

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 215**

51 Int. Cl.:

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2010 E 10708493 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2413939**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus que comprende citicolina y ácido úrico**

30 Prioridad:

30.03.2009 ES 200900856

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC I PROVINCIAL DE
BARCELONA (100.0%)**

**C/ Villarroel 170
08036 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

CHAMORRO SÁNCHEZ, ÁNGEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 543 215 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 para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus que comprende citicolina y ácido úrico.

5

Campo de la invención

La presente invención se encuadra en general dentro del campo de la biomedicina y en particular se refiere a una nueva composición farmacéutica que comprende ácido úrico y citicolina y su uso para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus.

10

Antecedentes de la invención

La muerte celular después de un accidente cerebrovascular es el resultado de la interacción compleja de excitotoxicidad, acidosis, inflamación, estrés oxidativo, despolarización periinfarto y apoptosis.

15

El término apoptosis se utiliza como sinónimo de muerte celular programada (MCP); sin embargo, originalmente la apoptosis se definió como un conjunto de cambios morfológicos que ocurren después de la MCP. En neuronas en desarrollo, estos cambios incluyen la condensación y la escisión de cromatina y la formación de los llamados cuerpos apoptóticos. Estos cambios son diferentes de los cambios morfológicos que caracterizan a la inflamación por necrosis de los orgánulos citoplasmáticos y la ruptura de la membrana mitocondrial y citoplasmática.

20

Una lesión isquémica leve normalmente induce la muerte celular a través de un mecanismo de tipo apoptótico en lugar de por necrosis. Los activadores de la apoptosis incluyen radicales libres de oxígeno, la ligadura a receptores de muerte, daño del ADN, activación de proteasas y desajuste del balance iónico. Varios estudios experimentales han mostrado que la inhibición de la apoptosis reduce la gravedad de la lesión isquémica.

25

La activación de las caspasas es una consecuencia de la apoptosis mitocondrial. La disfunción mitocondrial y la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial pueden resultar en activación de caspasas a través de la salida del Citocromo C hacia el citoplasma; sin embargo, existen otros mecanismos diferentes por medio de los cuales la disfunción mitocondrial puede contribuir a la muerte neuronal isquémica. La mitocondria gravemente dañada puede ser incapaz de mantener el gradiente electroquímico necesario para la respiración y la oxidación de la glucosa. De este modo, la disfunción mitocondrial puede agravar la lesión isquémica por exacerbación del fallo energético. La mitocondria disfuncional también produce radicales libres de oxígeno que lesionan otros orgánulos celulares y al ADN. Por lo tanto, los tratamientos que previenen la disfunción mitocondrial podrían ser una estrategia neuroprotectora más potente que la inhibición de caspasas.

30

35

Unos niveles altos de Ca^{2+} , Na^+ y ADP intracelulares hacen que la mitocondria produzca niveles nocivos de especies reactivas de oxígeno. A diferencia de otros órganos, el cerebro es especialmente vulnerable a las especies reactivas de oxígeno debido a que las neuronas tienen niveles relativamente bajos de antioxidantes endógenos. La abundancia de los radicales de oxígeno causa la destrucción de macromoléculas celulares y participan en mecanismos de señalización que provocan la muerte celular apoptótica. La isquemia activa la óxido nítrico sintasa (NOS) e incrementa la generación de óxido nítrico (NO), que se combina con superóxido para producir peroxinitrito, un potente agente oxidante. La producción de NO y el estrés oxidativo están unidos también a la sobreactivación de la poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1), una enzima para la reparación del ADN.

40

45

Después de reperfusión, hay un incremento en la producción de superóxido, de NO y de peroxinitrito. La formación de estos radicales en la proximidad de vasos sanguíneos juega un importante papel en la lesión inducida por reperfusión. Estos radicales activan las metaloproteasas (MMP), que degradan el colágeno y las lamininas en la lámina basal, rompen la integridad de la pared vascular e incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). El estrés oxidativo y nitrosilativo también activa el reclutamiento y la migración de neutrófilos y de otros leucocitos hacia la vasculatura cerebral, que liberan enzimas que incrementan adicionalmente la degradación de la lámina basal y la permeabilidad vascular. Estos eventos pueden conducir a una hemorragia parenquimatosa, edema cerebral vasogénico e infiltración leucocitaria dentro del cerebro.

