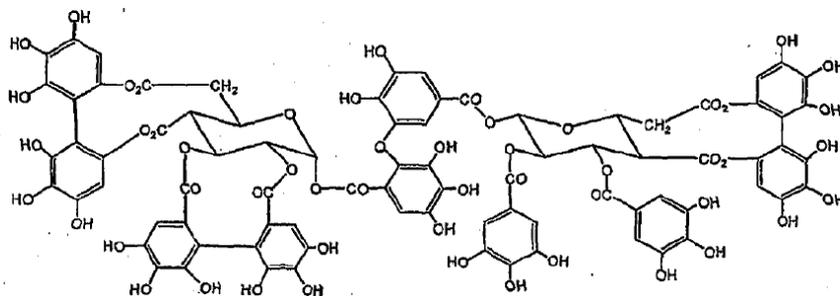
- 30 La solicitud PCT WO 03/043645 se refiere a un extracto orgánico de *Geum Japonicum Thunb.*, que comprende una mezcla de varios taninos hidrolizables (tales como Gemin A, B, C, D, E y F), entre otros, para tratar los músculos cardíacos infartados e isquémicos por estimulación de la angiogénesis y regeneración miocárdica en una etapa temprana del proceso de recuperación del tejido dañado.

- 35 La solicitud WO 2004/052381 se refiere a un extracto orgánico de una variante de *Geum Japonicum Thunb.*, que comprende una mezcla de varios taninos hidrolizables (tales como Gemin A, B, C, D, E y F), entre otros, para tratar el tejido dañado o isquémico (por ejemplo, después de un daño muscular o cutáneo y fractura ósea).

Compendio de la invención

- 40 Es un objeto de la presente invención, es proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas, que comprende un compuesto aislado de fórmula (I). El compuesto de fórmula (I) muestra efectos terapéuticos beneficiosos potentes en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas por estimulación de la angiogénesis y protección contra la apoptosis endotelial, dando como resultado una revascularización en el miocardio infartado y la prevención de la muerte isquémica de más cardiomiocitos. Dicho compuesto se refiere aquí en lo sucesivo como "Ga". El compuesto es conocido en la técnica pero nunca se ha conocido que poseyera las actividades biológicas y efectos terapéuticos aquí mencionados. De hecho, los taninos, que pertenecen a Ga, son convencionalmente revisados como ingredientes no activos y en el proceso de
- 45 identificación de los ingredientes activos en fitoterapia los investigadores desechan rutinariamente los taninos como

residuos. Ga se puede aislar de materiales naturales, particularmente de plantas, o pueden obtenerse a través de síntesis química total o semi, con las técnicas sintéticas existentes o desarrolladas en el futuro.



Fórmula I

El compuesto troncal de fórmula I (también referido como Ga en esta solicitud) puede tener sustituyentes en varias posiciones y conservar actividades biológicas similares a las del compuesto troncal Ga. Un sustituyente es un átomo o grupo de átomos sustituidos en lugar del átomo de hidrógeno. La sustitución se puede obtener por métodos conocidos en el campo de la química orgánica.

Una persona con conocimiento ordinario en la técnica considerará, que el compuesto troncal de arriba o su variante sustituida se puede hacer en varias, formas posibles isómeras racémicas, diastereoisómeras o enantiómeras, pueden formar sales con minerales ácidos y orgánicos, y pueden también formar derivados tales como N-óxidos, profármacos, bioisósteros. "Profármaco" significa una forma inactiva del compuesto debido al acoplamiento de uno o más grupos protectores especializados utilizados de una manera transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables en la molécula madre, que es metabolizada o convertida en el compuesto activo dentro del cuerpo (en vivo) una vez administrado. "Bioisósteros" significa un compuesto que resulta del cambio de un átomo o de un grupo de átomos con otro, átomo o grupo de átomos, ampliamente similar. El objeto de un reemplazamiento bioisostérico es crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares a las del compuesto madre. El reemplazamiento bioisostérico puede estar basado fisicoquímica o topológicamente. Fabricar adecuados profármacos, bioisósteros, N-óxidos, sales o varios isómeros aceptables farmacéuticamente a partir de un compuesto conocido (tales como aquellos descritos en esta memoria) está dentro del conocimiento ordinario de la técnica. Además, todas las formas isoméricas, sales y derivados adecuados de los compuestos arriba mencionados están descritos en la misma.

Como aquí se describe, el término "derivado funcional" significa un profármaco, bioisósteros, N-óxido, sal o varios isómeros aceptables farmacéuticamente del compuesto específico descrito arriba, que puede ser ventajoso en uno o más aspectos comparado con el compuesto madre. Fabricar derivados funcionales puede ser laborioso, pero algunas de las tecnologías implicadas son bien conocidas en la técnica. Están disponibles varios métodos sintéticos químicos de alto rendimiento. Por ejemplo, la química combinatoria ha dado como resultado la rápida expansión de colecciones de compuestos, que cuando se acoplan con varias tecnologías eficientes de bio-cribado pueden conducir al descubrimiento eficiente y aislamiento útil de derivados funcionales.