50

55

Es conocido el uso de la citicolina para el tratamiento preventivo de los trastornos neurológicos y cognitivos asociados a los accidentes cerebrovasculares y a los traumatismos craneales. Citicolina estimula la biosíntesis de los fosfolípidos estructurales de la membrana neuronal, como se demuestra en estudios realizados con espectroscopia por resonancia magnética. Citicolina, mediante esta acción, mejora la función de los mecanismos de membrana, tales como el funcionamiento de las bombas de intercambio iónico y los receptores insertados en ella,

5 cuya modulación es imprescindible para una correcta neurotransmisión. Citicolina por su acción estabilizadora de la membrana, posee propiedades que favorecen la reabsorción del edema cerebral. Estudios experimentales han demostrado que Citicolina inhibe la activación de determinadas fosfolipasas (A1, A2, C y D), reduciendo la formación de radicales libres, evitando la destrucción de sistemas membranosos y preservando los sistemas de defensa antioxidante, como el glutatión.

10 Citicolina preserva la reserva energética neuronal, inhibe la apoptosis y estimula la síntesis de acetilcolina. Se ha demostrado experimentalmente también que Citicolina ejerce un efecto neuroprotector profiláctico en modelos de isquemia cerebral focal. Ensayos clínicos han demostrado que Citicolina mejora significativamente la evolución funcional de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo, coincidiendo con un menor crecimiento de la lesión isquémica cerebral en las pruebas de neuroimagen. En pacientes con traumatismo craneoencefálico, Citicolina acelera la recuperación de estos pacientes y reduce la duración y la intensidad del síndrome post-conmocional. Citicolina mejora el nivel de atención y de conciencia, así como actúa favorablemente sobre la amnesia y los trastornos cognitivos y neurológicos asociados a isquemia cerebral.

15 El ácido úrico es un potente agente antioxidante que bloquea la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico, el cual daña las células al nitrosilar los residuos de tiroxina de las proteínas. La concentración plasmática de AU es casi 10 veces superior a la de otras sustancias antioxidantes, como las vitaminas C o E, y su capacidad antioxidante es mayor. Además, el AU previene la degradación de la superóxido dismutasa extracelular, enzima imprescindible para el funcionamiento endotelial normal. En cultivo de células del hipocampo, el AU protege del daño excitotóxico por glutamato, estabilizando la homeostasis del calcio y preservando la función mitocondrial. También, el AU ha mostrado la inhibición de la reacción de Fenton.

20 En la rata adulta, la administración de AU 2 horas antes de la oclusión de la arteria cerebral media o 1 hora después de la reperusión reduce significativamente el infarto cerebral resultante, suprime la acumulación de ROS y disminuye la peroxidación lipídica. La administración de AU es neuroprotectora en un modelo tromboembólico de isquemia cerebral focal de rata y este efecto neuroprotector es sinérgico respecto al efecto beneficioso conseguido por el rtPA.

25 Hay estudios que evidencian la relación existente entre unos niveles de ácido úrico más elevados en sangre en el momento de un ictus y la menor severidad neurológica ocasionada por este.

30 Como consecuencias de importantes investigaciones, en el campo de la neurología, hemos comprobado que la administración conjunta de ácido úrico y citicolina tiene un efecto sinérgico sobre la protección de la muerte celular relacionada con necrosis y apoptosis.

35 Descripción de la invención

40 Así pues, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus.

45 En la presente invención por "tratamiento neuroprotector" nos referimos al tratamiento que detiene o ralentiza la secuencia de eventos bioquímicos y moleculares que conducen a la muerte celular.

50 En la presente invención por "pacientes con ictus" nos referimos a pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular con brusca alteración del flujo sanguíneo al cerebro. En particular, nos referimos a pacientes que han sufrido ictus isquémico o infarto cerebral, trombosis, embolismo, ictus hemorrágico, aneurisma, o ataque isquémico transitorio.

En un aspecto más en particular, la cantidad terapéuticamente eficaz de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables de la composición farmacéutica de la presente invención se encuentra comprendida entre 1 - 4 mg/ml.

55 En un aspecto más en particular, la cantidad terapéuticamente eficaz de citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables de la composición farmacéutica de la presente invención se encuentra comprendida entre 2 - 4 mg/ml.