La composición farmacéutica se puede formular por medios convencionales conocidos por personas expertas en la industria farmacéutica en una forma de dosificación adecuada, tal como comprimidos, cápsulas, inyección, solución, suspensión, polvo, jarabe, etc, y administrarse a un sujeto mamífero que sufre una enfermedad cardíaca coronaria o infarto de miocardio (IM) en una manera adecuada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto aislado de fórmula (I) para uso en un método de estimular la revascularización en tejidos cardíacos dañados o muertos causados por una enfermedad cardíaca isquémica, tal como por ejemplo, aterosclerosis de arterias coronarias en un sujeto mamífero. El método comprende una etapa de administrar una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (I) al sujeto mamífero.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto aislado de fórmula (I) para uso en un método para tratar, mejorar o curar una condición patológica en un mamífero, donde la condición patológica, como juzgan personas expertas en medicina, se pueden tratar o aliviar por regulación al alza de las expresiones de factores angiogénicos (VEGF y FGF), lo que promueve la revascularización temprana en miocardio infartado, y/o por inducción de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, lo que inhibe la muerte apoptótica de los cardiomiocitos en los corazones infartados y previene la extensión progresiva de más daño isquémico y limita el tamaño del infarto. El método comprende una etapa de administrar una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (I) al mamífero.

Varios rasgos de novedad que caracterizan la invención se señalan con particularidad en las reivindicaciones anexas y forman una parte de esta descripción. Para una mejor comprensión de la invención, sus ventajas operativas, y objetos específicos alcanzados por su uso, debería hacerse referencia a los dibujos y a la siguiente descripción en las que hay realizaciones preferidas ilustradas y descritas de la invención.

5 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 resume el proceso de aislamiento de Ga a partir de la planta de *Geum Japonicum* como un ejemplo de fabricar el compuesto de la presente invención.

FIG. 2 muestra el efecto de neovascularización temprana del miocardio infartado tras tratamiento con Ga. 1: dos días después de la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) e inyección Ga; 2: corazón control día dos; 3: siete días después de la ligadura de LAD e inyección Ga; 4: corazón control siete días; 5: análisis RT-PCR y 6: análisis Western blot, que muestra significativamente expresiones genéticas reguladas al alza de VEGFb y VEGFc en los tejidos cardíacos tratados con Ga (donde A simboliza VEGFb, B simboliza VEGFc, G simboliza GAPDH, C simboliza grupo control, T simboliza grupo tratado con Ga, M simboliza marcador molecular).

FIG. 3 muestra el efecto inducido por Ga en el potencial de supervivencia y en el tamaño del infarto. 1: siete días después de la ligadura LAD (control); 2: siete días después de la ligadura LAD (tratado con Ga); 3: análisis Western blot que muestra el aumento de las expresiones de fosfo-Akt1 con tratamiento Ga; 4: análisis Western blot que muestra el incremento de las expresiones de Bc12 con tratamiento Ga (C y T permanente para el grupo control y grupo tratado con Ga, respectivamente); 5: tinción tricrómica del miocardio de rata dos semanas después del infarto (control); y 6: tinción tricrómica del infarto de miocardio de rata dos semanas después del infarto (tratado con Ga), que muestra significativamente la reducción del tamaño del infarto y el incremento de la masa de miocardio viable dentro de la pared anterior.

Descripción detallada de realizaciones particulares

I. Procedimientos experimentales

Todos los protocolos utilizados en la presente invención están conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de E.E.U.U, y están aprobados por el Comité Ético Experimental Animal de la Universidad China de Hong Kong.

Aislamiento de Ga de Geum Japonicum: Para los experimentos descritos a continuación, se obtuvo Ga de la planta de *Geum Japonicum*. En referencia a la FIG. 1, la planta se recolectó de la provincia Guizhou de China en Agosto, se secó (10 Kg) y se filtró con 70% de etanol (100 L) dos veces al día durante 3 días a temperatura ambiente. El extracto se combinó y pulverizó en seco para producir un residuo sólido (1Kg). El residuo sólido se suspendió en 10 L de agua y sucesivamente se repartió con cloroformo (10 L) dos veces, luego en n-butanol (10 L) dos veces para producir las correspondientes fracciones. La fracción soluble en n-butanol (GJ-B) se filtró y pulverizó en seco para producir una fracción en polvo. Se mostró que la fracción soluble en n-BuOH podía mejorar significativamente la proliferación de células endoteliales de la arteria coronaria humana-HCAECs (Clonetics, Inc.) y estimular la rápida neovascularización en la zona infartada del modelo animal IM. La fracción soluble en n-BuOH se aplicó en una columna de Sephadex LH-20 equilibrada con metanol al 10 % y eluyó incrementando la concentración de metanol en agua, resultando 7 fracciones. La fracción 3, eluída con aproximadamente metanol al 50 %, mostró una actividad potente en estimulación significativa de la angiogénesis en miocardio infartado. Esta fracción 3 contiene taninos que se utilizan para probar sus efectos en un modelo animal de IM. Se determinaron por análisis de RMN las estructuras de los compuestos activos contenidos en esta fracción activa. Por supuesto, como Ga es un compuesto natural conocido, se puede obtener de otras plantas y producir resultados satisfactorios.

Animales, procedimientos quirúrgicos: Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (SD), de 250-300 g de peso. A continuación de una anestesia adecuada, se realizó a los animales una toracotomía izquierda, se abrió el pericardio y se ligó la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Se inyectó Ga disuelta en PBS (0,1 ml, que contienen 0,3 mg de Ga) en el miocardio distal (la región que se presume isquémica) de la arteria ligada inmediatamente después de la ligadura en el grupo de ensayo (que tiene 60 ratas, por ejemplo, n=60). Un volumen equivalente de PBS se inyectó a la localización correspondiente de las ratas en el grupo control (n=60). Se eutanizaron cincuenta ratas de cada grupo en los días 2, 7, 14 y 30 tras el infarto para una medición morfológica y funcional. Para el grupo placebo (n=6), se realizó una toracotomía izquierda y se abrió el pericardio pero no se ligó la LAD. Para el grupo control normal (n=6), las ratas no fueron sujeto de ningún tratamiento y procedimiento quirúrgicos.

Mediciones de la neovascularización en la zona infartada: Se extirparon los ventrículos izquierdos de las ratas sacrificadas en los días post-infarto 2 y 7 y se cortaron de la punta a la base en 3 cortes transversales. Los cortes se fijaron en formaldehído y se embebieron en parafina. Se determinó la densidad vascular de las muestras de sección histológica contando el número de vasos sanguíneos en la zona infartada utilizando un microscopio óptico bajo un campo de alta energía (HPF) (x 400). Se utilizaron ocho HPFs aleatorios y no solapados dentro del infarto presentado para contar todos los vasos sanguíneos en cada sección. El número de vasos sanguíneos en cada HPF

se promedió y expresó como el número de vasos sanguíneos por HPF. Los recuentos vasculares se realizaron por dos investigadores en una manera ciega.

5 *Mediciones de la apoptosis del miocito por el ensayo TUNEL de secciones de tejido de parafina:* Se utilizó el método de ensayo TUNEL para la detección in situ de la apoptosis a nivel⁹ celular simple. Las secciones de tejido miocárdico infartado de rata se obtuvieron a partir de ambos grupos ensayo y control en el día 7 post-infarto. Después de la desparafinación y rehidratación, los tejidos se digirieron con Proteinasa K (Dako) durante 15 minutos e incubaron con TdT (Roche) y Biotina-16-dUTP (Roche) durante 60 minutos a 37°C. Después de la incubación con SP-HRP (Roche) durante 20 minutos, la tinción TUNEL se visualizó con DAB (Dako), que tiñó el núcleo (con el fragmento DNA teñido de marrón). Las secciones de tejido se examinaron microscópicamente a un campo de alta energía (x 400) y al menos 100 células se contaron en un mínimo de 10 HPF. El número de miocitos apoptóticos por HPF se refirió como el índice apoptótico.

15 *Estimación del infarto miocárdico:* Los corazones de las ratas, sacrificadas en el día 14 post infarto, se estirparon y seccionaron de la punta a la base en tres o cuatro cortes transversales y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones finas (5 µm de espesor) para cada portaobjetos y se tiñeron con tinción H&E y tricómico de Masson (Sigma, E.E.U.U), que marca de azul el colágeno y de rojo el miocardio. Todos los portaobjetos de estas secciones se proyectaron en una pantalla de un ordenador con planimetría asistida (Imagen J 1.34S, Wayne Rasband, National Institutes of Health, E.E.U.U). Se midieron para cada portaobjetos las circunferencias endocárdica y epicárdica así como la longitud de la cicatriz. La porción infartada del ventrículo izquierdo se calculó a partir de estas mediciones y el radio de la longitud de la cicatriz para la circunferencia ventricular del endocardio y epicardio de los portaobjetos se expresó como un porcentaje para definir el tamaño del infarto^{9,10,11}.

25 *Medición Ecocardiográfica de la Función Miocárdica:* En total, 118 ratas SD recibieron ecocardiografía basal antes de cualquier procedimiento experimental. La ecocardiografía se registró bajo anestesia controlada utilizando un transductor de fase matriz S10-MHz y un sistema GE VingMed Vivid 7. Las imágenes de las ecocardiografías en trazado modo M y bidimensional (2D) se registraron a partir de las vistas de los ejes largo y corto paraesternal. La vista del eje corto era a nivel de los músculos papilares. Las áreas ventricular izquierda final diastólica (LVDA) y final sistólica (LVSA) se midieron a partir de los volúmenes sistólico final y diastólico final LV del ventrículo izquierdo en el eje largo paraesternal (LVEDV y LVESD) calculados mediante el método en modo M. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) y la reducción fraccional (FS) se derivaron del área transversal del LV en la vista del eje corto bidimensional: $EF = [(LVEDV - LVESV)/LVEDV] \times 100\%$ y $FS = [(LVDA - LVSA)/LVDA] \times 100\%$ ¹². La fórmula estándar se utiliza para los cálculos ecocardiográficos.