En un aspecto más en particular, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un vehículo acuoso. Más en particular, el vehículo acuoso es suero fisiológico. Más particularmente, el suero fisiológico comprende 0.1 % de carbonato de litio y 5 % de manitol.

En un aspecto más en particular, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral, más en particular, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intravenosa.

5

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a la combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en terapia combinada para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus.

10

En un aspecto más en particular, la terapia combinada se realiza mediante la administración de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables de forma simultánea, en un aspecto más en particular, la terapia combinada se realiza mediante la administración de ácido úrico y citicolina de forma secuencial.

15

En la presente invención por “administración de forma simultánea” nos referimos a que la administración de ácido úrico se realiza al mismo tiempo que la administración de citicolina.

20

En la presente invención por “administración de forma secuencial” nos referimos a que la administración de ácido úrico precede de forma inmediata a la administración de citicolina o que la administración de citicolina precede de forma inmediata a la administración de ácido úrico.

25

En un aspecto más en particular, la administración de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables se realiza en una cantidad comprendida entre 1-4 mg/ml disuelto en suero fisiológico que comprende 0.1 % de carbonato de litio y 5% de manitol. En un aspecto más en particular, el ácido úrico se administra por vía parenteral, más en particular, se administra vía intravenosa.

30

En un aspecto más en particular, la administración de citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables se realiza en una cantidad comprendida entre 500-2000 mg. En un aspecto más en particular, la citicolina se administra por vía parenteral, más en particular, se administra vía intravenosa.

35

En un aspecto más en particular, la terapia combinada se realiza mediante la administración de ácido úrico y citicolina de forma de forma conjunta.

En la presente invención por “administración conjunta” nos referimos a que el ácido úrico está mezclado con la citicolina.

40

En un aspecto más en particular, la administración de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables de forma conjunta se realiza en forma de la composición farmacéutica descrita en la presente invención.

45

Descripción de las figuras

La figura 1 describe el efecto del ácido úrico y de la citicolina sobre la muerte celular inducida por carencia de oxígeno y glucosa (OGD). Los valores son la media +/- SEM (n=4). Significancia: *vs control, \$ vs OGD. (C:Control; UA: Ácido Úrico; Cit: Citicolina; UA + Cit: Ácido Úrico + Citicolina; OGD: Carencia de oxígeno y de glucosa.

50

La figura 2 muestra el efecto del ácido úrico y de la citicolina sobre la condensación de la cromatina inducida por OGD, (coloración de Hoechst). Los valores son la media +/- SEM (n=6).

La figura 3 muestra la actividad de la caspasa-3, 24 horas después de la OGD. Los valores son la media +/- SD (n=2-3)

Descripción detallada de la invención

55

Se prepararon cultivos mezclados de neuronas/glia de embriones fetales de ratas Sprague-Dawley de 18 días como se describen Petegnief, V., Saura, J., De Gregorio-Rocasolano, N., y Paul, S. M. (2001) *Neuroscience* **104**, 223 - 234. Se resuspendieron las células en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% y 100 µg/ml de gentamicina y se sembró sobre placas de 24 pozos recubiertas previamente con poli-L-lisina (5 µg/ml)

(Nunc, Roskilde, Dinamarca) con una densidad de $0,6 \times 10^6$ células/pozo y se cultivó a 37°C en una incubadora con 95% de aire atmosférico / 5% de CO_2 . Se cambió parcialmente el medio in vitro los días 4, 7 y 10 (DIV) con MEM suplementado con B27. Se utilizaron los cultivos en 11 - 13 DIV. Se preparó ácido úrico 11,9 mM en carbonato de litio 1,35 mM y manitol al 5%. Se añadió ácido úrico en una concentración 100 μM al medio de cultivo 60 min antes del tratamiento con OGD (carencia de oxígeno y de glucosa) y estaba también presente durante y después de la OGD o de normoxia en los correspondientes amortiguadores HEPES y el medio de cultivo. Se añadió citicolina en una concentración de 100 μM 60 minutos antes, durante y después de OGD o de normoxia. Se trataron los cultivos con ácido úrico solo, con citicolina sola o con la combinación de ambos medicamentos. Cultivos hermanos fueron tratados con vehículo: carbonato de litio 1,35 mM y manitol al 5%.