35 *Análisis RT-PCR de supervivencia asociada a expresiones genéticas:* Un corte pequeño del tejido de miocardio infartado preparado arriba se puso en nitrógeno líquido inmediatamente después de la incisión y se almacenó a -80°C. Según las instrucciones del fabricante, se aisló el RNA total utilizando el Mini Kit RNeasy Qiagen (Catálogo Número 74104, Qiagen, Alemania), se disolvió en 20-30µl de agua libre de RNasa y se almacenó a -80°C. La contaminación integral de RNA ribosómico y ADN se chequeó rutinariamente utilizando formaldehído que desnatura el gel de electroforesis de ARN (1,2%) antes de proceder con el análisis. La contaminación proteica y la concentración de ARN total se valoró por determinación del ratio OD260:OD280 espectrofotométricamente (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Alemania).

40 *Análisis Western Blot:* Alrededor de 50 mg del tejido arriba mencionado preparado de miocardio infartado se trituró a polvo en nitrógeno líquido. 1 mL de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% de Nonidet P-40, 10% de glicerol, NaF 200 mM, pirofosfato sódico 20 mM, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 mM, y ortovanadato de sodio 1 mM) se añadió al polvo y colocó en hielo durante 30 minutos. El rendimiento proteico se cuantificó por un kit de valoración proteica Bio-Rad DC (Bio-Rad). Cantidades iguales (10 g) de proteína total se fraccionaron por tamaño mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Amersham, E.E.U.U). Las hibridaciones se bloquearon con tampón fosfato salino plus 0,1% (vol/vol) Tween 20 (PBST) que contiene 5%(peso/vol) de leche en polvo (PBSTM) durante 30 minutos a temperatura ambiente y sondó durante 60 minutos con anticuerpos primarios específicos frente a fosfo-AKt1 de rata (ratón, Santa Cruz) o Bcl-2 de rata (ratón, Sigma-Aldrich), diluido en 1:1000 en PBSTM. Después del lavado extensivo en PBST, las hibridaciones se sondaron por conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) (dilución 1/1000 en PBSTM, 60 minutos), se lavaron extensamente con PBST, y desarrollaron por quimioluminiscencia.

55 *Bioestadísticas:* Todos los datos morfométricos se recogieron a ciegas. Los resultados se presentan como valor medio ±SD calculados a partir de las mediciones medias obtenidas de cada corazón. Se determinó la significación estadística por comparación entre dos mediciones utilizando el incomparable test de Student de dos colas. Valores de $p < 0,05$ se consideraron ser significativos.

II. Revascularización inducida por Ga en miocardio infartado.

En referencia a la FIG.2, estudios histológicos revelaron que muchos vasos sanguíneos se formaron nuevamente a lo largo de la zona infartada completa, incluyendo las áreas centrales y las zonas del borde en el día 2 tras el infarto (FIG.2:1), donde los vasos sanguíneos formados nuevamente están indicados por flechas rojas. Algunos de los

vasos sanguíneos nuevamente formados se rellenaron con células sanguíneas y otras estaban aún en la fase temprana de desarrollo de regeneración de vasos sanguíneos y mostraban una estructura similar a un lumen sin relleno de células sanguíneas. La densidad capilar en la zona del infarto del miocardio tratado con Ga era una media de 18 ($18 \pm 3,9$) relleno con células sanguíneas y 8 ($8 \pm 2,8$) con estructuras similares al lumen por HPF, calculado de 8 campos seleccionados aleatoriamente en cada uno de los 15 portaobjetos de los corazones tratados con Ga en el día 2 (FIG.2:1). En cambio, se observaron pocos vasos sanguíneos ($5 \pm 2,1$ por HPF) con una infiltración celular inflamatoria en la zona del infarto en el miocardio control en el día 2 post IM (FIG.2:2). En corazones tratados con Ga, en el día 7 post IM, los vasos sanguíneos nuevamente formados rellenos con células sanguíneas permanecían ($11 \pm 3,6$) a lo largo de la zona del infarto pero no se observaron las estructuras similares al lumen (FIG. 2:3). En cambio, las muestras control mostraron principalmente tejido fibroso sustituido del miocardio infartado con sólo unos pocos vasos sanguíneos ($3 \pm 1,2$) a los 7 días del infarto (FIG.2:4). Los análisis RT-PCR y Western blot demostraron que la revascularización inducida por Ga dentro de las 24 horas en miocardio infartado era acompañado concomitantemente con la activación de las expresiones génicas de VEGF y bFGF en los correspondientes tejidos cardíacos. Las expresiones de VEGF y bFGF en el miocardio tratado con Ga se incrementaron a 1,8 y 2,2 veces respectivamente (FIG.2:5 & 6,T) comparado con sus expresiones en el grupo control de miocardio no tratado (FIG. 2:5 & 6,C).

III. Mejora del potencial de supervivencia de Ga y reducción del tamaño del infarto.

En referencia a la FIG. 3, siete días después de la ligadura de LAD, los controles de los miocitos en riesgo a lo largo del borde del peri-infarto (FIG. 3:1) mostraron formas distorsionadas e irregulares comparado con los miocitos en la parte distal del corazón. En cambio, los miocitos en el borde del peri-infarto de los corazones tratados con Ga mostraron una forma regular (FIG. 3:2) y las miofibras permanecen saludables y no estrechas y delgadas como en el corazón no tratado. Con la tinción de TUNEL, se encontró que el número de miocitos apoptóticos detectados en el miocardio de ventrículo izquierdo tratado con Ga (FIG. 3:2) era aproximadamente tres veces menor comparado con los controles no tratados (para energía de alto rendimiento: $1,70 \pm 0,18$ contra $5,04 \pm 0,75$, $P < 0,001$; FIG.3:1). Estas diferencias eran particularmente evidentes dentro del borde del peri-infarto donde la forma irregular de los miocitos en los corazones control tenía el número más alto de núcleos apoptóticos, que se tiñeron de marrón. Muchos de los núcleos apoptóticos se observaron en el borde del peri-infarto más que en los miocitos de la zona distal del infarto. Además, se encontró en la zona del infarto de los corazones tratados con Ga una significativa mayor densidad de capilares rodeado por los miocitos con muchos menos núcleos apoptóticos. En cambio, se observó una densidad de capilares significativamente menor y más núcleos apoptóticos en los corazones no tratados del grupo control. En total, estos resultados indican que la angiogénesis inducida por el tratamiento con Ga previno un proceso de extensión pro-apoptótico en ambas células, endoteliales y miocitos, mejoró la supervivencia de miocitos viables y células endoteliales dentro de la zona del peri-infarto y consecuentemente mejoró la función miocárdica. Para determinar si el efecto anti apoptótico inducido por Ga en los miocitos viables en riesgo eran a través de expresiones de proteínas anti apoptóticas, se realizaron análisis western blots. Se demostró que la prevención inducida por Ga de la extensión del proceso apoptótico del tejido cardíaco en riesgo era concomitantemente acompañado por un incremento en las expresiones génicas de los factores clave supervivientes. Se incrementaron las expresiones de Akt1 (FIG. 3:3,T) y Bcl2 (FIG. 3:4,T) por 3,3 y 2,8 veces respectivamente comparado con los tejidos cardíacos en el grupo control (Fig.3 & 4,C).

Para investigar si el incremento del potencial de supervivencia de los miocitos viables y células endoteliales dentro de la zona del peri-infarto inducida por Ga resultaría en la reducción del tamaño del infarto, se midieron los tamaños del infarto de diferentes grupos animales. Como se muestra en la FIG.3, la proporción media de deposición de colágeno o tejido cicatrizado/miocardio ventricular izquierdo (como se define por la tinción Tricrómica de Masson) era del 27,44% en ratas tratadas por Ga (FIG.3:5), comparado con el 39,53% para aquellos del grupo control (FIG.3:6) 14 días post infarto, indicando que Ga mejoraba el potencial de supervivencia de ambas células endoteliales y miocitos e incrementó significativamente la masa de miocardio viable dentro de la pared libre anterior de los ventrículos izquierdos. La reconstitución de la vasculatura coronaria dañada y la reducción del tamaño del infarto inducidos por el tratamiento de Ga se acompañaron por una significativa mejora funcional, como se demostró en las mediciones ecocardiográficas donde, en comparación con los corazones control de IM no tratados en el día 7 y 14 post infarto, la fracción de eyección (EF) de los corazones IM tratados con Ga era significativamente mayor ($55,68 \pm 2,63$ veces contra $49,67 \pm 2,78$, $P = 0,03$) en el día 7, y se incrementó significativamente ($60,11 \pm 2,66$ contra $48,26 \pm 2,55$, $P = 0,001$) en el día 14. Similarmente, la fracción corta (FS) de los corazones IM tratados con Ga eran significativamente mayores ($27,33 \pm 1,63$ contra $22,17 \pm 1,67$, $P = 0,01$) en el día 7 y se incrementó significativamente ($29,87 \pm 2,66$ contra $21,35 \pm 2,08$, $P = 0,002$) en el día 14.