Para el tratamiento con carencia de oxígeno y glucosa (OGD), se incubaron los cultivos celulares en amortiguador HEPES libre de glucosa (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgSO_4 0,62 mM) durante 90 minutos en una incubadora de hipoxia con 5% de CO_2 / 0,6% de O_2 . Se incubaron cultivos de control en normoxia en el mismo amortiguador que contenía D-glucosa 5,5 mM en una incubadora con 95% de aire atmosférico / 5% de CO_2 . Al final del episodio de hipoxia o de normoxia, se reemplazó el amortiguador con MEM + B27 sin antioxidante y se retornaron las células a una incubadora con 95% de aire atmosférico / 5% de CO_2 .

Para el ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa, se estimó la muerte celular 3 horas 30 minutos después de la OGD y a continuación se midió la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de acuerdo a una modificación del método de (Wroblewski y LaDue, 1955). La disminución de la absorbancia en NADH 0,75 mM a 340 nm fue seguida en un amortiguador de fosfato (50 mM, pH 7,4) en presencia de ácido pirúvico 4,2 mM como sustrato.

Para la coloración de Hoechst, se lavaron los cultivos con PBS, se los fijó durante 20 minutos con paraformaldehído al 4% a 4°C y se lavó con PBS. Se incubaron luego las células durante 30 minutos con el colorante nuclear de Hoechst 33258 con una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después del lavado, se examinaron las células en un microscopio de fluorescencia bajo luz UV. Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de los núcleos apoptóticos con el software analySIS. Se seleccionaron los umbrales para discriminar entre coloración brillante en los núcleos apoptóticos condensados y la coloración nuclear normal en células sanas. Se calculó el área correspondiente a la coloración de la cromatina condensada (coloración brillante) como el porcentaje del área total en cada campo. Los resultados se expresaron como porcentaje de control.

Para determinar la actividad de la caspasa-3, se llevó a cabo el ensayo de acuerdo con Valencia, A., y Moran J. (2001) *J. Neurosci. Res.* 64, 284 - 297 Wroblewski, F., y LaDue, J. S. (1955) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90, 210 - 213, utilizando 100 μg de proteínas y Ac-DEVD-AMC 25 μM como sustrato. Se monitoreó la fluorescencia de AMC, generada por la escisión de Ac-DEVD-AMC (excitación/emisión 380/460 nm), cada 2 minutos durante 30 minutos en un Espectrofluorómetro de Microplaca Gemini XS (Molecular Probes). Se calculó la actividad enzimática como un Δ de fluorescencia/mg de proteína/minuto.

Se llevó a cabo un análisis estadístico unidireccional de varianza (ANOVA) con el ensayo post hoc de Bonferroni para determinar si los grupos eran significativamente diferentes. Significancia: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs control. \$\$ $P < 0.01$ vs OGD.

Ejemplos

Ejemplo 1: *Efecto del ácido úrico y de la citicolina sobre la muerte inducida con OGD.*

El insulto isquémico indujo una muerte celular dramática. En realidad, se incrementó la actividad de la lactato deshidrogenasa en un 288% ($P < 0,001$) cuando se la comparó con condiciones normóxicas, a las 3 horas 30 minutos de la reoxigenación. Como se muestra en la **figura 1**, el tratamiento con ácido úrico solo o con citicolina sola no mejoró la viabilidad celular en condiciones isquémicas. Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos permitió una reducción significativa de la muerte celular (38%, $P < 0,01$ cuando se la comparó con OGD). Demostrando el efecto sinérgico del tratamiento con los dos compuestos conjuntamente.

Ejemplo 2: *Tratamiento conjunto con ácido úrico/citicolina redujo la condensación de la cromatina inducida por OGD*

Ya que la condensación de la cromatina es un indicativo de apoptosis, medimos este parámetro 48 horas después de la lesión isquémica. El tratamiento con OGD tendió a incrementar el número de núcleos apoptóticos cuando se lo comparó con la normoxia. Como se muestra en la **figura 2**, el número de núcleos apoptóticos se redujo significativamente en presencia del tratamiento conjunto de ácido úrico + citicolina ($P < 0,01$ vs OGD), mostrando el efecto sinérgico de ambos compuestos cuando se administran conjuntamente.