En resumen, los ejemplos de arriba demuestran que Ga es capaz de regular al alza las expresiones de VEGF y bFGF para la reconstitución temprana del sistema de suministro sanguíneo, induciendo la expresión de proteínas Akt1 y Bcl2 anti apoptóticas para prevenir la muerte apoptótica de cardiomiocitos en riesgo, y lleva a una mejora funcional significativa del corazón que sufre un acontecimiento isquémico. Por consiguiente, Ga proporciona una nueva dimensión, como un medicamento terapéutico en angiogénesis, en el tratamiento de enfermedades cardíacas isquémicas.

IV. Fabricación de Composiciones Farmacéuticas y sus usos en el tratamiento de enfermedades isquémicas en mamíferos

Una vez que se identifica el compuesto químico eficaz y se obtienen las preparaciones parcial o sustancialmente puras del compuesto, ambos por aislamiento del compuesto natural a partir de recursos naturales tales como plantas o por síntesis química, se pueden fabricar varias composiciones o formulaciones farmacéuticas de un compuesto puro utilizando procedimientos existentes o procedimientos de desarrollo futuros en la industria. Los procesos específicos de fabricación de formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación (incluyendo, pero no limitado a, tableta, cápsula, inyección, jarabe) de compuestos químicos no son parte de la invención y personas expertas en la técnica ordinaria de la industria farmacéutica son capaces de aplicar uno o más procesos establecidos en la industria para la práctica de la presente invención. Alternativamente, personas expertas en la técnica ordinaria pueden modificar los procesos convencionales existentes para un mejor ajuste de los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, las bases de datos de patentes o solicitudes de patentes proporcionadas en la página web oficial USPTO contienen sustanciosos recursos que conciernen a la fabricación de formulaciones y productos farmacéuticos de compuestos químicos efectivos. Otro recurso de información útil es Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations, editado por Sarfaraz K. Niazi y vendido por Culinary & Hospitality Industry Publications Services.

Como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "extracto de planta" significa una mezcla de compuestos naturales obtenidos vía un proceso de extracción a partir de partes de una planta, donde al menos el 10 % de la masa seca total es de compuestos no identificados. En otras palabras, un extracto de planta no significa un compuesto identificado sustancialmente purificado de la planta. El proceso de extracción implica típicamente una etapa de sumergir una parte(s) de la planta cruda en un disolvente (comúnmente, agua y/o un disolvente orgánico) a lo largo de un tiempo predeterminado, opcionalmente separar la solución de los restos de la planta y luego separar el disolvente de la solución, para obtener un extracto, que puede además opcionalmente someterse a la concentración y/o purificación parcial. El término "excipiente farmacéutico" significa un ingrediente contenido en una formulación de un fármaco que no es un constituyente medicinalmente activo. El término "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que es suficiente para obtener un efecto terapéutico en el sujeto tratado. La dosis efectiva variará, como reconocen aquellos expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, ruta de administración, uso de excipientes, y la posibilidad de co-uso con otro tratamiento terapéutico. Una persona experta en la técnica puede determinar una cantidad efectiva en una situación particular utilizando un método convencional conocido en la técnica.

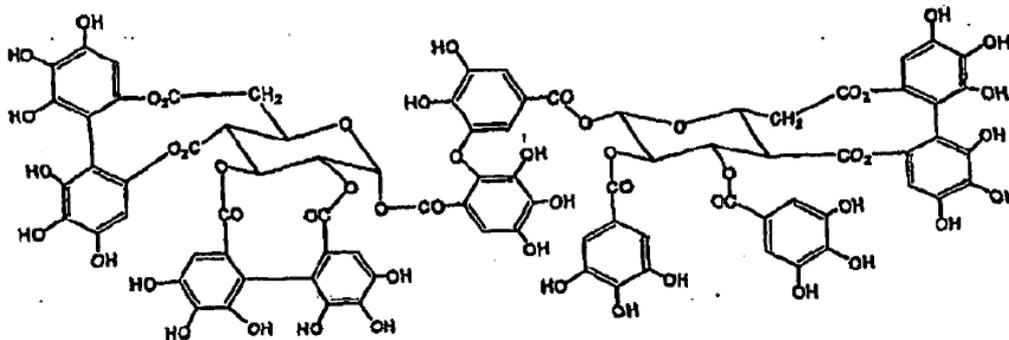
V. Referencias

1. Banai S, Jaklitsch M, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R, Epstein S, Unger E. Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res*. 1991;69:76-85.
2. Pu L, Sniderman A, Brassard R, Lachapelle K, Graham A, Lisbona R, Symes J. Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy. *Circulation*. 1993;88:208-215.
3. Folkman J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995;333:1757-1763.
4. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. 1997;386:671-674.
5. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte Activation in Angiogenesis and Collateral Growth in the Rabbit Hindlimb. *J. Clin. Invest*. 1998;101:40-50.
6. Arras M, Mollnau, H, Strasser R, Wenz R, Ito W, Schaper J, Schaper W. The delivery of angiogenic factors to the heart by microsphere therapy. 1998;16:159-162.
7. Schlaudraff K, Schumacher B, von Specht B, Seitelberger R, Schlosser V, Fasol R. Growth of "new" coronary vascular structures by angiogenetic growth factors. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1993;7:637-643.
8. Unger EF, Shou M, Sheffield CD, Hodge E, Jaye M, Epstein SE. Extracardiac to coronary anastomoses support regional left ventricular function in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1993;264:H1567-1574.
9. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine*. 2001;7:430 – 436.
10. Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol* 1997;272:H722-727.
11. Yang F, Liu Y, Yang X, Kapke A, Carretero O, Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice. *Exp Physiol*. 2002;87:547-555.

12. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent J-P, Kantelip J-P. Mesenchymal Progenitor Cells Differentiate into Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Rat Cellular Cardiomyoplasty Model. *Circulation*. 2003;108:253II-258.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto aislado de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad cardíaca coronaria o infarto cardíaco en un sujeto mamífero.



Fórmula I

2. Uso según la reivindicación 1, en donde dicho compuesto ejerce un efecto terapéutico por revascularización en un tejido cardíaco infartado de dicho sujeto mamífero.
3. Uso según la reivindicación 2, donde dicha revascularización ocurre dentro de las 24 a 72 horas siguientes al tratamiento con dicho compuesto.
4. Uso según la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad cardíaca coronaria o infarto cardíaco es causado por aterosclerosis de arterias coronarias.
5. Uso de un compuesto aislado de fórmula (I) como se definió en la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para la revascularización del miocardio infartado de un sujeto mamífero.
6. Uso según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto activa la expresión de VEGF y bFGF.
7. Uso según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto es inyectado directamente en los tejidos en dicho miocardio infartado.
8. Uso según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto es llevado a los tejidos en dicho miocardio infartado por administración oral.
9. Uso según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto es llevado a los tejidos en dicho miocardio infartado por inyección subcutánea, inyección intramuscular, o infusión intravenosa.
10. Un compuesto aislado de fórmula (I) como se definió en la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de enfermedad cardíaca coronaria o infarto cardíaco en un sujeto mamífero y/o para la revascularización del miocardio infartado de un sujeto mamífero.