Ejemplo 3: *Tratamiento conjunto con ácido úrico/citicolina inhibió la actividad de la caspasa-3 inducida por OGD*

Ya que la activación de la caspasa-3 puede contribuir a la muerte apoptótica, medimos la actividad enzimática de esta proteasa 24 horas después de la OGD en nuestro modelo. Los datos preliminares muestran que el insulto isquémico incrementó en un 40% la actividad de la caspasa-3 y el tratamiento conjunto con ácido úrico/citicolina eliminó este efecto, la **figura 3** manifiesta el efecto sinérgico de ambos compuestos.

5

Ejemplo 4: Composición farmacéutica de ácido úrico y citicolina.

INGREDIENTES	CANTIDAD (mg)	CANTIDAD (mg/ml)	EJEMPLO
Ácido úrico	500-2000	1-4	1000 mg
Citicolina	1000-2000	2-4	1000 mg
Suero fisiológico con 0.1 % en volumen de litio y 5% de manitol	500 ml		500 mg

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que la cantidad terapéuticamente eficaz de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables se encuentra comprendida entre 1 - 4 mg/ml.
- 10 3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada por que la cantidad terapéuticamente aceptable de citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables se encuentra comprendida entre 2 – 4 mg/ml.
- 15 4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un vehículo acuoso.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, caracterizada por que el vehículo acuoso es suero fisiológico.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, caracterizada por que el suero fisiológico comprende carbonato de litio y manitol.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición farmacéutica se administra por vía parenteral.
- 25 8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.
- 30 9. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso en terapia combinada para el tratamiento neuroprotector en pacientes con ictus.
- 35 10. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la reivindicación 9, caracterizada por que la terapia combinada se realiza mediante la administración de ácido úrico y citicolina de forma simultánea o secuencial.
- 40 11. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la cualquiera de las reivindicaciones 9-10, caracterizada por que la administración de ácido úrico se realiza en una cantidad comprendida entre 1-4 mg/ml disuelto en suero fisiológico con carbonato de litio y manitol.
- 45 12. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, caracterizada por que la administración de citicolina se realiza en una cantidad comprendida entre 500-2000 mg.
- 50 13. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según la reivindicación 9, caracterizada por que la terapia combinada se realiza mediante la administración de ácido úrico y citicolina de forma conjunta.
- 55 14. Combinación sinérgica de ácido úrico y citicolina para uso según la reivindicación 13, caracterizada por que la administración de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables de forma conjunta se realiza en forma de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
15. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha combinación sinérgica se administra por vía parenteral.

16. Combinación sinérgica de ácido úrico o sus sales farmacéuticamente aceptables y citicolina o sus sales farmacéuticamente aceptables para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha combinación sinérgica se administra por vía intravenosa.

5

Actividad LDH (Abs 340)