FIG. 1

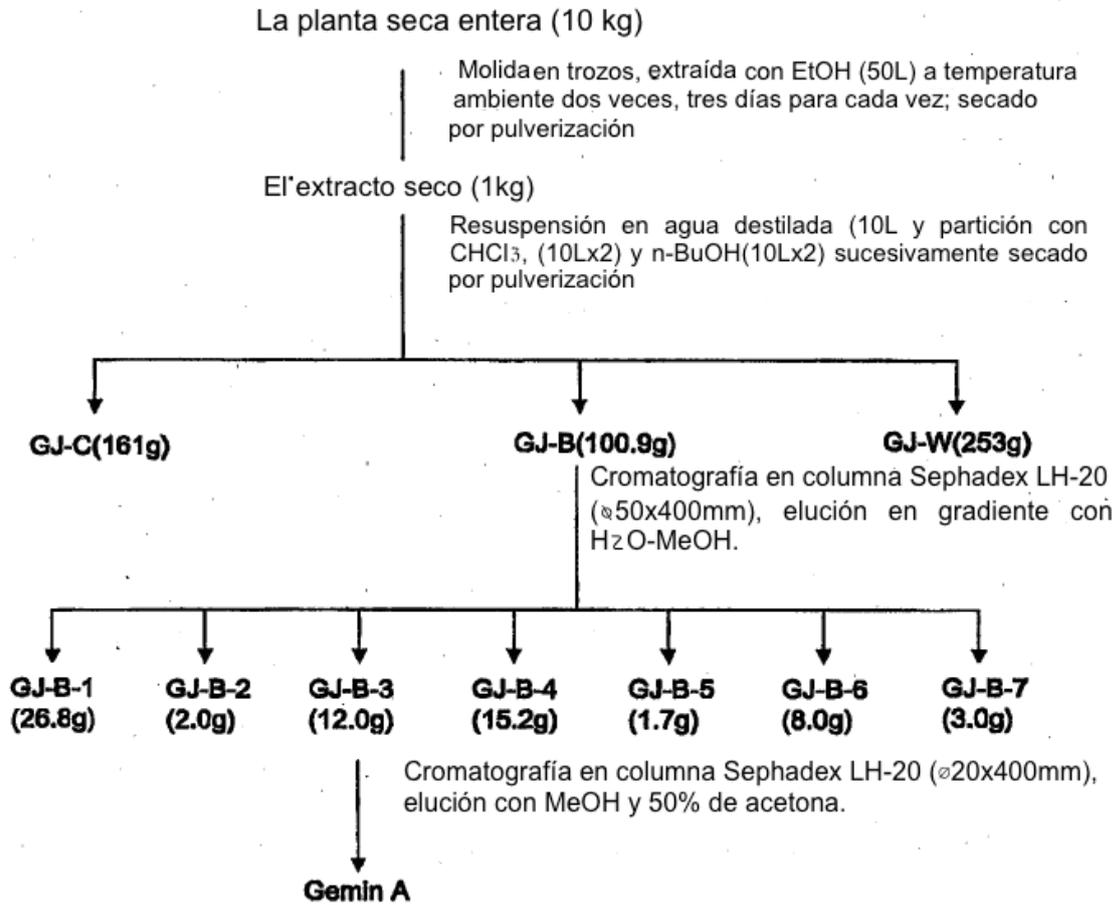


FIG. 2

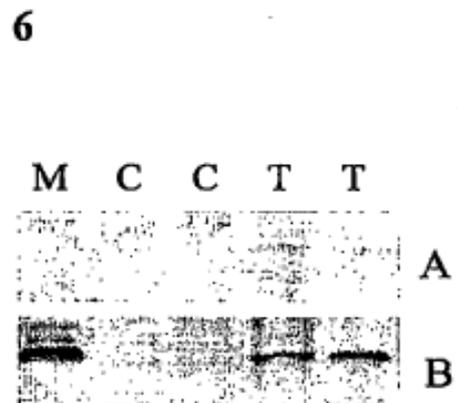
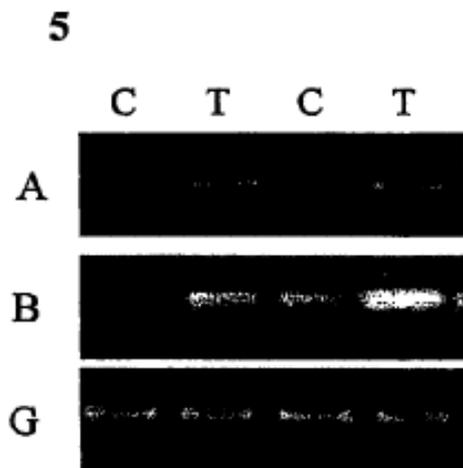
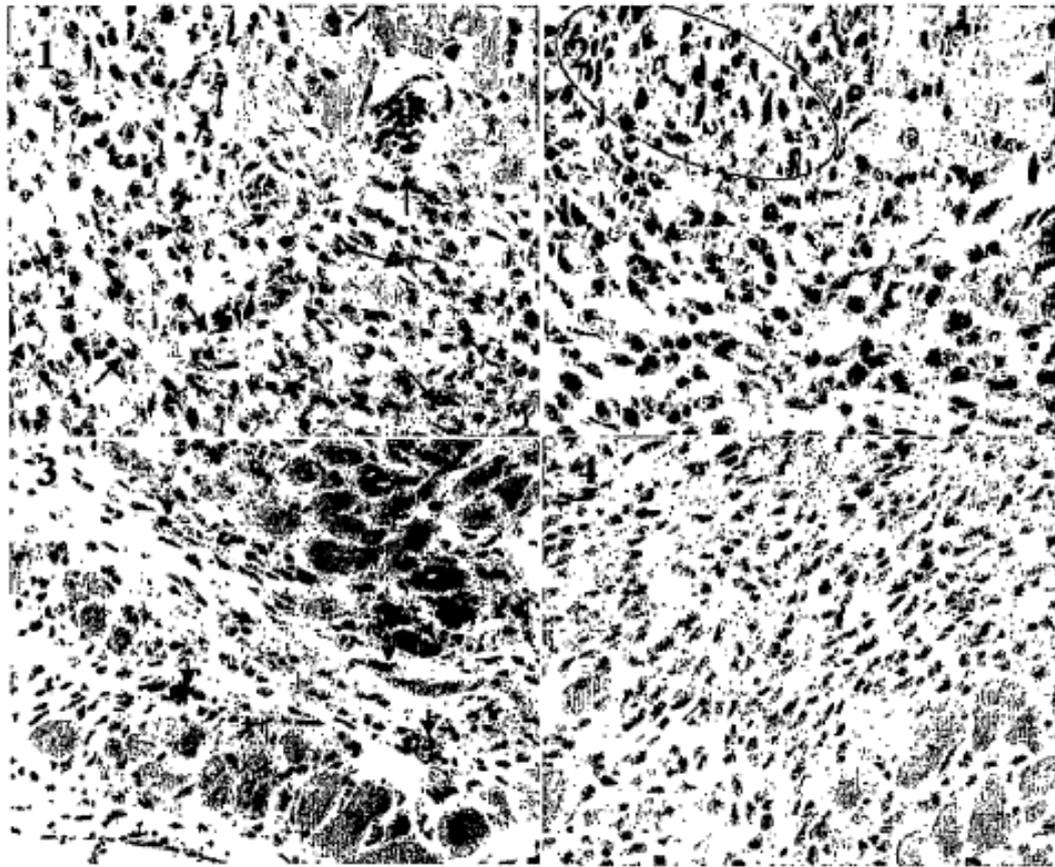


FIG. 3