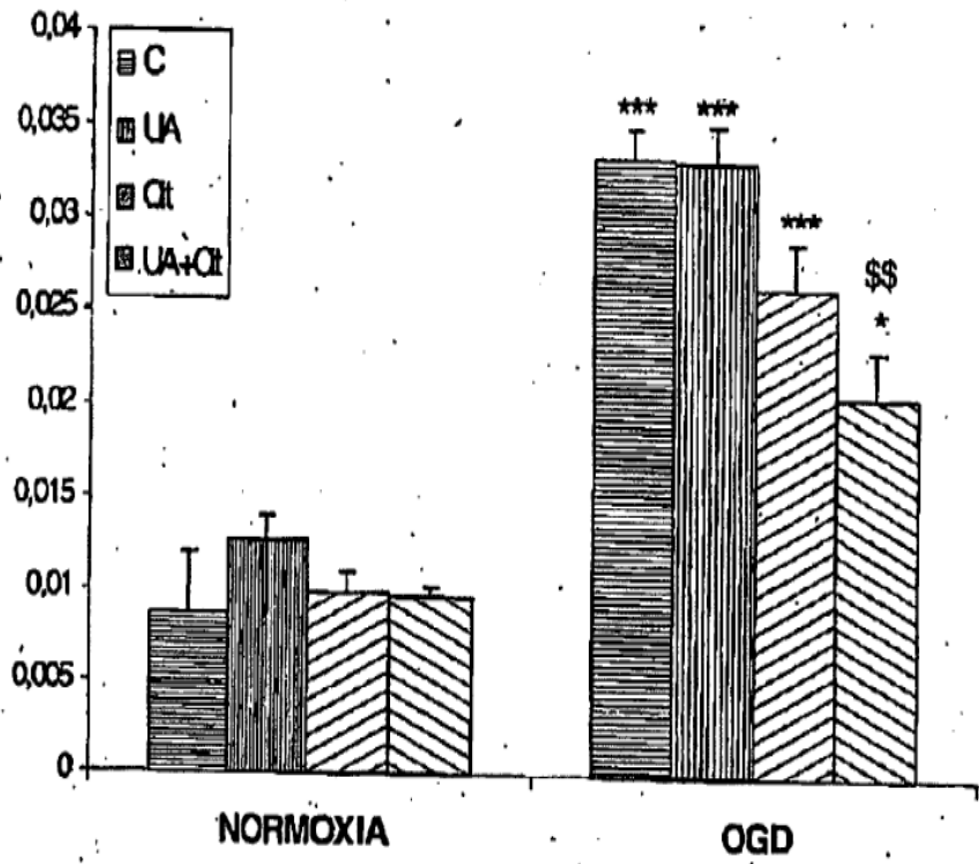


FIG. 1

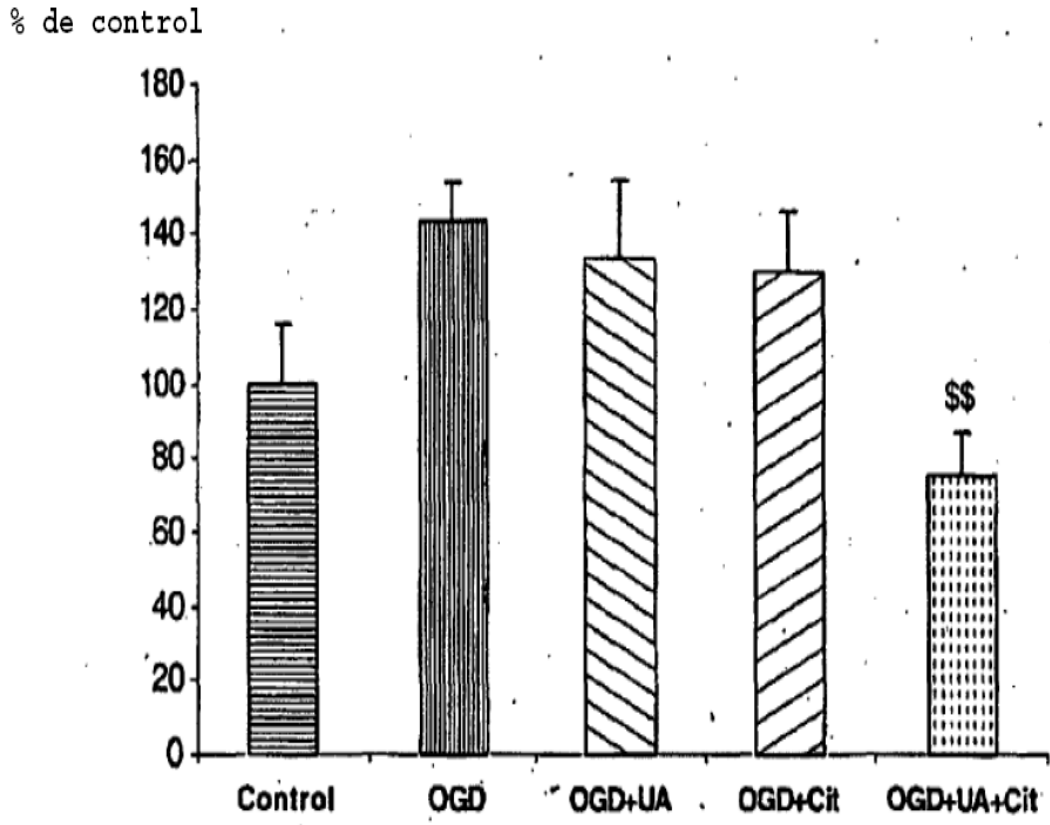


FIG. 2